

Tesis Doctoral

*Filogeografía de *Zaedyus pichiy* (Mammalia, Xenarthra) y su correlación con el paleoclima del sur de Sudamérica.*

Lic. Magali Gabrielli

Directora: Dra. Marta Susana Lizarralde, Director: Dr. Edgardo Ortíz Jaureguizar



Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata

2020

Dedicatoria y agradecimientos

Quisiera agradecer a la Dra. Marta Lizarralde por confiar en mí, por su dirección y por haberme enseñado, al Dr. Edgardo Ortíz Jaureguizar por haber aceptado la codirección de esta tesis, por estar siempre disponible para ayudarme y aconsejarme cuando lo necesitaba. De igual manera, agradezco a la Dra. Viviana Confalonieri por su codirección en las becas obtenidas que me permitieron realizar este trabajo de tesis doctoral.

Agradezco el haber podido realizar mi educación formal en todos sus grados en instituciones públicas y realizar esta tesis de doctorado gracias a la existencia del CONICET, organismo que me otorgó las becas tipo I y II.

A los fondos Ibol Argentina-CONICET, Idea Wild y CREOI por los subsidios recibidos.

Al Centro Regional de Estudios Genómicos, por darme el espacio físico para realizar mis tareas, y a su gente por la colaboración.

A mis compañeros de laboratorio: Sebastián Poljak, Mariana Fasanella, Yamila Cardoso, Cecilia Bruno, Luciana Sapia y Diego Barraso, quienes me enseñaron a nivel académico como personal.

A los encargados de la colección de Mastozoología del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia.

A quienes me acompañaron en los viajes de campaña: Diego Barraso, Mariano Merino, Belén Semeñiuk, Sebastián Poljak, Agustín Abba, Luis Pagano y Never Bonino.

A los colaboradores en la obtención de tejidos: Agustín Abba, Mariano Merino, Belén Semeñiuk, Marcos Sterkel, Ulyses Pardiña, Daniel Udrizar, María Encarnación Pérez, Laureano González, Gabriel Martín, Mariela Superina, Viviana Seitz, Fernando Mapelli, Luis Pagano y Never Bonino.

A Sofía Silva y Carolina Torres, Eduardo Sanabria, Alejandro Ferreiro, Sebastián Poljak, Belén Semeñiuk y Florencia Pisano por responder a mis consultas y despejar mis dudas sobre alguna metodología o resultado y por la ayuda en la edición de figuras y formato.

También quiero mencionar al fallecido Dr. Gustavo Juan Scillato-Yané, un reconocido especialista en xenartros, quien fue uno de los mejores profesores que tuve en la carrera. Me habría encantado que hubiese sido jurado de mi tesis.

Finalmente, quiero agradecer y dedicar esta tesis a mi familia y a mis amigos. Quienes me ayudaron y acompañaron en este largo proceso. ¡Gracias!

*“El gran libro que hay que tener siempre abierto y
esforzarse en leer es el de la naturaleza”*

Antonio Gaudí

[Resumen p 8](#)

[Abstract p 12](#)

[Capítulo 1. Introducción p 16](#)

[Historia evolutiva de los Euphractinae \(Chlamyphoridae, Xenarthra\): Estudios previos p 16](#)

[Historia biogeográfica de algunos géneros de Euphractinae p 21](#)

[La especie *Zaedyus pichiy* p 21](#)

[Teoría de la coalescencia p 23](#)

[Filogenética p 25](#)

[Biogeografía p 26](#)

[Marcadores moleculares p 29](#)

[Hipótesis y objetivos del estudio p 31](#)

[Hipótesis p 31](#)

[Objetivos p 31](#)

[Capítulo 2. Materiales y Métodos p 33](#)

[Muestreo p 33](#)

[Colección y preservación del material colectado p 35](#)

[Extracción del ADN p 36](#)

[Marcadores moleculares p 37](#)

[Amplificación y secuenciación del ADN p 37](#)

[Procesamiento de datos p 38](#)

[Análisis estructural de las secuencias de los marcadores moleculares D-loop y COI en el Magorden *Xenarthra* p 39](#)

[Análisis del marcador molecular gen Citocromo oxidasa c subunidad I \(COI\) p 39](#)

[Análisis del marcador molecular de la Región Control \(D-loop\) p 40](#)

[Preparación de matrices: Alineamiento, edición de secuencias y elección de modelos evolutivos p 41](#)

[Prueba de calidad de matrices p 44](#)

[Análisis interespecífico: Aportes moleculares a la filogenia de la subfamilia Euphractinae p 44](#)

[Análisis filogenético para el marcador molecular del gen de la COI p 45](#)

[Máxima parsimonia \(MP\) p 45](#)

[Máxima verosimilitud \(MV\) p 45](#)

[Inferencia Bayesiana \(IB\) p 46](#)

[Test de hipótesis filogenéticas por el método bayesiano basado en coalescencia p 46](#)

[Análisis biogeográficos p 47](#)

[Análisis de dispersión-vicarianza \(DIVA\) p 48](#)

[Dispersión-Extinción-cladogénesis \(DEC\) p 49](#)

[Análisis Bayesiano Binario MCMC \(BBM\) p 49](#)

[Análisis intraespecíficos: Diversidad genética, estructura poblacional e historia demográfica de *Zaedyus pichiy* en Argentina p 49](#)

[Diversidad genética p 50](#)

[Estructura poblacional p 50](#)

[Árbol de haplotipos p 50](#)

[Redes de haplotipos p 50](#)

[Análisis de la Varianza Molecular p 51](#)

[Diversidad genética en el espacio, autocorrelación espacial y Test de Mantel p 51](#)

[Historia demográfica p 52](#)

[Índices de diversidad y pruebas estadísticas p 52](#)

[Análisis bayesianos p 52](#)

[Reconstrucción demográfica p 52](#)

[Filogeografía bayesiana de *Zaedyus pichiy* en Argentina p 53](#)

[Capítulo3. Resultados p 54](#)

[Análisis estructural de las secuencias de los marcadores moleculares D-loop y COI en *Magorden Xenarthra* p 54](#)

[Análisis del marcador gen Citocromo oxidasa c subunidad I \(COI\) p 54](#)

[Análisis del marcador de la Región Control \(D-loop\) p 55](#)

[Prueba de calidad de matrices p 59](#)

[Análisis interespecífico: Aportes moleculares a la filogenia de la subfamilia Euphractinae p 61](#)

[Análisis filogenético para el marcador del gen de la COI p 61](#)

[Máxima parsimonia \(MP\) p 61](#)

[Máxima verosimilitud \(MV\) p 62](#)

[Inferencia Bayesiana \(IB\) p 63](#)

[Test de hipótesis filogenéticas por el método bayesiano basado en coalescencia p 64](#)

[Análisis de los datos genéticos p 64](#)

[La reconstrucción del árbol de genes p 65](#)

[Delimitación de las relaciones entre especies p 67](#)

[Análisis biogeográficos / Reconstrucción de áreas ancestrales p 69](#)

[Análisis intraespecíficos: Diversidad genética, estructura poblacional e historia demográfica de *Zaedyus pichiy* en Argentina p 74](#)

[Diversidad genética p 74](#)

[Estructura poblacional p 81](#)

[Árbol de haplotipos p 81](#)

[Redes de haplotipos p 85](#)

[Análisis de la Varianza Molecular p 87](#)

[Diversidad genética en el espacio y aislamiento por distancia p 91](#)

[Historia demográfica p101](#)

[Índices de diversidad y pruebas estadísticas p 101](#)

[Análisis bayesianos: Reconstrucción demográfica y filogeografía bayesiana de *Zaedyus pichiy* en Argentina p 104](#)

[Capítulo4. Discusión p 107](#)

[Aportes del análisis estructural del marcador molecular D-loop p 107](#)

[Aportes moleculares a la filogenia de la subfamilia Euphractinae p 113](#)

[Filogeografía de *Zaedyus pichiy* en Argentina p 117](#)

[Consideraciones finales p 124](#)

[Bibliografía p 131](#)

[Índice de tablas p 156](#)

[Índice de Figuras p 157](#)

[*Índice de programas utilizados p 160*](#)

[*Apéndice 1: Lista de muestras colectadas de *Z. pichiy* p 163*](#)

[*Apéndice 2: Marcadores nucleares p 168*](#)

[*Apéndice 3: Secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos p 169*](#)

[*Apéndice 4: Tabla codificación de áreas, mapas de distribuciones de especies y biomas de América Latina p 172*](#)

Zaedyus pichiy es un armadillo que pertenece a la Subfamilia Euphractinae junto con las especies de los géneros *Chaetophractus* y *Euphractus*. El origen y las relaciones entre las especies actuales de Euphractinae no están resueltos, sin embargo su radiación se relaciona a importantes cambios ambientales provocados por el levantamiento de la cordillera de los Andes. Los registros fósiles para los géneros actuales de la subfamilia se remontan al Mioceno tardío mientras que los registros de sus especies son del plioceno/Pleistoceno. Por otro lado, se cree que la distribución de todos los armadillos actuales ha sido afectada por fluctuaciones climáticas y del nivel del mar, características del Pleistoceno, debidas al avance y retirada de los glaciares que causaron la retracción y expansión de biomas. *Zaedyus pichiy* presenta la mayor parte de su amplia distribución en Argentina, habiéndose extendido a Chile en el reciente. Como indica el título, este estudio pretende aportar conocimiento sobre la historia filogeográfica de *Zaedyus pichiy* en Argentina, donde tuvo lugar la mayor parte de su historia evolutiva. Sin embargo la primera pregunta que surge es ¿Dónde y cuándo se originó *Zaedyus pichiy*?, lo que lleva a interrogantes sobre la historia evolutiva de la subfamilia Euphractinae a la que pertenece, como por ejemplo: ¿Cómo y cuándo fue el origen de las especies actuales de Euphractinae, fue una radiación temprana en el Mioceno tardío-Plioceno temprano en la Región Pampeana?, coincidiendo con los registros más tempranos de sus géneros en ese periodo y región; ¿cómo se relaciona *Zaedyus pichiy* con el resto de los géneros actuales de Euphractinae? en la actualidad hay dos hipótesis, una plantean que el género *Chaetophractus* es parafilético estando *C. villosus* emparentado con *Euphractus*, y *C. vellerosus* siendo especie hermana de *Zaedyus pichiy*; mientras que en la tradicional, el género *Chaetophractus* es monofilético, estando agrupado con *E. sexcinctus*, siendo *Z. pichiy* el primer linaje en emerger. Y finalmente profundizando sobre *Zaedyus pichiy* ¿cuál es la diversidad genética de sus poblaciones, como se distribuye en la actualidad y cuál fue la historia de sus poblaciones para llegar a ella, que factores la moldearon? ¿Fueron los cambios climáticos cíclicos ocurridos durante el Pleistoceno? de ser así, la diversidad de los haplotipos de sus poblaciones debería distribuirse en un gradiente latitudinal, los más ancestrales en latitudes más bajas, mientras que los derivados evolutivamente de aquellos en latitudes más altas, mostrando la expansión más reciente debido al aumento de temperatura. Para intentar responder estas preguntas se planteo como objetivos: (1) Esclarecer las relaciones filogenéticas entre las especies actuales de Euphractinae, determinar sus tiempos de divergencia y sus posibles áreas ancestrales. (2) Analizar el patrón filogeográfico de *Zaedyus pichiy* en todo su rango de distribución en Argentina y examinar la relación entre dicho patrón y la historia geomorfológica de la región.

Primero se realizó la caracterización y el análisis de las secuencias obtenidas de una porción de la Región Control (RC) del D-loop, y de una porción del gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial en representantes del Magorden *Xenarthra*, ahondando en la estructura de las secuencias de D-loop y sus posibles implicancias.

Las relaciones filogenéticas de las especies actuales de la subfamilia Euphractinae fueron inicialmente abordadas mediante los métodos tradicionales de inferencias filogenéticas (Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencias Bayesianas) analizando una porción del gen COI. Se utilizaron secuencias de este marcador para 16 especímenes pertenecientes a Euphractinae, con varias secuencias para cada unidad taxonómica, como así también 13 secuencias para representantes del resto de las subfamilias de Cingulata y 6 secuencias del clado Pilosa que se utilizaron como outgroup. Obteniendo una matriz de alineamiento final de 35 individuos totales y 658 pb. Además, se estimó el árbol de especies a través del método bayesiano basado en coalescencia que estima filogenia de múltiples marcadores y se realizó una prueba de hipótesis filogenéticas forzando la monofilia entre las diferentes especies, siendo cada hipótesis una combinación diferente entre dos especies actuales de la subfamilia. Para estos análisis se utilizaron 51 secuencias parciales del gen mitocondrial COI con una longitud de 658 pb, obtenidas en este estudio y otras disponibles en bases de datos públicas. También se utilizó 19 secuencias disponibles del gen factor von Willebrand (vwf) con una longitud de 1145 pb y 17 del gen cáncer de mama 1 (BRCA1) de 2851 pb de longitud. Finalmente, utilizando el árbol de especies se intentó aproximar el territorio donde ocurriera esta diversificación, haciendo un análisis de aéreas ancestrales por métodos basados en Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencias Bayesianas.

Para el estudio integral filogeográfico de *Zaedyus pichiy* en Argentina se utilizaron las porciones del gen COI y de la Región Control (D-loop). Ya sea analizando la matriz de ambos marcadores concatenados (COI + D-loop) o sus matrices por separado. La matriz obtenida de los marcadores concatenados resultó de 1115 pb de longitud, contando con 112 secuencias de las que 37 son de individuos en los que se logró secuenciar ambos marcadores, 26 cuentan con secuencias para el marcador COI y 49 individuos para D-loop, teniendo una cantidad considerable de datos faltantes. Debido a esto también se utilizó una matriz más chica de marcadores concatenados (COI+D-loop), sin datos faltantes de 28 secuencias y 967 pb. Como así también las matrices de los marcadores por separado reducidas a la mayor cantidad de secuencias y pares de bases con la menor cantidad de datos faltantes posible. Obteniendo para la matriz del marcador COI 59 secuencias de 492 pb de longitud, donde se identificaron 27 haplotipos y donde las diversidades haplotípica y nucleotídica fueron de 0,933 y 0,01420 respectivamente, mientras que para el fragmento D-loop se obtuvo una matriz de 75 secuencias con una longitud de 405 pb y 38 haplotipos con una diversidad haplotípica de 0,957 y nucleotídica de 0,01559. Se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional de la especie, como así también se estudió la historia demográfica y se analizó la congruencia entre las estimaciones de los procesos inferidos para la especie con los registros paleontológico y arqueológico y estudios del paleoclima, relacionándolo con sus características de historia de vida, a fin de lograr un mayor entendimiento.

En cuanto a la estructura de las secuencias de D-loop: Se encontró un fragmento de 80 pb que se repite en las secuencias de la primera porción de la RC del D-loop en las especies de armadillos estudiados. El motivo de repetición es adyacente a la secuencia del dominio TAS de dicha región y su origen sería causado por un

deslizamiento de replicación unidireccional en una dirección de 3' a 5'. La explicación más parsimoniosa para la evolución de las repeticiones en las especies actuales de Euphractinae con implicancias en la filogenia de la subfamilia es que existe una mayor cercanía entre *Zaedyus* y *Chaetophractus*, hipótesis que no concuerda con la filogenia clásica de los Euphractinae. La heterogeneidad encontrada en esta subfamilia hace que sea difícil proponer un patrón general de variación en las repeticiones de la RC del D-loop.

En cuanto a la filogenia de la subfamilia: Los análisis tradicionales del marcador COI no resolvieron las relaciones dentro de la subfamilia Euphractinae y al combinarlo con los marcadores nucleares en el análisis Bayesiano particionado se sostiene que *Zaedyus pichiy* es la especie basal de la subfamilia, coincidiendo con la hipótesis tradicional. Sin embargo, el clado *Euphractus* + *Chaetophractus* recibe un apoyo moderado. En el análisis de las diferentes hipótesis de delimitación, la hipótesis que agrupa a *E. sexcintus* con *C. villosus* es la que presentaría menos ambigüedad. Por lo tanto sigue habiendo discrepancias en los resultados de marcadores codificantes. En este estudio se descarta que las discrepancias se deban a la inclusión de una sola especie del género *Chaetophractus* o a la tasa evolutiva del marcador utilizado, afirmando como la mayor causa a la reciente y rápida diversificación de la subfamilia. El origen del clado que contiene a las especies actuales de Euphractinae es de 3,60 Ma (95% HPD: 1,75-7,53), siendo un poco más recientes que en estudios anteriores y coincidentes con las estimaciones de las últimas etapas del levantamiento andino y la consiguiente formación de biomas secos en el cono sur, que tuvieron lugar en el Plioceno. Estos acontecimientos también explican la separación entre *Zaedyus* con *Euphractus* + *Chaetophractus* que es de 2,92 Ma (95% HPD: 1,02-6,16). Por su parte, la diferenciación de *Chaetophractus* en sus especies tiene una edad estimada de 2,42 Ma, que es apoyada por el registro fósil y coincide con el comienzo del Pleistoceno, período que se caracterizó por fluctuaciones del clima hasta que se establecieron los ciclos glaciares. Según los análisis biogeográficos, el origen del clado Euphractinae es el área de los desiertos templados del centro de Argentina. La separación entre sus especies resultaron ser más reciente que la hipótesis propuesta sobre una radiación temprana en el Mioceno tardío-Plioceno temprano en la Región Pampeana, donde comienzan los registros de sus géneros. Los resultados en este trabajo rechazan esa hipótesis y acercan dichos orígenes al establecimiento de las especies actuales en el registro fósil, abarcando el intervalo que va desde Plioceno medio al Pleistoceno y proponiendo como el área de ocurrencia los desiertos templados del centro de Argentina.

En cuanto a la Filogeografía de *Zaedyus pichiy*: Esta especie presenta una cierta y particular estructuración geográfica, pudiéndose identificar dos unidades filogeográficas diferenciadas dentro de su amplio rango de distribución. El clado A reúne casi en su totalidad los haplotipos de las poblaciones del norte, entre los 29° y 39° latitud sur, y del sur de la distribución de la especie desde los 46° latitud sur. Mientras que el clado B reúne las poblaciones del centro de la distribución (de las provincias de Río Negro y Chubut) entre los 39° y 46° latitud sur. Estos dos clados responderían a dos expansiones relativamente recientes y muy cercanas desde un mismo centro de origen donde la primera (clado A) se expande en su inicio hacia el norte para volver y expandirse

hacia el noreste y el sur, luego de lo cual es desplazada por la segunda (clado B) en el centro de la distribución de la especie en su propia expansión desde la zona del noroeste de Patagonia (Río Negro) hacia el sur y este de Chubut y, quizás también, hacia el norte y sur de la distribución. Además, *Zaedyus pichiy* presenta una cierta correspondencia geográfica por regiones según el análisis de varianza, el árbol y redes de haplotipos. El clado A tiene más relaciones soportadas y muestra más estructura en las redes en la región norte, lo que podría deberse a que sería la primera rama de la expansión más antigua. Dentro del clado B, la población RNP es la que tiene la mayor variabilidad haplotípica y el haplotipo más abundante. También muestra cierta estructura y un subgrupo de haplotipos divergentes por lo que sería la más antigua de este clado y la más cercana al centro de origen, que estaría entre el río Neuquén y el río Limay, mostrando diferentes pulsos de expansión desde dicho centro. El resto de las poblaciones del clado muestra una estructura en estrella en las redes, lo que representaría la expansión reciente hacia el este y sur. La zona del centro de origen de las poblaciones actuales *Zaedyus pichiy* obtenido en este estudio concuerda con una zona de estabilidad en cuanto a los vientos y precipitaciones durante los ciclos glaciares del pleistoceno (refugios pleistosenicos) para vertebrados y plantas. Según la variación existente la presencia de los ríos está comenzando a actuar como quiebre y estructurando a las poblaciones por regiones, pudiéndose explicar por el aumento de caudal de los ríos pasada la última glaciación. A pesar que la variabilidad nucleotídica y haplotípica detectada fue alta en todas las poblaciones, parece ser posible detectar gradientes asociados a los principales macroambientes (diferenciados principalmente de oeste a este) en ambos clados (A y B) y también de norte a sur de la distribución sobre todo en el clado A, que es el que posee mayor distribución latitudinal. Se detectó señal de expansión poblacional en *Zaedyus pichiy*, aunque no tan pronunciada en el clado A por ser el primero en tener una gran expansión sobre todo hacia el norte, llegando a tener una distribución más amplia a la actual según el registro arqueológico. Actualmente se muestra señales de estructuración en esa región y de desplazamiento en el centro sur por el clado B, mostrando su expansión más actual al sur en Santa Cruz. Las mismas causas de aumento de temperatura y cambio en los biomas que habrían generado la retracción en el norte de la distribución serían las causantes de las expansiones en Patagonia que seguirían sucediendo en la actualidad la primera en la parte sur (clado A) y la segunda en la parte central de Patagonia (clado B). Los resultados de esta tesis solo muestran el último ciclo de retracción/expansión-recolonización de *Zaedyus pichiy* desde lo que sería aproximadamente el centro de su distribución actual en dos olas consecutivas, la primera más rápida, alcanzó una mayor distribución, en tanto que la segunda logró establecerse en la parte norte de la Patagonia reemplazando a la primera. Esto llevo a formar dos unidades filogeográficas diferenciadas (clados A y B), dando una distribución particular de la diversidad de sus haplotipos la cual no siguen un gradiente latitudinal de norte a sur de la distribución de la especie como se planteó al comenzar el estudio.

Zaedyus pichiy is an armadillo that belongs to the Euphractinae Subfamily along with species of the genera *Chaetophractus* and *Euphractus*. The origin and relationships between the current species of Euphractinae are not resolved, however its radiation is related to important environmental changes caused by the rise of the Andes mountain range. The fossil records for the subfamily's current genera date back to the late Miocene while the records for their species are from the Pliocene / Pleistocene. On the other hand, it is believed that the distribution of all current armadillos has been affected by climatic and sea level fluctuations, characteristics of the Pleistocene, due to the advance and retreat of glaciers that caused the retraction and expansion of biomes. *Zaedyus pichiy* has most of its wide distribution in Argentina, having spread to Chile recently. As the title indicates, this study aims to provide knowledge about the phylogeographic history of *Zaedyus pichiy* in Argentina, where most of its evolutionary history took place. However, the first question that arises is where and when did *Zaedyus pichiy* originate?, which leads to questions about the evolutionary history of the Euphractinae subfamily to which it belongs, such as: How and when was the origin of the current species of the Euphractinae, it was an early radiation in the late Miocene-early Pliocene in the Pampean Region?, coinciding with the earliest records of their genera in that period and region; How is *Zaedyus pichiy* related to the rest of the current genera of Euphractinae? Currently there are two hypotheses, one suggest that the genus *Chaetophractus* is paraphyletic with *C. villosus* being related to *Euphractus*, and *C. vellerosus* being a sister species to *Zaedyus pichiy*, while in the traditional one, the genus *Chaetophractus* is monophyletic, being grouped with *E. sexcinctus*, *Z. pichiy* being the first line to emerge. And finally, delving into *Zaedyus pichiy*, what is the genetic diversity of its populations, how is it currently distributed and what was the history of its populations to reach it, what factors shaped it? Were the cyclical climate changes that occurred during the Pleistocene? if so, the diversity of the haplotypes of their populations should be distributed in a latitudinal gradient, the most ancestral in lower latitudes, while evolutionarily derived in higher latitudes, showing the most recent expansion due to the increase in temperature. To try to answer these questions, i set the following objectives: (1) To clarify the phylogenetic relationships between the current species of Euphractinae, to determine their divergence times, and their possible ancestral areas. (2) Analyze the phylogeographic pattern of *Zaedyus pichiy* throughout its range in Argentina and examine the relationship between this pattern and the geomorphological history of the region.

First, the characterization and analysis of the sequences obtained from a portion of the Control Region (CR) of the D-loop, and from a portion of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene of mitochondrial DNA in representative species of the Magorden Xenarthra, delving into the structure of D-loop sequences and their possible implications.

The phylogenetic relationships of the current species of the Euphractinae subfamily were initially approached by means of the traditional methods of phylogenetic inferences (Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inferences) analyzing a portion of the COI gene. Sequences of this marker were used for 16 specimens belonging to Euphractinae, with several sequences for each taxonomic unit, as well as 13 sequences for representatives of the rest of the Cingulata subfamilies and 6 sequences from the Pilosa clade that were used as outgroup. Obtaining a final alignment matrix of 35 total individuals and 658 bp. In addition, the species tree was estimated through the Bayesian method based on coalescence that estimates the phylogeny of multiple markers and a test of phylogenetic hypotheses was carried out forcing monophyly between the different species, each hypothesis being a different combination between two current species of the subfamily. For these analyzes, 51 partial sequences of the COI mitochondrial gene with a length of 658 bp were used, obtained in this study and others available in public databases. Also, 19 sequences available from the von Willebrand factor (vwf) gene with a length of 1145 bp and 17 from the breast cancer 1 (BRCA1) gene of 2851 bp in length were used. Finally, using the species tree, an attempt was made to approximate the territory where this diversification occurred, making an analysis of ancestral areas by methods based on Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inferences.

For the comprehensive phylogeographic study of *Zaedyus pichiy* in Argentina, the portions of the COI gene and the Control Region (D-loop) were used. Either analyzing the matrix of both concatenated markers (COI + D-loop) or their matrices separately. The matrix obtained from the concatenated markers was 1115 bp in length, with 112 sequences of which 37 are from individuals in which both markers were sequenced, 26 have sequences for the COI marker and 49 individuals for D-loop, having a considerable amount of missing data. Due to this, a smaller matrix of concatenated markers (COI + D-loop) was also used, with no missing data of 28 sequences and 967 bp. As well as the separate marker arrays reduced to as many sequences and base pairs as possible with the least amount of missing data possible. Obtaining for the COI marker matrix 59 sequences of 492 bp in length, where 27 haplotypes were identified and where the haplotype and nucleotide diversities were 0.933 and 0.01420 respectively, while for the D-loop fragment a matrix of 75 sequences were obtained with a length of 405 bp and 38 haplotypes with a haplotype diversity of 0.957 and nucleotide diversity of 0.01559. The genetic diversity and population structure of the species were analyzed, as well as the demographic history and the congruence between the estimates of the inferred processes for the species with the paleontological and archaeological record and paleoclimate studies was analyzed, relating it to its life history characteristics, in order to gain a better understanding.

Regarding the structure of the D-loop sequences: An 80 bp fragment was found that is repeated in the sequences of the first portion of the D-loop CR in the armadillo species studied. The repeat motif is adjacent to the sequence of the TAS domain of said region and its origin would be caused by a unidirectional slippage of replication in a 3'-5' direction. The most parsimonious explanation for the evolution of repeats in current Euphractinae species with implications for the phylogeny of the subfamily is that there is a greater closeness

between *Zaedyus* and *Chaetophractus*, a hypothesis that does not agree with the classical phylogeny of Euphractinae. The heterogeneity found in this subfamily makes it difficult to propose a general pattern of variation in the repetitions of the CR of the D-loop.

Regarding the phylogeny of the subfamily: The traditional analyzes of the COI marker did not resolve the relationships within the Euphractinae subfamily and when combined with the nuclear markers in the partitioned Bayesian analysis, it is argued that *Zaedyus pichiy* is the basal species of the subfamily, coinciding with the traditional hypothesis. However, the clade *Euphractus* + *Chaetophractus* receives moderate support. In the analysis of the different delimitation hypotheses, the hypothesis that groups *E. sexcintus* with *C. villosus* is the one that would present the least ambiguity. Therefore discrepancies remain in the coding marker results. In this study, it is ruled out that the discrepancies are due to the inclusion of a single species of the genus *Chaetophractus* or to the evolutionary rate of the marker used, stating the recent and rapid diversification of the subfamily as the main cause. The origin of the clade that contains the current species of Euphractinae is 3.60 Ma (95% HPD: 1.75-7.53), being a little more recent than in previous studies and coinciding with the estimates of the last stages of the Andean uplift and the consequent formation of dry biomes in the southern cone, which took place in the Pliocene. These events also explain the separation between *Zaedyus* with *Euphractus* + *Chaetophractus* which is 2.92 Ma (95% HPD: 1.02-6.16). On the other hand, the differentiation of *Chaetophractus* in its species has an estimated age of 2.42 Ma, which is supported by the fossil record and coincides with the beginning of the Pleistocene, a period characterized by fluctuations in climate until the glaciers cycles were established. According to biogeographic analyzes, the origin of the clade Euphractinae is the area of the temperate deserts of central Argentina. The separation between their species turned out to be more recent than the hypothesis proposed about an early radiation in the late Miocene-early Pliocene in the Pampean Region, where the records of their genera begin. The results in this work reject this hypothesis and bring these origins closer to the establishment of current species in the fossil record, covering the interval from the Middle Pliocene to the Pleistocene and proposing the temperate deserts of central Argentina as the area of occurrence.

Regarding the *Zaedyus pichiy* Phylogeography: This species has a certain and particular geographical structure, two differentiated phylogeographic units within its wide range of distribution can be identified. Clade A combines almost entirely the haplotypes of the northern populations, between 29° and 39° south latitude, and the south of the distribution of the species from 46° south latitude. While clade B gathers the populations of the center of the distribution (of the provinces of Río Negro and Chubut) between 39° and 46° south latitude. These two clades would respond to two relatively recent and very close expansions from the same center of origin where the first (clade A) expands at the beginning towards the north to return and expand towards the northeast and south, after which it is displaced by the second (clade B) in the center of the distribution of the species in its own expansion from the northwestern part of Patagonia (Río Negro) towards the south and east of Chubut and, perhaps also, towards the north and south of the distribution. In addition, according to the analysis of variance, the tree and

haplotype networks, *Zaedyus pichiy* presents a certain geographical correspondence by regions. Clade A has more supported relationships and shows more structure in the networks in the northern region, which could be because it would be the first branch of the oldest expansion. Within clade B, the RNP population is the one with the highest haplotid variability and the most abundant haplotype. It also shows a certain structure and a subgroup of divergent haplotypes so it would be the oldest of this clade and the closest to the center of origin, which would be between the Neuquén River and the Limay River, showing different expansion pulses from origin's center. The rest of the populations of the clade show a star structure in the networks, which would represent the recent expansion towards the east and south. The zone of the center of origin of the current *Zaedyus pichiy* populations obtained in this study matches with a zone of stability in terms of winds and rainfall during the Pleistocene glacial cycles (Pleistocene refuges) for vertebrates and plants. According to the existing variation, the presence of the rivers is beginning to act as a break and structuring the populations by regions, which can be explained by the increase in the flow of the rivers after the last ice age. Although the nucleotide and haplotid variability detected was high in all populations, it seems to be possible to detect gradients associated with the main macroenvironments (differentiated mainly from west to east) in both clades (A and B) and also from north to south of the distribution especially in clade A, which is the one with the greatest latitudinal distribution. A sign of population expansion was detected in *Zaedyus pichiy*, although not so pronounced in clade A because it was the first to have a great expansion, especially towards the north, reaching a wider distribution than the current one according to the archaeological record. Currently, there are signs of structuring in that region, also displacement in the south-central region by clade B, showing its most current expansion to the south in Santa Cruz. The same causes of temperature increase and change in the biomes that would have generated the retraction in the north of the distribution would be the cause of the expansions in Patagonia that would continue to occur today, the first in the southern part (clade A) and the second in the central part of Patagonia (clade B). The results of this thesis only show the last retraction / expansion-recolonization cycle of *Zaedyus pichiy* from what would be approximately the center of its current distribution in two consecutive waves, the first faster, reaching a greater distribution, while the second managed to establish itself in the northern part of Patagonia, replacing the former. This led to the formation of two differentiated phylogeographic units (clades A and B), giving a particular distribution of the diversity of their haplotypes which does not follow a latitudinal gradient from north to south of the distribution of the species as was proposed at the beginning of the study.

Historia evolutiva de los Euphractinae (Chlamyphoridae, Xenarthra): Estudios previos

Los *Xenarthra* son uno de los grupos de mamíferos más peculiares y característicos de la Región Neotropical, conformando uno de los cuatro grandes clados de placentarios (Delsuc *et al.* 2002). Estudios tanto morfológicos como moleculares apoyan sin ambigüedades la división de este grupo en dos Órdenes: Cingulata, representado en la actualidad por los armadillos (*Dasypodidae* y *Chlamyphoridae*), y Pilosa, representado actualmente por los osos hormigueros y afines (*Vermilingua*: *Myrmecophagidae*) y los perezosos (*Folivora*: *Megalonychidae* y *Bradypodidae*) (Engelmann 1985; Patterson *et al.* 1992; Delsuc *et al.* 2001; Madsen *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2001).

La filogenia de los representantes actuales de Pilosa ha sido bien resuelta dentro de este suborden (Gaudin y Branham 1998; Delsuc *et al.* 2001; Greenwood *et al.* 2001; Barros *et al.* 2003). En el caso de los armadillos se han realizado varios estudios filogenéticos, pero las relaciones entre algunas de sus familias, géneros y especies aun no están claramente resueltas (Guth 1961; Engelmann 1985; Patterson *et al.* 1989; Delsuc *et al.* 2001, 2002, 2003, 2012; Gibb *et al.* 2016; Mitchell *et al.* 2016).

Con nueve géneros que agrupan 21 especies de las 30 vivientes de *Xenarthra* (Wetzel 1985a; Vizcaino 1995; Wetzel *et al.* 1982), los armadillos (*Cingulata*: *Dasypodidae* y *Chlamyphoridae*) son actualmente el linaje más diverso. Las especies vivientes de *Xenarthra* son un relictos de una espectacular radiación que ocurrió durante el aislamiento de América del Sur en el Terciario, gran parte de la cual desapareció con el evento masivo de extinción global que tuvo lugar al final del Pleistoceno (Carlini *et al.* 2010; Cione *et al.* 2015). Curiosamente, resta conocer el origen de *Xenarthra*, ya que el registro fósil comienza en el Eoceno Inferior y se desconoce su historia mesozoica (véase Pascual y Ortiz-Jaureguizar 2007 y la bibliografía allí citada; Woodburne *et al.* 2014). La división de los armadillos en dos familias distintas, *Dasypodidae* y *Chlamyphoridae*, propuesta en el estudio filogenético molecular de todo el ADN mitocondrial de Gibb *et al.* (2016) es la adoptada en la actualidad (Figura 1).

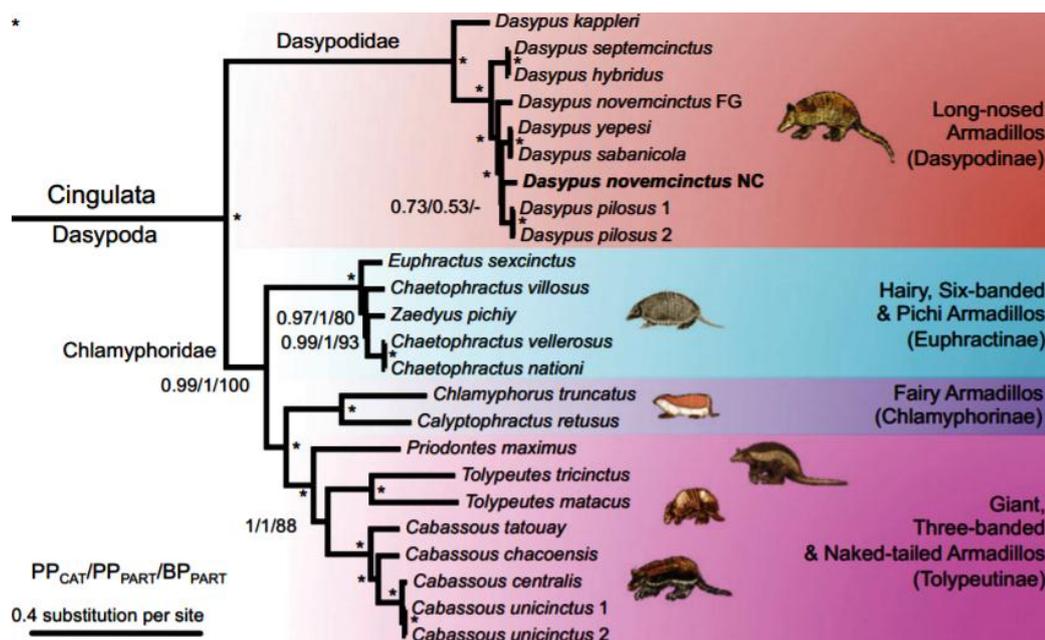


Figura 1: Relaciones filogenéticas del clado Cingulata según Gibb et al. 2016.

Estudios moleculares sucesivos han señalado, con fuerte apoyo, a la subfamilia Dasydinae como la que derivó más tempranamente (Delsuc et al. 2002, 2003, 2012; Abba et al. 2015), coincidiendo con el registro más antiguo de un Dasydidae, *Riostegotherium yanezi*, en sedimentos originalmente asignados al Paleoceno Superior de Brasil (Oliveira y Bergqvist 1998) pero que en la actualidad son considerados del Eoceno Inferior (Ciancio 2016; Gaudin y Croft 2015; Woodburne et al. 2014). Los estudios moleculares también han recuperado las monofilias de las subfamilias Tolypeutinae (*Priodontes*, *Cabassous* y *Tolypeutes*) y Euphractinae (*Euphractus*, *Zaedyus* y *Chaetophractus*) (Delsuc et al. 2002, 2003, 2012; Abba et al. 2015; Mitchell et al. 2016). Delsuc et al. (2012) recategorizaron la tribu Chlamyphorini Wetzel (1985b), cuyos miembros se conocen vulgarmente con el nombre de pichiciegos, al nivel de subfamilia Chlamyphorinae. Sin embargo, la relación entre esta nueva subfamilia y las antes mencionadas Tolypeutinae y Euphractinae no fue clarificada, como tampoco la relación entre los géneros dentro de estas dos últimas subfamilias (Möller-Krull et al. 2007; Delsuc et al. 2012; Abba et al. 2015).

Por lo antes mencionado, la subfamilia Euphractinae (anteriormente tribu Euphractini, McKenna y Bell 1997; Gardner 2005), vuelve a contener las cinco especies actuales originalmente incluidas en ella por Frechkop y Yepes (1949), es decir: *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus 1758), *Zaedyus pichiy* (Desmarest 1804), *Chaetophractus villosus* (Desmarest 1804), *Chaetophractus vellerosus* (Gray 1865) y *Chaetophractus nationi* (Thomas 1894). Análisis morfológicos y moleculares recientes proponen la sinonimia de *C. nationi* (Peludo andino) y *C. vellerosus* (Piche llorón), considerando a *C. nationi* como la variante de altura de la especie *C. vellerosus* (Abba et al. 2015).

En particular, los tres géneros vivientes de Euphractinae (*Chaetophractus*, *Euphractus* y *Zaedyus*) son muy similares morfológica y ecológicamente, y sus interrelaciones han sido difíciles de descifrar exclusivamente en el

terreno morfológico (Engelmann 1985; Gaudin y Wible 2006). La morfología de sus placas aporta diferencias sustanciales para clasificar las especies, siendo especialmente útil en zooarqueología y paleontología, esto se ve reflejado en numerosos trabajos, como por ej., Krmpotic *et al.* 2009; Loponte y Acosta 2012; Soibelzon 2017; Soibelzon *et al.* 2013. Todos presentan profundas variaciones en el set diploide (58-62 cromosomas) (Jorge *et al.* 1977; Jorge y Pereira 2008), proponiéndose varios mecanismos participantes en la evolución cariotípica de este grupo (Lizarralde *et al.* 2005).

Sin embargo, hasta el momento los estudios moleculares no pudieron resolver las relaciones dentro de esta subfamilia (Delsuc *et al.* 2002, 2003; Abba *et al.* 2015). Delsuc *et al.* (2003), analizando tres exones y dos genes mitocondriales concatenados, recuperó (con apoyo estadístico bajo) el clado *Chaetophractus* + *Euphractus* excluyendo el género *Zaedyus*, lo que resulta congruente con el estudio cladístico basado en caracteres cráneo-dentales realizado por Gaudin y Wible (2006). Por el contrario, en un estudio de retroposones y sus regiones flanqueantes, se han encontrado múltiples evidencias de la agrupación entre *Chaetophractus* y *Zaedyus*, con la exclusión de *Euphractus* (Möller-Krull *et al.* 2007), hipótesis compatibles con las relaciones obtenidas de estudios morfológicos de caracteres postcraneales (Abrantes y Bergqvist 2006). En este sentido, Abba *et al.* (2015) dan una posible explicación de la discrepancia observada entre los estudios moleculares, indicando que podría deberse a la especie utilizada para representar el género *Chaetophractus* en cada estudio, dado que Delsuc *et al.* (2003) se basaron en *C. villosus*, mientras Möller-Krull *et al.* (2007) lo hicieron en *C. vellerosus*.

Es de destacar que las dos especies del género nunca habían sido incluidas en un mismo estudio molecular o morfológico, por lo que un análisis filogenético de todas las especies de Euphractinae basado en marcadores nucleares codificantes y no codificantes, sugiere la parafilia del género *Chaetophractus*, con *C. vellerosus* más estrechamente relacionada con *Zaedyus pichiy* que con *C. villosus*, siendo este último más cercano a *E. sexcinctus* (Abba *et al.* 2015). Tal relación sería compatible con la similitud encontrada en estudios cromosómicos entre *C. vellerosus* y *Z. pichiy* (Jorge *et al.* 1977; Lizarralde *et al.* 2005; Jorge y Pereira 2008). Sin embargo, las reconstrucciones filogenéticas condujeron a conflictos topológicos entre marcadores nucleares codificantes y no codificantes. El análisis de datos de marcadores no codificantes sugiere, con un fuerte apoyo estadístico, la parafilia del género *Chaetophractus*, mientras que la partición de marcadores codificantes produjo una topología alternativa menos robusta, recuperando al género *Chaetophractus* como monofilético y agrupándolo con *E. sexcinctus*, resultando *Z. pichiy* el primer linaje de Euphractinae a emerger. Los autores sostienen que estos resultados, en principio contradictorios, podrían explicarse por el escaso número de sitios informativos disponibles en las dos matrices de secuencias utilizadas, especialmente en aquella de los marcadores codificantes (Abba *et al.* 2015).

De acuerdo con el registro fósil y la distribución actual, los *Xenarthra* se habrían originado en América del Sur, abarcando la historia evolutiva conocida de este clado prácticamente la totalidad del Cenozoico, por lo cual han sido utilizados como modelo en paleobiogeografía (Patterson y Pascual 1972; Carlini y Vizcaíno 1987;

Vizcaíno 1995; Gaudin y Croft 2015; Ciancio 2016; Soibelzon *et al.* 2019). Delsuc *et al.* (2004) utiliza la filogenia molecular establecida para las especies actuales de *Xenarthra*, robusta en la mayoría de sus relaciones filogenéticas (Delsuc *et al.* 2002; Delsuc *et al.* 2003) y también la estimación de sus tiempos de divergencia, para interpretar estos resultados en el contexto de los bien documentados cambios ambientales de la era Cenozoica. Esta era se caracterizó por las variaciones climáticas drásticas asociadas con los cambios en los niveles del mar, las principales modificaciones bióticas, fases tectónicas de levantamiento andino y las variaciones de temperatura (véase Haq *et al.* 1987; Pascual y Ortiz-Jaureguizar 1990, 2007; Marshall y Sempere 1993; Zachos *et al.* 2001; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006; Ciancio 2016, Soibelzon *et al.* 2019). Sus resultados encuentran una correlación entre los principales períodos de cambios ambientales y la diversificación de los linajes de *Xenarthra*.

A pesar de que la relación filogenética entre *Chlamyphorinae*, *Euphractinae* y *Tolypeutinae* no es clara (Möller-Krull *et al.* 2007; Delsuc *et al.* 2012; Abba *et al.* 2015) la separación entre estas subfamilias se estima que ocurrió poco después de la transición Eoceno-Oligoceno (Delsuc *et al.* 2012; Mitchell *et al.* 2016). Este período se caracterizó por un óptimo en la glaciación de la Antártida, con la formación y expansión de la capa de hielo en el continente, y el establecimiento de la actual corriente circumpolar antártica, lo que indujo un drástico enfriamiento global (Zachos *et al.* 2001).

La evolución de la subfamilia *Euphractinae* está asociada geográficamente al sur de Sudamérica, los armadillos (*Mammalia*, *Xenarthra*, *Dasyopodidae*, *Euphractinae*) del Tinguirirican (Oligoceno temprano) de los Andes chilenos documentan un morfología evolutivamente transicional del exoesqueleto entre dos subclados principales (*Dasyopodinae* y *Euphractinae*) en un momento cercano a su divergencia filogenética, arrojando considerable luz sobre la historia evolutiva del grupo. (Carlini *et al.* 2009).

Hallazgos de registros fósiles de *Zaedyus* en las provincias de La Pampa y Entre Ríos (Cione *et al.* 2000; Esteban *et al.* 2001) acercan su origen al Mioceno tardío. Lo mismo ocurre con el género *Chaetophractus*, ya que su registro más antiguo proviene de la Formación Sálidas del Mioceno tardío de La Rioja (Tauber 2005; Brandoni *et al.* 2012). Sin embargo, *Zaedyus pichiy* se conoce desde el Pleistoceno al Reciente de América del Sur (Cione y Tonni 1999; Cione *et al.* 2015) y el registro más antiguo de *Chaetophractus villosus* corresponde a la Edad Chapadmalense (Plioceno tardío) según Scillato–Yané 1982 y Carlini y Scillato–Yané 1999, mientras que Cione *et al.* (2015) y Soibelzon *et al.* (2019) lo remiten como máximo a la Edad Marplatense de Buenos Aires (finales Plioceno-Pleistoceno temprano). Para el caso de *Chaetophractus vellerosus*, si bien se encontró una sobreestimación en la zona pampeana del registro de *Xenarthra*, se asignó al Pleistoceno inferior-medio su registro más antiguo (Soibelzon *et al.* 2006). Finalmente, el fósil más antiguo de *Euphractus sexcinctus* data del Pleistoceno temprano de Bolivia (Marshall y Sempere 1991).

Delsuc *et al.* (2004) propone que la radiación de las especies actuales de *Euphractinae* se produjo en el Mioceno superior debido a importantes cambios ambientales ocurridos en ese período. Estos fueron el desarrollo

de aridez y mayor estacionalidad en la Patagonia oriental, que resultaron en una profunda diferenciación de las Regiones andinas y extraandinas. Con retracción de los bosques y aumento de la diversidad y la abundancia de formas xéricas en la región extraandina, que definió la provincia paleofitogeográfica de Proto-Espinal / Estepa (Barreda *et al.*, 2007) en el mioceno tardío y que luego durante el Plioceno y el Pleistoceno debido a los Periodos glaciales con vientos fuertes, descenso de la temperatura global, y el nuevo gradiente de precipitación debido a la Cordillera de los Andes, empujó el bosque andino templado fresco al dominio antártico actual y condujo a la aridización de la región extraandina formando la Estepa (bioma estepa = provincias fitogeográficas Patagonia, Monte, Espinal y Pampa, según Cabrera, 1976) (Pascual y Ortiz-Jaureguizar 1990; Pascual *et al.* 1996; Latorre *et al.* 1997; Ortiz-Jaureguizar 1998; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006; Tonni y Carlini 2008; Iglesias *et al.* 2011; Goin *et al.* 2015).

Varios otros estudios de paleobotánica y palinología en la Patagonia apoyan que el marcado desarrollo de aridez y extrema estacionalidad con expansión de hábitats de ecosistemas abiertos (pastizales o sabanas) se dio en el Mioceno medio-tardío (Palazzesi y Barreda 2007; Barreda y Palazzesi 2007; Iglesias *et al.* 2011; Le Roux 2012; Strömberg *et al.* 2013; Goin *Et al.* 2015). Este cambio habría sido desencadenado por la última fase del levantamiento de la cordillera de los Andes (últimas fases de la segunda crisis tectónica boliviana) que, eficazmente, bloqueó el desborde de humedad desde el Océano Atlántico y la cuenca del Amazonas hacia la parte central y centro-norte de Chile (Marshall y Sempere 1993; Le Roux 2012). En ese momento, la corriente fría de Humboldt se estableció en el Pacífico Sur y, junto con los Andes, ayudó a crear la "diagonal árida" de América del Sur, que se extiende desde el sur del desierto de Atacama hasta las estepas secas de Patagonia (Bruniard 1982). El efecto del monzón sudamericano interceptó más lluvia desde el noreste, las que se intensificaron en el noroeste de Argentina y el sur de Bolivia, donde se registran actualmente las comunidades forestales (Le Roux 2012). Todo esto ocurría al mismo tiempo que las grandes intrusiones marinas que formaron el mar Paranaense y el mar Amazónico durante el Mioceno (Pascual *et al.* 1996; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006) se retiraron, dando lugar a extensas praderas que se extendieron desde el norte de la Patagonia a lo largo del resto de América del Sur.

Aunque otros estudios sugieran que la relación de causalidad entre el cambio climático y el levantamiento de los Andes puede ser más complicado de lo calculado previamente (Lamb y Davis 2003; Palazzesi *et al.* 2014), la sincronización en algunos eventos de diversificación entre linajes independientes de *Xenarthra* (por ejemplo, la reciente diversificación de Euphractinae coincidiendo con la separación entre *Dasyopus novemcintus* y *Dasyopus kappleri* aproximadamente 6-7 Ma en el Mioceno tardío, Delsuc *et al.* 2004) sumado al hecho que los Euphractinae actualmente son representantes característicos de las zonas zoogeográficas que comenzaron a formarse en ese periodo (Pascual *et al.* 1996), sugiere que los cambios ambientales muy probablemente generaron oportunidades ecológicas importantes en la conformación de la historia evolutiva de las especies actuales de *Xenarthra* (Delsuc *et al.* 2004).

Historia biogeográfica de algunos géneros de Euphractinae

Carlini y Scillato-Yané (1996) proponen que los Euphractinae del Mioceno-Plioceno sufrieron una radiación desde los ambientes templados hacia los cálidos del centro y norte de Argentina, independiente a la de los géneros vivientes. Por su parte, la distribución de los Euphractinae y de todos los armadillos actuales ha sido afectada por fluctuaciones climáticas y del nivel del mar características del Pleistoceno debidas al avance y retirada de los glaciares, que causaron la retracción y expansión en alternancia de sabanas y estepas áridas y bosques tropicales y subtropicales más húmedos (Ortiz-Jaureguizar 1986; Pascual y Ortiz-Jaureguizar 1990; Vizcaíno *et al.* 1995; Pascual *et al.* 1996; Soibelzon *et al.* 2010). Por ejemplo durante los períodos fríos y áridos del Cuaternario, Euphractinae y Tolypeutinae se trasladaron más de una vez a la Región Pampeana Oriental, y durante los períodos interglaciares, algunos armadillos se extinguieron localmente y / o se trasladaron a la Patagonia (siendo el caso de *Zaedyus*). Así se documenta la presencia en la Región Pampeana Oriental de diferentes asociaciones de armadillos según el periodo. La asociación característica en el Pleistoceno fue *Z. pichiy* - *T. matacus*. Mientras que *Z. pichiy* - *C. villosus* caracterizó el Holoceno medio temprano, en el presente esta asociación se registra aproximadamente 1000 km al noroeste de dicha región (norte de provincia de San Luis) y la presencia de la pareja *C. villosus* - *D. hybridus* (probablemente establecida desde finales del Holoceno) es la que caracteriza hoy la Región Pampeana Oriental (Soibelzon *et al.* 2019).

Chaetophractus villosus expandió su rango de distribución en la Región Pampeana hacia el este y el noroeste debido a los mencionados cambios pleistocenos, y tuvo una expansión reciente hacia el sur de la Argentina ocupando toda la Patagonia (Poljak 2009; Poljak *et al.* 2010), colonizando la porción norte en los últimos 10 Ka. y alcanzando el estrecho de Magallanes en el último siglo, siendo introducido años atrás en la Isla Grande de Tierra del Fuego (Poljak *et al.* 2007, 2010, 2020; Abba *et al.* 2014; Gallo *et al.* 2019).

Chaetophractus vellerosus, por su parte, retrajo su distribución al interior del actual territorio argentino, área centro-norte del país (siendo esta su área de distribución ancestral) debido a los cambios climáticos del Pleistoceno tardío-Holoceno temprano, para luego expandirse, al menos dos veces, desde el Noroeste argentino hasta Buenos Aires (Poljak 2009; Poljak *et al.* 2018). La primera de estas expansiones habría llegado al este de la provincia de Buenos Aires hace 0,8 Ma y la segunda, más reciente, dando lugar a la población disyunta de la zona costera de la Bahía Samborombón en la provincia de Buenos Aires (Poljak 2009). Para explicar la distribución disyunta, más recientemente, el mismo autor (Poljak *et al.* 2018) propone una colonización a larga distancia, basada en una variabilidad genética nula, registros paleontológicos y evidencia de alternancia de períodos climáticos frío/árido y templado/húmedo durante el último millón de años en el sur de Sudamérica.

La especie *Zaedyus pichiy*

Los registros más antiguos del género corresponden al Piso/Edad Huayqueriense (Mioceno tardío) de la provincia de La Pampa (Esteban *et al.* 2001) y Entre Ríos (Cione *et al.* 2000) aunque en este último el registro de

Zaedyus es dudoso debido al pobre material y a que su aparición no está de acuerdo con los taxones restantes, por ser típico de regiones relativamente frías y xéricas. Prosiguen registros en los Pisos/Edades Chapadmalalense a Lujanense de la Región Pampeana (Plioceno medio y tardío/ Pleistoceno tardío–Holoceno temprano) (Scillato-Yané 1982; Tonni y Fidalgo 1982; Deschamps y Borromei 1992; Scillato-Yané *et al.* 1995; Mazzanti y Quintana 1997; Deschamps 2005; Luna y Cruz 2014; Soibelzon *et al.* 2019).

El fósil más antiguo de *Zaedyus pichiy* es del Pleistoceno de la provincia de Buenos Aires (Soibelzon *et al.* 2010; Cione *et al.* 2015), y cuenta también con registros en el Holoceno de Bolivia (Marshall y Sempere 1991). Asimismo numerosos registros arqueológicos del Holoceno medio temprano ubican a *Zaedyus pichiy* en la Región Pampeana (Salemme y Berón 2004; Abba y Vizcaino 2011; Soibelzon y León 2017) y también hay registros del Holoceno tardío que muestran la Asociación de *Zaedyus pichiy* y *C. villosus* en la Pampa Ondulada junto con *D. hybridus* (Loponte y Acosta 2012). Lo que constituye un ejemplo de una significativa serie de asociaciones de mamíferos de aboengo subtropical con otros de clima árido registrados en la Región Pampeana y relativizan el empleo de *Z. pichiy* como un indicador de paleoambientes áridos en dicha región ya que curre en momentos donde las condiciones ambientales permitieron, según estudios de paleosuelos, el desarrollo de los pastizales centrales de Argentina (Loponte y Acosta 2012). Además estos últimos registros contrastan con la idea tradicional que propone a la asociación de *C. villosus* y *D. hybridus* como la característica en la Región Pampeana en ese periodo, estando la asociación *Zaedyus pichiy* y *C. villosus* replegada al noreste y dando como la causa de ello a que durante los periodos interglaciares, *zaedyus* se extinguió localmente de la Región Pampeana y / o se trasladó a la Patagonia (Loponte y Acosta 2012; Soibelzon *et al.* 2019). Ya que en los ciclos más húmedos y cálidos *Z. pichiy* se contrae, restringiéndose al Espinal y Monte y durante periodos de menor precipitación y temperatura expande su distribución, caracterizándola como indicador ambiental de condiciones áridas, como ya se menciona (Abba y Vizcaino 2011; Soibelzon y León 2017).

Por otra parte Abba y colaboradores (2014) basados en una minuciosa revisión de registros de la especie propone que durante los últimos 10 ka, *Z. pichiy* invadió progresivamente el sur de la Patagonia habitando casi todo el territorio patagónico (Patagonia norte y central) durante el Holoceno. Y travesando el río Santa Cruz, invadiendo la Patagonia austral, en los últimos 100 años, probablemente debido a causas antrópicas (Abba *et al.* 2014).

Esta especie, inicialmente endémica de Argentina, se extendió a Chile en el siglo XIX (Superina y Abba 2014). En Argentina está presente en las ecoregiones del Espinal, Pampa, Monte de Sierras y Bolsones, Monte de Llanuras y Mesetas y Estepa Patagónica en altitudes no mayores a 2.500 msnm ocurriendo desde las provincias de San Juan y La Rioja hasta el Estrecho de Magallanes de forma continua, abarcando las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Mendoza, San Luis, Chubut, Córdoba, La Rioja, Neuquén, Río Negro, San Juan y Santa Cruz (Superina *et al.* 2019). En Chile, se registra en las regiones de Valparaíso, Maule, Biobío, Aysén del General Carlos del Ibáñez de Campo, y Magallanes y Antártica Chilena (Superina y Abba 2014).

Zaedyus pichiy presenta osteodermos marginales bruscamente puntiagudos, pabellones auriculares cortos, y una línea dorsal longitudinal clara que se extiende a partir de la primera banda móvil al final posterior del escudo pélvico, Figura 2 (Superina 2008; Superina y Abba 2014). Características particulares en su dentición y el hecho de carecer de glándulas pélvicas la separan del resto de los Euphractinae (Wetzel 1985b). Es una especie diurna y de hábitos solitarios, que habita zonas áridas con suelos arenosos y firmes y que excava cuevas (Superina 2008). Clasificada como una especie omnívoro-oportunista con preferencia por los insectos, se alimenta de varias especies de escarabajos y sus larvas, hormigas, escorpiones, arañas, fósidos, larvas de dípteros, vertebrados como lagartos y pequeños mamíferos, material vegetal y hongos (Superina et al. 2009; Superina et al. 2019). Son los únicos *Xenarthra* que entran en “torpor” o “sopor”. Su temperatura corporal es altamente variable, con un promedio de 35,1°C y puede descender a 10°C durante el “sopor” (Superina 2008). En la actualidad esta especie está sujeta a una intensa presión cinegética con fines alimenticios en toda su distribución, especialmente en el norte y este de su rango, que junto como la conversión y degradación de su hábitat debido a actividades agrícola-ganaderas, los atropellamientos y la depredación por perros, son las principales causas en la reducción de sus poblaciones. Esto llevo a su categorización como Casi Amenazada en la Lista Roja de los mamíferos de Argentina (Superina et al. 2019).



Figura 2: Una hembra de *Zaedyus pichiy* juvenil del Departamento de Malargüe, Provincia de Mendoza, Argentina. Por Superina (2014).

Teoría de la coalescencia

Varios de los métodos utilizados en esta tesis tanto para ahondar en la sistemática filogenética de la subfamilia como para la realización del estudio filogeográfico de la especie *Z. pichiy*, se basan en la “teoría de la coalescencia”, formulada por Kingman al principio de los 80 y posteriormente desarrollada por Hudson (1990), entre otros.

Esencialmente, la coalescencia consiste en la reconstrucción de la historia genealógica de una muestra de secuencias hasta el ancestro común más reciente (MRCA), considerando solamente aquellos linajes que dieron descendencia en la muestra de secuencias (Hudson 1990; Nordborg 2000).

Esta teoría, al igual que los métodos moleculares para estudiar las filogenias, se aparta de la teoría de genética de poblaciones tradicional, pues se basa en la teoría del neutralismo de la evolución molecular formulada por Kimura (Kimura y Ohta 1969; Kimura 1980). De esta manera, la teoría de la coalescencia considera que las mutaciones neutras se acumulan a lo largo de las ramas de los árboles que representan las genealogías génicas, dicho de otro modo, 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 génica. De esta manera, todos los alelos de un gen en una determinada generación derivan o “coalescen” hacia un único alelo ancestral. Por lo tanto, 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).

La coalescencia se basa en el modelo matemático de Wright-Fisher (1931) (coalescencia básica) e incorpora distintos parámetros (N , mutación, migración, tiempos de coalescencia, etc.) en lo que sería la “coalescencia completa”.

La teoría se aplica por:

1) Métodos “Estadísticos resumen”: sintetizan la información contenida en la muestra comparándola con lo que se esperaría obtener bajo un modelo nulo o neutro, como las poblaciones ideales de Wright-Fisher (coalescencia básica). Se pueden detectar procesos que afectaron a la muestra en el pasado (cambios en el tamaño de la población, estructuración poblacional, selección natural; recombinación). Algunos de los estadísticos resumen más comunes son: D de Tajima (1989) y la distribución de las diferencias pareadas (Rogers y Harpending 1992).

2) Métodos de “Coalescencia completa”: detectan cambios en el tamaño de la población, estructuración poblacional, selección natural, recombinación, estimando los parámetros relacionados con estos mismos procesos (tasa de mutación poblacional, número de migrantes por generación entre n poblaciones, tasa de crecimiento poblacional, tiempo desde el ancestro común más reciente de la muestra, tiempo de divergencia entre dos poblaciones o la tasa de recombinación de la población).

3) Métodos de “simulación coalescente”: generan genealogías mediante simulaciones basadas en los algoritmos de la teoría coalescente, que se utilizan como hipótesis nula. Estas genealogías simuladas se contrastan con los resultados de los datos reales (p.ej., se utilizan desviaciones del coalescente básico y se observa si se recuperan los datos reales).

La teoría de la coalescencia 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).

Filogenética

La práctica filogenética trata de estimar la relación ancestro–descendiente a partir de los caracteres estudiados, representando dicha relación en los árboles filogenéticos.

*La cladística prefiere el árbol filogenético que implique la mínima cantidad de cambios evolutivos (“pasos” evolutivos) para explicar una determinada matriz de caracteres (principio de Máxima Parsimonia) (Farris 1970; Swofford *et al.* 1996). Además, asume que cualquier carácter heredable es una homología potencial (Grandcolas *et al.* 2001), dándole el “mismo peso” a todos los caracteres al momento de inferir los árboles (Hennig 1968). Cuando la cantidad de caracteres homoplásicos es grande, puede causar que los árboles reflejen relaciones filogenéticas espurias (Bergsten 2005), fenómeno conocido como atracción de ramas largas (Felsenstein 1978).*

*Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana son métodos estadísticos basados en modelos de evolución molecular, donde se toma en cuenta el conocimiento *a priori* de los caracteres, especialmente cuando son moleculares. El método de ML estima la probabilidad de qué tan bien la matriz de caracteres es explicada por los árboles filogenéticos (Felsenstein 2004), mientras que la IB estima la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos (la matriz de caracteres) (Huelsenbeck *et al.* 2001; Brooks *et al.* 2007). Mientras la ML calcula cada árbol y la longitud de ramas posible derivada de los datos según el modelo de evolución seleccionado (Huelsenbeck y Rannala 1997), la IB realiza búsquedas a través de un número menor de árboles según sus valores de probabilidades posteriores, empleando para los cálculos del algoritmo conocido como Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Huelsenbeck *et al.* 2001) siendo más rápido y demandando menos poder computacional. ML y la IB son poco confiables cuando las tasas de evolución de ADN no son homogéneas en el tiempo ni entre linajes (Kolaczkowski y Thornton 2004). Adicionalmente, ML es afectado por la “repulsión” de grupos hermanos cuando estos se ubican en ramas largas de los árboles (Siddall 1998).*

*Debido a los diferentes defectos de los métodos, el hecho de que ninguno es efectivo en todas las circunstancias, y la carencia de consenso respecto a la metodología filogenética, se utiliza un procedimiento conciliatorio al emplear los tres métodos (Peña *et al.* 2011). Si las topologías de los árboles obtenidos usando los diferentes métodos son concordantes, la hipótesis filogenética resultante es considerada robusta. Si no es el caso, se deberá tener cautela al discutir las relaciones filogenéticas de los nodos discordantes. Siendo la probable causa de las discordancias la complejidad de las matrices de caracteres más que la imperfección de los métodos, se recomienda aumentar el número de taxones y caracteres en las matrices para resolver relaciones filogenéticas*

ambiguas y nodos débilmente soportados (Peña *et al.* 2011). Sin embargo, esta estrategia no siempre resuelve el problema, dado que la ambigüedad puede encontrar una explicación en el proceso de especiación de un clado. En el marco de un análisis filogenético, el concepto de especie que se utiliza es el llamado concepto filogenético de especie, que asume que los alelos de individuos que pertenecen a unidades reproductivamente aisladas, formarán clados recíprocamente monofiléticos, es decir, que tendrán un ancestro común más cercano entre ellos que con otros alelos (Wheeler y Meier 2000). Sin embargo, en el caso de “complejos de especies” con radiaciones recientes y linajes “jóvenes”, es posible que las especies no hayan alcanzado el estado recíprocamente monofilético en sus alelos debido al fenómeno de reparto incompleto de linajes (“Incomplete Linaje Sortin”; Maddison y Knowles 2006; Knowles y Carstens 2007) ya que los alelos de cada población recientemente aislada reproductivamente pasan por un estado de polifilia, parafilia y, finalmente, alcanzan la monofilia recíproca.

Se han desarrollado algoritmos bayesianos que aplican la teoría de la coalescencia, y que tienen por objetivo delimitar “árboles de especies” a partir de dos o más “árboles de genes” (Edwards *et al.* 2007; Liu y Peralis 2007; Heled y Drummond 2010) aun cuando las especies no hayan alcanzado el estado recíprocamente monofilético. Belfiore *et al.* (2008) demostraron que este tipo de métodos son más eficientes en estos casos que el análisis concatenado de genes, llevado a cabo mediante metodologías Bayesianas más tradicionales de análisis filogenéticos (Ronquist y Huelsenbeck 2003).

Estos algoritmos Coalescentes tienen en cuenta factores demográficos (p.ej., $2N$ y flujo génico) en la construcción de los árboles. Es posible mediante estos métodos probabilísticos apoyar un modelo de especiación reciente, a pesar de que la inspección visual de los árboles no muestre monofilia recíproca (Degnan y Salter 2005; Liu and Pearl 2006; Maddison y Knowles 2006; Carstens y Knowles 2007; Knowles and Carstens 2007; Belfiore *et al.* 2008; Heled y Drummond 2011).

Biogeografía

La biogeografía es la rama de la Biología que estudia las distribuciones geográficas de los seres vivos, tanto en la actualidad como en el pasado. Dentro de ella se distinguen dos grandes líneas de investigación: la biogeografía ecológica y la biogeografía histórica.

La biogeografía histórica estudia cómo los procesos históricos (por ejemplo, evolución, tectónica) que ocurren en grandes escalas de tiempo, influyen los patrones de distribución de la vida. Dentro de ella existen numerosos enfoques que poseen asimismo diversas aproximaciones metodológicas (Crisci *et al.* 2000). Algunos de estos enfoques utilizan las filogenias de las especies para inferir su historia biogeográfica. Las filogenias de un grupo taxonómico constituyen una hipótesis de las relaciones biológicas de un grupo, fundamentada en un conjunto de evidencias (datos). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que como cualquier hipótesis, la filogenia construida sobre la base de un conjunto de taxones y datos determinados podrían no necesariamente representar su verdadera historia evolutiva. Así, contrastada con nueva evidencia, es posible que la topología previa de la

filogenia pueda cambiar. En consecuencia, los resultados de los análisis biogeográficos basados en filogenias, son asimismo hipótesis.

Los datos moleculares emergentes de las especies han revolucionado los estudios biogeográficos en general. En la biogeografía histórica frecuentemente se utilizan filogenias moleculares para aplicar los diferentes métodos y evaluar de este modo los procesos de especiación, dispersión, extinción de los linajes y clados y la reconstrucción de sus posibles áreas ancestrales (Morrone 2000).

*Una de las ventajas de los datos moleculares para este tipo de estudios, es la posibilidad de estimar las edades de divergencia entre los clados (relojes moleculares), lo que permite inferir los efectos de los cambios climáticos y geológicos del pasado en el patrón de especiación y en la dispersión de los organismos (Riddle *et al.* 2008). No obstante, correlación no implica causa. Las correlaciones entre edades de divergencia y condiciones geológicas deben ser interpretadas como hipótesis tentativas, que deben ser sujetas a evaluaciones futuras.*

*La subdisciplina que más ha crecido dentro de la biogeografía ha sido la filogeografía (Posadas *et al.* 2013), surgida a fines de los '80 y definida como “el estudio de los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente dentro de taxa cercanamente emparentados” (Avise *et al.* 1987).*

El crecimiento de la filogeografía se debe en gran parte al avance tecnológico (rapidez y facilidad para la obtención de secuencias de ADN), analítico (poder computacional) y teórico (principalmente la teoría de la coalescencia, según Avise 2009).

*La filogeografía es considerada una subdisciplina de la biogeografía histórica, dado que estudia aspectos históricos de la distribución actual de los linajes genealógicos (Avise 2000); o bien, es mencionada como parte de la biología evolutiva, ya que integra conceptos que provienen de disciplinas microevolutivas (a nivel de poblaciones e individuo) y macroevolutivas (por encima del nivel de especie) (Avise *et al.* 1987; Avise 2000, 2009; Domínguez–Domínguez y Vázquez–Domínguez 2009). Es decir, aplica los algoritmos de la filogenia molecular, sólo que a un nivel infraespecífico, pero también utiliza conceptos que provienen de la genética de poblaciones y considera la información geográfica como punto fundamental. La filogeografía se ha utilizado para determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación, integrándose a otras disciplinas como son la taxonomía y la biología de la conservación (Avise *et al.* 1987; Avise 2000, 2009; Freeland 2005; Vázquez–Domínguez, 2002, 2007; Domínguez–Domínguez y Vázquez–Domínguez 2009).*

Mayormente, la filogeografía se utiliza como una herramienta para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie (o especies cercanamente emparentadas). Mediante este enfoque se puede determinar el origen geográfico de una especie, es decir, aquellas áreas de distribución original con gran diversidad genética, y establecer rutas de colonización y centros secundarios de dispersión (Lanteri y

Confalonieri 2003) para relacionarlos con evidencias geomorfológicas y paleoclimáticas. La reconstrucción de los cambios demográficos ocurridos en las poblaciones animales es de fundamental importancia para determinar la historia zoogeográfica de las regiones (Storz et al. 2002; Shapiro et al. 2004; Drummond et al. 2005; Goossens et al. 2006). Los procesos demográficos históricos tales como la subdivisión poblacional, la reducción o expansión del rango de distribución o, alternativamente, el mantenimiento de largos períodos de estabilidad poblacional, dejan señales contrastantes en los patrones de distribución geográfica de la variación genética (Matocq et al. 2000; Mora et al. 2007). Estas señales filogeográficas pueden ser utilizadas para reconstruir la historia demográfica de las poblaciones (Abbort et al. 2000; Avise 2000; Hewitt et al. 2000; De Chaine et al. 2006; Aoki et al. 2008; Ruzzante et al. 2008). Por otra parte, cuando es posible obtener estimaciones precisas de los cambios demográficos (flujo génico, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella), esta información puede relacionarse con eventos ambientales fehacientemente documentados, constituyendo de tal manera una herramienta poderosa para evaluar hipótesis sobre la forma en que los factores ambientales determinan la dinámica poblacional de las especies (Heller et al. 2008).

Los métodos basados en la coalescencia, a diferencia de 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 (Roderik 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 (Avise 2000). Por lo tanto, si se hacen inferencias sobre el pasado histórico de las poblaciones cuando éstas todavía no alcanzaron la monofilia, es posible hallar una variación alélica ancestral, que puede ser interpretada erróneamente como debida a flujo génico interpoblacional (Schaal y Olsen 2000).

Los primeros métodos de inferencia filogeográfica agrupados en la filogeografía estadística (Knowles y Maddison 2002), incorporan la naturaleza estocástica de los procesos genéticos, y permiten estimar la influencia de eventos evolutivos ante las expectativas teóricas de modelos explícitos (Neigel et al. 1991; Templeton 1998; Knowles 2004). Estos sufren limitaciones desde el punto de vista estadístico y biológico (Knowles 2004). Uno de estos primeros métodos para inferir la historia de un taxón en un contexto geográfico, fue el Análisis de Clados Anidados (Templeton 1998, 2008) en desuso en la actualidad debido a críticas que afirman que, en ciertas situaciones, el análisis puede proporcionar resultados erróneos (Knowles y Maddison 2002; Panchal y Beaumont 2007; Knowles 2008). Como respuesta a ello, actualmente surgió y está en pleno desarrollo la Filogeografía bayesiana, que ha sido aplicada en este estudio.

Marcadores moleculares

La elección del o los marcadores es muy importante dependiendo del tipo de estudio y el nivel taxonómico en el que se desee trabajar, ya que cada marcador molecular tiene su tasa de evolución particular. El ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma haploide que usualmente no recombina y que en la mayoría de los casos es de herencia matrilineal (Birky 2001), resultando una molécula fácil de aislar dado que presenta varias copias por célula. Además, exhibe una alta tasa de mutación (Brown *et al.* 1979) que, al menos en animales, evoluciona más rápido que el ADN nuclear. Todas estas razones hacen que el ADNmt sea el más utilizado para estudios de filogeografía, genética de poblaciones, filogenias moleculares y sistemática (Pages y Holmes 1998). Sin embargo, generalmente se recomienda incluir uno o más marcadores nucleares para investigar la historia evolutiva de complejos de especies recientemente divergentes (Kawakami *et al.* 2007) con el fin de descartar posibles eventos de hibridación.

Los marcadores de ADN nuclear también son de utilidad en filogeografía para recuperar el impacto de eventos biogeográficos relativamente antiguos (Spinks 2010). Entre ellos los microsatélites son los más utilizados, sin embargo, los marcadores basados en secuencias poseen una serie de ventajas sobre ellos, incluso en las escalas de tiempo recientes (Brito y Scott 2009). Los segmentos codificantes (exones) de la mayoría de los genes eucariotas están interrumpidos por intrones no codificadores. Los exones son usualmente utilizados en estudios de filogenias. Los exones nucleares de los genes factor von Willebrand (*vwf*) y cáncer de mama 1 (*BRCA1*) fueron amplificados y secuenciados con éxito para gran parte de las especies de *Xenarthra* en varios trabajos de filogenias moleculares (Delsuc *et al.* 2002, 2004, 2012; Abba *et al.* 2015). Los intrones por ser más variables dentro de las especies son utilizados con mayor frecuencia como marcadores de variación para subdividir población, diseñando los cebadores en regiones conservadas de exones flanqueantes (Lessa 1992). Otros marcadores moleculares nucleares utilizados extensamente son los que secuencian las diferentes regiones del ADN ribosómico (ADNr) ya que sus tasas de evolución son muy variables entre sí, un ejemplo son los espaciadores transcribibles internos (ITS) (Alvarez y Wendel 2003).

El genoma mitocondrial es un cromosoma circular cerrado de doble cadena que codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales, ya que las restantes son codificadas por el ADN nuclear. Las dos cadenas del ADNmt reciben el nombre de cadena L (ligera o “light”) y cadena H (pesada o “heavy”) atendiendo a su coeficiente de sedimentación. La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena H. El ADNmt contiene información de 38 genes: 2ARNr (ribosómicos), 22ADNt (de transferencia) y 13 genes estructurales, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa, entre ellas la citocromo oxidasa subunidad I (COI). La región mayor no codificante, conocida como Región Control o “D-Loop” se sitúa entre el gen que codifica para el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. En la Región Control se localizan el origen de replicación de la cadena H, los promotores para la transcripción de las dos hebras, dos lugares de unión de factores de transcripción, tres bloques de secuencias

conservados asociados con el inicio de la replicación, y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (Foranet *et al.* 1988; Coskun *et al.* 2003). La Región Control se destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes, y por su elevada variabilidad intrapoblacional (Vigilant *et al.* 1991; Greenberg *et al.* 1983).

La longitud total del genoma mitocondrial en *Xenarthra* varía entre 16000-17000 pares de bases (pb), según las secuencias actualmente disponibles de algunas de sus especies (Arnason *et al.* 1997, 2002). Esta variación es debida a las diferencias en la longitud de la región de control. En el armadillo *Dasyopus novemcinctus* se informó una longitud máxima de la Región Control de 1604 pb, caracterizada por la aparición de “motivos repetitivos” o “repeticiones microsátélites” en dos lugares diferentes (Huchon *et al.* 1999). La heteroplasmia en el ADNmt de este armadillo es debido a la ocurrencia de diferente número de dicho “motivo” en diferentes moléculas del mismo individuo (Arnason *et al.* 1997). Poljak (2009) también reportó repeticiones en el tramo final de las especies *C. villosus* y *C. vellerosus*. Repeticiones como las mencionadas, suelen causar problemas técnicos en la amplificación por PCR y en la secuenciación.

Para *Dasyopus novemcinctus* también se han reportado diferencias en relación a otros euterios, tales como cambios del codón de inicio o un codón de parada incompleto en genes codificadores de proteínas, como también características estructurales en el tallo y bucle de genes de ARNt de aminoácidos que forman una estructura de bucle y horquilla atípico pero estable, que aparentemente no alteran su correcta función. Un ejemplo de esto se da en el origen de replicación de la hebra L (Ori L) entre los genes ARNt-Asn y ARNt-Cys (Arnason *et al.* 1997).

Las mutaciones estructurales (reordenamientos, duplicaciones y/o deleciones) pueden darse en el genoma mitocondrial tanto como en el genoma nuclear, y también pueden darse casos de duplicación de un gen mitocondrial en el genoma nuclear, originándose de este modo un pseudogen. Algunos de estos, como la heteroplasmia ya mencionada, o pseudogenes, se han reportado en especies de *Xenarthra* (Arnason *et al.* 1997; Delsuc *et al.* 2003; Poljak 2009). En filogeografía se evita utilizar secuencias de pseudogenes y secuencias que tengan estos tipos de reordenamientos o se descartan las regiones de la secuencia que los contenga, y solo son utilizadas las mutaciones puntuales como caracteres para inferir procesos evolutivos (Lessa *et al.* 2010).

El marcador más utilizados para resolver estudios filogeográficos y relaciones filogenéticas en los niveles más bajos, es la Región Control del ADN mitocondrial. Esta región, también conocida como D-Loop, tiene una extensión variable de aproximadamente entre 1200-1600 pb y se caracteriza por presentar la mayor variabilidad del genoma mitocondrial, por tasas evolutivas diferenciales en sus dominios, y por la disponibilidad de secuencias de varias especies existentes en bases de datos, representando un excelente marcador para el estudio de las relaciones evolutivas. En particular, ha resultado útil en estudios recientes sobre *Chaetopharctus villosus* y *C. vellerosus* (Poljak *et al.* 2010, 2018, 2020; Abba *et al.* 2014).

Hipótesis y objetivos del estudio

En base a todo lo expuesto precedentemente surgen las preguntas: ¿Dónde y cuándo se originó *Zaedyus pichiy*?, ¿cómo y cuando fue el origen de las especies actuales de la subfamilia Euphractinae?, ¿cómo se relaciona *Zaedyus pichiy* con el resto de los generos actuales de Euphractinae?, ¿puede el análisis de un mayor numero de muestras y de diferentes marcadores moleculares ayudar a dilucidar la relación entre los generos actuales de Euphractinae?, ¿cual es la diversidad genética de las poblaciones de *Zaedyus pichiy*, como se distribuye en la actualidad y cual fue la historia de sus poblaciones para llegar a ella, que factores la moldearon?.

Hipótesis

Para intentar responderlas en este estudio se testean las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La parafilia del género *Chaetophractus*: *C. villosus* está emparentado con *Euphractus*, y *C. vellerosus* es especie hermana de *Zaedyus pichiy*.
2. El género *Chaetophractus* es monofilético, estando agrupado con *E. sexcinctus*, siendo *Z. pichiy* el primer linaje de Euphractinae en emerger (hipótesis filogenética tradicional o clásica).
3. Las especies actuales de la subfamilia Euphractinae tuvieron su origen y radiación temprana en el Mioceno tardío-Plioceno temprano en la Región Pampeana, coincidiendo con los registros más tempranos de sus géneros en ese periodo y región.
4. La distribución actual de *Zaedyus pichiy* ha sido moldeada por los cambios climáticos cíclicos ocurridos durante el Pleistoceno, experimentando periodos de expansión y retracción de sus poblaciones. La diversidad de sus haplotipos se distribuye en un gradiente latitudinal, los más ancestrales se encuentran a latitudes más bajas, mientras que los derivados evolutivamente de aquellos en latitudes más altas, mostrando la expansión más reciente de sus poblaciones debido al aumento de temperatura.

Objetivos

Por lo tanto el presente trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo aportar conocimientos sobre la historia evolutiva de *Zaedyus pichiy* y de la subfamilia Euphractinae a la que pertenece, intentando:

(1) Esclarecer las relaciones filogenéticas entre todas sus especies, determinar sus tiempos de divergencia, y sus posibles áreas ancestrales. Para ello se utilizaron tanto marcadores moleculares nucleares (más conservados y capaces de reconstruir la mayoría de los eventos evolutivos antiguos) generados por otros autores en trabajos anteriores, como mitocondriales (suficientemente poderosos para detectar fracturas recientes) obtenidos para este estudio.

(2) Analizar el patrón filogeográfico de *Zaedyus pichiy* en todo su rango de distribución en Argentina, mediante el análisis de secuencias hipervariables de una porción de la Región Control del ADN mitocondrial (D-loop) y de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Asimismo, examinar la relación entre dicho patrón y la historia geomorfológica (tectónica y paleoclimática) de la región.

En particular, los objetivos específicos son:

a) Utilizar los diferentes métodos disponibles para determinar la filogenia de la subfamilia y obtener las probables edades de sus nodos.

b) Aplicar al cladograma obtenido los métodos de la biogeografía histórica disponibles para obtener una hipótesis sobre sus áreas ancestrales.

c) Correlacionar la filogenia, las edades y las áreas obtenidas, con los cambios climático-ambientales acaecidos durante el biocrón del grupo de especies estudiadas.

d) Analizar la variabilidad genética, la estructura poblacional, la historia demográfica, y el patrón filogeográfico de *Zaedyus pichiy*.

e) Correlacionar los eventos climático-ambientales del pasado que pudieron haber producido o afectado la variabilidad genética, la estructura poblacional, la historia demográfica, y el patrón filogeográfico obtenidos para *Zaedyus pichiy*.

Muestreo

Los puntos de muestreo se diseñaron mediante el estudio detallado de la bibliografía, resultando de gran utilidad el catálogo de las colecciones de *Xenarthra* de referencia de Argentina del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” de Buenos Aires (MACN) y del Museo de La Plata (MLP) (Abba y Vizcaíno 2008), el trabajo de modelado de distribuciones de las especies de *Xenarthra* en Argentina realizados por Abba (Abba *et al.* 2012) y la revisión de dichas colecciones (MLP; MACN). Así también se ha tenido en cuenta el material obtenido en las colecciones de referencia y a través del aporte de instituciones e investigadores de otras regiones del país y particulares. En este sentido, se destaca la utilidad del Banco de Muestras y Tejidos existente en el Laboratorio de Ecología Molecular del Centro Regional de Estudios Genómicos con muestras de especies del Magorden *Xenarthra*, principalmente de la familia *Chlamyphoridae*, provenientes de trabajos previos realizados por el grupo encabezado/dirigido por la Dra. Lizarralde. Los ejemplares de colección o las muestras del banco que no contaban con datos de coordenadas geográficas, fueron georeferenciados estimando las coordenadas de sus localidades mediante el programa Google Earth.

Procurando obtener un muestreo representativo de toda la extensión de la distribución de la especie en estudio, se priorizaron zonas o áreas faltantes de la distribución del grupo, especialmente en sentido latitudinal. Se gestionaron y obtuvieron los permisos de colecta correspondientes. El objetivo del muestreo fue coleccionar un mínimo de 5 muestras por localidad de muestreo, o en el caso de obtener un número menor, muestrear un mayor número de localidades en esas zona obteniendo muestras de localidades más cercanas entre sí.

Se obtuvieron un total de 112 muestras de *Zaedyus pichiy* provenientes de diversas localidades de las provincias de La Rioja, San Juan, Mendoza, San Luis, La Pampa, Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz. En la Tabla 1 se muestran detalles de las localidades por provincia, las coordenadas geográficas y la cantidad de muestras por cada localidad. Algunos sitios de muestreo, por ser muy próximos, se consideraron como la misma población y se las ubicó en el medio de la distancia entre las localidades cercanas.

Acrónimo Población	Provincia/área	N	Coordenadas	
			Lat.	Long.
LRP	La Rioja, Pagancillo	4	-29.54	-68.09
MLV	Mendoza, Lavalle / San Juan, Bermejo	10	-32.26	-67.73
MCP	Mendoza, Capital	1	-32.85	-68.77
MÑA	Mendoza, Ñacuñan	1	-34.05	-67.97
SLC	San Luis, Ea. El Centenario	11	-34.17	-65.84
MSR	Mendoza, San Rafael	1	-34.60	-69.02
MMA	Mendoza, Malargüe	4	-35.97	-69.19
BAL	Buenos Aires, Pellegrini /La Pampa, Atreuco, Conhella	7	-36.41	-63.41
BAC	Buenos Aires, Laguna Chasico	1	-38.51	-63.32
BAP	Buenos Aires, Pedro Luro	3	-39.53	-62.69
NJA	Neuquén, Junín de Los Andes	7	-39.94	-70.96
RNP	Río Negro, Pilcaniyeu	31	-41.13	-70.72
RNM	Río Negro, Meseta de Somuncurá	3	-41.45	-66.88
CHC	Chubut, Cushamen	1	-42.37	-71.03
CHE	Chubut, Ea. Talagapa	1	-42.15	-68.25
CHP	Chubut, Península Valdés	1	-42.40	-64.77
CHT	Chubut, Trelew	5	-43.23	-65.45
CHA	Chubut, Alto de las Plumas	4	-43.72	-67.29
CHR	Chubut, Río Chico	1	-45.68	-68.34
SCN	Santa Cruz, Lagos del Norte	7	-47.12	-70.87
SCC	Santa Cruz, Lagos del Centro	3	-48.26	-71.56
SCS	Santa Cruz, Lagos del Sur	1	-49.53	-71.45
SCP	Santa Cruz, Comandante Luis Piedrabuena	4	-49.93	-69.03

Tabla 1: Poblaciones muestreadas y sus coordenadas geográficas expresadas en grados decimales.

En la Figura 3 se muestran la distribución conocida en Argentina de *Zaedyus pichiy* según Superina *et al.* 2019, yendo desde la diagonal árida que cruza el país en su centro desde La Rioja hasta el sur de Buenos Aires, y llegando hasta el sur de Santa Cruz. También con puntos se muestran las localidades de la que se obtuvieron

muestras, pudiéndose observar que el muestreo abarca el amplio rango geográfico de *Z. pichiy*. El acrónimo de cada muestra y su lugar de colecta (provincia, localidad y coordenadas) se muestran en el Apéndice 1.

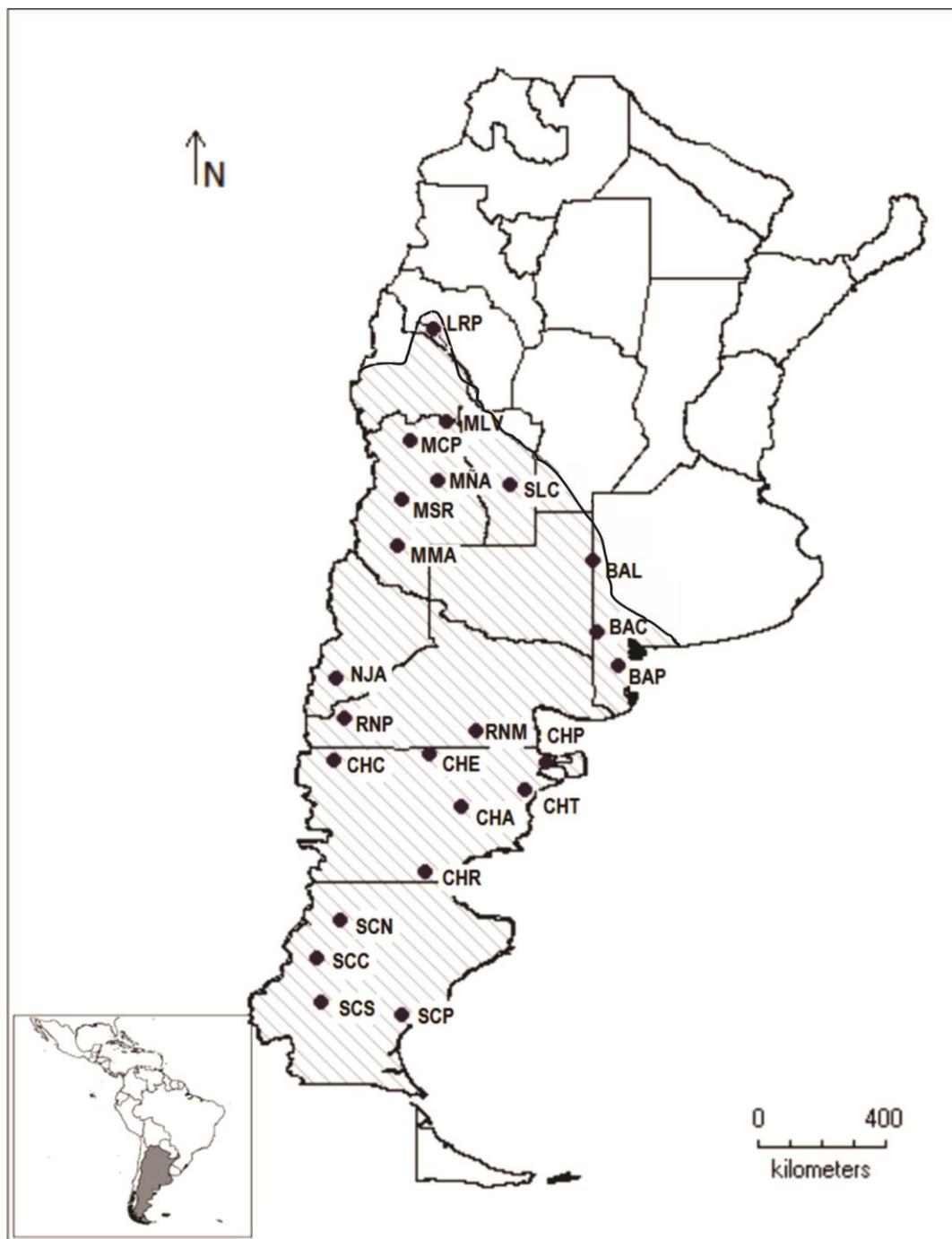


Figura 3: En el mapa se muestra la distribución en Argentina conocida de *Zaedyus pichiy* marcada con líneas grises, y con círculos negros las localidades donde se obtuvieron muestras.

Colecta y preservación del material colectado

El muestreo se realizó por avistamiento y captura manual de individuos en el campo, ya que resulta el método más eficiente de colecta para estos mamíferos (Medri 2008; Poljak 2009; Abba com. pers.). Se utilizaron

guantes de látex para manipular cada animal y extraer una pequeña porción de tejido del pabellón auricular (dado que al ser una zona muy esclerotizada no sangra, y no genera infecciones) desinfectando el material quirúrgico en cada toma y minimizando el tiempo de manipulación del animal para minimizar el estrés. Después de obtener la muestra y las medidas corporales generales y sexo de cada individuo, los ejemplares fueron liberados en el mismo punto de colecta. En el caso de colecta de animales muertos (ya sea por causa natural o atropellamiento vehicular) se conservaron a -20°C para luego depositarlos como “especímenes voucher” en la colección de la Sección Mastozoología, División Zoología Vertebrados, de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. El material se fijó según el protocolo adecuado a la colección y se registró el punto GPS donde fue colectado. Antes de fijar el material se extrajo la muestra para el análisis molecular que en estos casos consistió en tejido muscular. También se obtuvo gran cantidad de muestras de tejido muscular seco de carcasas y restos aportados por habitantes de las localidades muestreadas que las recolectaron del campo con fines decorativos o las conservan luego de cazar y comer al animal.

Las muestras de tejido se conservaron en microtubos de polipropileno de 1,5 ml con alcohol etílico 96 %, el cual fue renovado a las 24-48hs, momento en que finalmente se reemplazó por una mezcla de etanol-metanol en partes iguales, preservándose a -20°C hasta su procesamiento.

Se maximizó la capacidad de utilizar fuentes poco convencionales de tejido de forma “no invasiva” (p.ej., colecta de animales muertos o carcasas con tejido encontradas en el campo o estancias, y muestras de especímenes de museo). La identificación de las especies fue realizada siguiendo las descripciones de Superina y Abba (2014).

Extracción de ADN

La extracción de ADN para las muestras de tejido se realizó siguiendo los protocolos habituales, utilizando el método que más se ajustó a cada tipo de tejido, preservación y calidad: cloruro de sodio (Aljanabi *et al.* 1997), cloruro de litio-cloroformo (Gemmell y Akiyama 1996) o fenol-cloroformo (Sambrock *et al.* 1989).

La revisión de la colección de Mastozoología del MACN posibilitó, complementariamente, la toma de muestras de tejido de ejemplares de museo, con la finalidad de poner a prueba diferentes protocolos de extracción de material preservado (Moraes-Barros y Stenghel Morgante 2007). Sin embargo el ADN obtenido de este tipo de muestras fue de mala calidad por lo cual no se logró amplificar a partir de ellas ninguno de los marcadores utilizados.

La calidad y la cantidad de ADN extraído se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, sembrando 2-5 μl de producto y 5 μl de un marcador de peso molecular de 100 pb para su cuantificación. Al gel se le adicionó bromuro de etidio para su posterior revelado bajo luz ultravioleta. Aquellas muestras que presentaron un patrón chorreado en el revelado de la corrida electroforética fueron incubadas 2 horas a 37°C con ARNasa

para eliminar el ARN degradado, realizando posteriormente una nueva cuantificación. Luego, el ADN obtenido se conservó a -20°C para las futuras amplificaciones.

Marcadores Moleculares

Brevemente, la primera porción de D-loop, de aproximadamente 460 pb, fue amplificada y secuenciada en este estudio, aunque solamente se utilizó para los análisis intraespecíficos (ver más adelante).

El otro marcador mitocondrial utilizado fue el gen de la Citocromo c oxidasa subunidad I (COI), específicamente la región conocida como código de barras genético (“DNA Barcoding”) para la identificación de especies, que comprende 658 pb. En particular, aunque presenta menor variabilidad intraespecífica que D-loop, su alta variación interespecífica permite obtener una buena determinación de la mayoría de las especies de vertebrados. COI se amplificó y secuenció para todas las especies de *Xenarthra* presentes en el banco de muestras del laboratorio de Ecología Molecular, con el fin de realizar una aproximación filogenética en la subfamilia Euphractinae. La disponibilidad de secuencias de COI para una gran variedad de grupos taxonómicos depositadas en las plataformas del Genbank y del Bold System (Barcoding), posibilitó utilizar varias de ellas para este estudio.

Para el análisis filogeográfico Multilocus (Brito y Scott 2008; Spinks *et al.* 2010) se testeó una batería de cebadores para amplificación por PCR (Apéndice 2) perteneciente a intrones y exones de varios genes nucleares y espaciadores del ADNr, obtenidos de la literatura para otros vertebrados y a través de contactos con especialistas en otros grupos de *Xenarthra* (Silva *com. per.*). Esta batería se probó en un número reducido de muestras, para comprobar su utilidad y analizar la variabilidad presente en cada uno y luego seleccionar el o los más adecuados para el estudio. El mayor desafío metodológico para utilizar ADN nuclear en estos estudios son los niveles bajos de divergencia de secuencia, por lo cual se excluyeron cebadores de *Xenarthra* utilizados por otros especialistas, que no resolvieron las relaciones dentro de la subfamilia o generaron resultados ambiguos con los marcadores mitocondriales utilizados en esos estudios (Delsuc *et al.* 2002, 2003, 2004, 2012; Möller-Krull *et al.* 2007). Finalmente de la batería de cebadores testeados para el análisis filogeográfico multilocus, amplificaron con éxito para *Zaedyus pichiy* dos candidatos. Sin embargo, dado que ninguno de ellos presentó variabilidad en la submuestra estudiada, no fueron utilizados.

Amplificación y secuenciación de ADN

Se aplicó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis *et al.* 1990) para amplificar segmentos de ADN específicos con cebadores de los marcadores moleculares mencionados antes y utilizados en el estudio, los que se especifican en la Tabla 2.

La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 25 μl , compuesto por 1 μl de ADN de la muestra a una concentración aproximada de 25ng/ μl ; 1 μl de cada cebador (1 μM); 17,5 μl de H_2O ; 2,5 μl de buffer (10x); 1,5 μl de Cl_2Mg (50 nM); 0,5 μl de dNTPs (50 nM) y 0,25 μl de Taq polimerasa (5U/ μl). En todas las reacciones de

PCR se utilizó un control negativo. El ciclado consistió de 3 de fases: (1) 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, (2) 40 ciclos de amplificación [cada ciclo consistente en 45 segundos de desnaturalización a 94°C; 1 minuto de asociación (annealing) a 55-60°C dependiendo de los cebadores usados y 1,5 minutos de extensión a 72°C] y (3) una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se precipitaron por purificación alcohólica o PEG-NaCl según cantidad y calidad del producto amplificado. La cuantificación, calidad y tamaño molecular de los fragmentos amplificados, como así también posteriores purificaciones, se realizaron mediante electroforesis en gel (explicada anteriormente, véase 2.2.1).

Las extracciones y amplificaciones de la COI se realizaron en el laboratorio molecular del MACN y se secuenciaron en el Centro Canadiense de DNA Barcoding, Instituto de Biodiversidad de Ontario (Universidad de Guelph, Guelph, Ontario) como parte del Proyecto del Convenio iBOL/CONICET (bajo dirección de la Dra. Lizarralde). Los productos amplificados de D-loop fueron secuenciados en MacroGen Inc., Corea del Sur. La reacción de secuenciación fue realizada en placas de 96 celdas conteniendo cada celda 20 µl del producto PCR, además de los cebadores específicos correspondientes a cada marcador molecular.

Cebador	Marcador	Secuencia (5' - 3')	Fuente y año
L15926	D-loop	CAATTCCTCCGGTCTTGTAACC	Vila <i>et al.</i> 1999
H16340	D-loop	CCTGAAGTAGGAACCAGATG	Vila <i>et al.</i> 1999
Mo-L15926	D-loop	CCGGTCTTGTAACCATAAATG	Este estudio
Mo-H16340	D-loop	CCTGAACAAAGAACCAGATG	Este estudio
VF1_t1	COI	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAGACATTGG	Ward <i>et al.</i> 2005
VR1_t1	COI	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Ward <i>et al.</i> 2005
C_VF1di-T1	COI	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	Ivanova <i>et al.</i> 2006
C_VR1di-T1	COI	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA	Ivanova <i>et al.</i> 2006

Tabla 2: Nombre de cebadores utilizados para cada marcador, su secuencia nucleotídica y trabajo en el que fueron publicados.

Procesamiento de datos

En los análisis de las siguientes secciones, en los cuales se utilizan secuencias de diferentes especies de *Xenarthra*, se presentarán los resultados utilizando acrónimos para el nombre de las especies según la tabla a continuación (Tabla 3).

Espece	Acrónimo
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Es
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	Cve
<i>Chaetophractus villosus</i>	Cvi
<i>Zaedyus pichiy</i>	Zp
<i>Chlamyphorus truncatus</i>	Ct
<i>Tolypeutes matacus</i>	Tm
<i>Cabassous unicinctus</i>	Cu
<i>Priodontes maximus</i>	Pm
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Dn
<i>Dasyopus kappleri</i>	Dk
<i>Dasyopus hybridus</i>	Dh
<i>Cyclopes didactylus</i>	Cyd
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tt
<i>Bradypus tridactylus</i>	Bt
<i>Choloepus didactylus</i>	Cd
<i>Choloepus hoffmanni</i>	Ch

Tabla 3: Acrónimos para cada especie utilizadas en los análisis.

Análisis estructural de las secuencias de los marcadores moleculares D-loop y COI en el Magorden Xenarthra

Es necesario gran cuidado en la interpretación de las secuencias de ADN mitocondrial generados por PCR utilizando cebadores universales. Por esta razón, en este estudio se realizó un exhaustivo control de calidad y de homología de secuencia revisando posibles fuentes de error (pseudogenes y heteroplasmia).

Análisis del marcador molecular Citocromo oxidasa c subunidad I (COI)

El gen COI codifica la proteína estructural transmembrana citocromo oxidasa C, subunidad I, que se encuentra incluida en las bicapas lipídicas de bacterias y mitocondrias, y actúa como enzima en la cadena de transporte de electrones.

En el patrón de evolución de las secuencias codificantes, el cambio en la primera y segunda posición del codón casi siempre resulta en un cambio de aminoácido (cambio no sinónimo), mientras que cambios en la tercera posición no suelen producir un cambio de aminoácidos (cambio sinónimo). El cambio de un aminoácido puede

producir un cambio de la carga, peso molecular y estructura de la proteína y, por lo tanto, una pérdida o alteración de su función.

Es por ello que, en genes codificantes, se detectan pocas mutaciones en la primera y segunda posición de los tripletes. De tal modo, se acumula la mayor parte de ellas en las terceras, pudiendo llegarse a la saturación en esta posición. Por ende, para analizar y comparar las secuencias del marcador COI obtenidas y utilizadas en este estudio se realizó un alineamiento y traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas con el programa BioEdit v7.0.9.1. Tomando como referencia el marco de lectura y secuencia aminoacídica del gen COI en secuencias de otros mamíferos y reemplazando el código estándar utilizado por convención (código genético de *Escherichia coli*) por la tabla del código genético mitocondrial para vertebrados que fue tomada del GenBank y que utiliza el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, U.S.A. Las diferencias entre los códigos radican en algunos codones de iniciación, codones de parada, y codones que codifican diferentes aminoácidos. En el análisis se observó:

- *variación de codones: sustituciones de bases en diferentes posiciones de los codones. Cantidad de sustituciones no sinónimas acumuladas.*
- *presencia de codones de terminación.*
- *longitud de las secuencias: detectando mutaciones de inserción y deleción de bases nitrogenadas (indeles) que generen desplazamiento del marco de lectura abierto conservado del gen codificante modificando completamente la secuencia aminoacídica de la proteína, anulando muy probablemente su función.*
- *Comparación de las tasas de sustitución entre las secuencias de COI y NUMT, apoyada en diferencias en las tasas de mutación entre los genomas nucleares y mitocondriales.*

Análisis del marcador molecular la Región Control (D-loop)

La RC de los mamíferos tiene una longitud que varía entre 880 y 1400 pb, debido a la presencia de un número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTRs) generadas por “resbalamiento de cadena” (Levison y Gutman 1987) o recombinación intra o inter-molecular (Rand y Harrison 1989). También se han detectado pseudogenes y heteroplasmia de este marcador (Huchon *et al.* 1999; Tully *et al.* 2000; Arnason *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2006; Goios *et al.* 2006). 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 “región hipervariable” y se los utiliza en estudios de genética de poblaciones y filogeografía (Confalonieri *et al.* 1998; Moraes-Barros *et al.* 2006; entre otros). Estos dos dominios a su vez incluyen en su secuencia segmentos conservados (ETAS1, ETAS2, CSB1, CSB2, CSB3) capaces de formar estructuras en forma de trébol (típicas de los ARN de transferencia) y, aunque aún no se ha dilucidado, estos elementos se vinculan al control de la replicación del ADNmt y la

transcripción de sus genes (Brown *et al.* 1986; Saccone *et al.* 1987; Sbisà *et al.* 1997). Por último, el dominio DC es conservado y útil para comparar taxa más divergentes (Brown *et al.* 1986; Saccone *et al.* 1987; Sbisà *et al.* 1997; Larissa *et al.* 2002).

En el presente estudio se compararon las secuencias de la especie *Zaedyus pichiy* entre sí, describiendo de forma somera la estructura de la primera porción de esta región para esta especie y comparándola con secuencias de representantes de otros géneros de *Xenarthra* obtenidas en este estudio, y de Poljak *et al.* (2010), quienes calcularon los porcentajes de bases que conforman los dominios ETAS y parte del DC del segmento secuenciado, así como las repeticiones presentes, determinando posición, longitud y el grado de conservación de los elementos estructurales ETAS1 y ETAS 2. La detección de posibles NUMT, se realizó mediante comparación de tasas de sustitución entre las secuencias.

Preparación de matrices: Alineamiento, edición de secuencias y elección de modelos evolutivos

Para la edición y alineamiento de las matrices utilizadas para los análisis filogenéticos y filogeográficos, se utilizaron, tomadas en diferentes conjuntos, las secuencias seleccionadas del análisis estructural de las secuencias (sección anterior) tanto para COI como para D-loop pero para este último solo se utilizaron las secuencias que tenían la conformación de repetidos de tipo A descrita. También se utilizaron secuencias disponibles en bases de datos públicas de los marcadores COI y los genes nucleares *Vwf* y *BRCA1*, que también fueron previamente revisadas para corroborar que no presentaran inserciones o deleciones que pudiesen alterar el marco de lectura, minimizando la posibilidad de utilización de pseudogenes para la construcción de las matrices.

Las secuencias fueron editadas manualmente utilizando el software BioEdit v7.0.9 (Hall 1999) y posteriormente alineadas en un archivo para cada marcador. Fueron aplicados diferentes métodos de alineamiento: 1) el algoritmo ClustalW (Thomson *et al.* 1994) mediante el programa ClustalX v2.1, con diferentes valores de penalidad por apertura y extensión de gaps; 2) el algoritmo de Muscle (Edgar 2004) a través del programa Seaview, también con diferentes valores de penalidad por apertura y extensión de gaps; y 3) para los marcadores codificantes, se alinearon aminoácidos que fueron traducidos reversiblemente, utilizando el programa BioEdit v 7.0.9. Para evaluar los alineamientos se realizó una búsqueda heurística con el programa TNT v.1.1 (Goloboff *et al.* 2008) para cada uno. Las búsquedas consistieron de 200 réplicas de secuencias de adición al azar y TBR (“treebisection-reconnection branch swapping”), guardando 10 árboles por réplica. Por cada matriz se corrió el análisis dos veces; en la primera, los “gaps” fueron considerados como 5to estado y, en la segunda, como entradas faltantes. De cada análisis se anotó su longitud y la cantidad de árboles obtenidos. También se realizó un consenso estricto y se exploró la topología del árbol. Bajo el criterio de parsimonia se consideró que el alineamiento que recupera el árbol más corto, es el más óptimo.

Los métodos probabilísticos utilizados en esta tesis (MV y Bayesianos) requieren la incorporación de un modelo de sustitución nucleotídica. En este trabajo se calculó el modelo de evolución molecular para la matriz de alineamientos de cada marcador con el programa jModeltest 0.1.1 (Posada 2008), utilizando el criterio de información de Akaike AIC (Posadas y Buckley 2004). Cuando se utilizó una matriz concatenada, fue particionada colocando el modelo obtenido para cada marcador.

En la tabla 4 se muestra para cada matriz utilizada en los diferentes análisis, los programas y las diferentes estrategias de alineación evaluados, como así también los árboles de máxima parsimonia que resultan de cada alineamiento probado, y el modelo evolutivo calculado para el que obtuvo el menor número de árboles óptimos y con la menor cantidad de pasos en el árbol consenso.

Matriz	Programa	Estrategia	Gaps internos como estado			Gaps internos como missing			Modelo evolutivo jModelTest
			Árboles óptimos	Pasos	Cons. pasos	Árboles óptimos	Pasos	Cons. pasos	
COI (para filogenia por métodos tradicionales)	Clustal-W	por defecto	3	666	703	3	666	703	TVM+I+G
	Clustal-W	apertura 80/ extensión gaps 5	3	666	703	3	666	703	
	Muscle	por defecto	3	666	703	3	666	703	
	Muscle	Maxiters 2 - diags	3	666	703	3	666	703	
	BioEdit	Alineamiento aminoácidos	3	666	703	3	666	703	
COI (para filogenia por coalescencia)	Clustal-W	por defecto	21	984/5	1027	21	984/5	1027	TPM1uf+I+ G
	Clustal-W	Apertura 80/extensión gaps5	1	985	985	1	985	985	
	Muscle	por defecto	1	982	982	1	982	982	
	Muscle	Maxiters 2 - diags	1	985	985	1	985	985	
	BioEdit	Alineamiento aminoácidos	1	985	985	1	985	985	
Vwf (para filogenia por coalescencia)	Clustal-W	por defecto	2	526	527	2	526	527	TIMI+G
	Clustal-W	apertura 80/ extensión gaps5	2	546	547	2	546	547	

	<i>Muscle</i>	<i>por defecto</i>	2	526	527	2	526	527	
	<i>Muscle</i>	<i>Maxiters 2-diags</i>	2	508	509	2	508	509	
	<i>BioEdit</i>	<i>Alineamiento aminoácidos</i>	2	526	527	2	526	527	
<i>BRCA1 (para filogenia por coalescencia)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	2	877	879	2	877	879	<i>TVM+G</i>
	<i>Clustal-W</i>	<i>apertura / extensión gaps</i>	2	877	879	2	877	879	
	<i>Muscle</i>	<i>por defecto</i>	2	1084	1085	2	1084	1085	
	<i>Muscle</i>	<i>Maxiters 2-diags</i>	2	877	879	2	877	879	
	<i>BioEdit</i>	<i>Alineamiento aminoácidos</i>	2	877	879	2	877	879	
<i>COI (filogeografía Zaedyus)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	2	60	62	2	60	62	<i>HKY+I</i>
<i>D-loop (filogeografía Zaedyus)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	760	73	100	760	73	100	<i>HKY+I+G</i>
<i>COI+D-loop (filogeografía Zaedyus)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	90	200	733	90	200	733	<i>TIMI+I+G</i>
<i>COI+D-loop (filogeografía Zaedyus + outgroup)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	30	234	291	30	234	291	<i>TPM3uf+I+G</i>
<i>COI+D-loop, sin datos faltantes (filogeografía Zaedyus)</i>	<i>Clustal-W</i>	<i>por defecto</i>	110	103	120	110	103	120	<i>HKY+I</i>

Tabla 4: Detalles de las diferentes estrategias de alineamiento utilizadas para cada matriz y los árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de ellas. En gris se marcan las que generaron los árboles óptimos con menor cantidad de pasos y se muestra el Modelo evolutivo calculado a través del jModel Test para cada una de ellas.

Prueba de calidad de matrices

Previamente a los análisis filogenéticos y filogeográficos, se estimó la señal filogenética presente en los datos (matrices de secuencias) utilizando el programa TREE-PUZZLE (Schmidt y von Haeseler 2003) que implementa un algoritmo rápido, llamado “quartet puzzling” (Strimmer y von Haeseler 1996) y utiliza su propio método para evaluar la confiabilidad de los agrupamientos, permitiendo realizar un “Likelihood zapping”

(Strimmer y von Haeseler 1997) para estimar si la señal filogenética en nuestras secuencias es buena o contradictoria. Esto se logra evaluando la probabilidad posterior de las tres topologías resultantes de aplicar MV a grupos de cuatro secuencias (cuartetos) de la matriz estudiada. Y se obtiene un “Diagrama” de asignación de “probabilidad”, a partir del factor de elongación (conjunto de datos que mide la señal filogenética) que muestra los cuartetos resueltos, los parcialmente resueltos y los no resueltos, dando la pauta de la señal filogenética y el ruido que se tiene en la matriz.

Análisis interespecífico: Aportes moleculares a la filogenia de la familia Euphractinae

Como primer acercamiento para abordar el estudio de la evolución de la subfamilia Euphractinae a través del tiempo, se emplearon los tres métodos usualmente utilizados en estudios de sistemática filogenética: Cladística (MP), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Los análisis se realizaron con el marcador COI. No se ha incluido D-loop por no ser un marcador que se use para filogenia ya que su análisis no resuelve a nivel de relaciones entre especies. Sin embargo se encontró que este marcador presenta variación en su longitud entre y dentro de las especies de armadillos por poseer diferente número de repetidos, los que pueden llegar a aportar información sobre la filogenia de este grupo (ver más adelante), debiendo ser estudiado con mayor profundidad.

Un árbol basado en un gen no siempre representa las relaciones filogenéticas de las especies en estudio, por lo que para obtener una hipótesis filogenética robusta es necesario utilizar varios marcadores no ligados. Por ello, lo mejor es utilizar tanto marcadores mitocondriales como nucleares. El mayor desafío metodológico para utilizar ADN nuclear en estudios filogenéticos de especies cercanas es su baja tasa de mutación, por lo que estas especies tienen niveles bajos de divergencia de secuencia. Otro problema es el ruido que genera en la filogenia la herencia biparental y el proceso de “crossing-over”.

Análisis previos detectaron incongruencias entre filogenias basadas en otros genes mitocondriales y las derivadas de genes nucleares. Por lo tanto, en este estudio se realizó un “test de hipótesis” dentro de la subfamilia Euphractinae, bajo un método bayesiano de reconstrucción del árbol de especies basado en modelos coalescentes de múltiples especies (Heled y Drummond 2010) intentando sortear así la ambigüedad provocada por la rápida y reciente diversificación de este clado (Delsuc *et al.* 2004; Abba *et al.* 2015). Este método permite analizar las secuencias de todas las especies de la subfamilia con todos los marcadores disponibles que tuvieron al menos una secuencia por especie, que fueron COI y dos genes nucleares codificantes (exones). Finalmente, con la hipótesis filogenética con mayor soporte se hizo una reconstrucción de áreas ancestrales. Estas reconstrucciones permiten interpretar los datos derivados de estos estudios en un contexto evolutivo y biogeográfico.

Análisis filogenético para el marcador molecular del gen de la COI

Se utilizaron secuencias de este marcador para 16 especímenes pertenecientes a Euphractinae con varias secuencias para cada unidad taxonómica de la subfamilia, como así también 13 secuencias para representantes del

resto de las subfamilias de Cingulata y 6 secuencias del clado Pilosa que se utilizaron como outgroup. Obteniendo una matriz de alineamiento final del marcador del gen mitocondrial COI para los análisis filogenéticos tradicionales de 35 individuos totales y 658 pb. La mayoría de las secuencias fueron obtenidas para este estudio, pero también se utilizaron secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y Bold Systems (Apéndice 3). Para esta matriz todos los métodos de alineamiento, tanto considerando los gaps internos como 5to estado o como datos faltantes, produjeron el mismo resultado. El modelo de evolución que mejor se ajustó al alineamiento para este set de datos es TVM más sitios invariables, más la distribución gamma (TVM+I+G; ver más adelante tabla 3).

Se reconstruyó el árbol del gen empleando los tres métodos tradicionales de inferencias filogenéticas: máxima parsimonia (MP), Máxima verosimilitud (MV) e inferencias bayesianas (BI).

Máxima parsimonia (MP)

El análisis cladístico basado en la parsimonia consiste en la búsqueda de los cladogramas más cortos posibles. Como es un método estrictamente numérico, no hay requerimientos de un modelo que relacione estos árboles con un proceso biológico. En este trabajo se ha usado el programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.* 2008) para inferir las filogenias según MP. Se realizó una búsqueda tradicional usando TBR con 1000 secuencias al azar adicionadas. Con los árboles obtenidos se generó un árbol de consenso estricto, y en él se calcularon las frecuencias absolutas de los valores de soporte Jackknife con 1000 réplicas.

Máxima verosimilitud (MV)

Se utilizó el programa PHYML (Guindon y Gascuel 2003) para inferir la filogenia a partir del método de Máxima verosimilitud. Este programa fue diseñado para procesar conjuntos de datos de tamaños moderados a grandes, y utiliza métodos rápidos y eficientes para explorar el espacio de árboles y buscar el árbol más probable, es decir, la hipótesis con máxima verosimilitud. El análisis puede ser llevado a cabo asumiendo diferentes modelos de evolución, por lo que se configuró el modelo de sustitución (012314), y los valores de las tasas relativas para este modelo según lo calculado previamente para la matriz por el programa jModeTest, permitiendo que optimice los sitios invariables y la distribución gamma. El tipo de búsqueda de árbol fue Best of NNI and SPR. La robustez de los resultados fue estimada a partir de “bootstrap”, que es el método más utilizado para evaluar la confianza de las relaciones inferidas dentro de los árboles. En este análisis, el soporte de bootstrap para cada una de las ramas del árbol se obtuvo usando 1000 réplicas.

Inferencia Bayesiana (IB)

La IB calcula por medio de simulación a través de los Métodos de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) la probabilidad posterior (PP) de la distribución de un árbol, es decir la probabilidad de que una determinada hipótesis sea correcta conociendo el modelo de evolución y un conjunto de datos observados. Este análisis fue realizado en el programa MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist y Huelsenbeck 2003). La

corrida se realizó utilizando cuatro cadenas simultáneas (tres calientes y una fría) para 20.000.000 de generaciones con un espacio de muestreo cada 100 generaciones. Los parámetros del modelo se configuraron según el resultado para esta matriz de datos, el comando utilizado para configurar los parámetros del modelo TVM+I+G fue `lset nst=5 rates=invgamma`, ya que dicho modelo tiene dos de las seis tasas de sustitución iguales y variación entre sitios. Luego de evaluar el marcador de verosimilitud, el 10% de las generaciones fueron descartadas. El resto de los árboles obtenidos se utilizaron para calcular el árbol consenso final, que se visualizó en FigTree v1.2 (Rambaut 2011). Los parámetros de interés para evaluar la convergencia de las cadenas también se visualizaron con el programa Tracer v1.5 (Drummond y Rambaut 2007).

Test de hipótesis filogenéticas por el método bayesiano basado en coalescencia

Para estimar el árbol de especies de la subfamilia Euphractinae, se utilizaron 51 secuencias parciales del gen mitocondrial COI con una longitud de 658 pb, obtenidas en este estudio y otras disponibles en las bases de datos GenBank y Bold Systems. También se utilizó 19 secuencias del gen factor von Willebrand (vwf) con una longitud de 1145 pb y 17 del gen cáncer de mama 1 (BRCA1) de 2851 pb de longitud. Las secuencias de ambos exones nucleares provienen, en su mayoría, de los trabajos previos de filogenias moleculares sobre *Xenarthra* (Delsuc *et al.* 2002, 2004, 2012; Abba *et al.* 2015) disponibles en GenBank. Estos marcadores se analizaron simultáneamente utilizando BEAST v1.8 (Drummond *et al.* 2012) que implementa un método bayesiano basado en la teoría de la coalescencia y encuentra el árbol de especies más probable. Para ello, se incluyeron 87 individuos que representan a 15 especies de *Xenarthra* con al menos un individuo por especie para cada gen, pues si se consideran las particiones no vinculadas, no es necesario disponer de los mismos individuos analizados para cada marcador. El apéndice 3 muestra el número de individuos secuenciados para cada fragmento génico, para cada taxón, y los correspondientes números de acceso de GenBank. Primero se corrió el programa sin forzar ningún grupo, y luego se forzó a individuos de diferentes especies en unidades con el fin de probar varias hipótesis filogenéticas alternativas de grupos monofiléticos: (1) *Chaetophractus*; (2) *Euphractus* y *C. vellerosus*; (3) *Euphractus* y *C. villosus*; (4) *Zaedyus* y *Euphractus*; (5) *Zaedyus* y *C. vellerosus*; (6) *Zaedyus* y *C. villosus*.

Un archivo de entrada para BEAST se generó mediante el programa BEAUti v1.8 (Drummond *et al.* 2012) para cada hipótesis y para la corrida sin constricciones. Los tres marcadores se analizaron simultáneamente, fueron tratados como no enlazados, el nivel de ploidía para COI se analizó como "mitocondrial", y los genes restantes fueron designados como "autosómica nuclear" (default). Se eligió como "priors" los modelos más generales tanto para la estimación del árbol de especies ("Yule process", modelo básico de especiación sin extinción), como para estimar los tamaños poblacionales ("piecewise linear and constant root", modelo de tamaño poblacional constante).

Se utilizaron los modelos de evolución molecular calculados previamente para cada conjunto de datos específicos. La heterogeneidad y constancia de las tasas de evolución en estos linajes ya se puso a prueba en

Delsuc *et al.* (2003, 2004). De acuerdo con ello, fue seleccionado un modelo sin partición entre posiciones de los codones para el cálculo de las tasas de sustitución, y se utilizó un modelo “relajado” de reloj. Para calibrar las edades de los nodos en los “árboles de especies” se utilizó la edad de la raíz del árbol, es decir, la edad del clado *Xenarthra* (58 millones de años) según su registro fósil más antiguo (Vizcaíno *et al.* 1998) compatible con la edad estimada a partir de varios conjuntos de datos moleculares (Delsuc *et al.* 2001, 2004; Yoder y Yang 2000).

Se utilizaron los recursos disponibles en el Portal de Ciencia CIPRES (Miller *et al.* 2010) para realizar el análisis en el BEAST. El análisis se corrió ocho veces para 200.000.000 de generaciones, asegurando la convergencia; los árboles fueron muestreados cada 20.000 generaciones. La convergencia se infirió a través del tamaño de muestra efectivo (ESS) de parámetros de interés (árboles de genes, especies de árboles, la edad de la raíz), que estuvieron todos por encima de 200. El número de árboles guardados que fueron descartados como “burn-in” se determinó por el programa Tracer v1.5 (Drummond y Rambaut 2007), después de asegurar que la probabilidad de los resultados alcanzó una meseta. El árbol consenso se obtuvo con el programa Tree Annotator v1.7.

Los árboles se visualizaron en FigTree v1.2 (Rambaut 2011) presentando las probabilidades posteriores como el apoyo de ramas. Fue elegida la mejor hipótesis sobre la base de las probabilidades *a posteriori* de las ramas individuales, y en un análisis cualitativo de todos los “árboles de especies” a través del programa DensiTree 2.01 (Bouckaert 2010). DensiTree dibuja todos los árboles obtenidos en la corrida de BEAST usando líneas transparentes. En las zonas donde muchos árboles están de acuerdo en una topología específica y longitud de las ramas, se observa una zona densamente coloreada.

2.3.3.2.2. Análisis biogeográficos

Para abordar el estudio biogeográfico de la subfamilia Euphractinae se tuvieron en cuenta diez de las veinte especies de Cingulata actuales, siendo las especies utilizadas en el estudio filogenético bayesiano basado en coalescencia ya que se utilizó el árbol consenso obtenido en él como hipótesis filogenética para los análisis. También se definieron regiones geográficas teniendo en cuenta los principales biomas de América Latina (según mapa Andrés 2010, Apéndice 4). Cada una de estas fue codificada con una letra. Luego tomando las áreas de distribución de cada una de las especies de armadillos presentes en la filogenia según la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en su versión 2014/2017 (Abba *et al.* 2014a; Abba *et al.* 2014b; Anacleto *et al.* 2014a; Anacleto *et al.* 2014b; Anacleto *et al.* 2014c; IUCN SSC Anteater, Sloth and Armadillo Specialist Group 2017; Loughry *et al.* 2014; Noss *et al.* 2014; Superina y Abba 2014; Superina *et al.* 2014); también Apéndice 4, se obtuvo la codificación en regiones geográficas de la distribución de cada una de las especies para la realización de los análisis, lo que se muestra en la Tabla del Apéndice 4. Para *Dasypus novemcinctus*, la única especie que alcanza en su distribución el extremo sudeste de

América del Norte (Taulman y Robbins 2014; Shapiro *et al.* 2015), no se tuvo en cuenta su distribución en dicha región por ser una expansión reciente (Arteaga *et al.* 2012; Taulman y Robbins 2014; Feng y Papes 2015).

La reconstrucción de áreas ancestrales se realizó a través de tres métodos basados en eventos, utilizando el programa RASP (“Reconstruct Ancestral State in Phylogenies”) v3.1 (Yu *et al.* 2015). Al mismo tiempo, para cada método se realizaron dos análisis “restringidos” (Ronquist 1996), en los que se limitó el número de áreas permitidas en la distribución ancestral del grupo, suponiendo que el ancestro del grupo no estaba presente en todas las áreas que ahora ocupa sino que se originó en un “centro de origen” (una o varias áreas) desde donde se dispersó al resto de las áreas (Sanmartín 2003). El primer criterio de restringir el número de áreas, que en este caso son las áreas *sensu* Andrés (2010), fue considerar el número máximo de áreas en el que se distribuye cualquiera de los representantes actuales del grupo (10). Ya que resulta poco probable que el ancestro de los armadillos estuviera presente en una distribución tan extensa, en un segundo análisis se restringió el número de áreas a 4, para así poder obtener cuales serían las áreas más probables de formar parte de esta distribución ancestral (Sanmartín 2003). Igualmente, el resto de los armadillos se incluyó como grupo externo en el análisis biogeográfico; ya que el objetivo primordial de esta tesis es la subfamilia Euphractinae.

Los tres métodos son: Análisis de dispersión-vicarianza (DIVA), Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC) y Análisis Bayesiano Binario MCMC (BBM).

Análisis de dispersión-vicarianza (DIVA) (Ronquist 1997)

Se utilizó el análisis estadístico S-DIVA (“Statistical dispersal-vicariance analysis”) según la modificación propuesta por Nylander *et al.* (2008). El método basado en DIVA optimiza áreas ancestrales en los nodos de las filogenias, minimizando el número de dispersiones y extinciones en relación a eventos vicariantes (Ronquist 1997). Este nuevo método, llamado Bayes-DIVA o S-DIVA, calcula la optimización de las áreas sobre un conjunto de árboles tomando así la incertidumbre topológica en cuenta, pudiendo reducir las incertidumbres en las reconstrucciones biogeográficas por sí mismas (Nylander *et al.* 2008). Se utilizaron 15.000 árboles retenidos en el análisis bayesiano, descartándose un “burn-in” de 1.500 árboles.

Un análisis DIVA es propenso a errores cuando la historia biogeográfica incluye numerosos eventos de dispersión, ya que a menudo encuentra áreas ancestrales generalizadas hacia la base del árbol (Ronquist 1997; Kodandaramaiah 2009). Por lo tanto, también se realizó un análisis de rangos ancestrales utilizando los dos métodos siguientes.

Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC)

Este modelo, que fue diseñado por Ree *et al.* (2005) y Ree y Smith (2008), se basa en el principio de máxima verosimilitud y permite la comparación de modelos. Se infieren las probabilidades relativas de cada posible rango ancestral y los rangos en competencia según los diferentes escenarios. Los parámetros de máxima

verosimilitud son estimados para las tasas de migración entre áreas y extinciones locales dentro de las áreas. DEC tiene la ventaja de tomar una escala temporal de un cronograma para estimar las probabilidades de cambio entre los estados ancestrales de una rama. Dada una topología, el largo de las ramas y las distribuciones actuales de los taxones, este método encuentra los valores de los parámetros biogeográficos que maximizan la probabilidad de los datos observados. Este análisis fue originalmente escrito en lenguaje Phyton bajo el nombre de Lagrange (Ree y Smith 2008). El programa RASP usa el código de C++ de Lagrange, dado que es más rápido que la versión Phyton. En particular, se utilizó el árbol de consenso generado por BEAST, y se establecieron coeficientes de igualdad (= 1.0) en las matrices de adyacencia y dispersión. Esto permite que las especies se co-distribuyan libremente entre las regiones, y dispersen con probabilidades iguales entre ellas.

Análisis Bayesiano Binario MCMC (BBM)

Este método bayesiano para la reconstrucción de estados ancestrales, fue aplicado a estudios biogeográficos (Sanmartin *et al.* 2008). BBM modela dispersiones entre áreas como un proceso estocástico representado por una cadena de Markov, involucrando la transición entre dos o más estados discretos con diferentes probabilidades. Para correr este análisis, se ha utilizado el modelo F81. Este es el modelo más general y complejo implementado en el programa RASP.

Análisis intraespecíficos: Diversidad genética, estructura poblacional e historia demográfica de *Zaedyus pichiy* en Argentina

Para los análisis intraespecíficos se utilizaron las secuencias obtenidas en este estudio para los marcadores COI y D-loop. Ya sea analizando la matriz de ambos marcadores concatenados (COI + D-loop) o sus matrices por separado. La matriz obtenida de los marcadores concatenados resulto de 1115 pb de longitud (aproximadamente las 658 pb del código de barras de la COI + 460 pb de la primera porción del D-loop), contando con 112 secuencias de las que 37 son de individuos en los que se logro secuenciar ambos marcadores, 26 cuentan con secuencias para el marcador COI y 49 individuos para D-loop, teniendo así esta matriz una cantidad considerable de datos faltantes. Debido a esto también se utilizo una matriz mas chica de marcadores concatenados (COI+D-loop), sin datos faltantes de 28 secuencias y 967 pb. Como así también las matrices de los marcadores por separado reducidas a la mayor cantidad de secuencias y pares de bases con la menor cantidad de datos faltantes posible. Obteniendo para la matriz del marcador COI 59 secuencias de 492 pb de longitud, mientras que para el fragmento D-loop se obtuvo una matriz de 75 secuencias con una longitud de 405 pb.

Diversidad genética

Para describir la diversidad genética se identificaron haplotipos y se calcularon diferentes índices de variación molecular. Dado que cada marcador puede tener características propias, la diversidad molecular es descripta para cada marcador por separado y, posteriormente, para ambos marcadores mitocondriales

concatenados. Para cada población muestreada y la especie en su conjunto, se estimó: el número de haplotipos (k), la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (Π) (Nei 1987), y el número de sitios polimórficos (sitios informativos y no informativos). Para su cálculo se utilizó el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer 2010).

Estructura poblacional

Árbol de haplotipos

En cuanto al análisis de la estructura poblacional, se realizó un árbol de haplotipos mediante una aproximación bayesiana con el paquete de reconstrucciones genealógicas BEAST v1.8 (Drummond *et al.* 2012) a través del Portal de Ciencia CIPRES (Miller *et al.* 2010), utilizando los modelos de evolución molecular calculados previamente. La convergencia de los parámetros, estacionalidad de la cadena de MCMC, y el tamaño muestral efectivo para cada parámetro (EES), fue corroborado a través del programa Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond 2007). Este análisis se realizó con los haplotipos identificados a partir de una matriz de ambos marcadores mitocondriales concatenados, utilizando como grupo externo secuencias de *Chaetophractus vellerosus* para polarizar el árbol. Se contemplaron cuatro categorías discretas de sustitución nucleotídica, y el parámetro dedistribución gamma fue estimado por el programa. La corrida se llevó a cabo mediante el algoritmo Yule Process con 10.000.000 de interacciones de MCMC, muestreando todos los parámetros cada 1000 interacciones. Con el programa Tree Annotator v1.7 se obtuvo el árbol consenso, descartando como “burn-in” el número de árboles sugerido por el programa Tracer. Las medidas de soporte para cada clado son expresadas como probabilidad posterior, medida que representa la frecuencia con que fue encontrado cada uno de los nodos. La edición de los árboles fue realizada con los programas FigTree y CorelDraw.

Redes de haplotipos

Debido a que las genealogías intraespecíficas no se disponen de manera jerárquica, no son siempre dicotómicas y presentan un reparto incompleto de linajes, las redes de haplotipos son más apropiadas que los árboles filogenéticos para representar las relaciones dentro de una especie (Posada y Crandall 2001). Por esa razón se construyó una red de haplotipos para las matrices de cada marcador por separado y la matriz de los dos marcadores concatenados. Los gaps fueron considerados como 5to estado. Se utilizó el método Median-Joining Network (MJN) (Bandelt *et al.* 1999) y un análisis posterior de máxima parsimonia (Polzin *et al.* 2003) ejecutados a través del programa NETWORK 4.6.1.3 (www.fluxus-engineering.com). Para la edición gráfica de las redes se utilizó el programa CorelDraw.

Análisis de la Varianza Molecular

Con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer 2010) se obtuvo la tabla de las comparaciones pareadas de los índices de fijación (F_{st}) mediante las distancias de Tamura–Nei (Tamura y Nei 1993), para distinguir diferencias y/o similitudes entre las poblaciones. Luego se realizó el análisis de Varianza Molecular

(AMOVA) y se examinaron diferentes niveles de divergencia. Este análisis utiliza información de las secuencias de ADN para testear si existen diferencias entre grupos definidos *a priori* (Excoffier *et al.* 1992). Dichos grupos fueron definidos por varios criterios y serán explicados en la sección de los resultados. La varianza total de la muestra es descompuesta en porcentaje de variación entre los grupos, dentro de estos, y entre individuos de las poblaciones. La significancia de los índices de fijación se realiza mediante una prueba no paramétrica, donde se permutan haplotipos, individuos y poblaciones, y se vuelven a calcular los valores para comparar los estadísticos (Excoffier *et al.* 1992). En este estudio, la significancia fue obtenida mediante 1000 permutaciones.

Diversidad genética en el espacio, autocorrelación espacial y Test de Mantel

Se utilizó el programa Alleles in Space (AIS) (Miller *et al.* 2005) para realizar los tres análisis.

Para visualizar patrones de diversidad genética en el paisaje se utilizó la opción de interpolación genética con la forma del paisaje (“Interpolate Genetic Landscape Shape”, IGS). Este análisis se aplica a especies que se encuentran distribuidas de forma continua en una zona amplia, sin necesidad de definir poblaciones *a priori*, evitándose así la designación arbitraria de “poblaciones” cuando las distribuciones son continuas. Es útil tanto para análisis filogeográficos y análisis de estructura espacial, de manera de poder determinar la distribución, centro de diversidad genética para los marcadores (de manera de observar sus diferencias) y determinar visualmente posibles barreras genéticas.

Este procedimiento produce una proyección en tres dimensiones. Este gráfico de paisaje genético (“genetic lands capeshapes” GLS) es análogo a un mapa de topografía geográfica, donde las regiones con grandes distancias genéticas entre individuos de diferentes localidades de muestreo, son equivalentes a altas elevaciones, mientras que regiones con bajas diferencias genéticas son equivalentes a bajas elevaciones (Vignieri 2007). Es así como obtenemos un gráfico de tres coordenadas x , y , z , donde x e y corresponden a las coordenadas geográficas, y z a las distancias genéticas interpoladas representadas en peso (“heights”). Los análisis se realizaron con un tamaño de grillado de 50×50 y un valor de 1 para el peso de las distancias, a partir de secuencias mitocondriales (COI y D-loop) de *Zaedyus pichiy* y sus coordenadas geográficas.

Para evaluar si la especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de sus poblaciones, se realizaron dos análisis. En primer lugar, para conocer si existen correlaciones significativas entre el flujo genético y la distancia geográfica, se utilizó el test de Mantel (Mantel 1967) con 1000 permutaciones para probar la significancia estadística. En segundo lugar, se realizó un análisis de autocorrelación espacial. Para ADN mitocondrial, el programa AIS calcula D como el porcentaje/proporción de sitios no coincidentes entre pares de individuos. Para la autocorrelación, la distancia geográfica se dividió en 10 clases de distancia que poseían igual tamaño de muestra. El AIS calcula el estadístico A_y como la distancia genética promedio entre pares de individuos que caen dentro de

cada clase de distancias, teniendo en cuenta todos los *loci*. Así, A_{ij} toma valores de 1 cuando todos los individuos son diferentes, y valores de 0 cuando son idénticos.

Historia demográfica

Índices de diversidad y pruebas estadísticas

En esta sección se calcularon nuevamente valores de diversidad genética, pero agrupando los haplotipos sobre la base de los linajes obtenidos en la reconstrucción genealógica. Además, para evaluar posibles eventos de expansión demográfica o estabilidad, se estiman las distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias “mismatch distributions” (Rogers y Harpending 1992) utilizando nuevamente el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer 2010) así como los test de neutralidad “D” de Tajima (Tajima 1989) y “Fs” de Fu (Fu 1997) utilizando el programa DNAsp v5 (Hudson 1990). La evaluación estadística de estas pruebas se realizó mediante simulaciones coalescentes bajo aproximación canónica (Hudson 2001) es decir, se simulan muchos sets de datos bajo un modelo coalescente básico, y se comparan los parámetros obtenidos de los datos reales y de los simulados para calcular los límites de confianza de tales parámetros (Rozas *et al.* 2003).

Análisis bayesianos

Para inferir la historia evolutiva a través del tiempo y el espacio de *Zaedyus pichiy*, se emplearon técnicas de estimación bayesiana mediante el Software BEAST. Este paquete proporciona métodos eficaces de reconstrucción demográfica y difusión a través del tiempo y la filogeografía. Dado que estos análisis requieren gran poder de cálculo, se corrieron a través del Portal de Ciencia CIPRES (Miller *et al.* 2010) en el cluster disponible.

Para estos análisis se utilizó la matriz concatenada, utilizando el modelo de evolución molecular correspondiente calculado previamente. Es importante destacar que el cálculo de los parámetros de un modelo probabilístico completo requeriría un tiempo y esfuerzo computacional enorme, por lo que se utilizaron como “priors” un modelo de reloj molecular relajado, y la tasa de mutación estimada para el gen COI en el análisis filogenético de la subfamilia.

Reconstrucción demográfica

Para realizar la reconstrucción demográfica de *Zaedyus pichiy* se corrió el programa bajo los modelos bayesianos constante, “skyline-plot” y “sky-ride”. Los dos análisis se corrieron en BEAST v1.8 con 25.000.000 interacciones de las cadenas MCMC, muestreadas cada 5000 interacciones y con los “priors” ya mencionados. Los parámetros de la corrida fueron visualizados con Tracer v1.5. y fueron aceptables para los modelos constante y “skyline-plot”, por lo que con el mismo programa, posteriormente se compararon por el Factor de Bayes (FB). De esta forma, se estimó la variación en el tamaño efectivo poblacional (N_e) de la especie a través del tiempo

según el modelo que mejor se ajustó a los datos, pudiendo realizar el resumen visual de la reconstrucción demográfica también con el programa Tracer v1.5.

Filogeografía bayesiana de *Zaedyus pichiy* en Argentina

En la filogeografía bayesiana (Lemey *et al.* 2009) y, en particular, para el modelo espacial discreto, el análisis considera los puntos de muestreo como entidades discretas y, por lo tanto, los lugares inferidos de antepasados comunes sólo pueden darse dentro del conjunto de lugares observados en el muestreo. De hecho, en aquellas especies que se distribuyen de forma continua a lo largo del terreno que ocupa su distribución, las muestras se distribuyen a menudo de forma continua y son menos susceptibles para la naturaleza discreta del esquema de muestreo. Con el fin de eliminar la suposición de restricción del espacio discreto, Lemey *et al.* (2009) presentaron un modelo para estimar reconstrucciones filogeográficas que considera el espacio como un continuo, y propone dos modelos para el proceso de difusión. El modelo estricto de difusión browniano estándar (BD) supone que el proceso permanece homogéneo durante toda la filogenia, considerando que la misma velocidad de difusión se aplica a todas las ramas, en todo momento, y entre dos lugares (tasa de dispersión constante). Análogo a lo sucedido con los modelos de reloj molecular, el modelo de difusión “relax randomwalk” (RRW) relaja el supuesto más restrictivo del proceso, la constancia en la tasa de difusión en cada rama de la filogenia, pudiendo haber variación-rama específica en las tasas de dispersión (Lemey *et al.* 2010).

En este trabajo de tesis, se realizó el análisis bajo ambos modelos y se evaluó mediante la técnica de selección de modelos por FB, para comparar el modelo BD estándar contra RRW y ver cuál se ajusta a los datos.

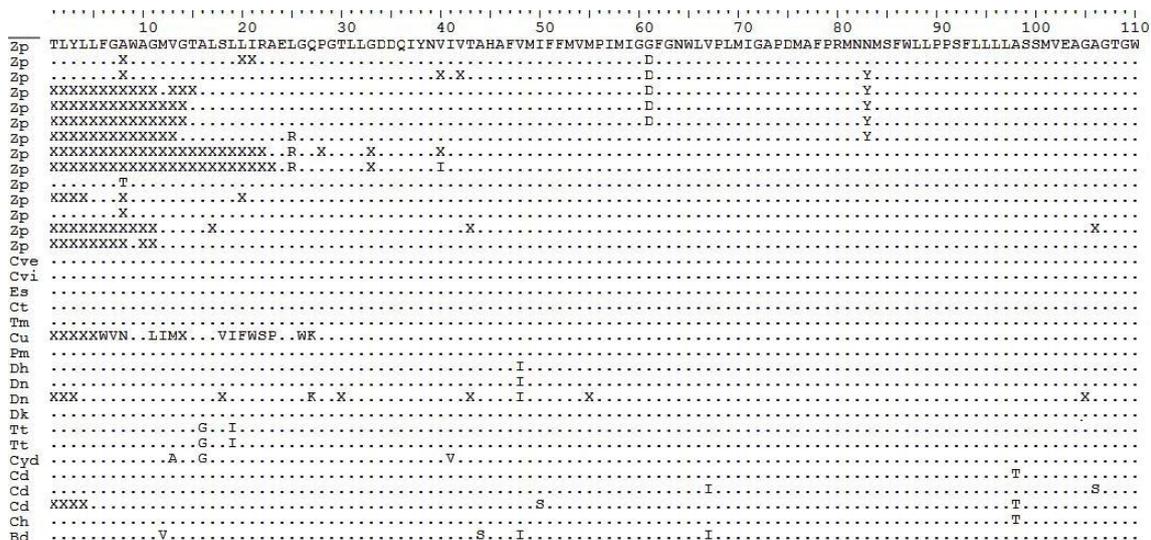
El archivo de entrada para el programa BEAST, con las especificaciones de las condiciones del análisis (“priors” ya mencionados y modelo demográfico elegido en el análisis anterior), se realizó en el programa BEAUti. La corrida se realizó en BEASTv1.8 y consistió en 20.000.000 de interacciones, con los parámetros muestreados cada 4000 interacciones. La convergencia de la corrida y la estacionalidad de los parámetros (ESS), así como el número de árboles descartando como “burn-in” fueron chequeados a través del programa Tracer v1.5. Posteriormente, se buscó el árbol consenso de máxima credibilidad utilizando el TreeAnnotator v1.7. El árbol obtenido representa la reconstrucción de la historia demográfica en espacio y tiempo. El último paso del análisis se realizó con el programa Spread v1 (Bielejec *et al.* 2011) que proporciona herramientas para construir proyecciones espacio-temporales de filogenias dando un archivo de polígonos (KML) para la visualización en paquetes de programas geográficos compatibles como Google Earth (disponible en <http://earth.google.com>). Una reconstrucción animada de la inferencia filogeográfica y espacio temporal que ilustra cómo la especie se extendió a través del tiempo, se realizó utilizando el cálculo de diversas estadísticas de resumen en puntos arbitrarios en el tiempo (p.ej., la tasa de dispersión, la direccionalidad, distancia ortodrómica recorrida). También se estimaron regiones de alta probabilidad de lugares ancestrales, a veces arbitrarias en el proceso de difusión. Las medidas naturales de incertidumbre producidas en estas inferencias, también se visualizan como polígonos KML.

Análisis estructural de las secuencias de los marcadores moleculares D-loop y COI en el Magorden Xenarthra

Análisis del marcador molecular Citocromo oxidasa c subunidad I (COI)

En el análisis del alineamiento del marcador COI fueron descartadas 35 secuencias obtenidas para este estudio pertenecientes a *Zaedyus pichiy*, 14 por su mala calidad (gran cantidad de ambigüedades y presencia de codón de parada o terminación) y 21 por tratarse de posibles secuencias de un pseudogen, observándose en ellas variación de su longitud: detectando una inserción de 3 pares de bases y un indel que generan desplazamiento del marco de lectura abierto conservado y modifican la secuencia aminoacídica, y con una tasa de sustitución más altas que las secuencias no descartadas, lo que apoya esta suposición. Por último, cuatro de estas secuencias presentan una porción de su secuencia repetida, lo que es característico de un pseudogen. Quedando finalmente 63 secuencias con una longitud de entre 492 a 658 pb del marcador COI.

En la Figura 4 se puede observar el alineamiento y la traducción de las secuencias nucleotídicas obtenidas para el marcador COI en secuencias aminoacídicas de los haplotipos encontrados para la especie *Zaedyus pichiy*, como así también para todas las especies de armadillos utilizadas en esta tesis. Pudiendose ver la variación de aminoácidos en la secuencia de los armadillos y en especial en *Zaedyus pichiy*, lo que marca la variación en codones y da una idea de la cantidad de sustituciones no sinónimas acumuladas.



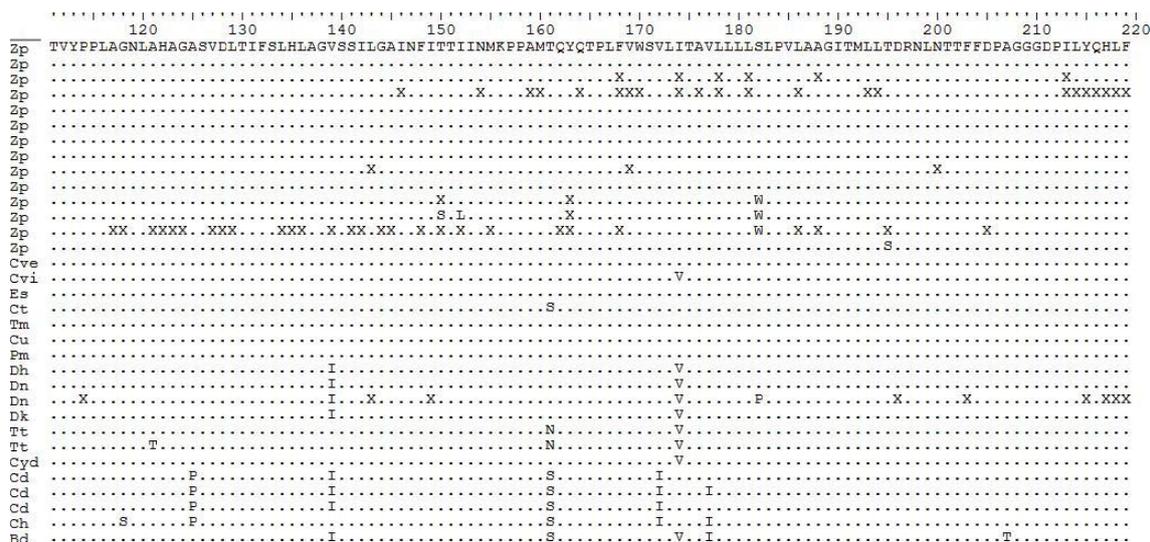


Figura 4: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas, obtenidas para el gen *COI*, traducidas en secuencias aminoacídicas de los haplotipos de las especies de armadillos utilizadas.

Análisis del marcador molecular de la Región Control (D-loop)

Analizando la estructura de 99 secuencias de la primera porción de la RC obtenidas para *Zaedyus pichiy* en este estudio y de secuencias de este marcador disponibles para varias de las otras especies de armadillos, se observa una estructura común en la que un fragmento de 80 pb funciona como un minisatélite, el cual se repite (a excepción de *Dasyurus kappleri*) dos, tres, cuatro o cinco veces, seguido casi siempre de una porción parcial del mismo fragmento de 47 pb. Todo este conjunto está flanqueado por una región 5' de 92 pb y otra 3' de 169 pb. Este tipo de repeticiones ya ha sido descrito en otros vertebrados (p.ej., Fumagalli et al. 1996; Gemmell et al. 1996; Terencio et al. 2012). Según la cantidad y tipo de repeticiones (total o parcial), se clasificó las secuencias de las especies de armadillos (Figura 5). Hasta el momento solo en *Zaedyus pichiy* se pudieron amplificar secuencias con variación en el número de repetidos (A, B y C). La presencia de doble banda en el gel de agarosa en varias muestras sugieren heteroplasmia, la obtención de la secuencia de tipo C y la reamplificación de la misma muestra donde se recuperó una secuencia parcial de tipo A apoyan esta suposición aunque debe estudiarse más profundamente.

La ausencia de múltiples tipos de secuencias en el resto de las especies puede deberse al bajo número de muestras secuenciadas; sin embargo, su análisis permite una primera aproximación. En este sentido, cabe destacar que aunque del género *Chaetophractus* se cuenta con un número grande de muestras, hasta el momento no se ha encontrado variación en esta porción de la RC (Poljak 2009).

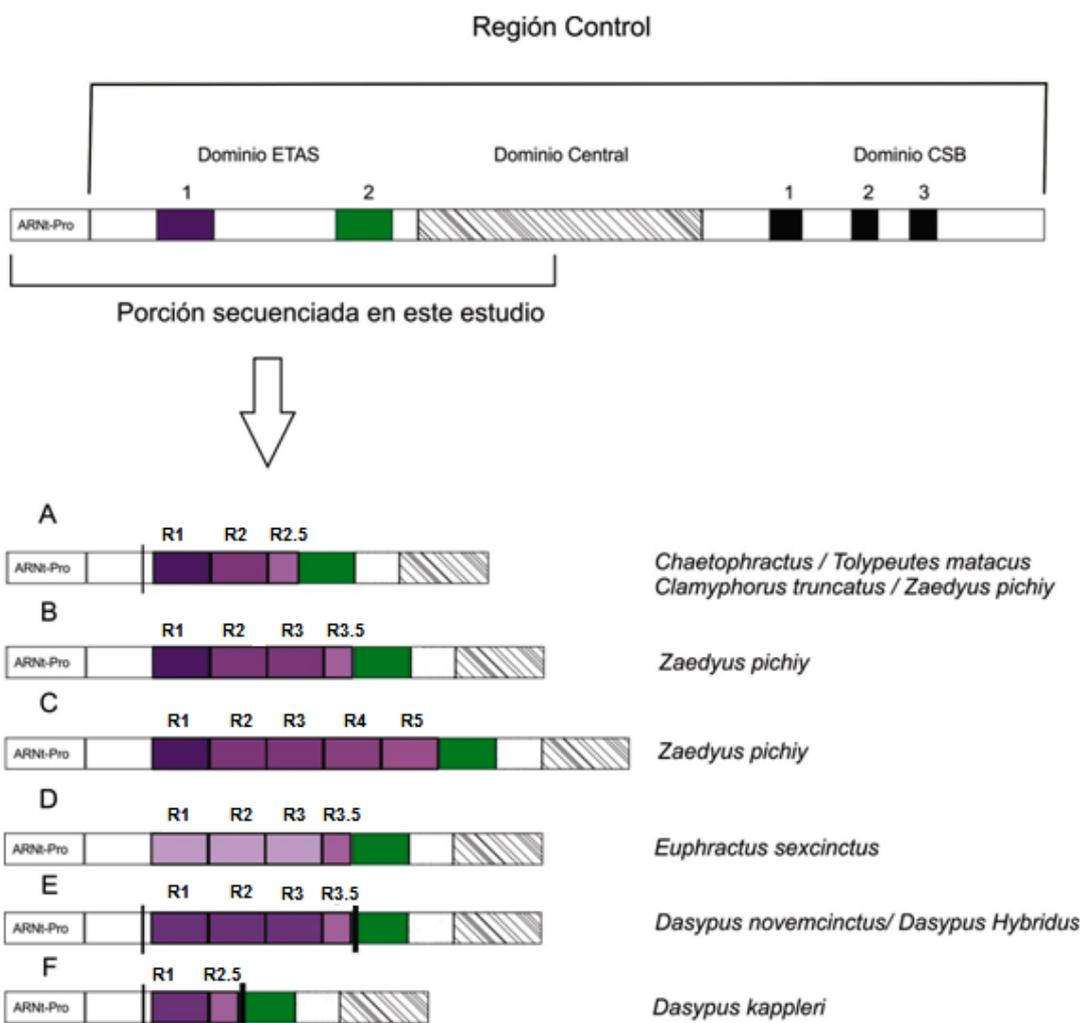


Figura 5: esquema de la primera porción de la Región Control y clasificación de las secuencias de armadillos según su estructura.

Tomando al repetido 1 de una secuencia tipo A de *Zaedyus pichiy* como referencia para alinear todos los repetidos de los diferentes tipos, mostrando solo una secuencia por especie y tipo para simplificar (ver alineamiento Figura 6) y centrándose en los *Euphractinae*, se observa que el repetido R1 es relativamente homogéneo en todas las especies, con la excepción de aquellas de *Euphractus sexcinctus*.

Consecuentemente, pueden diferenciarse claramente dos clusters para el repetido 1: a) la secuencia de *Euphractus sexcinctus* por un lado; b) todas las demás, repartidas en solo cuatro haplotipos con cero a dos diferencias respecto de la referencia.

En el repetido R2 se repite la situación: a) en *Euphractus sexcinctus* su secuencia es idéntica o muy parecida a su repetido 1; y b) los demás *Euphractinae* tienen una secuencia consenso que tiene varias diferencias respecto de la referencia (en su mayoría transiciones).

El repetido trunco (llamado 2.5 o 3.5 en el alineamiento) es el único en que *Euphractus sexcinctus* se parece a las demás especies de Euphractinae. La secuencia consenso del repetido trunco comparte, con la consenso del repetido 2 de los Euphractinae, la presencia de varias transiciones puntuales y lleva además otras.

Los repetidos extra (R3, R4 y R5) de las diferentes secuencias de *Zaedyus pichiy* son muy parecidos al consenso del repetido 2 para el grupo de los Euphractinae sin *Euphractus sexcinctus*.

En *Euphractus sexcinctus* el repetido 3 se diferencia por solo un cambio de R1 y R2 de esta especie.

En síntesis, los repetidos parecen evolucionar de modo muy distinto en *Euphractus sexcinctus* que en el resto: mientras que en la mayoría el repetido 2 es muy distinto del R1, en *Euphractus sexcinctus* ambos repetidos son en general idénticos. Esto también se puede ver realizando un árbol de distancias con las secuencias (Figura 7).

	5	15	25	35	45	55	65	75
Zp_A_rep01	TCCTATGTAT	TATCGTGCAT	ATATTTATTT	ACCCCATGCA	TATCATATAA	TACTATACAT	TAATAATCTT	ACATAGTACA
Zp_B_rep01C.....A...
ZP_C_rep01G..
Cve_A_rep01
Cvi_A_rep01C..
Es_D_rep01C...C.T.CA....
Es_D_rep02C...C.T.CA....
Es_D_rep03C..C..C.T.CA....
Zp_A_rep02	A....A...	.C.CC....T..
Zp_B_rep02	A....A...	.C.....
Zp_B_rep03	A....A...	.C.....A....
ZP_C_rep02	A....A...	.C.C...C.G..
ZP_C_rep03	A....A...	.C.C...C.A....
ZP_C_rep04	A....A...	.C.C...C.G..G..
ZP_C_rep05C.	A....A...	.C.C...C.GG.C	AGG...G..	...C.CG..
Cve_A_rep02	A....A...	.C.C...C.
Cvi_A_rep02	A....A...	.C.C...C.T..
ZP_A_rep02.5C.	A....A...	.C..C...C.	...A..C...
Zp_B_rep03.5C.	A....A...	.C..C...C.	...A..C...
Cve_A_rep02.5C.	A....A...	.C.CC...C.	...A..C...
Cvi_A_rep02.5	A....A...	.CG..C..C.	...AT..C...
Es_D_rep03.5C.	A....A...	.C..C...C.	...A..C...
Tm_A_rep01	.TT.....	A....A...	.C..C...C.A..GT.T..	..T.....
Tm_A_rep02	.A.....	A....A...	.C..C...C.A..AT.T..	..T.....
Tm_A_rep02.5	.A.....	A....A...	.C..C...C.
Ct_A_rep01	CG.....	A....A...	.A....C..GGT.
Ct_A_rep02	.T.....	A....A...	.CTA...A.	T.....GT.CAG..
Ct_A_rep02.5C.	A....A...	.C....CAG	T.....A..
Dk_F_rep.1	CG.....	AT.....	.C..C...C.A..-T.A.T.C	..T...A..A....
Dn_E_rep01	CG.....	AT.....	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....
Dh_E_rep01	CG.....	AT.....	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....C...
Dn_E_rep02	.T.....	A...ACA...	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....
Dh_E_rep02	A...ACA...	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....C...
Dn_E_rep03	.T.....	A...ACA...	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....C...
Dh_E_rep03	A...ACA...	.C..C...C.A..TAT.ACT..	..T.....C...
Dk_F_rep.1.5	.T.....	A....A...	.C..C.C.C.	T.....	G....
Dn_E_rep03.5	.T.....	A...ACA...	.C....C.
Dh_E_rep03.5	A...ACA...	.C.CC...C.

Figura 6: Alineamiento de secuencias de la primera porción de la Región Control.

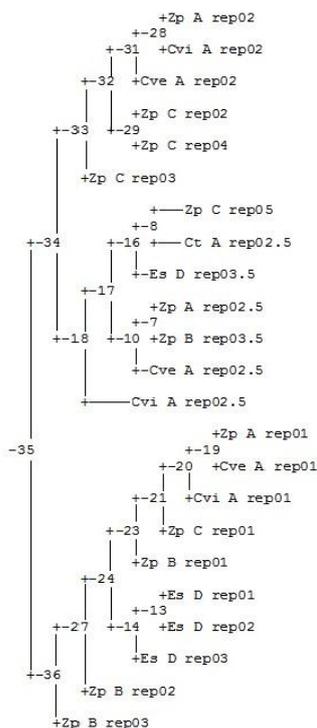


Figura 7: Árbol de similitud a través de método Neighbor-joining para alineamiento de repetidos, se muestra el recorte de los Euphractinae.

En función de los resultados obtenidos, la aparición de un tercer repetido es un evento que ha ocurrido al menos dos veces en este grupo, por lo cual sería importante seguir secuenciando muestras para las especies de *Chaetophractus*, ya que cabría esperar que aparecieran individuos con 3 repetidos.

Por otro lado, si se analizan las secuencias de la RC, sin tener en cuenta las repeticiones, las diferencias entre secuencias de las especies de Euphractinae no separan claramente a sus especies. Debido a esto, y como ya se mencionó, es que el marcador D-loop no se utiliza para diferenciar especies ya que no resuelve dada la alta variabilidad que presenta. Sin embargo encontramos posible analizar y mostrar la variación estructural de sus distintas regiones en las especies de armadillos en un contexto filogenético. Consecuentemente, comparar el número y composición de las repeticiones para analizar la filogenia de los euphractinos puede ser otro aporte válido a la discusión, que según distintas hipótesis relacionan alternativamente a sus géneros entre sí (*Zaedyus*+*Chaetophractus* o *Euphractus*+*Chaetophractus*).

Que los repetidos R1 sean iguales entre *Zaedyus pichiy* y *Chaetophractus* así como también sus repetidos R2, mientras que en *Euphractus sexinctus* los repetidos R1, R2 y R3 son parecidos entre sí, da la pauta de una mayor cercanía entre *Zaedyus* y *Chaetophractus*. Asimismo, que el repetido trunco sea parecido en los tres géneros supondría que ello ocurrió por convergencia o, más probablemente, antes de la separación de los géneros y la aparición de los repetidos enteros luego de la separación de *Euphractus* y *Zaedyus*+*Chaetophractus*. Esta hipótesis, sin embargo, no concuerda con la filogenia clásica de la subfamilia Euphractinae (Figura 8).

Observando los repetidos en el resto de las especies de armadillos, encontramos al repetido trunco en todas las especies, dando la pauta de mayor ancestralidad aún. Analizando al género *Dasyurus* se observa que también hay variación en el número de repetidos entre sus especies, pero la hipótesis más parsimoniosa de la aparición de los repetidos en este caso no estaría en conflicto con la filogenia del género.

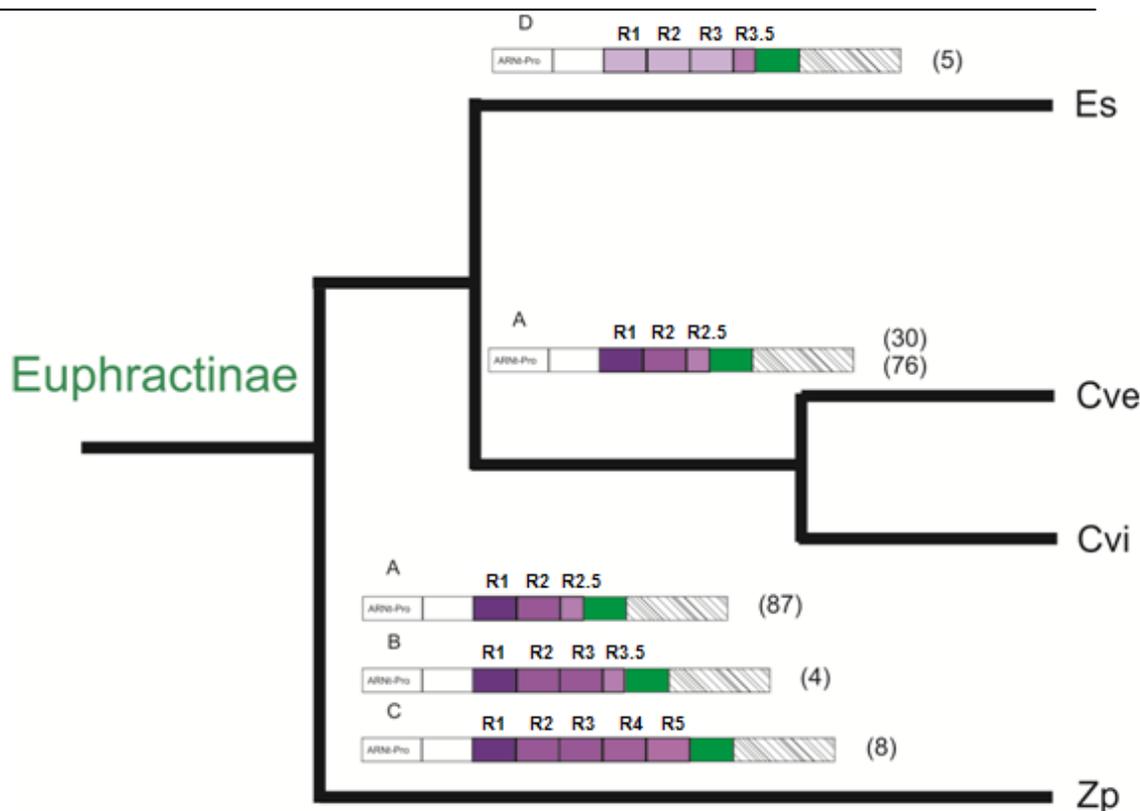


Figura 8: Representación de la filogenia clásica de la subfamilia Euphractinae mostrando la relación entre sus especies junto con los esquemas de los tipos estructurales de la primera porción de la Región Control según la clasificación de la Figura 2 encontrados en cada una de ellas.

Prueba de calidad de matrices

En la Figura 9 se muestran los diagramas de asignación de probabilidad que se calcularon con el programa TREE-PUZZLE para cada una de las matrices de datos utilizadas en este trabajo. El porcentaje de cuartetos sin resolver por completo se muestra en el centro del diagrama de triángulo, mientras que los porcentajes de los cuartetos en parte resueltos están en los lados del triángulo, siendo su total la suma de esos valores. Finalmente, los valores de los cuartetos resueltos se encuentran en los vértices.

La medición de la señal filogenética en el conjunto de datos de la matriz de secuencias del marcador COI utilizada para el análisis filogenético por métodos tradicionales, muestra el 11% de cuartetos no resuelto y el 6,1% de cuartetos en parte resueltos, teniendo por lo tanto esta matriz un 17,1 % de sus datos que no aportan información, o son una fuente de ambigüedad (Figura 9.1).

Por otra parte, las matrices de secuencias utilizadas para el análisis filogenético por el método del coalescente muestran: para el marcador COI un 6,9% de cuartetos no resueltos y 3,2% de cuartetos en parte resueltos, que juntos hacen un 10,1% del total de los cuartetos (Figura 9.2.a); para el marcador Vwf un 5,1% de cuartetos no resueltos y un 3% de cuartetos en parte resueltos, dando un 8,1% del total de los cuartetos (Figura 9.2.b); y para el marcador BRCA1 que tiene un 2,8% de cuartetos no resueltos y 0,7% de cuartetos en parte resueltos, lo que suma un total de 3,5% (Figura 9.2.c). Se observa por lo tanto que la matriz del marcador mitocondrial tiene una menor señal filogenética, y mayor ambigüedad que los marcadores nucleares utilizados.

Para la matriz de secuencias concatenadas de los marcadores COI+D-loop con outgroup, utilizada para los análisis filogeográficos, se muestra un 28,5% de cuartetos no resueltos y un 13,8% de cuartetos en parte resueltos, teniendo por lo tanto esta matriz un 42,3% del total de los cuartetos sin resolver (Figura 9.3.a). Este alto porcentaje podría deberse a que TREE-PUZZLE, además de medir la probabilidad de resolución de los cuartetos, también cuenta la cantidad de datos faltantes y caracteres ambiguos por secuencia y para la alineación completa, por lo que las secuencias individuales que contienen una gran cantidad de lagunas (datos faltantes “n” seguidos), que es lo que sucede en esta matriz debido a que no se logró amplificar los dos marcadores para todas las muestras ni todas las secuencias tienen la misma longitud, aumenta la inexactitud y disminuye la señal filogenética, que también tiene como fuente de inexactitud a los caracteres ambiguos así como una posible falta de sitios comunes con otras secuencias.

Para la matriz de secuencias del marcador COI+D-loop utilizada para los análisis filogeográficos sin outgroup, se muestra un 15,7% de cuartetos no resueltos y un 4% de cuartetos en parte resueltos dando en su conjunto un 19,7% del total (Figura 9.3.b). Mientras que para la matriz de secuencias del marcador COI utilizada para los análisis filogeográficos se observa un 24,3% de cuartetos no resuelto y un 1,5% de cuartetos en parte resueltos, que sumados dan un 25,8% (Figura 9.3.c). Finalmente, para la matriz de secuencias del marcador D-loop utilizada para los análisis filogeográficos, el porcentaje de cuartetos no resuelto es de 23,9% y de cuartetos en parte resueltos es de 7,5%, dando en conjunto un 31,4% (Figura 9.3.d). Estos porcentajes son relativamente altos y, como ya se mencionó, el porcentaje de los cuartetos sin resolver entre todos los cuartetos posibles es un indicador de la idoneidad de los datos para los análisis filogenéticos y filogeográficos. En este sentido, un alto porcentaje resulta por lo general en un árbol altamente politómico, de relaciones no resueltas o con poco apoyo (Schmidt y von Haeseler 2003).

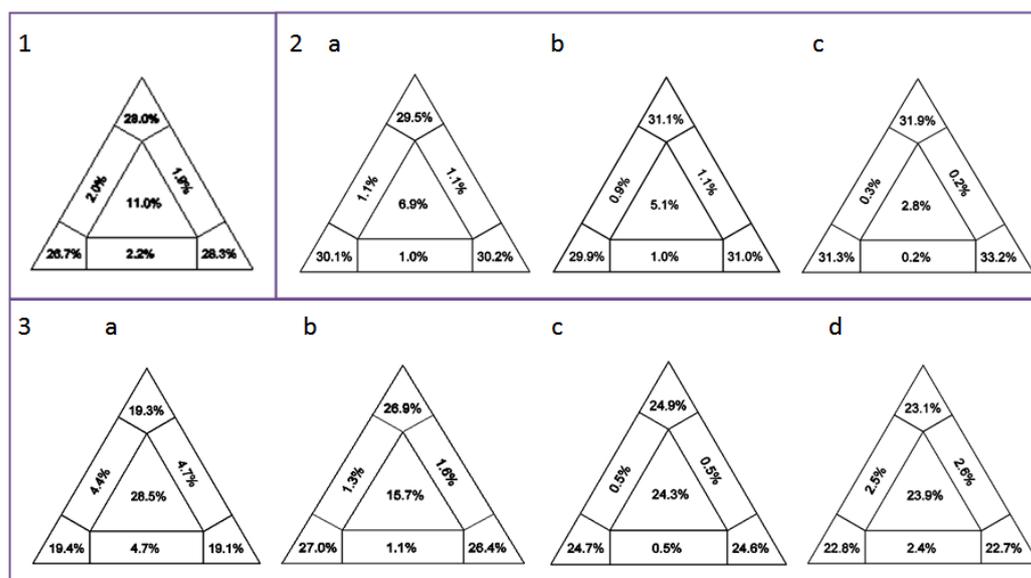


Figura 9. Diagramas para: 1) Matriz de secuencias del marcador COI utilizada para el análisis filogenético por métodos tradicionales; 2.a) Matriz de secuencias del marcador COI utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 2.b) Matriz de secuencias del marcador Vwf utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 2.c) Matriz de secuencias del marcador BRCA1 utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 3.a) Matriz de secuencias concatenadas de los marcadores COI+D-loop, con outgroup, utilizada para los análisis filogeográficos; 3.b) Matriz de secuencias del marcador COI+D-loop utilizada para los análisis filogeográficos; 3.c) Matriz de secuencias del marcadores COI utilizada para los análisis filogeográficos; 3.d) Matriz de secuencias del marcadores D-loop utilizada para los análisis filogeográficos.

Análisis interespecífico: Aportes moleculares a la filogenia de la subfamilia Euphractinae

Análisis filogenético para el marcador molecular del gen COI

Máxima parsimonia (MP)

En la Figura 10 se presenta el árbol de consenso estricto con 703 pasos, derivado de los tres árboles óptimos (cada uno con 666 pasos) obtenidos del alineamiento elegido, y considerando los gaps internos como datos faltantes.

El árbol presentado recupera con un soporte de Jackknife de 100 a la subfamilia Euphractinae como un clado monofilético, pero no resuelve con buena medida de soporte la relación entre sus especies, aunque éstas sí se definen claramente. No se recupera la subfamilia Tolypeutinae ni la relación entre las subfamilias de Chlamyphoridae, formándose una gran politomía junto con *Tamandua tetradactyla*, representante de Pilosa, que forma parte del outgroup. Debido a esto tampoco se recupera el clado de la familia. Por otra parte la familia Dasypodidae está bien soportada, así como también la relación entre las especies que la representan, siendo *Dasypus kappleri* la especie hermana del clado que forman *Dasypus novemcinctus* y *Dasypus hybridus*.

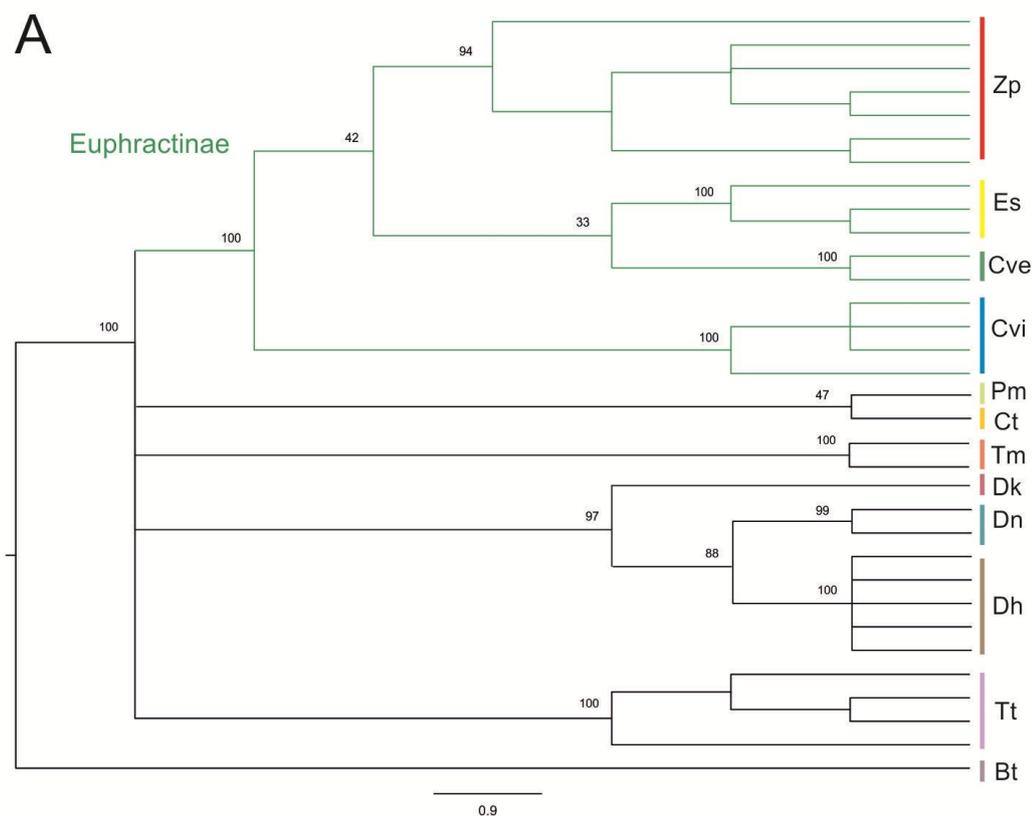


Figura 10: Consenso estricto (703 pasos) de los 3 árboles obtenidos por máxima parsimonia. En los nodos se muestra el soporte de Jackknife con frecuencias absolutas. Acrónimos de las especies: *Euphractus sexcinctus* (Es), *Chaetophractus vellerosus* (Cve), *Chaetophractus villosus* (Cvi), *Zaedyus pichiy* (Zp), *Chlamyphorus truncatus* (Ct), *Tolypeutes matacus* (Tm), *Cabassous unicinctus* (Cu), *Priodontes maximus* (Pm), *Dasypus novemcinctus* (Dn), *Dasypus kappleri* (Dk), *Dasypus hybridus* (Dh), *Cyclopes didactylus* (Cyd), *Tamandua tetradactyla* (Tt), *Bradypus tridactylus* (Bt), *Choloepus didactylus* (Cd) y *Choloepus hoffmanni* (Ch).

Máxima verosimilitud (MV)

El árbol de MV obtenido en el programa PhyML se muestra en la Figura 11. Este análisis, al igual que el anterior (MP), recupera claramente (valor de Bootstrap de 100) a la subfamilia Euphractinae como un clado monofilético y no resuelve con buena medida de soporte la relación entre sus especies. Sin embargo, en este resultado *Zaedyus pichiy* tiene un bajo soporte mientras que las restantes especies de esta subfamilia sí se definen claramente. Tampoco se recupera la subfamilia Tolypeutinae ni la relación entre las subfamilias. El clado de la familia Chlamyphoridae se visualiza con un soporte muy bajo. La familia Dasypodidae está bien soportada y la relación entre las especies que la representan es la misma que en el árbol de MP (Figura 10). El clado que forman todos los Cingulata tiene soporte bajo separándose del outgroup Pilosa, que se recupera como un clado monofilético.

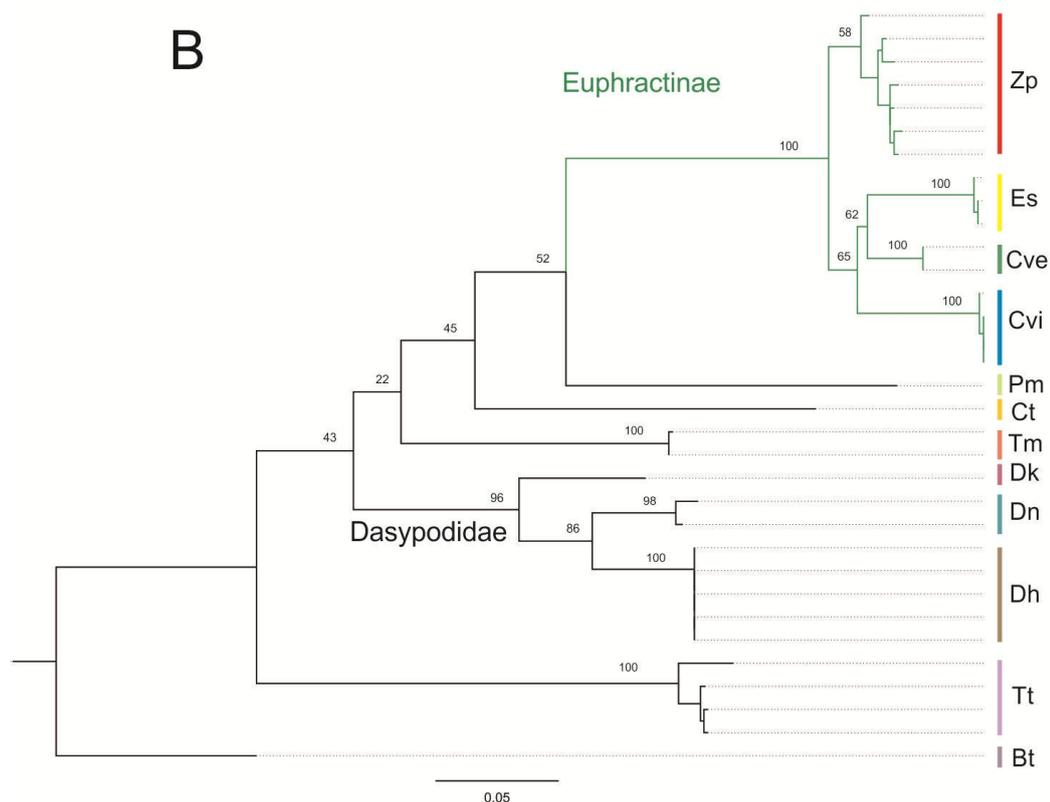


Figura 11: *Árbol de Máxima Verosimilitud para los armadillos estudiados basado en porción del gen mitocondrial COI. Los valores sobre las ramas son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas. Para los acrónimos de las especies, véase la Figura 7.*

Inferencia Bayesiana (IB)

El árbol reconstruido por IB mediante el programa MrBayes para el gen mitocondrial COI, se muestra en la Figura 12. Se presentan los valores de probabilidades posteriores (PP) en cada rama del árbol, para evaluar su soporte.

En los resultados aportados por IB, al igual que en los análisis de MP y MV, todos los representantes de la subfamilia Euphractinae forman un clado monofilético bien sustentado (1 PP). Del mismo modo que en el árbol MV, las especies dentro de este clado se definen con un buen soporte. Al igual que en los análisis anteriores (MP y MV, Figuras 10 y 11) la relación entre las especies de la subfamilia no se define, observándose una gran politomía (Figura 12).

Tampoco se recupera la subfamilia Tolypeutinae, conformando *Priodontes maximus* un clado bien soportado (0,95 PP) con el clado de la subfamilia Euphractinae, y siendo parte de un clado mayor también bien soportado (0,98 PP), con *Chlamyphorus truncatus* como grupo hermano y *Tolypeutes matacus* como grupo hermano de todo el clado. La familia Dasypodidae aparece como un grupo monofilético bien soportado (1 PP) y la relación

entre sus especies es idéntico al presentado por MP y MV (Figuras 10 y 11), como también su separación temprana de *Chlamyphoridae*.

El análisis IB es el único que recupera el clado *Cingulata* con un buen soporte (0.91 PP), separándose del outgroup, que no se recupera como un clado monofilético.

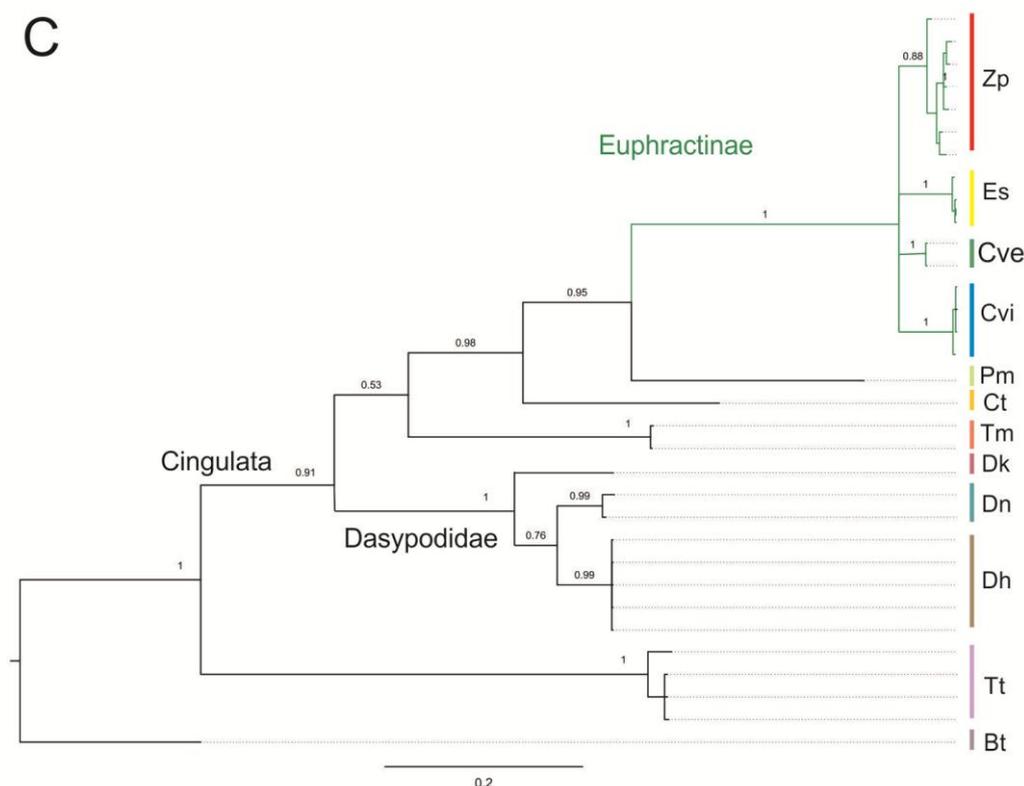


Figura 12: *Árbol de Inferencia Bayesiana para los armadillos estudiados basado en el gen mitocondrial COI. Los valores sobre las ramas son las probabilidades posteriores. Para los acrónimos de las especies, véase la Figura 7.*

Test de hipótesis filogenéticas por el método bayesiano basado en coalescencia

Análisis de los datos genéticos

La diversidad genética varía entre las particiones de datos: el gen mitocondrial tenía mayor número de sitios informativos en comparación con los *loci* nucleares (Tabla 5). La tasa de sustitución / linaje / Myr inferida por *beast para COI en relación con las tasas de BRCA1 y VWF2, también fue más alta para el gen mitocondrial que para los nucleares (Tabla 5).

<i>Gen</i>	<i>n</i>	<i>L</i>	<i>PI</i>	<i>Modelo</i>	<i>S</i>
<i>COI</i>	51	658	171	<i>TPM1uf+I+G</i>	6.982E-7
<i>BRCA1</i>	17	2851	287	<i>TVM+G</i>	4.64E-8
<i>VWF2</i>	19	1145	146	<i>TIMI+G</i>	7.365E-8

Tabla 5: Información acerca del datasets para cada fragmento génico analizado en el estudio filogenéticos por método bayesiano basado en coalescencia de la subfamilia Euphractinae. Referencias: *n*, número de individuos analizados para cada fragmento génico; *L*, longitud del alineamiento de secuencias (en pb); *PI*, número de sitios parsimoniosamente informativos; *Modelo*, modelo de evolución molecular; *S*, tasa de sustitución por sitio / Myr / linaje, Inferidas por *beast* en este estudio.

La reconstrucción del árbol de genes

La topología del árbol obtenido a partir del análisis Bayesiano particionado se muestra en la Figura 13. Se definió a los representantes de *Pilosa* como grupo externo. El orden *Cingulata* se recupera bien, con las familias *Dasypodidae* y *Chlamyphoridae* y las Subfamilias *Euphractinae* y *Tolypeutinae* y las relaciones entre ellas con fuerte apoyo por las altas probabilidades posteriores Bayesianas (BPP). El bajo soporte de la rama que definiría a *Chlamyphorus truncatus* como tribu *Chlamyphorini* dentro de la subfamilia *Tolypeutinae*, apoya la propuesta sistemática vigente en su recategorización en la subfamilia *Chlamyphorinae* como se sugiere en *Delsuc et al.* 2012.

Dentro de la subfamilia *Euphractinae*, las especies se agrupan en función de la clasificación taxonómica tradicional. Se recupera a *Zaedyus pichiy* como la primera especie en divergir, luego el grupo que contiene a *E. sexcintus* y a *Chaetophractus* (con un apoyo moderado, 72%) y presentando un bajo soporte (40%) la monofilia de *Chaetophractus*.

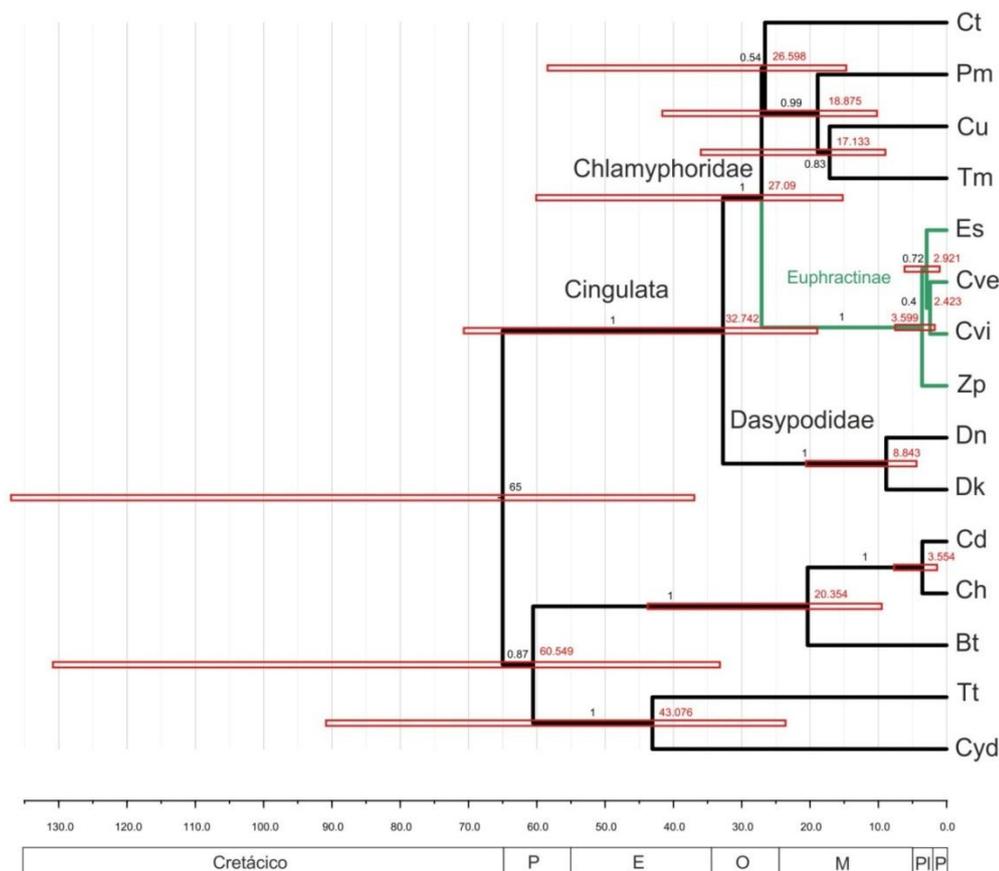


Figura 13. Topología del árbol obtenido del análisis Bayesiano particionado del conjunto de datos concatenados de los marcadores COI, BRCA1 y VWF2 para los armadillos estudiados. Muestra las edades de los nodos correspondientes a las relaciones entre las especies; barras en los nodo indican intervalos de alta confianza del 95% (HPD) para las edades de los nodos. Para la nomenclatura de especies, ver tabla 2. Los números sobre las ramas indican probabilidades *a posteriori* (BPP).

Los árboles obtenidos en la sección anterior (a través de los análisis de MV, IB, y MP en base a la alineación del gen COI) no pudieron resolver las relaciones dentro de la subfamilia Euphractinae. Por otra parte, la topología del árbol reconstruido a través del análisis Bayesiano particionado resuelve en parte estas relaciones, ya que el clado *Euphractus* + *Chaetophractus* recibe un apoyo moderado, y las relaciones entre las especies no se resuelven bien (poco apoyo) lo que sugiere que podría tratarse de una tricotomía.

Con respecto a la estimación de las fechas de los eventos de diversificación, la Figura13 muestra que la subfamilia Dasypodinae es la que diverge tempranamente (32,74 Ma, 95% HPD: 18,94 -70, 69) seguida por la diversificación de las subfamilias Tolypeutinae+Clamyphorinae y Euphractinae, que se remonta a 27,09 Ma (95% HPD: 15,22-60,09). El origen del clado que contiene a las especies actuales de Euphractinae se encuentra en 3,60 Ma (95% HPD: 1,75-7,53), no siendo totalmente coincidente con la separación entre las especies de *Dasyypus kappleri* y *Dasyypus hybridus* como se propone en Delsuc *et al.* (2004), ya que la edad de ese clado en este estudio es

de 8,84 Ma (95% HPD: 4,40-20,58). Siendo igualmente ambos eventos posteriores a la formación de la estepa patagónica y la Región Pampeana que se cree han tenido lugar en el Mioceno medio y tardío (Pascual y Ortiz-Jaureguizar 1990; Pascual *et al.* 1996; Latorre *et al.* 1997; Ortiz-Jaureguizar 1998; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006; Tonni y Carlini 2008; Iglesias *et al.* 2011; Goin *et al.* 2015).

Dentro del clado que contiene a las especies actuales de Euphractinae, la separación entre *Zaedyus pichiy* y *Euphractus sexcintus* + *Chaetophractus* es de 2,92 Ma (95% HPD: 1,02-6,16), mientras que el clado donde se diferencia el género *Chaetophractus* en sus especies tiene una edad estimada de 2,42 Ma.

Delimitación de las relaciones entre especies

Para esclarecer las relaciones que obtuvieron poco apoyo, es decir, que obtuvieron bajas probabilidades posteriores bayesianas (BPP) en la topología del árbol reconstruido a través del análisis Bayesiano particionado, se utilizó el programa DensiTree para visualizar todos los árboles calculados y así ver la cantidad de ramas de común acuerdo con la topología del árbol consenso y las ramas en conflicto con ella. Este análisis se muestra en la Figura 14 junto con un recorte y acercamiento de las relaciones entre las especies de la subfamilia Euphractinae. En el recorte se observan pocas ramas en rojo, sugiriendo poca ambigüedad, y mayor cantidad de ramas en verde, que indican diferentes tiempos de divergencia u otro posible arreglo de ramas que no causa un desarreglo mayor o se halle en discordancia con otros arreglos de ramas bien soportados. Líneas rojas se observan en relación a *C. villosus*, como también abundantes líneas verdes que marcan una rama densa entre *Chaetophractus villosus* y *Euphractus sexcintus*, entrando en conflicto con las líneas en azul, que marcan las ramas entre las especies del género *Chaetophractus* que soportan el arreglo del árbol consenso.

Con el fin de comparar el apoyo de las relaciones entre las especies de la subfamilia Euphractinae obtenida en la filogenia calculada a través de sus BPP y su plot obtenido en DensiTree, se probaron diferentes hipótesis de relaciones entre dichas especies y se hizo dicha comparación mediante las BPP recuperadas por ramas individuales (es decir, por los árboles consenso) y por visualización de todo el conjunto de árboles, utilizando el programa DensiTree (Figura 15.A-F).

Zaedyus pichiy se resolvió como el grupo hermano de los restantes taxones en las hipótesis con mayor apoyo (Figura 15.A, B y C). Las hipótesis que forzaron el agrupamiento de *Z. pichiy* con alguna de las dos especies de *Chaetophractus* recibieron los apoyos más bajos, teniendo también muy bajo apoyo la hipótesis que agrupaba a *Z. pichiy* con *E. sexcintus* (Figura 15.D). La hipótesis que recibió mayor apoyo fue la que agrupó a *E. sexcintus* con *C. vellerosus* (Figura 15.B). Sin embargo, la hipótesis que agrupa a *C. villosus* con *C. vellerosus* (taxonomía actual, Figura 12.A) y la hipótesis que agrupa a *E. sexcintus* con *C. villosus* (Figura 15.C) tienen BPP similares, siendo la última la que presenta menos ramas ambiguas según la visualización del plot generado por Densitree.

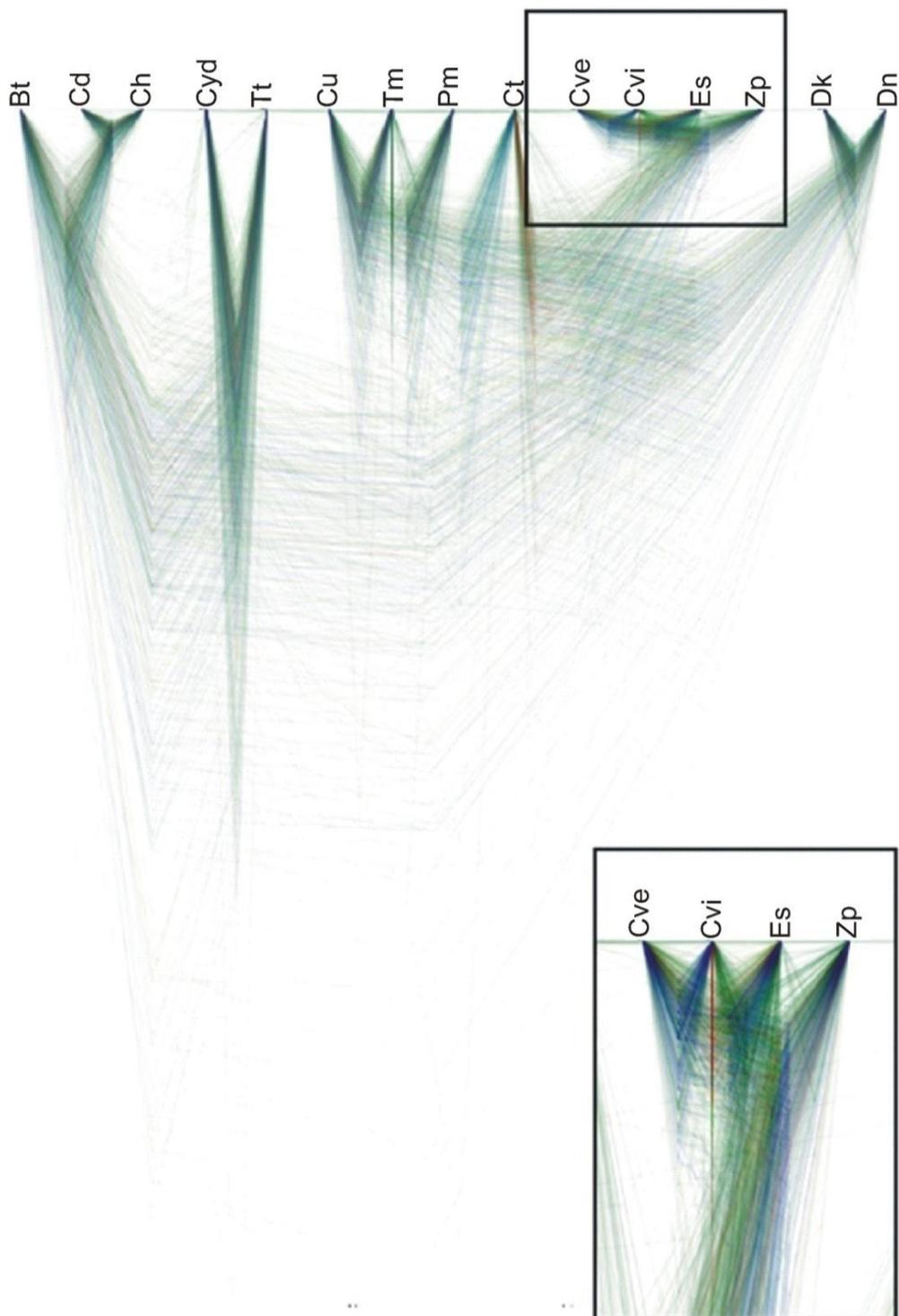


Figura 14: Visualización del árbol obtenido del análisis Bayesiano particionado del conjunto de datos concatenados de los marcadores COI, BRCA1 y VWF2 para los armadillos estudiados utilizando el programa DensiTree. Recorte y acercamiento de las relaciones entre las especies de la subfamilia Euphractinae. En azul se indican las ramas de común acuerdo con la topología del árbol consenso mientras en rojo se muestran las ramas en conflicto con ella.

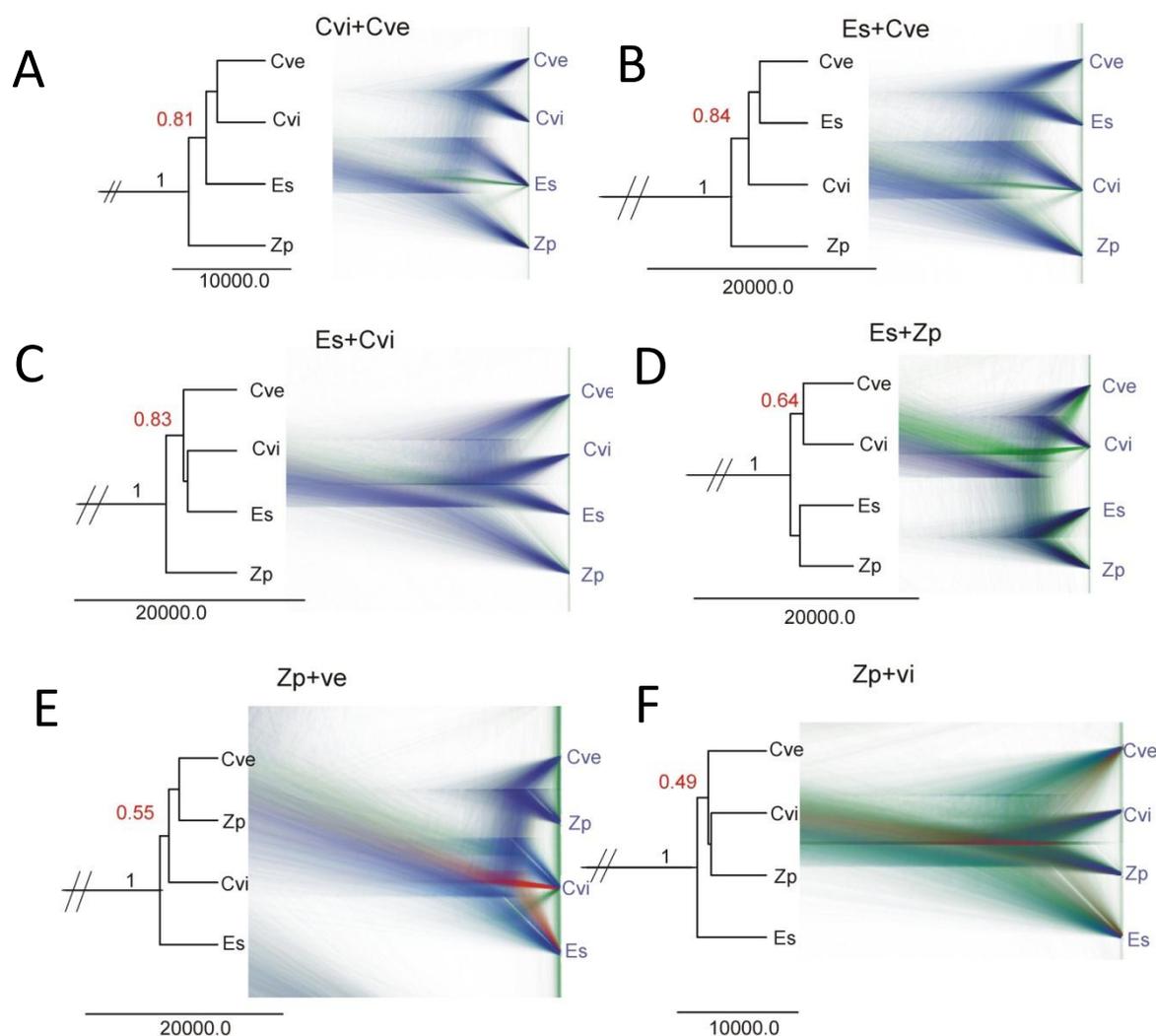


Figura 15. Árboles de especies obtenidos de los análisis con **beast* y sus plots de densidad de ramas de todas las hipótesis probadas para la subfamilia *Euphractinae*: (a) la hipótesis 1, (b) la hipótesis 2, (c) la hipótesis 3, (d) la hipótesis 4, (E) 5 hipótesis, y (f) hipótesis 6 (para una descripción de las hipótesis ver *Materiales y Métodos*). Nomenclatura de especies ver tabla 2. Los números encima de las ramas indican probabilidades *a posteriori*. Las barras de escala representan sustituciones por sitio. En los plots de *Densitree* en azul se indican las ramas de común acuerdo con la topología del árbol consenso mientras en rojo se muestran las ramas en conflicto con ella.

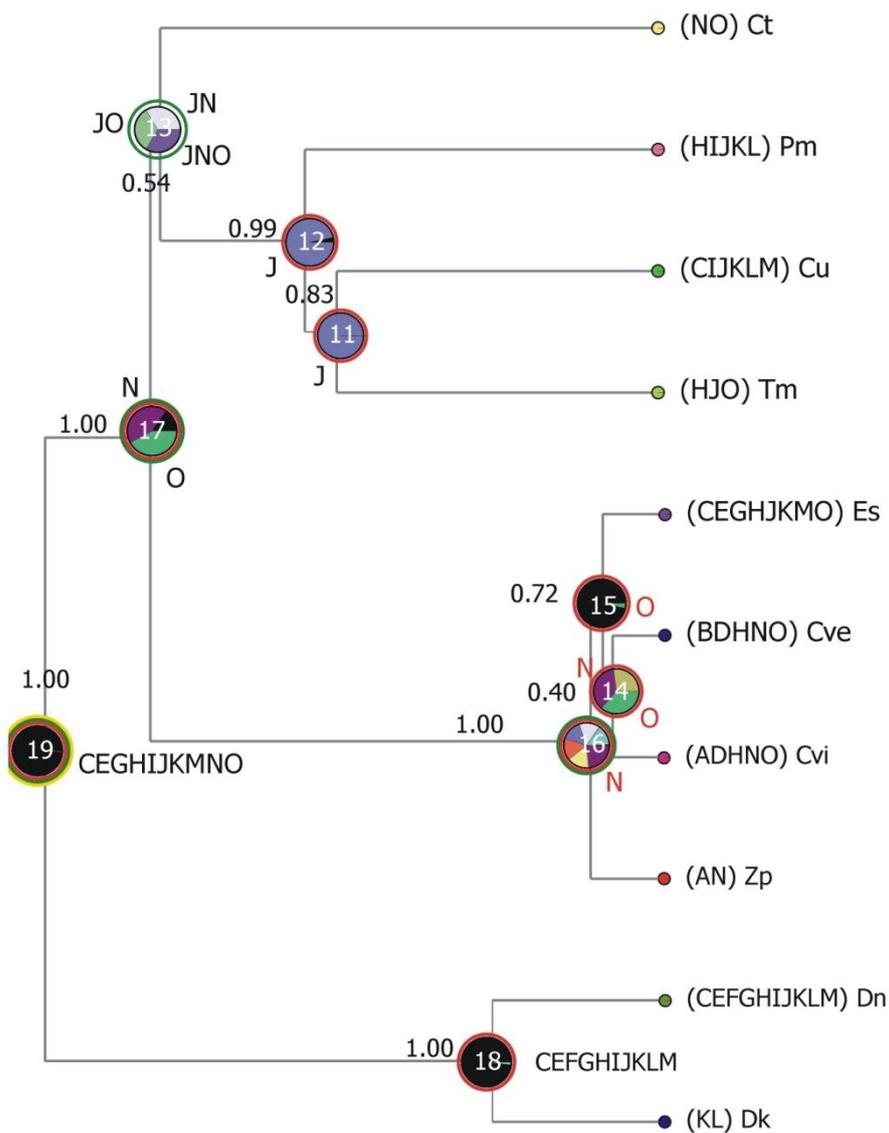
Análisis biogeográficos / Reconstrucción de áreas ancestrales

Resultados gráficos de los análisis de *S-DIVA* y *BBM* para los armadillos estudiados se muestran en la *Figura 16*. No fue posible realizar el análisis *DEC* para un máximo de área igual a 10, debido a que el poder computacional para ello excedió nuestra capacidad de cálculo y el resultado para un número máximo de área ancestral de 4 dio probabilidades de 0 para todos los nodos. Debido a esto, no se muestran los resultados para este método.

1

LEGEND

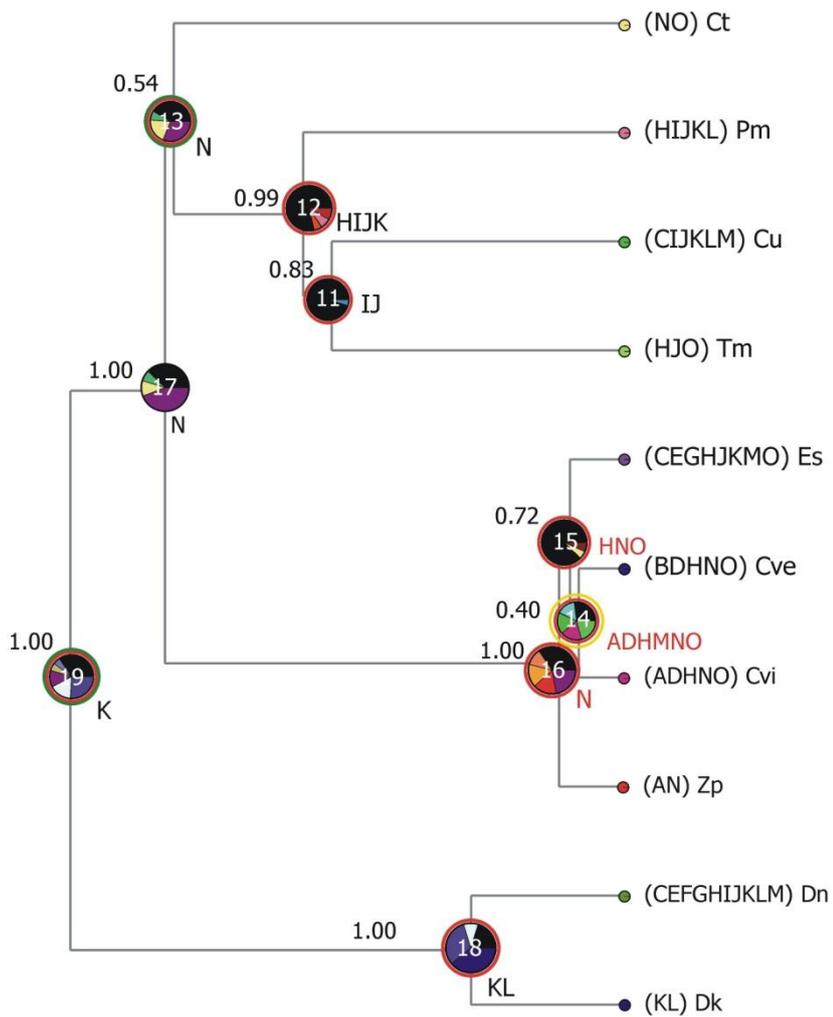
AHNO	AH
AMN	AHN
AN	AJN
DHNO	AJNO
H	AJO
HIJ	ANO
HIJK	AO
HIJL	HJN
HMNO	HJNO
HN	HJO
HNO	JLNO
IJ	JN
IJK	JNO
IJKL	JO
J	
K	
KL	
L	
MN	
N	
NO	
O	



2

LEGEND

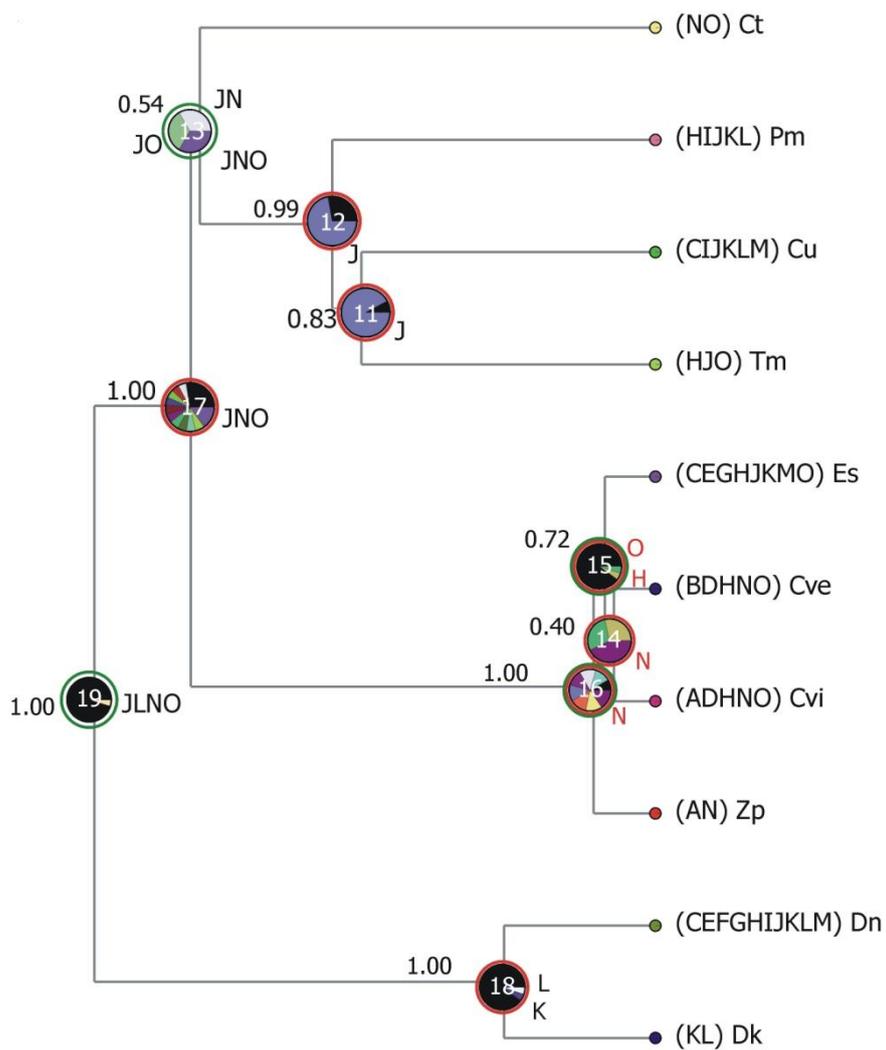
*	
AHNO	AH
AMN	AHN
AN	AJN
DHNO	AJNO
H	AJO
HIJ	ANO
HIJK	AO
HIJL	HJN
HMNO	HJNO
HN	HJO
HNO	JLNO
IJ	JN
IJK	JNO
IJKL	JO
J	
K	
KL	
L	
MN	
N	
NO	
O	



3

LEGEND

AHNO	AH
AMN	AHN
AN	AJN
DHNO	AJNO
H	AJO
HIJ	ANO
HIJK	AO
HIJL	HJN
HMNO	HJNO
HN	HJO
HNO	JLNO
IJ	JN
IJK	JNO
IJKL	JO
J	
K	
KL	
L	
MN	
N	
NO	
O	



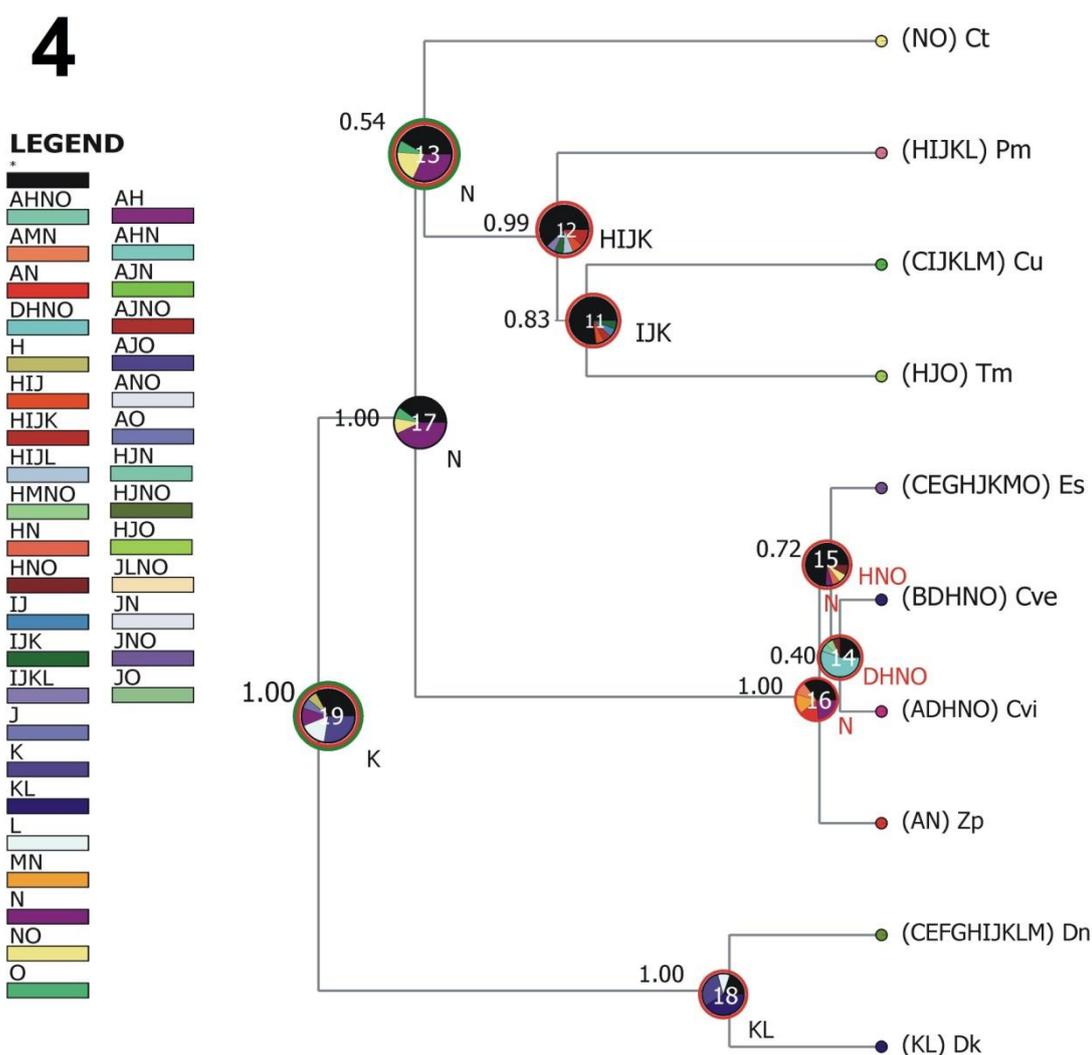


Figura 16: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA y BBM para los armadillos estudiados. (1) Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) por medio de S-DIVA, con un número máximo de 10 áreas para su distribución ancestral; (2) RAA con BBM, con un número máximo de 10 áreas para su distribución ancestral; (3) Análisis con S-DIVA un número máximo de 4 áreas para su distribución ancestral y; (4) Análisis BBM con un número máximo de 4 áreas para su distribución ancestral. Aro rojo: Dispersión, aro verde: Vicarianza y aro amarillo: Extinción. Cada nodo está dividido según la probabilidad de cada distribución representada por su color según la leyenda, en rojo figuran las letras de las distribuciones más probables para los Euphractinae. Cada área fue codificada con una letra según la Tabla 5.

Se observa que las corridas para S-DIVA han estimado un mayor número de áreas ancestrales combinadas para los nodos más basales y áreas únicas para los menos basales, mientras que las corridas para el método BBM han estimado lo opuesto. Los resultados de este último método para sus dos corridas fueron casi exactos.

Teniendo en cuenta los nodos bien soportados y analizando las áreas con las mayores probabilidades obtenidas, puede destacarse:

El primer análisis de S-DIVA (1 en la Figura 16) ha estimado un número de 10 áreas ancestrales combinadas para el nodo basal (19), siendo igual al número máximo de áreas seteado en esta corrida. Como ya se ha dicho, un inconveniente con este método es que la reconstrucción de las distribuciones ancestrales se hace más ambigua a medida que se acerca al nodo raíz del árbol. Esto se debe a que la optimización en cada nodo es tridimensional, y tiene en cuenta la información de los dos descendientes y del ancestro, que en el caso del nodo raíz no existe. Como resultado, la distribución ancestral de la raíz suele incluir todas o casi todas las áreas analizadas. El otro análisis de S-DIVA, restringido a un máximo de 4 áreas, estimó que el área ancestral de los armadillos (*Cingulata*) (nodo 19) podría abarcar los bosques tropicales húmedos del noroeste (L) y la sabana central de Brasil (J), como así también los desiertos templados de La Puna, Cuyo (N) y el centro de Argentina (O), sufriendo posteriormente un evento de vicarianza. Finalmente, los análisis BBM estimaron como área ancestral más probable para este grupo a los bosques tropicales húmedos del noreste de Brasil (L), a partir de la cual el grupo se dispersó.

Para el ancestro de las dos especies del género *Dasyypus* (nodo 18) con la excepción del primer análisis de S-DIVA (que sufre el inconveniente antes mencionado en los nodos cercanos a la raíz) los otros tres análisis estiman a los bosques tropicales húmedos de Brasil como su área ancestral, ya sean los del noroeste (L) o los del noreste (K) para S-DIVA, o combinados para BBM, planteando en ambos casos una posterior dispersión.

Para el nodo 17, los análisis de S-DIVA y BBM difieren en la resolución del área ancestral. Sin embargo, los cuatro análisis proponen que los desiertos templados del centro de Argentina (N) han jugado un papel importante. En los análisis con S-DIVA también se incluyen los desiertos templados de La Puna y Cuyo (O) y la sabana central de Brasil (J).

Las dos metodologías en ambas corridas coinciden en que el origen del clado *Euphractinae* (nodo 16) es el área de los desiertos templados del centro de Argentina (N), a partir de la cual se habría dispersado hacia los Bosques tropicales secos del norte de Argentina, Paraguay y sur de Bolivia (H) y a los Desiertos templados/semidesiertos de Cuyo y la Puna de Argentina (O), dando el área ancestral de *Euphractus* y *Chaetophractus* (nodo 15) según BBM o dispersándose y vicariando a “H” u “O”, respectivamente, para SDIVA.

Análisis intraespecíficos: Diversidad genética, estructura poblacional e historia demográfica de *Zaedyus pichiy* en Argentina

Diversidad genética

A partir de la matriz de las secuencias de ambos genes concatenados (COI + D-loop) se obtuvieron 100 haplotipos definidos por 130 sitios variables, 70 sitios son parsimoniosamente informativos y 60 corresponden a mutaciones simples (ver Tabla 6). En el total de la muestra fueron hallados valores altos de la diversidad haplotípica ($Hd=0,9911$) y nucleotídica ($\pi=0,01501$). El valor más alto de Hd se registra en varias localidades: SLC, MLV, LRP, RNM, SCN, SCC, SCP, CHT y BAL, mientras que el mayor valor de π lo presenta la población

SLC. Los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica con valores más bajos fueron encontrados en las poblaciones BAP y CHT, respectivamente. Con ambos genes concatenados no hubo haplotipos compartidos entre localidades, y el haplotipo que mostró mayor frecuencia estuvo presente en tres individuos restringidos a la localidad de RNP ($N^{\circ}h/N^{\circ}n$, ver Tabla 6).

Para la matriz del fragmento D-loop fueron hallados 73 sitios variables, 36 parsimoniosamente informativos y 37 corresponden a mutaciones simples (no informativas), que resultaron en 38 haplotipos. Las secuencias analizadas para este fragmento no registraron “indels” (inserciones-delecciones). El fragmento de D-loop presenta una alta diversidad haplotípica ($Hd=0,957$) y nucleotídica ($\pi=0,01559$). Al observar por separado las poblaciones muestreadas, la mayor diversidad nucleotídica ($\pi=0,01$) se encuentra en las poblaciones MLV y SCC y su valor más bajo ($\pi=0,00345$) se observa en las localidades NJA, CHA y SCP. El valor más alto de diversidad haplotípica corresponde a las localidades de LRP, RNM, SCC y BAL, y sus valores más bajos se registran en NJA, seguida por SCP y CHA (ver Tabla 6).

No se encontraron haplotipos compartidos por todas las poblaciones, pero sí haplotipos compartidos entre varias poblaciones (poblaciones pertenecientes a una misma región que comparten haplotipos, poblaciones del sur, poblaciones del norte y poblaciones del centro; ver red de haplotipos, Figura 19). La localidad que presenta la mayor frecuencia de un haplotipo es RNP, encontrándose en nueve individuos.

Para la matriz del marcador COI se identifican 27 haplotipos. En el alineamiento fueron reconocidos 75 sitios polimórficos, 38 sitios parsimoniosamente informativos y 37 mutaciones simples. Para la muestra total, los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica mostraron valores altos, $Hd=0,933$ y $\pi=0,01420$. Observando las poblaciones donde se pudieron hacer los cálculos, la diversidad haplotípica (Hd) presenta valores bajos ($Hd=0,7$) en la población de “SCN” y el valor más alto fue observado en las localidades “BAL, RNM y LRP” ($Hd= 1$), todas ellas del norte de la distribución. Respecto al índice de diversidad nucleotídica (π), presenta los valores más bajos ($\pi= 0,00215$ y $0,00258$) en las poblaciones de “RNM” y “SCN” respectivamente, y valores altos en las localidades de “RNP” ($\pi=0,01098$) y “MMA” ($\pi=0,01032$), ambas de la parte oeste de la distribución (ver Tabla 6).

Los dos marcadores son concordantes; COI resultó ser casi tan diverso como D-loop para esta especie, aunque el marcador D-loop presentó mayor variabilidad haplotípica y nucleotídica, como era de esperarse por ser la porción no codificante e hipervariable del ADN mitocondrial. El patrón de diversidad es similar en ambos fragmentos y en el concatenado. Aunque no es muy clara, parece haber una disminución de la diversidad haplotípica y nucleotídica hacia el este y sur de la distribución, sobre todo si se analizan las regiones de la distribución por separado (noroeste, centro y sur). Las poblaciones del norte y oeste de cada región presentaron los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica más altos, mientras que las poblaciones del sur y del este presentaron valores de diversidad un tanto menores, aunque debe destacarse que el número de muestras obtenidas

por población es menor en las poblaciones del sur y este. Si se toman en cuenta los dos clados que se obtienen en el árbol y la red de haplotipos (ver análisis más adelante) se observa que en varias de las poblaciones del borde de la discontinuidad del clado A, donde se toca con clado B, la diversidad de sus poblaciones es más baja (ver Tabla 6).

<i>Z. pichiy</i> COI+D-loop (1115 pd)						Fragmento de D-loop (405 pb)					Fragmento de COI (492 pb)				
Pop	N ^h /N ⁿ	P	S	$\pi \pm s.d.$	Hd $\pm s.d.$	N ^h /n ⁿ	P	S	$\pi \pm s.d.$	Hd $\pm s.d.$	N ^h /n ⁿ	Pol	S	$\pi \pm s.d.$	Hd $\pm s.d.$
				0.01083	1				0.00745	0.8				0.00731	0.9
SLC	11/11	22	19	±	±	4/6	9	8	±	±	4/5	7	7	±	±
				0.06561	0.0388				0.0091	0.172				0.00138	0.161
MCP	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
				0.0075	1				0.01073	0.75				0.00502	0.8
MLV	10/10	12	10	±	±	4/8	13	12	±	±	4/6	7	7	±	±
				0.05131	0.0447				0.00353	0.139				0.00223	0.172
				0.00484	0.8									0.01032	0.9
MMA	4/5	13	11	±	±	-	-	-	-	-	4/5	10	10	±	±
				0.04952	0.1265									0.00280	0.161
MÑA	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	1/1	0	0	0	0
MSR	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	1/1	0	0	0	0
				0.00747	1				0.00518	1					1
LRP	4/4	11	9	±	±	2/2	2	2	±	±	3/3	4	4	0.00572 ±	±
				0.07631	0.1778				0.00259	0.5				0.00214	0.272

<i>CHE</i>	<i>1/1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1/1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1/1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
				<i>0.00688</i>	<i>1</i>				<i>0.00517</i>	<i>1</i>				<i>0.00215</i>	<i>1</i>
<i>RNM</i>	<i>3/3</i>	<i>8</i>	<i>7</i>	\pm	\pm	<i>2/2</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>0.00258</i>	\pm	<i>2/2</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	\pm	\pm
				<i>0.07766</i>	<i>0.2722</i>					<i>0.5</i>				<i>0.00108</i>	<i>0.5</i>
				<i>0.00943</i>	<i>0.9677</i>				<i>0.00511</i>	<i>0.929</i>				<i>0.01098</i>	<i>0.848</i>
<i>RNP</i>	<i>28/31</i>	<i>43</i>	<i>42</i>	\pm	\pm	<i>14/23</i>	<i>14</i>	<i>13</i>	\pm	\pm	<i>8/12</i>	<i>14</i>	<i>14</i>	\pm	\pm
				<i>0.05760</i>	<i>0.0082</i>				<i>0.00065</i>	<i>0.035</i>				<i>0.00229</i>	<i>0.104</i>
				<i>0.00267</i>	<i>0.8571</i>				<i>0.00345</i>	<i>0.333</i>					
<i>NJA</i>	<i>6/7</i>	<i>8</i>	<i>7</i>	\pm	\pm	<i>2/6</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	\pm	\pm	<i>1/3</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
				<i>0.03253</i>	<i>0.0764</i>				<i>0.00223</i>	<i>0.215</i>					
				<i>0.00837</i>	<i>1</i>				<i>0.00679</i>	<i>0.7</i>				<i>0.00258</i>	<i>0.7</i>
<i>SCN</i>	<i>7/7</i>	<i>22</i>	<i>17</i>	\pm	\pm	<i>3/5</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	\pm	\pm	<i>3/5</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	\pm	\pm
				<i>0.06029</i>	<i>0.0764</i>				<i>0.00313</i>	<i>0.218</i>				<i>0.00105</i>	<i>0.218</i>
				<i>0.00957</i>	<i>1</i>				<i>0.01741</i>	<i>1</i>					
<i>SCC</i>	<i>3/3</i>	<i>16</i>	<i>11</i>	\pm	\pm	<i>3/3</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	\pm	\pm	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
				<i>0.07929</i>	<i>0.2722</i>				<i>0.00743</i>	<i>0.272</i>					

SCS	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0
SCP	4/4	2	0	±	±	2/3	2	2	±	±	1/2	0	0	0	0
				0.0012	1				0.00345	0.667					
				0.02821	0.1768				0.00163	0.314					
CHA	3/4	3	2	±	±	2/3	2	2	±	±	1/2	0	0	0	0
				0.0012	0.75				0.00345	0.667					
				0.02821	0.1768				0.00162	0.314					
CHP	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0
CHT	5/5	1	0	±	±	1/3	0	0	0	0	1/2	0	0	0	0
				0.00045	1										
				0.01497	0.1265										
CHR	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
CHC	1/1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
BAC	1/1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

					0.6667										
BAP	2/3	2	0	0	±	1/1	0	0	0	0	1/2	0	0	0	0
					0.2722										
				0.00706	1				1				0.00817	1	
BAL	6/6	18	16	±	±	4/4	6	6	0.00820 ± 0.00196	±	5/5	8	8	±	±
				0.05936	0.0962					0.177				0.00162	0.126
				0.01501	0.9911					0.957				0.01420	0.933
Total	100/112	70	60	±	±	38/75	37	36	0.01559 ± 0.00066	±	27/59	38	37	±	±
				0.07026	0.0012					0.012				0.00115	0.019

Tabla 6: Diversidad genética de *Zaedyus pichiy* para el concatenado y para cada fragmento (COI y D-loop). En cada población (Pop) se muestra el número de haplotipos sobre el número de secuencias ($N^{\circ}h/N^{\circ}n$), el número de mutaciones simples o “singletons” (S), la cantidad de mutaciones informativas (P), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (H_d). Detalles de cada localidad pueden verse en la Tabla 1.

Estructura poblacional

Árbol de haplotipos

En el análisis bayesiano de las relaciones entre haplotipos de *Zaedyus pichiy*, se utilizó como grupo externo una secuencia de *Chaetophractus vellerosus*. Para la matriz utilizada de ambos marcadores concatenados denominada “COI+D-loop (filogeografía *Zaedyus* + outgroup)” el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el TPM3uf+I+G bajo el AICc (ver Tabla3). En el árbol, *Zaedyus pichiy* se muestra como un clado monofilético en el cual se pueden distinguir dos haplogrupos principales, A y B, con probabilidades posteriores de 0,7 y 0,62 respectivamente (Figura 17). Cabe señalar que se anotaron solo las probabilidades posteriores que superaron el 0,5, ya que por debajo de este valor los resultados son muy poco confiables. Dentro del clado A se agrupan casi en su totalidad los haplotipos de las poblaciones del norte y del sur de la distribución de la especie, mientras que la mayor parte del haplogrupo B se distribuye en poblaciones del centro de la distribución (todos los haplotipos de las poblaciones de las provincias de Río Negro y Chubut pertenecen a este grupo). En el clado A hay mayor número de relaciones con PP por arriba de 0,5, en comparación con el clado B. Los subclados con soporte dentro del haplogrupo A sustentan relaciones entre haplotipos de una misma población (MLV3-5=0,99, SLC1-6-3-4=0,51 y NJA2-7-6-5-4-1-3=0,57) o entre haplotipos de las poblaciones del norte de la distribución (BAL-SLC=0,99/0,52, MLV-SLC=0,77, MMA-BAL=0,68, MLV-LRP-MMA=0,88 y MLV-LRP-MMA-SLC=0,54). Por último, existe un alto soporte entre un haplotipo de la población de Buenos Aires/La Pampa y uno de la población de Neuquén, siendo esta última una población más del centro de la distribución y siendo este haplotipo el único que no conforma el clado monofilético con el resto de los haplotipos de esa población (BAL4-NJA2=0,96). El clado A contiene también a las poblaciones del extremo sur de la distribución de la especie, las cuales se agrupan todas en un subclado, pero sin soporte.

Dentro del haplogrupo B, los pocos subclados con soporte sustentan relaciones entre haplotipos que pertenecen a una de las poblaciones de Río Negro “RNP” ($RNP29-22=0,62$ y $RNP31-10=0,55$) o la relación entre algún haplotipo de las poblaciones RNP y CHE, cercanas entre sí, con un haplotipo de la población SCC que es una población del sur de la distribución de la especie ($RNP12-CHE1-SCC3=0,62$). El grupo B incluye también algunos otros haplotipos pertenecientes a poblaciones del norte y del sur de la distribución de la especie (BAC1, SLC9 y MLV7 del norte y SCN4 y SCC2 del sur), pero como se relacionan estos haplotipos con los pertenecientes a las poblaciones de Río Negro y Chubut (centro de la distribución) en el árbol no tienen soporte.

En la Figura 18 se grafica en el mapa de Argentina la distribución y proporción de los haplogrupos A y B recuperados en el árbol de haplotipos, siendo el clado A representado en rojo y el B en amarillo. Al igual que en los resultados de los otros análisis, cada población se muestra representada en un gráfico de tortas donde su tamaño es proporcional a su “n”. De esta manera se observa con mayor claridad lo descripto anteriormente, donde el clado A se distribuye en las poblaciones del norte y sur pero no en las del centro de la distribución de la especie, mientras que el clado B compone la totalidad de los haplotipos de las poblaciones del centro y aporta también haplotipos a poblaciones del norte y sur.

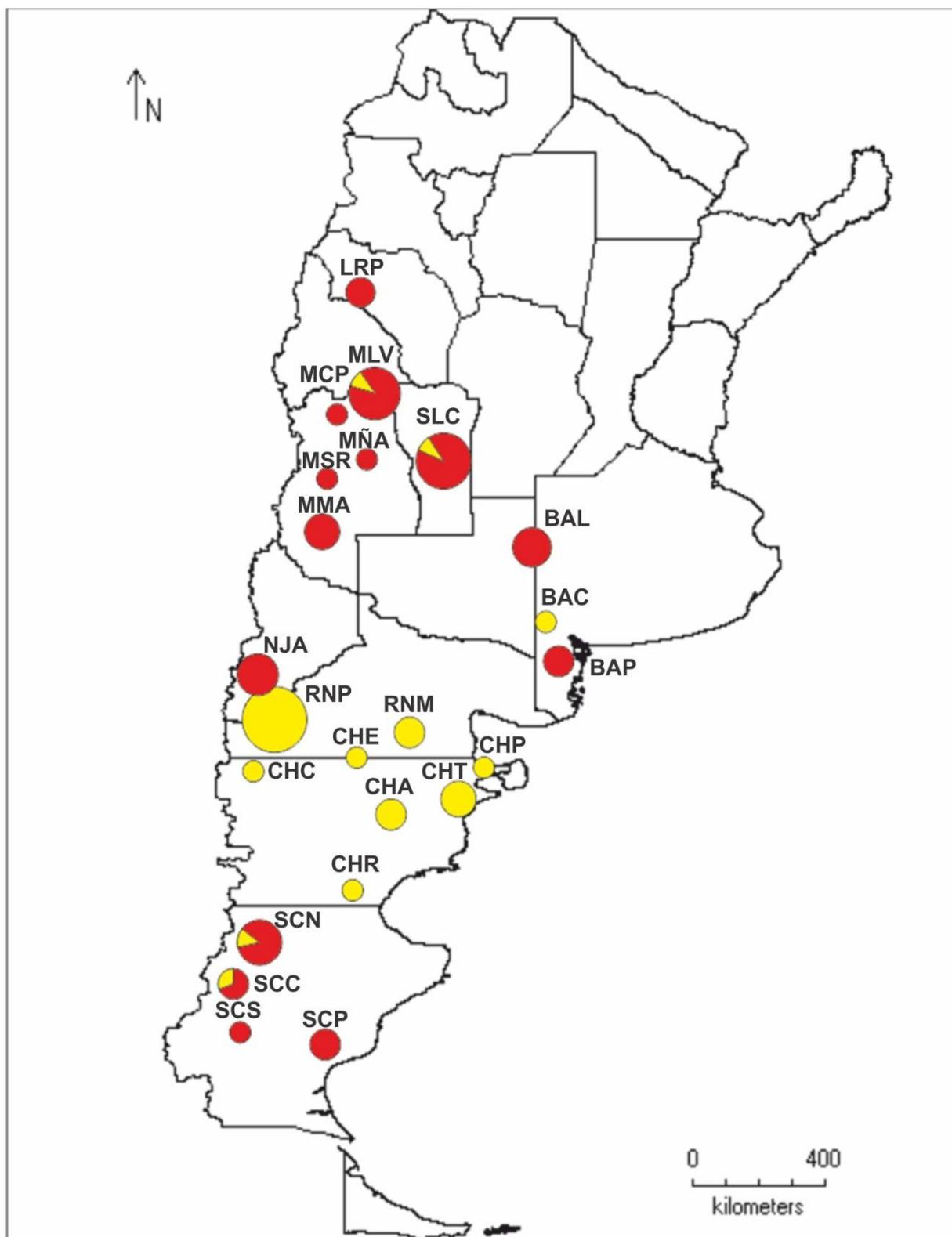


Figura 18. Mapa de Argentina donde se muestra cada población de *Zaedys pichiy* representada en un gráfico de tortas donde su tamaño es proporcional a su "n". También se muestra la distribución y proporción de los haplogrupos A y B recuperados en el árbol de haplotipos, siendo el clado A representado en rojo y B en amarillo al igual que en los resultados de los otros análisis.

Redes de haplotipos

Tanto la red de haplotipos para las secuencias de los marcadores concatenados (COI+D-loop) (Figura19.a), como las redes realizadas para cada marcador por separado (Figura19.b y c) muestran el mismo patrón concordante con el árbol de haplotipos, obteniendo dos agrupaciones separadas por 12 pasos mutacionales en el caso de la red para los marcadores concatenados (COI+D-loop) (Figura19.a), y de cinco pasos para las redes de los marcadores por separado (Figura19. b y c). Esta diferencia se debe a que para realizar la red con los marcadores concatenados, se cortaron todas las secuencias al tamaño de la secuencia más chica y se eliminaron las que tenían gran cantidad de datos faltantes, quedando un número más reducido de secuencias, representando cada una de ellas un haplotipo en la red. Igualmente, la relación entre los haplotipos y las poblaciones a las que pertenecen, es similar a la encontrada en las otras dos redes.

El grupo A reúne a todos los haplotipos de las poblaciones muestreadas, con la excepción de los pertenecientes a las provincias de Río Negro y Chubut. Una diferencia con el resultado del árbol de haplotipos es que ninguna de las redes muestra la pertenencia de un haplotipo de la población RNP (de Río Negro) al linaje A. En la red para el marcador COI, las poblaciones de una misma región suelen compartir haplotipos, no siendo tan patente en la red para el marcador D-loop y, por lo tanto, en su red solo las poblaciones de Santa Cruz comparten haplotipos entre sí, como también la población de San Luis con una de Mendoza.

Este grupo se muestra algo estructurado en cuanto a regiones, es decir por localidades cercanas, en las redes para COI y algo menos claro para D-Loop, mostrando conexiones al compartir haplotipos entre las poblaciones de Mendoza y La Rioja, Mendoza, San Luis y Buenos Aires, y las poblaciones de Santa Cruz con conexión entre ellas y con poblaciones de Buenos Aires/ La Pampa y San Luis. Tanto las poblaciones de Santa Cruz como la de Neuquén mostraron poca variabilidad, presentando generalmente un único haplotipo o, en ocasiones, dos, según el marcador. Por su parte, las poblaciones del norte muestran mayor cantidad de haplotipos en relación con el número de muestras. Esta diferenciación entre las poblaciones parece ser reciente, ya que no solo las poblaciones tienen haplotipos compartidos y se observa poca variabilidad haplotípica dentro de ellas, especialmente en las del centro sur, sino que, además, todos los haplotipos están separados por pocos pasos mutacionales.

Las poblaciones de Santa Cruz (tanto en D-Loop como en COI) comparten un mismo haplotipo, siendo el resto de sus haplotipos pocos diferentes (un paso mutacional de distancia), lo cual sugiere una expansión reciente. Los haplotipos de Santa Cruz parecen estar relacionados con haplotipos de Neuquén, población esta última que también tiene muy poca variabilidad, ya que la mayoría de sus muestras tienen el mismo haplotipo, por lo que también parece haber surgido de una expansión reciente. Tanto las poblaciones de Santa Cruz como la de Neuquén se conectan con haplotipos de poblaciones de Buenos Aires, La Pampa y San Luis, aunque hay muchos nodos hipotéticos. Podría inferirse que las regiones del norte de la distribución pertenecientes al clado A, parecen empezar a presentar restricción del flujo genético con aislamiento por distancia, aunque esto no se vio en los test

realizados, ya que comienzan a mostrar diferenciación y estructura y que parecen compartir el origen de sus haplotipos con los haplotipos que produjeron una colonización de larga distancia o una expansión a las regiones de Neuquén y Santa Cruz donde luego las poblaciones intermedias fueron dominadas por los haplotipos del clado B. Esto coincide con la que muestra la reconstrucción filogeográfica (ver Figura 23) donde se observa que la primera expansión del clado A es a La Rioja y Mendoza, seguida por una posterior tanto hacia el noreste (San Luis, Buenos Aires y La Pampa) como hacia el noroeste (Neuquén) y también al sur (Santa Cruz).

El linaje B agrupa todas las poblaciones pertenecientes a las provincias de Río Negro y Chubut, y contiene haplotipos de la población MLV de Mendoza y SCN y SCC de Santa Cruz, aunque solo en la red para D-Loop. En el árbol de haplotipo el clado B también contiene un haplotipo de la población de San Luis, lo que no se observa en las redes. La población BAC de Buenos Aires no se incluyó en el análisis de redes de haplotipos por el tamaño y cantidad de datos faltantes de su secuencia, por lo que no se pudo corroborar su pertenencia al clado B como muestra el árbol de haplotipos.

En el clado B, al revés de lo que sucede en el clado A, se ve más estructura en la red de D-Loop que en la de COI. Así, en la red para el marcador D-loop la población de Río Negro RNP comparte más de un haplotipo (basal) con otras poblaciones, mientras que en la red para el marcador COI el único haplotipo que comparten poblaciones del clado B es el H20.

La población RNP es la que tiene la mayor variabilidad haplotípica esto sugiere que es la más antigua del clado. Esta población también contiene el haplotipo que comparte con el resto de las poblaciones del clado, o está separado por pocos pasos mutacionales del resto de los haplotipos encontrados en las demás poblaciones. Por lo tanto, el grupo B expresaría una posible expansión reciente, compartiendo casi todas sus poblaciones el mismo haplotipo basal (H20 para COI y D-loop).

La población RNP también tiene un subgrupo de haplotipos divergentes, que se separan por varios pasos mutacionales tanto en la red para los marcadores concatenados como en la red para COI, aunque esto no se ve tan claramente en la red para el marcador D-loop, puesto que este grupo parecería estar solamente representado por el haplotipo H31. De tal modo, este grupo da indicios de que la población RNP tiene una cierta estructura. Salvo este grupo, las redes no muestran grandes discontinuidades genéticas; el haplotipo H20 de mayor frecuencia y amplia distribución, se ubica en el centro de la red (patrón filogeográfico “en estrella”) y el resto de los haplotipos de las poblaciones son exclusivos. En estos se incluyen los haplotipos únicos que aparecen en lo que serían poblaciones del clado A (CCN, CCC, MLV y SNL), indicando una expansión reciente desde la población ancestral de este clado, que sería la que tiene el mayor número de haplotipos RNP.

La conexión del clado B con el clado A es a través de haplotipos hipotéticos y por muchos pasos mutacionales, quizás debido a que el contacto de estos dos clados en su distribución es un contacto secundario luego de expansiones diferentes.

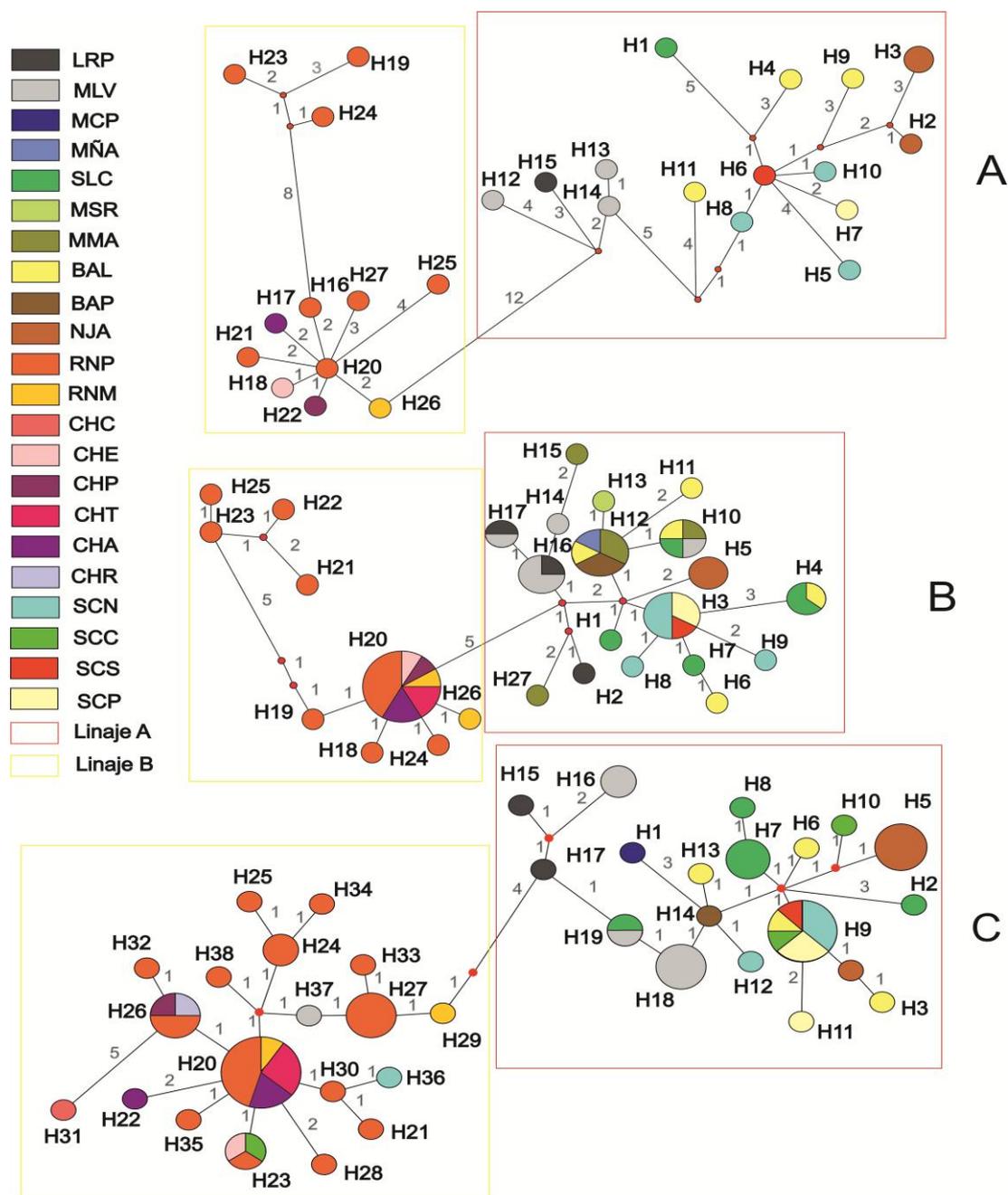


Figura 19: (a) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de COI+D-loop de longitud 967 pb correspondientes a 28 individuos de *Zaedys pichij*; (b) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de COI de longitud 492 pb correspondiente a 59 secuencias de *Z. pichij*; (c) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de D-loop de longitud 405 correspondiente a 75 ejemplares de *Z. pichij*. El tamaño de la esfera es relativo a la frecuencia del haplotipo que representa y en las ramas se marca con números la cantidad de pasos mutacionales. Los pequeños círculos rojos entre las ramas hacen referencia a haplotipos hipotéticos (no muestreados o extintos).

Análisis de la Varianza Molecular

En la tabla de F_{st} pareados (Tabla 7) se puede observar que las poblaciones MÑA, MSR, CHE, SCS, CHP, CHR, CHC y BAC no presentan diferencias significativas con ninguna población, pero estos resultados deben ser

desestimados o considerados preliminares debido a su escaso tamaño muestral (n=1). Teniendo en cuenta esto y analizando el resto de las poblaciones, se puede apreciar cierto grado de diferenciación regional, ya que las poblaciones de Cuyo (La Rioja –LRP- San Luis –SLC- y Mendoza –MLV-MMA) presentan diferencias significativas respecto de las poblaciones del norte de la Patagonia (Rio Negro -RNM –RNP- y Neuquén–NJA) y algunas de ellas con poblaciones del centro (Chubut –CHT-CHA) y sur de Patagonia (Santa Cruz –SCP-SCN) así como también con la población BAL (Buenos Aires y La Pampa). De las poblaciones de Cuyo, la de San Luis presentó una identidad propia, diferenciándose de las demás.

Dentro de las poblaciones del norte de Patagonia se ve una diferenciación de la población de Neuquén (NJA) con respecto a las poblaciones de Río Negro (RNM-RNP), mientras que en su conjunto se diferencian con poblaciones de Santa Cruz (SCN- SCP) y con la población de Buenos Aires y La Pampa (BAL).

La población de Neuquén también se diferencia con las poblaciones de Chubut del centro Patagonia, y las poblaciones de Chubut tienen a su vez una cierta diferenciación con las poblaciones del sur de la Patagonia (Santa Cruz) y con la población BAL de Buenos Aires y La Pampa.

	SLC	MCP	MLV	MM A MÑA	MSR	LRP	CHE	RNM	RNP	NJA	SCN	SCC	SCS	SCP	CHA	CHP	CHT	CHR	CHC	BAC	BAP	BAL	
SLC																							
MCP	-																						
MLV	+	-																					
MMA	-	-	-																				
MÑA	-	-	-	-																			
MSR	-	-	-	-	-																		
LRP	+	-	-	-	-	-																	
CHE	-	-	-	-	-	-	-																
RNM	+	-	+	+	-	-	+	-															
RNP	+	+	+	+	-	-	+	-	-														
NJA	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+													
SCN	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+												
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-												
SCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
SCP	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-									
CHA	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+									
CHP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
CHT	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+									
CHR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
CHC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
BAP	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
BAL	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	

Tabla 7: Tabla de significancia de *Fst* pareados en las poblaciones de *Zaedyus pichiy*, (+) resultados significativos, (-) resultados no significativos.

Para evaluar la estructuración poblacional revelada en los análisis anteriores, se hizo un análisis de la varianza molecular (AMOVA) realizando 2 pruebas. En la primera, la forma de agrupar fue separando los dos linajes principales recuperados en el análisis filogenético. En la segunda prueba, se agrupó según las áreas separadas por la existencia de ríos de gran caudal (Figura 20), definiéndose cinco grupos.

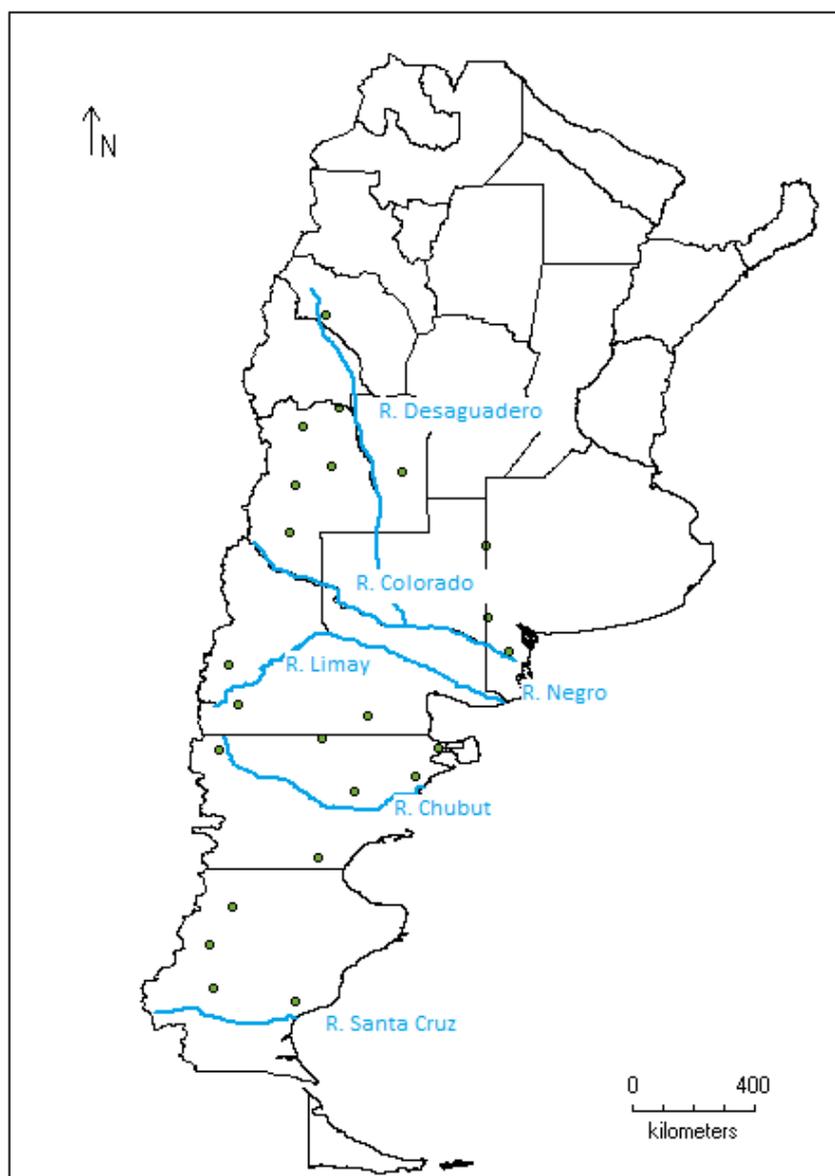


Figura 20: Mapa de la Argentina que muestra con puntos verdes las poblaciones muestreadas de *Zaedyus pichiy* y en color celeste los cursos de los grandes ríos que atraviesan su distribución, separando dichas poblaciones en cinco grandes áreas.

Los resultados que se muestran en la Tabla 8 sugieren que la agrupación por linajes es la que mejor explica la variación entre grupos (53,69 %; $ct=2,74069$). Sin embargo, la forma de agrupar según las áreas divididas por los ríos explica, con un porcentaje similar, la variación entre los grupos (47,12 %; $ct=1,98781$) siendo ambos porcentajes estadísticamente significativos.

Agrupaciones	% entre grupos (Φ_{ct})	% dentro de grupos (Φ_{sc})	% dentro de población (Φ_{st})
Linajes	53.69% (2.74069*)	7.36% (0.37552*)	38.96% (1.98880*)
Ríos	47.12% (1.98781*)	5.74% (0.24199*)	47.14% (1.98880*)

Tabla 8: Análisis de la Varianza Molecular para: pruebas 1 la agrupación se corresponde con los linajes obtenidos y prueba 2 donde las poblaciones se agruparon según separación de grandes ríos. El asterisco (*) indica una significancia de $p < 0,01$.

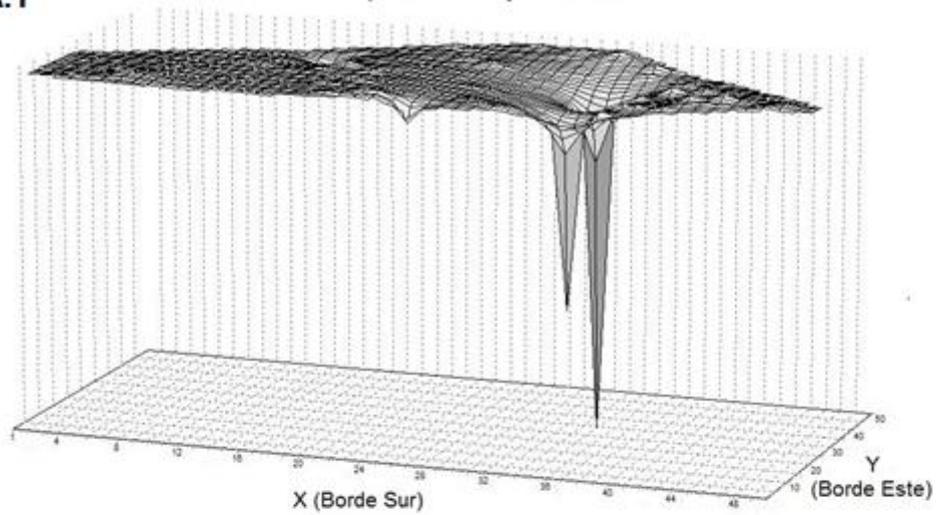
Diversidad genética en el espacio y aislamiento por distancia

Con respecto a la distribución geográfica de la diversidad genética, analizando todas las secuencias obtenidas para *Zaedyus pichiy* de ambos marcadores concatenados se observa una proyección en general plana, con unas depresiones marcadas en lo que sería la zona central de Mendoza y San Luis. Esto indica una baja diferenciación genética en esa zona geográfica, y una diversidad genética relativamente uniforme en el resto de la distribución (Figura 21.A.1). Lo mismo se desprende de la autocorrelación espacial (Figura 21.A.2), a pesar de no ser significativa ($V=0,0037$; $p=0,3250$), y del test de Mantel (Figura 21.A.3), que sí fue significativo ($r=0,487$; $p=0,0059$). Ambas muestran el mismo patrón: todas las clases de distancia genética presentan valores altos en todo el rango de distancia geográfica. Esto indicaría que *Zaedyus pichiy* no sigue un modelo de aislamiento por distancia.

Realizando los tres análisis para los clados A y B (obtenidos en análisis anteriores) por separado y para ambos marcadores concatenados, se puede observar que la proyección de la interpolación del paisaje genético para el clado A es muy similar a la anterior obtenida para todas las secuencias de *Zaedyus pichiy*, observándose las mismas depresiones y algunas elevaciones que dan la pauta de zonas con un poco más de diferenciación genética: zona Norte de San Luis y San Juan (Figura 21.B.1). En cuanto al clado B (Figura 21.C.1) se hacen visibles unas depresiones a los -43° lat -66° long, noreste de Chubut, donde habría una baja diversidad, y algunas leves elevaciones en lo que sería la zona noroeste limítrofe entre Neuquén y Río Negro, donde habría más diferenciación genética. También se observa que tanto el clado A como el B presentan patrones similares de distribución de los datos para la autocorrelación (Figura 21.B.2; C.2), aunque ninguno fue significativo (A: $v=0,0059$, $p=0,6150$ y B: $v=0,0091$; $p=0,8760$). En el test de Mantel también se observan los mismos patrones no significativos (A: $r=0,0533$; $p=0,0609$ y B: $r=0,0138$; $p=0,3816$) (Figura 21.B.3; C.3). Estos patrones no se diferencian con los encontrados para los análisis de todas las secuencias, indicando que ninguno de los dos clados (A y B) seguiría un modelo de aislamiento por distancia.

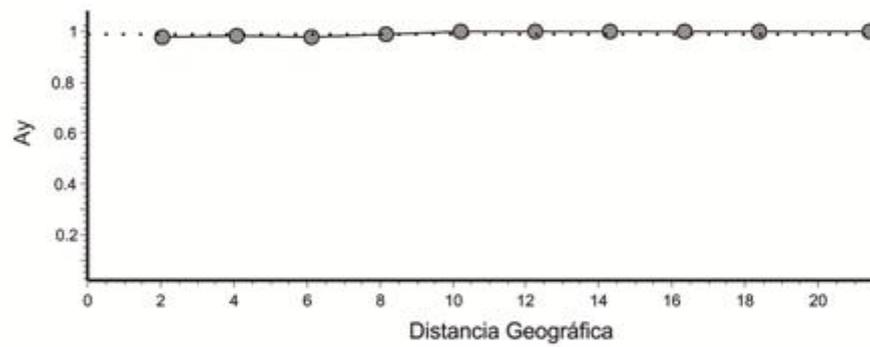
A.1

Interpolación Paisaje Genético



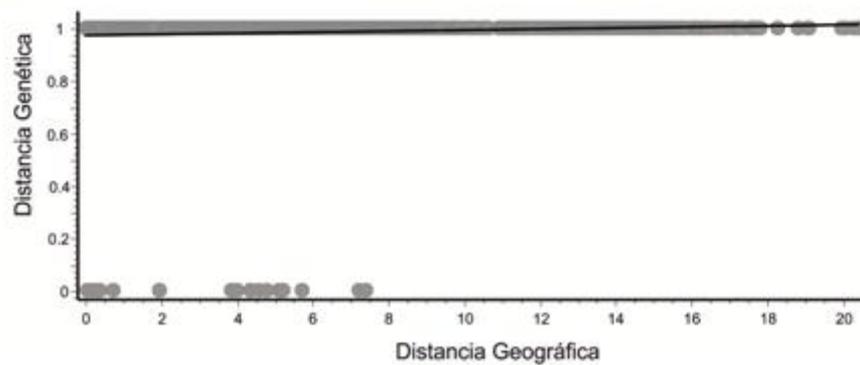
A.2

Resultado Análisis de Autocorrelación Espacial



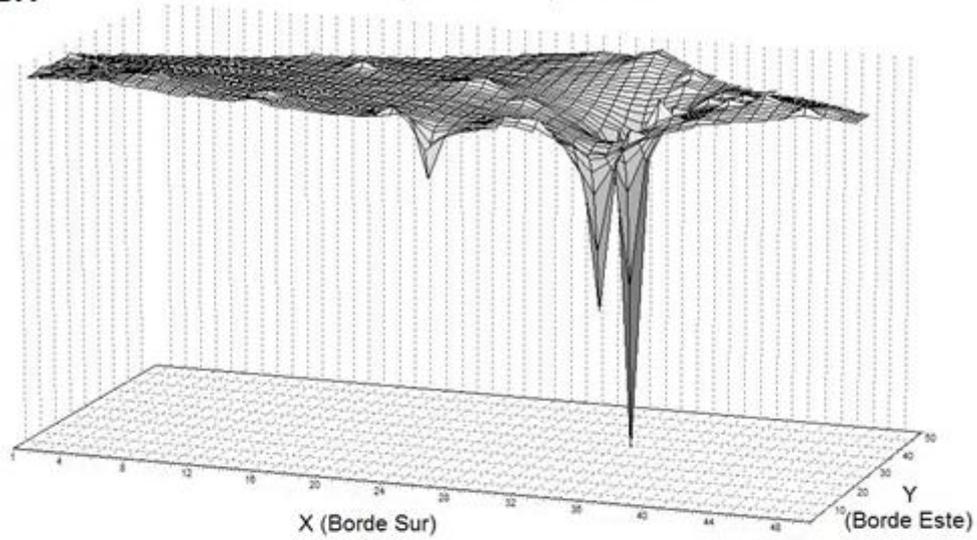
A.3

Resultado Test de Mantel

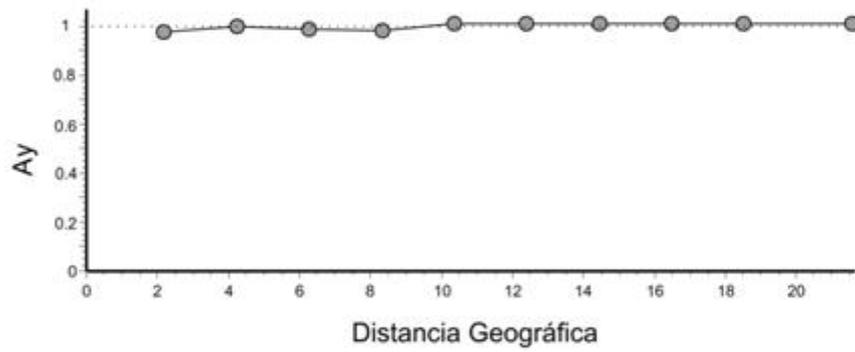


B.1

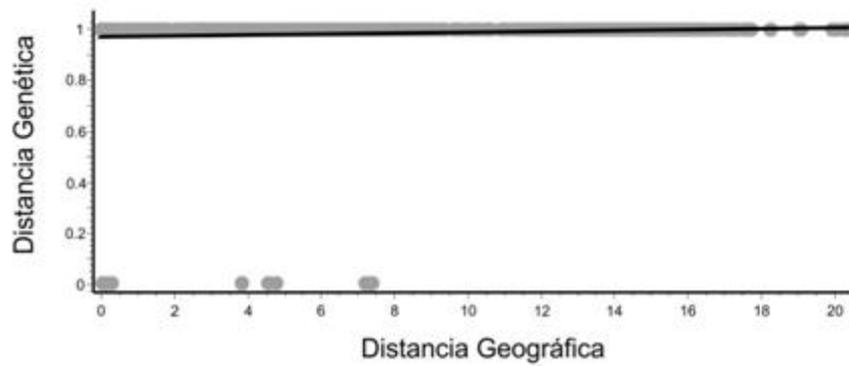
Interpolación Paisaje Genético

**B.2**

Resultado Análisis Autocorrelación Espacial

**B.3**

Resultado Test de Mantel



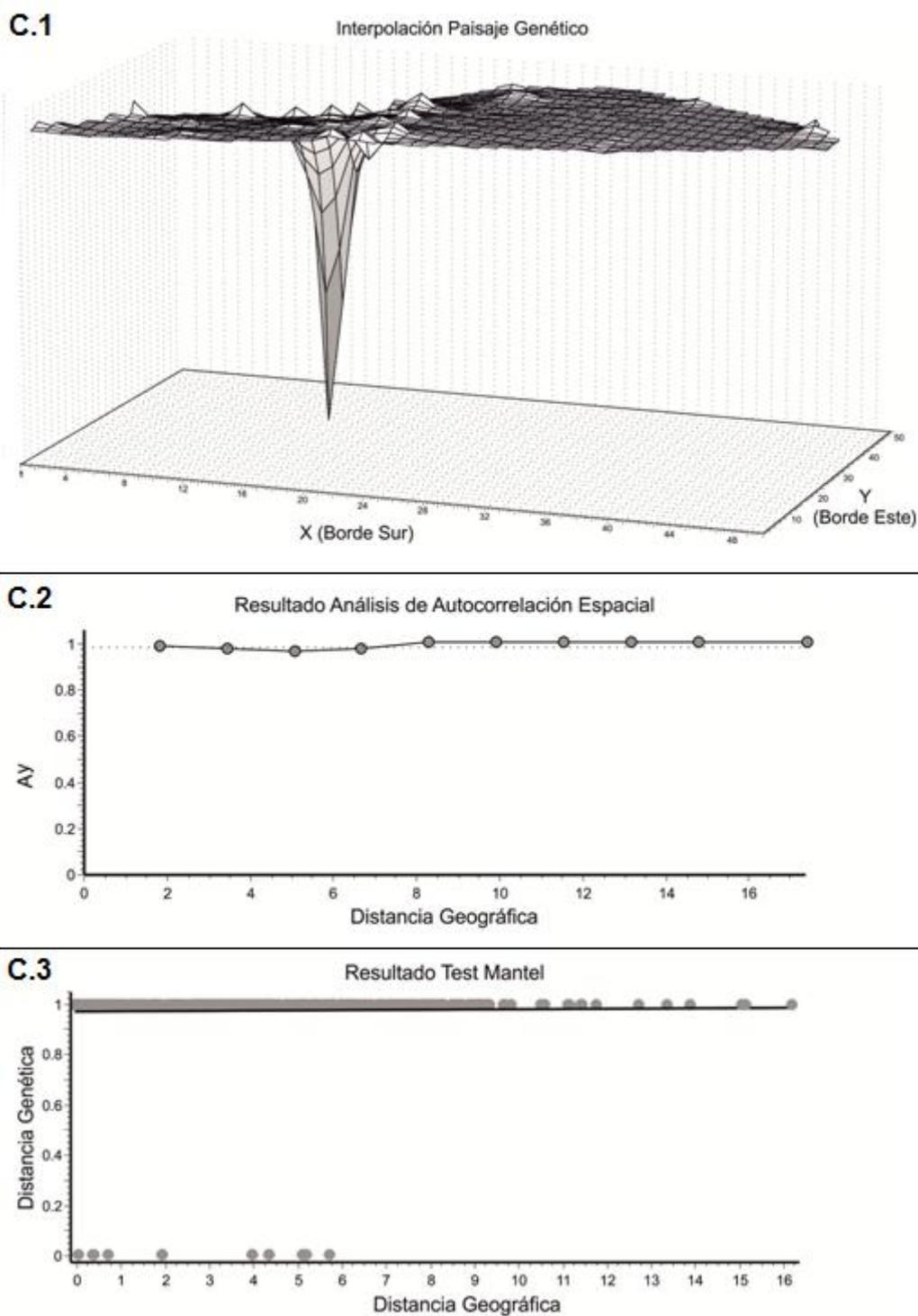


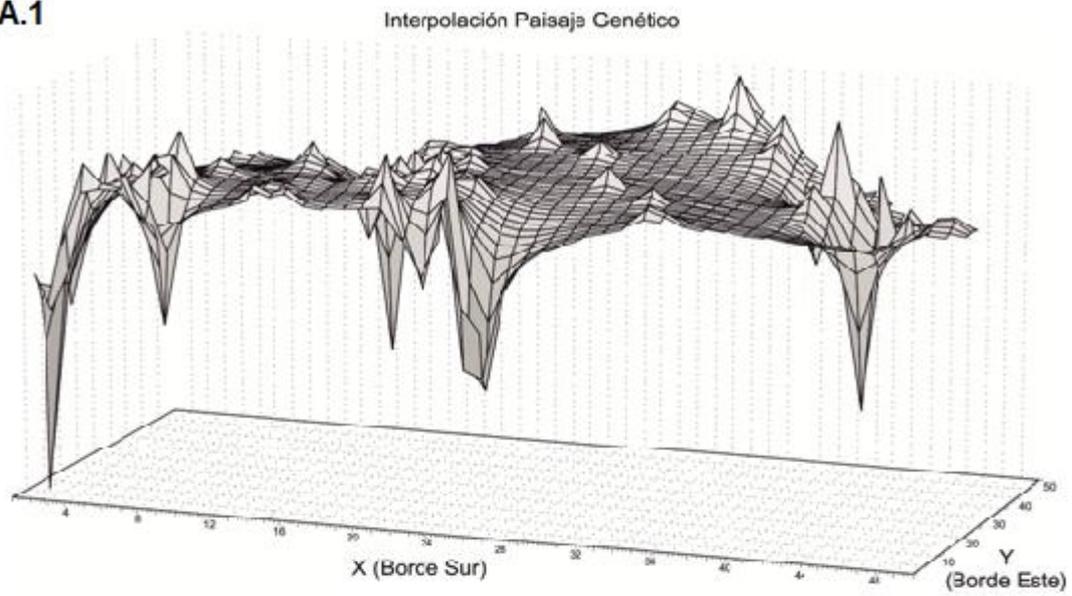
Figura 21. Para todas las secuencias obtenidas de ambos marcadores concatenados: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias de ambos marcadores concatenados, pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias de ambos marcadores concatenados, pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

A fin de establecer si algún tipo de señal o patrón fue enmascarado al concatenar los dos marcadores, se realizaron los tres análisis para cada marcador por separado. Esto se hizo tanto para todas las secuencias obtenidas de cada una, como así también separándolas en los clados A y B para cada marcador.

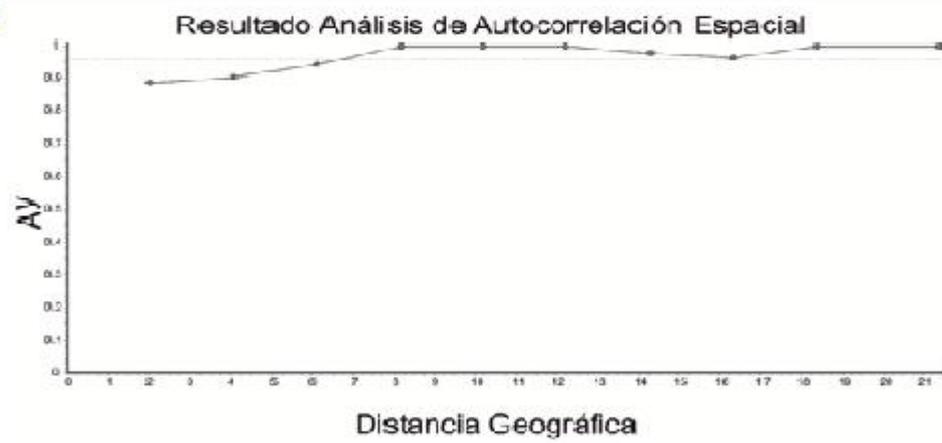
*Observando la distribución geográfica de la diversidad genética para las secuencias del marcador D-Loop obtenidas para *Zaedyus pichij*, se ve una proyección mucho más accidentada donde se acentúan las elevaciones y se suavizan las depresiones. Las regiones con elevaciones están separadas por llanuras, las zonas con más diferenciación genética se separan y reproducen claramente cuando se analizan los clados por separado, donde también se acentúan las depresiones debidas probablemente a la falta de la diversidad del clado no representado en cada caso (ver más adelante). No obstante, al analizarlos en conjunto se observa una mayor diversidad genética en el norte y sur de la distribución (aportada por el clado A) y la diversidad en el centro de la distribución, más concentrada (aportada por el clado B) (Figura 22.A.1). La autocorrelación espacial ($V=0,0420$; $p=0,0510$) Figura 20.A.2, fue significativa, como así también el test de Mantel ($r=0,1903$; $p=0,0009$) (Figura 22.A.3). Ambos análisis muestran el mismo patrón, donde se ve que solo en las primeras clases hay un aumento de la distancia genética a medida que aumenta la distancia geográfica, dando la pauta de que a distancias cortas podría estar actuando el aislamiento por distancia.*

En cuanto a los clados A y B para este marcador, se puede observar que las proyecciones de la interpolación del paisaje genético para ambos clados exacerban lo encontrado en los análisis para los marcadores concatenados. En la proyección del clado A se observan las mismas depresiones y elevaciones que dan la pauta de zonas con una mayor diferenciación genética (zona Norte de San Luis y San Juan, Figura 22.B.1). En cuanto al clado B (Figura 22.C.1) se hacen visibles depresiones en lo que sería la zona noreste de Chubut, donde habría una baja diversidad, y elevaciones en lo que sería la zona noroeste limítrofe entre Neuquén y Río Negro, donde este clado tendría la mayor diferenciación genética. También se observa que tanto el clado A como el B presentan patrones similares de distribución de los datos para la autocorrelación (Figura 22.B.2; C.2) y test de Mantel (Figura 22.B.3; C.3), siendo significativos para A ($v=0,09107$, $p=0,0040$; $r=0,2519$, $p=0,0009$) pero no para B ($v=0,09015$, $p=0,5080$; $r=0,0789$, $p=0,1598$). Se observa el mismo patrón que el obtenido para todas las secuencias del marcador sin distinguir clados, donde se ve que, de forma general, solo en las primeras clases hay un aumento de la distancia genética a medida que aumenta la distancia geográfica, dando la pauta de que a distancias cortas podría estar actuando el aislamiento por distancia.

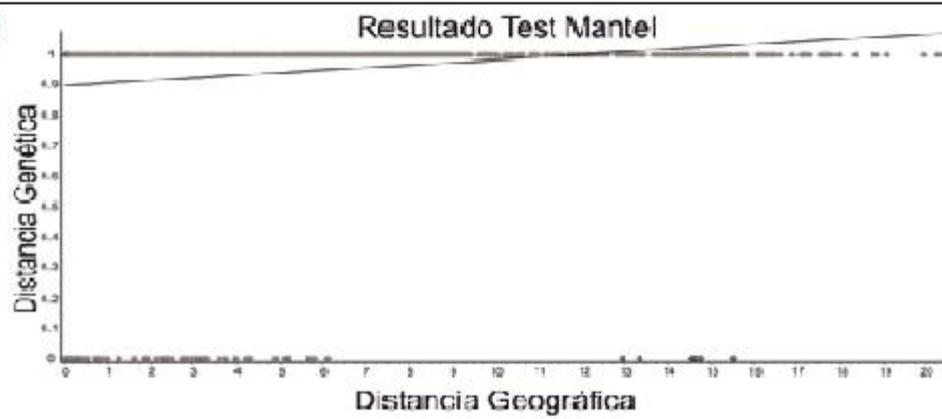
A.1



A.2

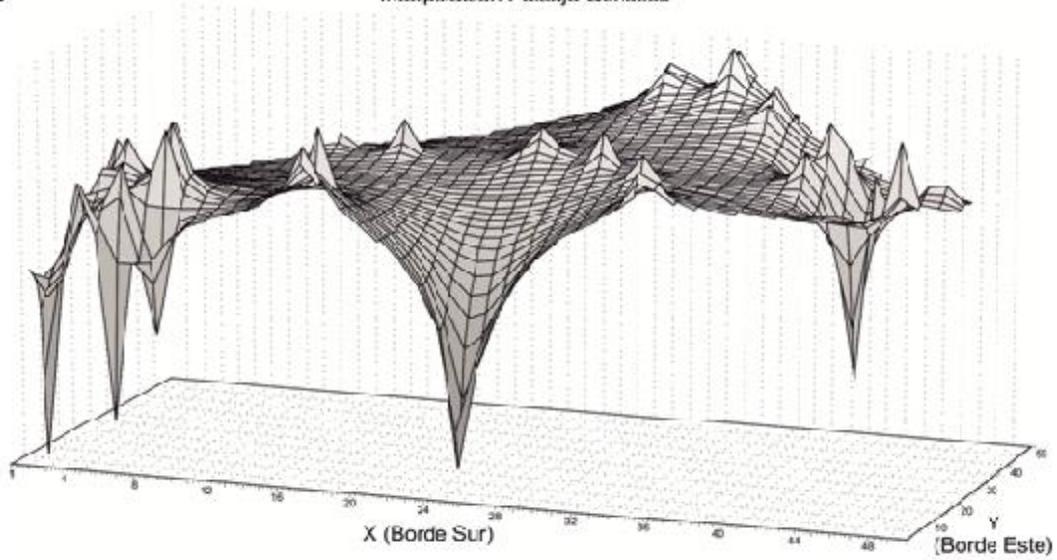


A.3



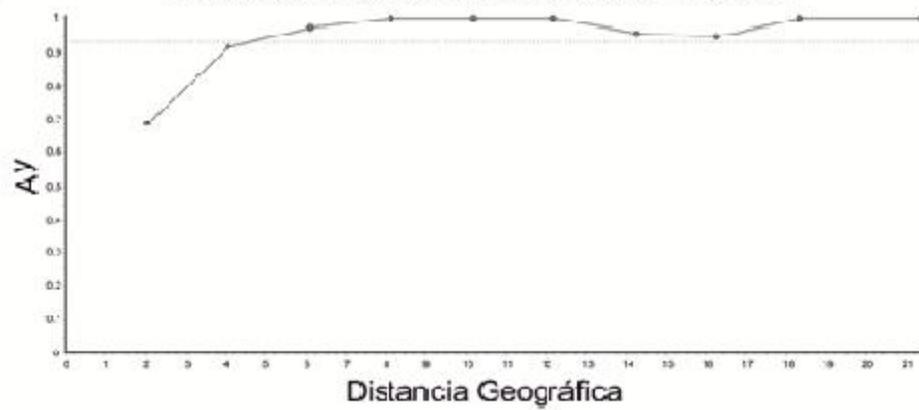
B.1

Interpolación Paisaje Genético



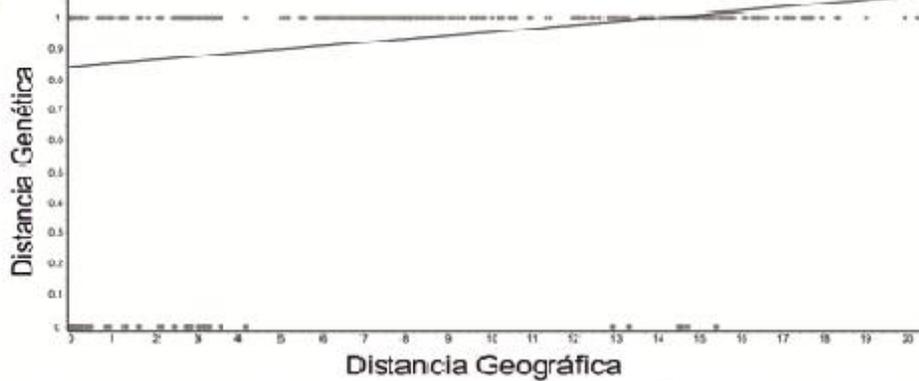
B.2

Resultado Análisis de Autocorrelación Espacial



B.3

Resultado Test Mantel



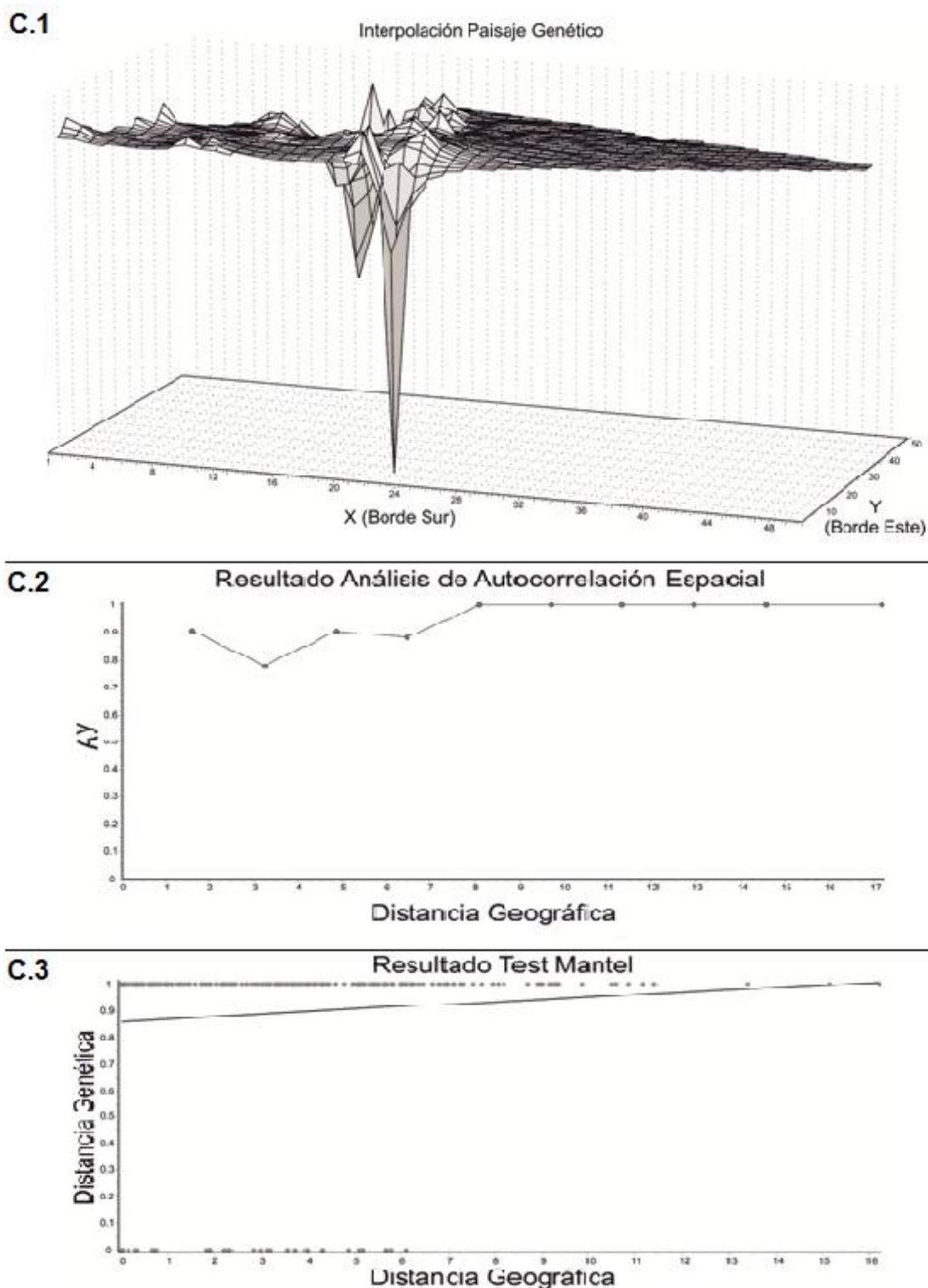
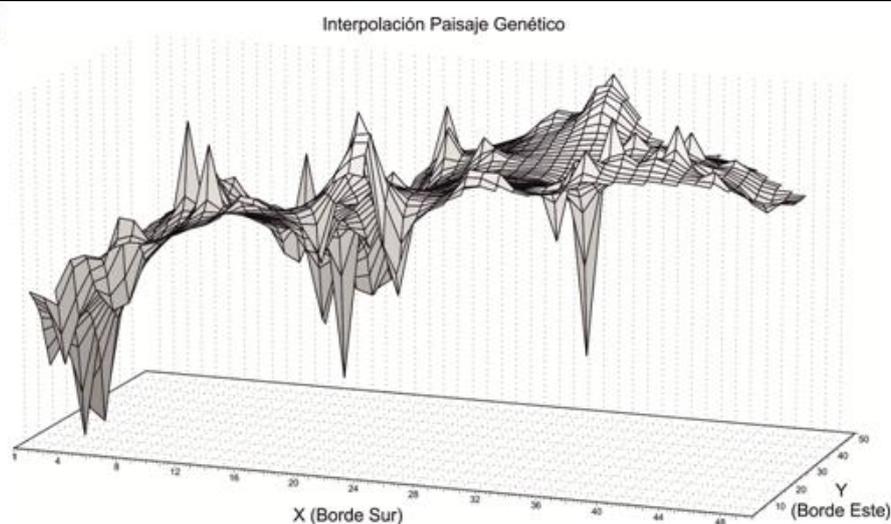


Figura 22. Para todas las secuencias obtenidas del marcador D-loop: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

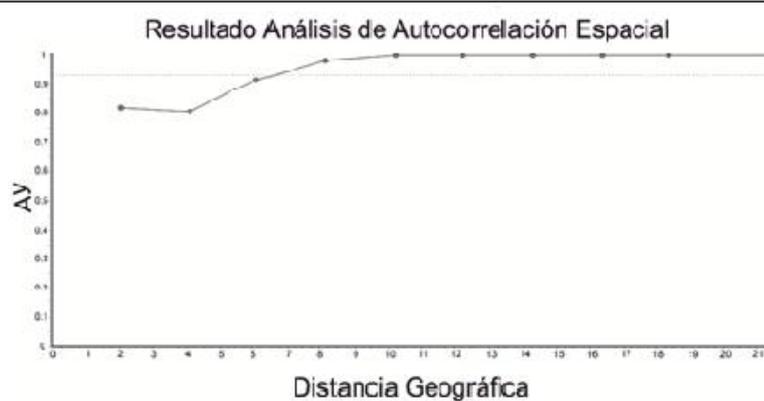
La proyección de la distribución geográfica de la diversidad genética para las secuencias del marcador COI, se observa aún más accidentada que la obtenida para el marcador D-Loop, mostrando el mismo patrón aumentado (Figura 23.A.1). Lo mismo sucede con la autocorrelación espacial ($V=0,0769$; $p=0,0370$; Figura 23.A.2), y el test de Mantel ($r=0,26087$; $p=0,0009$; Figura 23.A.3) que fueron significativos.

Como es de esperar, las proyecciones para los clados por separado también exacerban lo encontrado en los análisis para los marcadores concatenados y el marcador D-Loop (Figura 23.B.1y Figura 23.C.1), siendo la autocorrelación (Figura 23.B.2; C.2) y el test de Mantel (Figura 23.B.3; C.3), significativos para A ($v=0,0727$; $p=0,0250$; $r=0,2514$, $p=0,0009$) pero no para B ($v=0,23169$; $p=0,08800$; $r=0,0893$; $p=0,2727$).

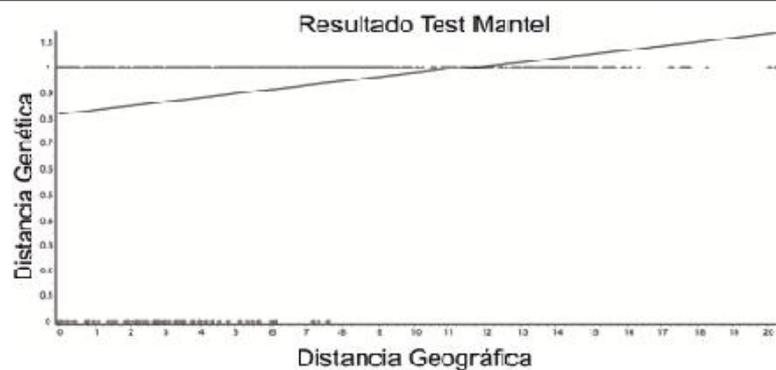
A.1



A.2

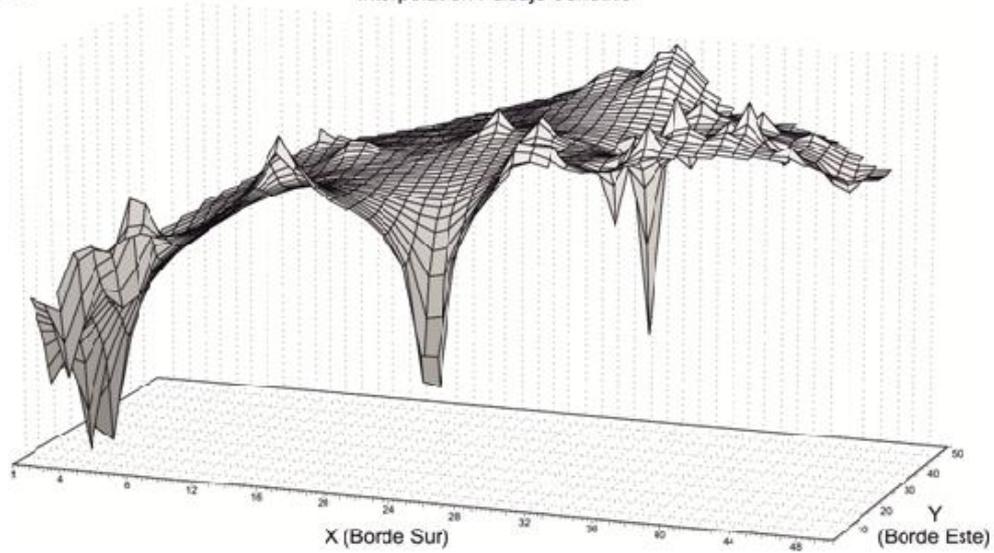


A.3



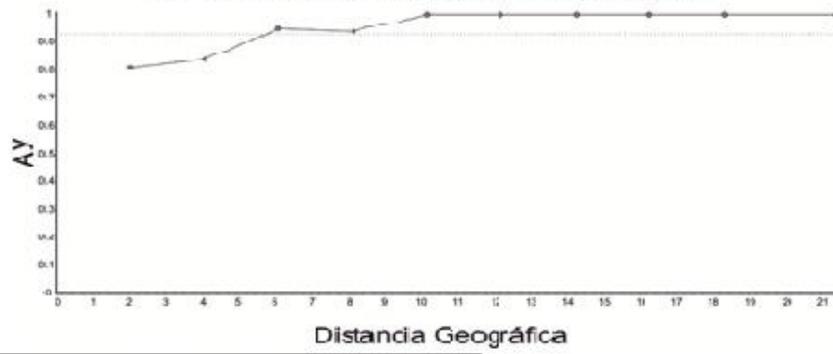
B.1

Interpolación Paisaje Genético



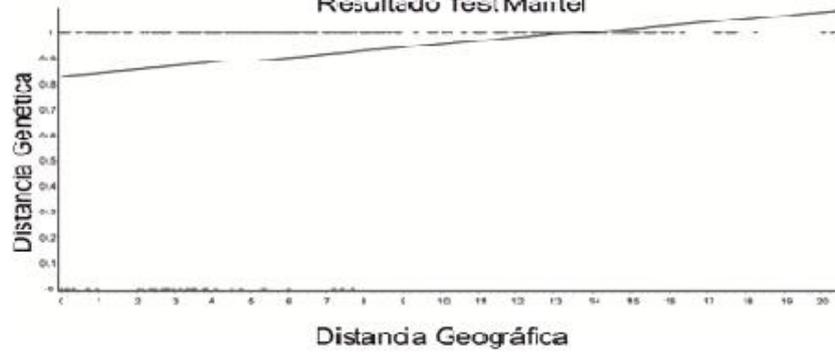
B.2

Resultado Análisis de Autocorrelación Espacial



B.3

Resultado Test Mantel



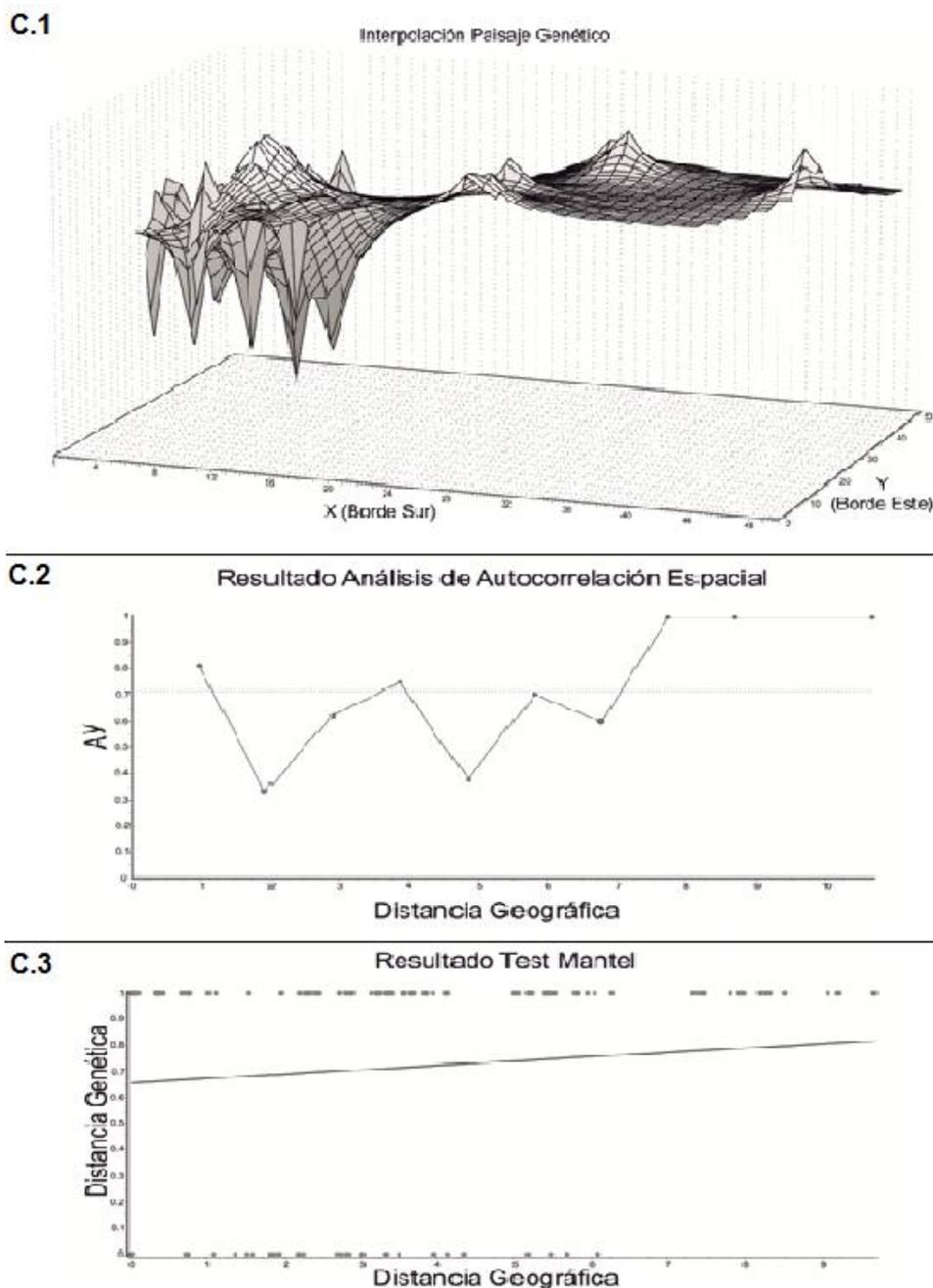


Figura 23. Para todas las secuencias obtenidas del marcador COI: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

Historia demográfica

Índices de diversidad y pruebas estadísticas

En cuanto a los valores de diversidad genética, se puede observar una alta diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π) para el linaje A y una más moderada para el linaje B, que a pesar de contener un subgrupo

divergentes pertenecientes a la localidad de RNP (red de haplotipos, Figura 19) sus haplotipos son más parecidos entre sí que en el grupo A. La diversidad nucleotídica (π) toma valores altos cuando se analizan ambos linajes juntos (ver Tabla 9).

Las pruebas de neutralidad realizadas para el conjunto de linajes de la especie muestran que la D de Tajima's y F_s de F_u 's tienen valores negativos y significativos, mientras que el r_g tiene un valor bajo, lo cual sugiere una expansión, pero sin significancia estadística (Tabla 9). El promedio de la cantidad de diferencias pareadas es de 6,718 y la distribución de las diferencias pareadas genera una gráfica levemente multimodal, aunque dentro del rango de lo esperado (Figura 24. A y B). A pesar que el valor de r_g no es significativo, el valor de F_s es una prueba muy potente para determinar expansión (Ramos-Onsins y Rozas 2002) y por lo tanto aquí se considera que el proceso de expansión demográfica está ocurriendo en *Zaedyus pichiy*. Tomando los linajes por separado, los resultados sugieren una expansión para ambos grupos, aunque menos marcada para el linaje A. Todos los estadísticos son negativos y significativos, y los valores de las distribuciones de las diferencias pareadas son bajos y significativos para un $P < 0,05$ (Tabla 9). De allí resultan gráficas unimodales, nuevamente no siendo tan clara para el clado A (Figura 24- A y B). El promedio de diferencias pareadas fue de 6.008 para el A y 2.059 para el clado B (Tabla 9).

Linaje	Índices de Diversidad			Test de Neutralidad		Análisis "mismatch distributions"			
	S	Hd \pm sd	π	D de Tajima's	Fs de Fu's	SSD	r	Nº medio de dif.	IC
A	40	0.9844 \pm 0.0028	0.01003 \pm 0.05021	-1.60094 (p=0.03400)	-25.38808 (p=0.000000)	0.01175 (p=0.45000)	0.03764 (p=0.04000)	6.008	3.029 - 10.863
B	56	0.9792 \pm 0.0043	0.00794 \pm 0.04418	-2.65547 (p=0.00000)	-26.23102 (p=0.00000)	0.02002 (p=0.07000)	0.11324 (p=0.02000)	2.059	1.290 - 3.181
A+B	60	0.9911 \pm 0.0012	0.01501 \pm 0.07026	-1.38363 (p=0.04900)	-24.82303 (p=0.00000)	0.01904 (p=0.51000)	0.03416 (p=0.25000)	6.718	2.367 - 12.999

Tabla 9: Diversidad genética y estadísticos en los diferentes linajes de *Zaedyus pichiy*, ver linajes en el árbol (Figura 17).

Para cada uno se muestra la diversidad haplotípica con su desvío estándar (Hd_sd), la diversidad nucleotídica (π), los índices de neutralidad D de Tajima y F_s de F_u con sus respectivos valores de significancia y valores asociados a la distribución de las frecuencias de las diferencias pareadas: SSD=suma de las desviaciones cuadradas entre las distribuciones de frecuencias observadas y esperadas, r = índice de irregularidad (Harpending 1994), Nº medio de diferencias y IC= intervalos de confianza de los Nº medios de las diferencias pareadas.

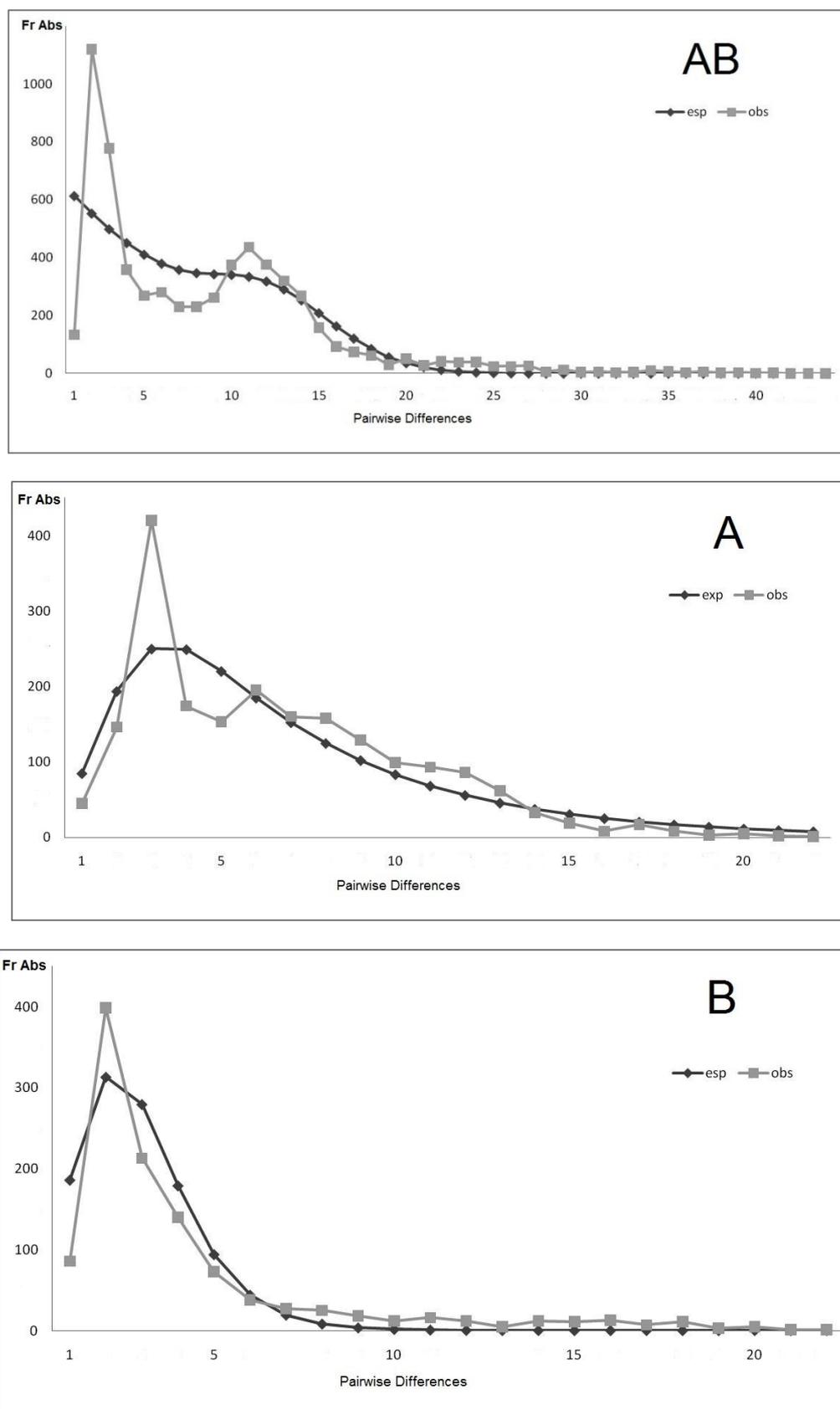


Figura 24: Distribución de las diferencias pareadas en: todas las muestras de *Zaedys pichiy* (AB), en el linaje A y en el linaje B. En los gráficos se observa con línea color gris la distribución de los datos y con línea color negra la distribución esperada bajo un modelo de expansión demográfica.

Análisis bayesianos: Reconstrucción demográfica y filogeografía bayesiana de *Zaedyus pichiy* en Argentina

El programa Tracer v1.5 arrojó que el modelo demográfico que mejor se ajustó a los datos es el constante, es decir que la variación en el tamaño efectivo poblacional (N_e) a través del tiempo no hace que los datos resuelvan con mayor credibilidad un modelo dado. Por ello se asume un modelo constante de tamaño poblacional, no siendo necesario mostrar el resumen visual de la reconstrucción demográfica. También se realizó el análisis para cada linaje principal, obteniéndose los mismos resultados que en el análisis global. Un proceso de expansión poblacional suele ir acompañado de un aumento del tamaño efectivo poblacional aunque puede no ocurrir, la expansión si fue detectada por todos los estadísticos utilizados, incluso por la distribución de diferencias pareadas para los linajes por separado.

Para la reconstrucción filogeográfica ninguna corrida logró la convergencia de las cadenas ni la estacionalidad de los parámetros (ESS), aún aumentando sucesivamente las interacciones. Tampoco se obtuvieron resultados confiables para las matrices de los marcadores moleculares por separado.

Solo se logró obtener una corrida con convergencia y estacionalidad de los parámetros bajo los modelos de reloj molecular estricto, demográfico constante, y modelo estricto de difusión browniano estándar (BD), es decir, utilizando los modelos más simples de reloj molecular, demografía y difusión (donde estos procesos permanecen homogéneos en el tiempo) y utilizando la matriz concatenada pero cortando todas las secuencias al tamaño de la secuencia más chica y eliminando las que tenían gran cantidad de datos faltantes. De tal modo, quedó finalmente un número reducido de secuencias, representando cada una de ellas un haplotipo, simplificando así la matriz y produciendo solo una primera aproximación.

La Figura 25 muestra la reconstrucción animada de la inferencia espacio-temporal de la filogeografía de *Z. pichiy* realizada mediante el programa Spread v1 (Bielejec *et al.* 2011) y visualizada en Google Earth (disponible en <http://earth.google.com>). Ellas ilustran cómo la especie se extendió a través del tiempo según la inferencia obtenida. No fue posible que el programa graficara las medidas de incertidumbre producidas por las inferencias de los lugares ancestrales.

Es posible que las incongruencias obtenidas y la imposibilidad de obtener corridas confiables con las matrices separadas y con la matriz concatenada sin modificar, se deban a que los datos faltantes de cada secuencia pueden generar ruido y enmascarar la información que se obtiene cuando se sacan dichas secuencias, es decir, que tal vez esas matrices no contienen la información necesaria para ponerlas a prueba ante modelos complejos y lograr que se ajusten.

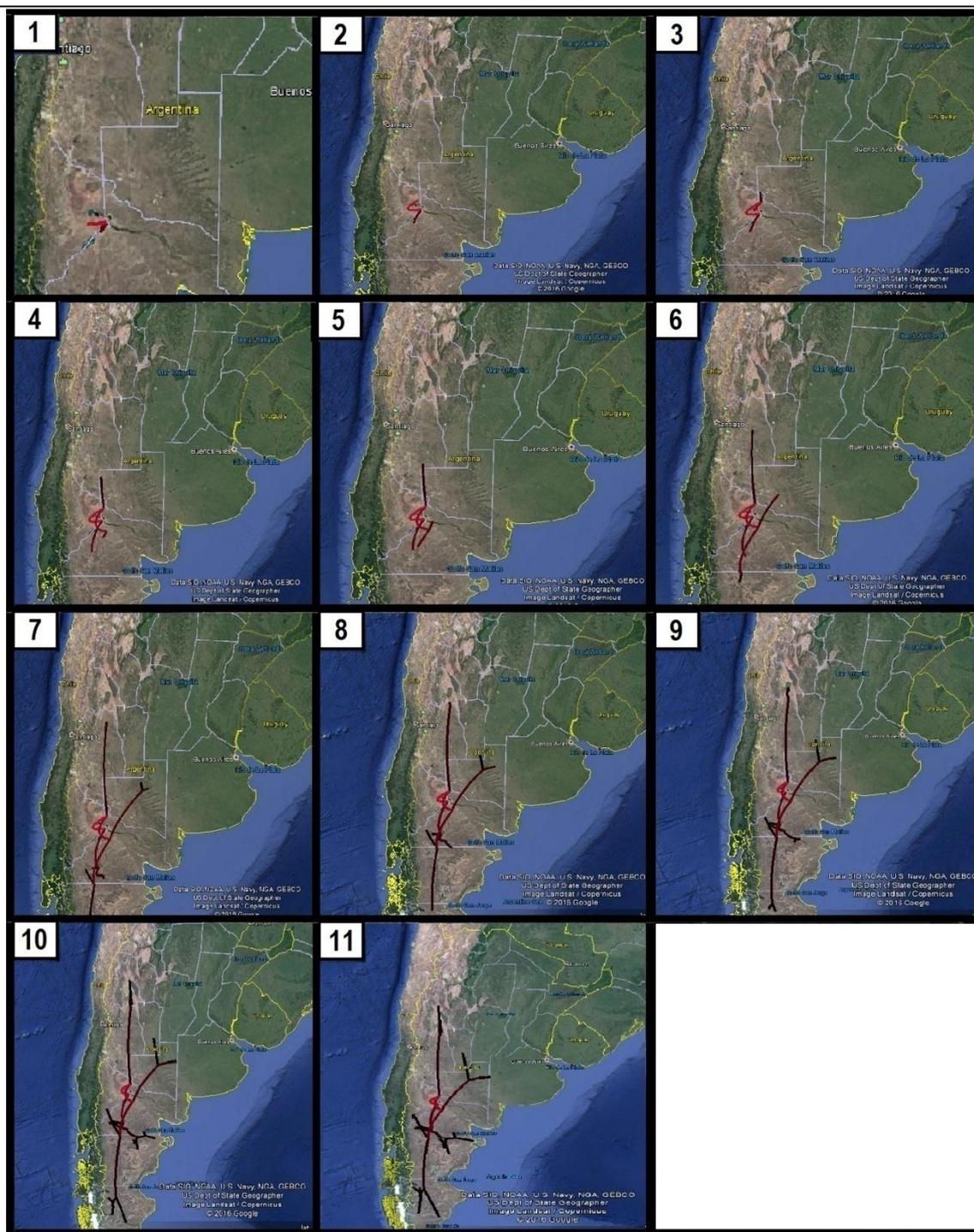


Figura 25: Reconstrucción animada de la inferencia espacio-temporal de la filogeografía de *Zaedys pichiy* a través del tiempo. La reconstrucción bayesiana muestra desde la Figura 1 a 11 diferentes momentos sucesivos en la distribución de la especie desde su probable centro de origen hasta su distribución presente. En las ramas se representa con rojo lo más basal y se va oscureciendo hacia lo más derivado.

El resultado obtenido en el análisis propone un origen de las poblaciones actuales de *Zaedys pichiy* situado entre Neuquén y Río Negro, más precisamente en la zona donde actualmente corren el Río Neuquén y el Río Limay para confluír y formar el Río Negro (Figura 23.1). De este centro de origen surgen dos linajes casi simultáneos (Figura 25.2): uno dispersa hacia el norte de Río Negro, para luego seguir hacia Mendoza (Figura

25.3-5) y más actualmente llegar hasta San Juan y La Rioja, pero también hacia el sur de Río Negro para luego tomar otras dos rutas de dispersión, una hacia Chubut (desde donde más actualmente se colonizó Neuquén y Santa Cruz) y otra hacia La Pampa, expandiéndose de ahí a San Luis y Buenos Aires (Figura 25.6-11). El otro linaje se expande del centro de origen hacia el centro-sur de Río Negro y permanece ahí, para más actualmente expandirse hacia el sur-oeste de la provincia y también hacia el noreste de Chubut (Figuras 25.7-11), aparentemente desplazando de esas regiones al primer linaje.

Las rutas y sus patrones de distribución actual son mayormente congruentes con lo visualizado en análisis anteriores (árbol de haplotipos, Figura 17, red de haplotipos, Figura 19 y distribución espacial de los linajes Figura18), donde se distingue los dos linajes principales A y B.

A pesar de que los desvíos en los cálculos del reloj molecular resultaron ser muy grandes (por lo que no se muestran edades específicas); teniendo en cuenta estos desvíos la historia que muestran las matrices de datos y sus análisis no sería mayor a 40 mil años.

Aportes del análisis estructural del marcador molecular D-loop

El D-loop es la región que evoluciona más rápido del genoma mitocondrial, no tiene función de codificación conocida y su organización estructural es similar en todos los organismos. Esta región se puede dividir en tres dominios: un dominio central conservado, que está en medio de los otros dos dominios más variables, los dominios ETAS y CSB, los cuales contienen elementos altamente conservados que se han mantenido en porciones de secuencia de estos dominios a través de grandes distancias evolutivas. Esto permite concluir que juegan un importante papel en la regulación de los procesos de replicación y la transcripción de ADNmt (Sbisà et al. 1997; Nahum 2001).

Estos dos dominios periféricos son los verdaderos responsables de la alta tasa de evolución de la región, generando heterogeneidad en longitud debida mayoritariamente a repeticiones en tándem, que pueden incluir o no a sus elementos conservados y variando su composición de bases. Esta variación de la longitud de la Región Control es un fenómeno bien documentado en una gran cantidad de especies, tanto de invertebrados como de vertebrados (p.ej., Rand y Harrison 1989; Fumagalli et al. 1996; Gemmell et al. 1996; Terencio et al. 2012) lo que sugiere que los polimorfismos de longitud se generan con bastante facilidad. En general, los motivos de repetición están ubicados en dos posiciones: adyacentes a los elementos conservados TAS, o adyacentes a los elementos conservados CSB de cada dominio (Fumagalli et al. 1996 Gemmell et al. 1996; Sbisà et al. 1997).

*El fragmento de 80 pb que se repite en las secuencias de la primera porción de la RC obtenidas y analizadas en este estudio de varias especies de armadillos, es el motivo de repetición adyacente a la secuencia TAS. Los bloques conservados ETAS1 y ETAS2 tienen una distancia variable en las diversas especies, con una longitud de 47 pb (porción parcial del fragmento) en *Dasyopus kappleri* a 400 (5 veces el fragmento de 80 pb) en *Zaedyus pichiy*.*

El papel de las secuencias repetidas en los dominios laterales no es claro, pero sin duda, son parte de las estructuras secundarias que ellos forman (una característica adicional conservada de estos dominios) al ser capaces de doblarse y autocomplementarse, aumentando su estabilidad según aumenta el número de unidades repetidas. Debido a la ubicación de las secuencias repetidas en el región reguladora y sus propiedades en términos de conformaciones variables, la eficiencia de la replicación del DNAm podría verse afectada, sugiriendo que podrían potencialmente alterar una región reguladora clave en el genoma mitocondrial (Fumagalli et al. 1996).

En estudios anteriores, el número de repeticiones en el dominio TAS nunca fue mayor que nueve y, en particular, los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan, ya que el mayor número de repeticiones fue cinco en una muestra de *Zaedyus pichiy*. De acuerdo con Fumagalli *et al.* (1996) esto se explicaría debido a que la selección parece actuar solo cuando la estructura D-loop es demasiado larga, lo que sugiere que por encima de un cierto número de repeticiones los procesos que conducen al inicio de la replicación pueden ser afectados.

Casi todas las especies de vertebrados estudiadas poseen una única copia "imperfecta" de las repeticiones en tándem en el extremo 3' (Fumagalli *et al.* 1996), apoyando la idea que el deslizamiento de replicación unidireccional es el mecanismo responsable de la gran variación de longitud en el ADNmt. En este modelo propuesto, la inserción o eliminación de unidades repetidas durante la replicación de ADNmt puede originarse debido a un desplazamiento competitivo entre repetidos en la estructuras estables de tallo-lazo formadas por ellos (Buroker *et al.* 1990) o por las estructuras secundarias de los genes flanqueantes (12S ARNr y ARNt) (Mundy *et al.* 1996). Por ende, la duplicación de motivos solo debería ocurrir en una dirección, debido a la replicación unidireccional de la cadena H en esta región (Wilkinson y Chapman 1991). De acuerdo a lo mencionado, las repeticiones en el extremo 5' deben duplicarse o eliminarse mientras que, en el extremo 3' nunca se duplican, protegiéndose así de un evento de eliminación. Esto genera un claro patrón de homogeneización en el proceso de variación de nucleótidos por ciclos reiterados de adición y eliminación de repeticiones (ver, por ejemplo, Rand 1994; Fumagalli *et al.* 1996) lo cual puede darse intraespecíficamente, a nivel de familia, o en categorías mayores (Faber y Stepien 1997; Cuiet *et al.* 2010).

Sin embargo, el patrón de variación que se observa en las especies de xenartros no es tan claro. En primer lugar, el repetido del extremo 3' es un repetido trunco, es decir, es solo la mitad de la secuencia del resto de los repetidos. Esto se ve en todas las secuencias analizadas, sugiriendo que esta secuencia trunca estaba presente en el genoma mitocondrial ancestral antes de la divergencia de al menos todos los Cingulata que, pareciera, fue adquiriendo polimorfismos luego de la división de las subfamilias. La única secuencia en la que no se encontró el repetido trunco es en la que tiene el mayor número de repetidos encontrados (cinco) de *Z. pichiy*. Esto puede deberse a la longitud del fragmento secuenciado, ya que la posición de los cebadores que se usaron para secuenciarlo no son fiables en las secuencias que poseen más de cinco repeticiones en tándem.

En lo que respecta a los Euphractinae, se aprecia que el repetido trunco (llamado 2.5 o 3.5 en este estudio) es el único en que *Euphractus* se parece a las demás especies de Euphractinae más que a sus repetidos enteros (Figuras 6 y 7), dando la pauta que es el más antiguo y está protegido de la eliminación y homogeneización, mostrando lo que sería la secuencia antigua de los Euphractinae con algunas mutaciones puntuales. En los repetidos enteros, se ve claramente la separación de *Euphractus* del resto de los representantes de la subfamilia, ya que sus tres repetidos son casi idénticos entre sí (Figuras 6 y 7), mostrando mayor homogeneización y sugiriendo una mayor tasa de inserción de repetidos en esta región para esta especie que en el resto de las especies.

Las secuencias del repetido 2 de *Zaedyus pichiy* y *Chaetophractus* se parecen más entre sí y a la del repetido trunco que al repetido 1 de cada especie, lo que sugiere que el proceso de homogenización no se ha dado a nivel de especie en estos dos géneros, ya que la convergencia en el número de repetido y en la mayoría de las mutaciones puntuales sería menos parsimoniosa. Lo mismo parecería ocurrir con los repetidos extra (R3, R4 y R5) de las diferentes secuencias de *Zaedyus pichiy* que también son parecidos al consenso de Euphractinae sin *Euphractus sexcinctus* del repetido 2 aunque con más polimorfismos debido a que los errores aumentan con el mayor número de repetidos. El número de mutaciones diferenciales entre *Zaedyus* y *Chaetophractus* en el repetido 1 es menor que en el repetido 2, dando la pauta que el 1 es más reciente. En síntesis, los repetidos enteros parecen evolucionar con tasas muy distintas en *Euphractus* que en el resto de los géneros. La hipótesis más parsimoniosa para explicar todo esto daría la pauta de más cercanía entre *Zaedyus* y *Chaetophractus*, lo que no concuerda con la filogenia clásica de la subfamilia Euphractinae.

Por otro lado, si analizamos las secuencias de la RC sin tener en cuenta las repeticiones, estas mostraron la misma organización general previamente informada por Poljak *et al.* (2010) en el género *Chaetophractus*, aunque sus diferencias no separan claramente a las especies. Por ello, comparar el número y composición de las repeticiones para analizar la filogenia puede ser otro aporte válido a la discusión que, según distintas hipótesis, relacionan alternativamente a los géneros de Euphractinae.

Que los repetidos extra en las secuencias de *Zaedyus pichiy* con más de dos repetidos sean parecidos al 2, da la pauta de que estas conformaciones serían más antiguas que la de solo dos repetidos enteros más el trunco, la cual comparten *Zaedyus* y *Chaetophractus*. Entre dichas conformaciones está la de tres repetidos más el trunco, pudiendo ser una hipótesis que se apoye en la filogenia tradicional, lo que podría explicarse asumiendo que la secuencia de tres repetidos enteros más el trunco sea “la ancestral”. En *Euphractus sexcinctus* aumentó su tasa al homogeneizarse los repetidos, mientras que en *Chaetophractus* se pierde un repetido. A pesar de que la mayor variación de conformaciones encontradas en *Zaedyus pichiy* apoya que sea la más antigua, también podría explicarse porque es la que cuenta con más muestras secuenciadas, pudiéndose encontrar en el futuro más conformaciones en los otros géneros.

Otra alternativa para explicar el patrón de repetidos en los Euphractinae sería que la secuencia ancestral tuviera dos repetidos y el trunco y que, al divergir *Euphractus*, aumentara su tasa y adquiriera un repetido extra, siendo esta explicación más parsimoniosa que la anterior. Esto indica que la aparición de un tercer repetido es un evento que habría ocurrido al menos dos veces en este grupo. Cabe esperar que esta conformación apareciera con la secuenciación de un número mayor de muestras en las especies de *Chaetophractus*.

Al observar los repetidos en el resto de las especies de armadillos y analizando en particular al género *Dasyurus*, se aprecia que también hay variación en el número de repetidos entre sus especies. En el caso de este género, la hipótesis más parsimoniosa de la aparición de los repetidos no está en conflicto con su filogenia.

Estas conclusiones podrían tener implicancias filogenéticas para la subfamilia, ya que en el resto de las especies de armadillos en que se analizaron los repetidos, su variación parece tener concordancia con la filogenia. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que hay presión de selección por la estabilidad estructural de esta región, así como también indicios de selección ambiental.

En cuanto al número de copias favorecido por la estabilidad de la estructura secundaria, al menos en los *Euphractinae* este estaría entre dos a tres repeticiones más la repetición trunca, ya que las conformaciones con mayor número de repeticiones encontradas en secuencias de *Zaedyus pichiy* no son las que prevalecen en la especie. Además, todas las secuencias de *Chaetophractus* y *Euphractus* hasta el momento tienen la misma conformación y número de repetidos. Dado que tres sería el número de repetidos más estable, esta configuración concuerda con la propuesta de Buroker *et al.* (1990), quienes propusieron el modelo de deslizamiento de replicación unidireccional por el cual se originan las repeticiones. Debido a esto, se estima que gran parte de la presión evolutiva en esta región no codificadora parece actuar en el nivel de la estructura secundaria en lugar del nivel de secuencia (Fumagalli *et al.* 1996) haciéndola una región muy elegida como marcador molecular para estudios de genética de poblaciones, filogenia y filogeografía (Avice 2004; Chen *et al.* 2004; Hrbek y Farias 2008). Sin embargo, en estos estudios se descartan las repeticiones, ya que la variación en la longitud de las secuencias hace difícil su alineación y aunque es cada vez más común detectar su presencia en al menos uno de los dominios mitocondriales de muchos taxones, muchas veces se omite y no se analiza, perdiéndose información valiosa. El análisis de las repeticiones debería realizarse separadamente, como en este estudio. A pesar que las mutaciones puntuales responderían al modelo neutral de evolución molecular, la variación en la tasa de mutación y la posible homogenización, junto con las inserciones/deleciones de repetidos pueden, por ejemplo, borrar o duplicar polimorfismos, causando diferencias entre individuos, especies, o géneros, tergiversando así la historia evolutiva y no permitiendo un análisis con los métodos de alineación tradicionales. Incluir alguna de estas repeticiones o pasar por alto alguna variación puede introducir información contradictoria en las matrices de secuencias, motivo por el cual para el análisis filogeográfico de *Zaedyus pichiy* en este estudio solo se han utilizado las secuencias con la menor cantidad de repetidos, al tiempo que se excluyó este marcador en el análisis de la filogenia de los *Euphractinae*.

Un ejemplo de la información valiosa que aporta el análisis de las repeticiones es representado por el estudio de poblaciones del pez-arroz japonés *Oryzias latipes* (*Actinopterygii*) que indicó una correlación significativa entre el número de repeticiones en tándem y la latitud geográfica de las secuencias, donde el número de las repeticiones fue mucho mayor en las poblaciones que habitan regiones más frías y altas, y el número de copias disminuyeron gradualmente entre poblaciones encontradas en latitudes más bajas, llegando a no tener repetidos en sus secuencias en poblaciones que habitan regiones tropicales (Hirayama *et al.* 2010) demostrándose así que puede haber selección ambiental en el número de repetidos. En los *Euphractinae* hasta el momento solo se encontró variación entre individuos en el número de copias en *Zaedyus pichiy*, siendo también donde se encontró el

mayor número de repeticiones. Esta especie está relacionada al frío y altura, por lo que habría que aumentar el muestreo para poder poner a prueba esta hipótesis. En particular, también son buenos candidatos el resto de las especies de la subfamilia: *Chaetophractus vellerosus* por tener poblaciones de mucha altura y poblaciones al nivel del mar (población disyunta de la costa bonaerense), *C. nationi* por registrarse en ambientes de altura, *C. villosus*, que pese a no habitar en alturas, posee la distribución más austral (aunque se cree que esta condición se dio muy recientemente, Poljak *et al.* 2020) y *Euphractus*, con una gran distribución en climas más cálidos, que va desde latitudes templadas a tropicales.

Para *Zaedyus pichiy*, en este estudio no solo se han encontrado individuos con diferentes números de copias, sino que también se han detectado secuencias con diferente número de repetidos en un mismo individuo. La frecuencia de este fenómeno (conocido como heteroplasmia) varía en gran medida entre diferentes grupos de organismos, pero es más común de lo que se creía anteriormente. Sin duda, las nuevas tecnologías permiten la detección de este fenómeno de forma más confiable y detallada. Los estudios actuales han estado enfocados principalmente a humanos y peces (Ludwig *et al.* 2000) y se han limitado, mayoritariamente, a la Región Control (no codificante) del ADNmt, ya que se ha demostrado que puede ser, en algunos casos, responsable de la diferencias en el tamaño (Foster *et al.* 2010), también causado por hibridación introgresiva (p.ej., Reis *et al.* 2010 en quelonios). En el caso de *Zaedyus pichiy*, la obtención de secuencias de la RC con diferente número de repetidos para un mismo individuo sugeriría que el polimorfismo de longitud es debido a la heteroplasmia. Según Gibb *et al.* (2016), que un evento de introgresión y/o hibridación haya afectado significativamente el mitogenoma de los xenartros es poco probable, debido a la congruencia global de los análisis filogenéticos y de datación de base nuclear y mitocondrial.

Los mecanismos moleculares que causan heteroplasmia aun no son conocidos en su totalidad, aunque se han propuesto diferentes explicaciones para la ocurrencia de este fenómeno en los organismos. Una de las posibles causas es el estrés oxidativo, ya que puede afectar al ADNmt de diversas formas. Entre las más conocidas pueden mencionarse la alteración oxidativa de bases, el aumento en el nivel de deleciones, y la aparición de mutaciones puntuales (Rand 1993; Hernández 2005; Gil y Sanchez 2010).

Otros estudios demostraron que las mutaciones heteroplásmicas pueden variar significativamente entre diferentes tejidos, incluso en el mismo individuo (Wallace 2008). Un trabajo en una población de la carpa común *Cyprinus carpio* (Actinopterygii) en la que se evaluó el grado de heteroplasmia en el músculo, hígado y riñón, demostró que el tejido muscular es más heteroplásmico (Cao *et al.* 2015). En este estudio, la mayor parte de las muestras de *Zaedyus pichiy* analizadas son de tejido muscular.

El grado de heteroplasmia puede variar también entre individuos, presentando diferentes porcentajes de mutaciones heteroplásmicas. Por ende, se deduce que hay diferencias en las tasas evolutivas del ADNmt de los

individuos, posiblemente influenciadas por factores ambientales que pueden llegar a fijar caracteres genéticos en la población por medio de procesos estocásticos como la deriva génica (Delgado Cano 2017).

Estudios en humanos demuestran que las mutaciones heteroplásmicas se encuentran a lo largo de todo el genoma mitocondrial, afectando diferentes genes codificadores de proteínas, ARNt y ARNr. La presencia de heteroplasmia en las regiones del ADNmt es independiente de la longitud y ubicación de dichas regiones, incluso los ARNes de transferencia tienen mayor tasa de heteroplasmia en comparación con las regiones codificantes de proteínas y ARNes ribosómicos. Esto ocurre porque sus secuencias se pliegan en estructuras secundarias características, mientras el ADNmt se está replicando. Estas conformaciones estructurales contribuyen a la inserción o deleción de nucleótidos, dando lugar a variaciones de longitud y heteroplasmia (Moritz *et al.* 1987). En párrafos anteriores se ha mencionado que esto está relacionado a lo que sucede en la RC del D-loop.

En cuanto a la menor incidencia de heteroplasmia en regiones conservadas, se observaron por ejemplo porcentajes más bajos para algunos genes del complejo IV (Citocromo c oxidasa) (Broughton *et al.* 2001). Es decir, que las regiones menos variables en cuanto a heteroplasmia corresponden frecuentemente a dominios hidrófilos de la membrana en proteínas como COI.

El otro marcador utilizado en este estudio es COI, descartando que los análisis realizados tengan algún sesgo por heteroplasmia. Otros vertebrados comparten características similares con las heteroplasmas humanas, ocurriendo la mayoría de las heteroplasmas detectadas en regiones intergénicas (Villare *et al.* 2016). Sin embargo puede haber diferencias en el grado heteroplásmico de cada individuo o linajes, y esto puede ser el resultado de la segregación replicativa del ADNmt, procesos estocásticos como la deriva génica, introgresión de ADNmt paterno, entre otras (Cao *et al.* 2015). Por ejemplo, Novelletto *et al.* (2016) concluyen que hay diferencias de las regiones o genes con mutaciones heteroplásmicas entre linajes de quelonios, y que ellas representan novedades evolutivas y permiten inferir que están operando la adaptación local y/o los polimorfismos basados en la selección local.

Estudios en humanos por medio de tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) sugieren que la deriva genética y/o la selección natural pueden estar actuando en el ADNmt para reducir la frecuencia de las mutaciones heteroplásmicas a nivel poblacional (Ramos *et al.* 2013). De hecho, la heteroplasmia en posiciones altamente estables podría tener un mayor impacto en la viabilidad de las mitocondrias, lo que sugiere que la selección purificadora debe estar operando para prevenir su fijación dentro de los individuos. Es decir que se cree que la desviación hacia la homoplasmia de la mayoría de las mutaciones heteroplásmicas se evitaría normalmente por la gravedad de la alteración de la fosforilación oxidativa y la consiguiente reducción del estado reproductivo. Por lo tanto, las variantes de secuencia que han alcanzado la homoplasmia deben ser neutras en términos de evolución y, por tanto, útiles sólo para trazar la evolución, aspectos demográficos y de migración. Sin embargo, ya hay documentadas excepciones, como el caso de una o más variantes homoplásmicas no neutras en humanos

(Skorecki y Behar 2016). También se han detectado interacciones epistáticas con otros locus genómicos y posible selección por factores ambientales (Skorecki y Behar 2016).

Los resultados de esta tesis serían el primer indicio de heteroplasma en al menos la región D-Loop de armadillos, debiendo avanzarse en el conocimiento de la genética mitocondrial y en su estado genético en sus especies. Es recomendable realizar otros estudios con mayor número de individuos, para obtener resultados que reflejen mejor el estado poblacional y las tendencias de estas especies, utilizando alguna de las diversas técnicas para la detección de heteroplasma como por ejemplo la secuenciación de alto rendimiento o tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS), siendo el método que actualmente es más efectivo y confiable (Li *et al.* 2010; Huang 2011; Wallace 2005). A pesar de esto, es difícil detectar y valorar la heteroplasma en diferentes tejidos afectados y aun no existen reportes del porcentaje de heteroplasma del genoma mitocondrial completo de vertebrados, ni de su nivel en cada región.

La heterogeneidad aparente que surge de las posibles explicaciones de lo encontrado en *Euphractinae*, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, hace que sea difícil proponer un patrón general de variación en sus repeticiones de la RC de D-loop.

El análisis de los polimorfismos de nucleótidos de secuencia de repetidos reveló homogeneidad entre repeticiones dentro de *Euphractus* y heterogeneidad en *Zaedyus* + *ChaetophRACTUS*. Se observa heterogeneidad en el número de repeticiones entre los individuos de *Zaedyus pichiy* además de heterogeneidad entre y también dentro de la especie pudiendo ser causado por heteroplasma (Figura 5).

Profundizar el estudio comparativo del ADNmt en las especies de dichos géneros, con muestras representativas de la distribución de cada una de las especies que consideren factores ambientales permitiría: (1) confirmar que las repeticiones en tándem en la RC de *Zaedyus pichiy* son debidas a la heteroplasma; (2) buscar heterogeneidad de polimorfismos de repetidos entre individuos dentro de las especies y determinar sus causas; (3) buscar heteroplasma en esas especies y secuencias repetidas en tándem en el otro dominio de la RC; (4) buscar heteroplasma en otras regiones; (5) indagar diferencias de heteroplasma entre diferentes tejidos; (6) identificar si no hay direccionalidad en la heteroplasma en determinadas regiones; y (7) intentar dilucidar cuál es la verdadera carga de la heteroplasma relacionada con variaciones en la secuencia de mtDNA, a fin de comprobar la neutralidad de los marcadores moleculares de los análisis filogenéticos y filogeográficos.

Aportes moleculares a la filogenia de la subfamilia *Euphractinae*

Los análisis MP, MV e IB del gen COI no resolvieron las relaciones dentro de la subfamilia *Euphractinae* (Figuras 10, 11 y 12), coincidiendo con estudios anteriores morfológicos y moleculares (Engelmann 1985; Delsuc *et al.* 2002, 2003; Gaudin y Wible 2006; Möller-Krull *et al.* 2007). A pesar que se incluyó a todas las especies de la subfamilia representadas por más de un espécimen, factor muy importante en filogenias complejas, es probable que

la ambigüedad persista debido a la rápida diversificación que sufrió esta subfamilia (Delsuc *et al.* 2004), así como también por la heteroplasmia mitocondrial mencionada anteriormente, y/o la selección natural. Sin embargo, trabajos con marcadores nucleares codificantes y no codificantes informan resultados similares (Abba *et al.* 2015). En tal sentido, es posible inferir con cierto grado de certeza que la diversificación sería responsable de la dificultad en resolver los parentescos.

El árbol reconstruido del análisis Bayesiano particionado de múltiples secuencias (utilizando especímenes de cada unidad taxonómica), combinando el marcador del gen mitocondrial con dos marcadores nucleares, resuelve en parte estas relaciones (Figura 13), sosteniendo a *Zaedyus pichiy* como la primera especie en divergir, lo que coincide con la hipótesis filogenética tradicional (Frechkop y Yepes 1949; Engelmann 1985; Gaudin y Wible 2006). Sin embargo, el clado *Euphractus* + *Chaetophractus* recibe apoyo moderado, por lo tanto las relaciones entre las especies de esta filogenia compleja no se resuelven bien, lo que sugiere que podría tratarse de una tricotomía. Finalmente, el análisis de las probabilidades posteriores de las diferentes hipótesis de delimitación apoya la hipótesis de que *Zaedyus pichiy* es la especie basal de la subfamilia Euphractinae, coincidiendo con el registro fósil, los estudios morfológicos cráneo dentales (Gaudin y Wible 2006) y los estudios moleculares de marcadores nucleares codificantes (Abba *et al.* 2015). Las hipótesis que agrupan a las tres especies restantes tienen BPP similares; en particular, la que agrupa a *Euphractus sexcinctus* con *Chaetophractus villosus* presenta menos ramas ambiguas según la visualización del plot generado por Densitree (Figura 15). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Delsuc *et al.* (2003), que analiza dos genes mitocondriales (diferentes a la COI) concatenados con tres exones (dos se utilizan en este estudio) aunque incluyendo únicamente a *C. villosus* como representante del género *Chaetophractus*.

En su estudio de retroposones y sus regiones flanqueantes, Möller-Krull *et al.* (2007) utilizana *Chaetophractus vellerosus* para representar al género *Chaetophractus*. Tanto la reciente filogenia de xenartros mediante ADNmt completo realizada por Gibb (2016) así como la partición de marcadores nucleares no codificantes de Abba *et al.* (2015), en la que se sinonimiza a *C. vellerosus* y *C. nationi*, sugieren la parafilia del género *Chaetophractus*. En este contexto, *C. vellerosus* resulta más relacionado con *Zaedyus pichiy* que con *C. villosus*. Sin embargo, las posiciones relativas *C. villosus* y *Euphractus sexcinctus* siguen aún inciertas, con posiciones conflictivas que no ofrecen fuerte apoyo. Esta hipótesis es apoyada también por estudios cromosómicos (Lizarralde *et al.* 2005; Jorge y Pereira 2008) y concuerdan con análisis morfológicos poscraneales (Abrantes y Bergqvist 2006) a pesar que no existe acuerdo entre todos los autores acerca del valor del esqueleto y los escudos en la filogenia de algunos grupos de xenatros (Delsuc *et al.* 2016).

Abba *et al.* (2015) explican la discrepancia entre los estudios moleculares por la especie utilizada para representar al género *Chaetophractus*, ya que hasta ese momento las dos especies del género nunca habían sido incluidas en un mismo estudio molecular o morfológico. Sin embargo, en dicho artículo se incluyeron todas las especies y tampoco dichos autores obtuvieron reconstrucciones filogenéticas concluyentes. Esto mismo sucedió en

esta tesis. Abba *et al.* (2015) sugieren que la discrepancia entre el análisis de datos de marcadores nucleares no codificantes con marcadores codificantes podría explicarse por el escaso número de sitios informativos disponibles en las dos matrices de secuencias utilizadas, especialmente en aquella de los marcadores codificantes.

En esta tesis, como en el estudio de Gibb *et al.* (2016) basado en mitogenoma, las secuencias utilizadas tienen tasas de variación más elevadas y sigue habiendo ambigüedad o apoyo bajo tanto para la hipótesis tradicional o como para la parafilia del género *Chaetophractus*. Consecuentemente, a fin de resolver esta filogenia a nivel molecular se debería profundizar en análisis de microsátélites o secuenciación masiva.

Como se mencionó en Materiales y métodos, el marcador no codificante mitocondrial D-loop no se utilizó en este estudio por la variación de las repeticiones halladas. Sin embargo, se realizó un análisis de las mismas con el objetivo de aportar información filogenética de la separación de la subfamilia, y su resultado apoya la hipótesis de monofilia del clado *Chaetophractus* + *Zaedyus*, pero también deja sin resolver la posición de *Euphractus* (Figura 8). El resto de la secuencia de D-loop no daría más información que los marcadores nucleares, ya que no permite diferenciar claramente las especies. Esto puede deberse a que el mecanismo que produce las repeticiones borra las mutaciones más recientes y, como la diversificación de la subfamilia se cree muy reciente, puede haber borrado las mutaciones huella de dicha historia evolutiva. En estudios donde se utiliza el marcador D-loop o el ADNmt completo, las repeticiones se enmascaran debido a que son demasiado largas para resolver con secuencia de lectura corta (Delsuc *et al.* 2016), o se descartan y no son analizadas (Abba *et al.* 2015; Gibb *et al.* 2016).

El análisis del número de las repeticiones, como de los marcadores codificantes mitocondriales y nucleares que apoyan la monofilia de *Chaetophractus* (hipótesis filogenética tradicional) podrían estar reflejando selección natural. Pero esta agrupación de las especies no parece obedecer a ninguna convergencia evolutiva (ni por altura ni hábitat). En cambio la relación de *Zaedyus pichiy* con *C. vellerosus* podría explicarse por una convergencia por selección como adaptación a la altura y ambientes más secos y fríos (biomas más específicos) donde esta selección se refleje en el ADN mitocondrial. Pero ello no explica los resultados de los marcadores no codificantes nucleares.

Como conclusión, hay discrepancias en resultados de marcadores codificantes tanto nucleares como mitocondriales y sus combinaciones tampoco disminuyen la incertidumbre encontrada. Esto podría deberse a que la selección natural está actuando o a que la reciente diversificación de la subfamilia todavía no permite detectar la monofilia recíproca entre las especies con estos marcadores a pesar de sus tasas altas de evolución.

En cuanto a los resultados del reloj molecular de las divisiones filogenéticas observadas y su correlación con los eventos geológicos, el origen del clado que contiene a las especies actuales de *Euphractinae* es de 3,60 Ma (95% HPD: 1,75-7,53, Figura 13), no siendo totalmente coincidente con las estimaciones anteriores, un poco más antiguas. Gibb *et al.* (2016) en su estudio da fechas a nivel de género más antiguas sugiriendo que son consecuencia de un muestreo más denso. En esta tesis, el muestreo fue mayor y las fechas son más recientes. A

pesar de esto, intervalos de confianza de 95% HPD estimados se solapan temporalmente y siguen siendo coincidentes con estimaciones de las últimas etapas del levantamiento andino y la consiguiente formación de biomas secos en el cono sur en el Mioceno medio y tardío (Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). Aproximadamente hace 5 Ma, ocurrió una elevación rápida y significativa, como consecuencia de la denominada "Fase Diaguíta" de la orogenia andina, que culminó aproximadamente en los 2,7 Ma, cuando la cordillera alcanzó su elevación actual (Yrigoyen 1979; Pascual *et al.* 1996; Gregory-Wodzicki 2000; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). Esto explicaría el origen de las especies vivientes de la subfamilia, como así también la separación entre *Zaedyus* con *Euphractus* + *Chaetophractus* de 2,92 Ma (95% HPD: 1,02-6,16) de acuerdo a esta tesis (Figura 13). Mientras el clado que diferencia el género *Chaetophractus* en sus especies tiene una datación estimada de 2,42 Ma, coincidiendo con el Pleistoceno temprano (2,6-0,8 Ma). Este período se halla caracterizado por fluctuaciones del clima hasta aproximadamente el último millón de años cuando quedan completamente establecidas las cinco glaciaciones pleistocenas (véase Rabassa *et al.* 2011), con períodos fríos (glaciales) regularmente fríos y suficientemente largos como para permitir un desarrollo significativo de lenguas de hielo a escala continental, fuera de las regiones polares (Ehlers y Gibbard 2007) lo que explicaría la diversidad intraespecífica de cada especie según los análisis genéticos realizados en esta tesis y en estudios previos sobre las especies de *Chaetophractus* (Poljak *et al.* 2010, 2018, 2020).

Tres de las cuatro especies de la subfamilia Euphractinae tienen su distribución actual a ambos lados de la Cordillera de los Andes, pero hasta el momento no han sido incluidas en ninguno de los estudios genéticos realizados muestras de ejemplares del sector chileno. Por lo tanto, se desconoce si existe diferenciación genética en ellas, y si los procesos de divergencia de especies están asociados con aislamiento debido al levantamiento andino. Se cree que hay cruce-migración andina al menos de *Zaedyus pichiy* (Cerdeña Cordero J. 2014). Por ende, es probable que el patrón de diversificación, tanto en el tiempo como en el espacio, refleje el resultado del cambio climático asociado con el levantamiento andino de la cordillera y no el mero efecto de una barrera física.

Las metodologías de análisis biogeográficos (Figura 16), que se basaron en la hipótesis filogenética tradicional, coinciden en que el origen de los representantes actuales del clado clado Euphractinae es el área de los desiertos templados del centro de Argentina, dispersándose y/o vicariando hacia los bosques tropicales secos del norte de Argentina, Paraguay y sur de Bolivia y los desiertos templados/semidesiertos de Cuyo y la Puna de Argentina, donde se habrían diferenciado *Euphractus* y *Chaetophractus*, coincidiendo con las estimaciones obtenidas por otros autores (Delsuc *et al.* 2004; Moraes-Barros y Arteaga 2015; Gibb *et al.* 2016; Poljak *et al.* 2010, 2018). El establecimiento de las especies actuales en el registro fósil abarca el intervalo que va desde Plioceno medio al Pleistoceno (Scillato-Yané 1982; Marshall y Sempere 1991; Carlini y Scillato-Yané 1999; Cione y Tonni 1999; Soibelzon *et al.* 2006), esto es cercano a la estimación obtenida del origen de los Euphractinae vivientes y apoya la diversificación del género *Chaetophractus* a principios del Pleistoceno, según la datación obtenida.

Según Gibb *et al.* (2016) la biogeografía histórica de los *Xenarthra* se explica mejor por una especialización progresiva debido a la diferenciación de bioma desde el Cenozoico hasta el presente, que probablemente condujo a más oportunidades para dispersarse y diversificarse. Esto se evidencia en la distribución de las especies de la subfamilia, las cuales se solapan poco o tiene simpatria secundaria establecida entre clados. En consecuencia, la diversificación del grupo se habría debido al levantamiento andino, el cambio climático y el establecimiento de nuevos biomas, ocupando *Zaedyus pichiy* la zona cordillerana y la estepa austral, siendo esta distribución separada precisamente por la conformación de la diagonal árida que se extiende desde el sur del desierto de Atacama hasta las estepas secas de Patagonia. Por su parte, *Chaetophractus vellerosus* ocupó la zona oeste y cordillerana más al norte, en tanto que *C. villosus* y *Euphractus* se distribuyeron en las extensas praderas que se extendieron desde el norte de la Patagonia luego de que las grandes ingresiones marinas que formaron el mar Paranaense y el mar Amazónico (Mioceno) se retiraron como consecuencia de la acción de la fase Quechua de la orogenia andina (Yrigoyen 1979) desarrollandose extensas planicies a lo largo del buena parte del continente sudamericano (Pascual *et al.* 1996; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). Actualmente, todas ellas expandieron su rango y solaparon. A modo de ejemplo, *Z. pichiy* y *C. villosus* solapan su distribución principalmente hacia el sur de Argentina y Chile, pero se cree que estas expansiones han sido muy recientes, como se señala en Abba *et al.* (2014).

Los resultados biogeográficos son concordantes con los anteriores estudios basados en filogenias moleculares. Así, Gibb *et al.* (2016) encuentran una correlación negativa significativa entre las tasas de especiación de los *Xenarthra* y la fluctuación de las temperaturas del Cenozoico, con un incremento en las tasas de especiación que se corresponde con el enfriamiento general de las temperaturas observado durante los últimos 15Ma. Esto apoya la hipótesis de que la conformación actual de la subfamilia Euphractinae fue causada por eventos de especiación rápidos y recientes, que se asocian a los cambios climáticos y el establecimiento de nuevos biomas desencadenados por las últimas etapas del levantamiento andino (véase Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006).

Una resolución definitiva de las relaciones entre los miembros de la subfamilia Euphractinae podría requerir nuevas tecnologías, especialmente las relacionadas con la próxima generación de secuenciación (Davey *et al.* 2011). Estas pueden superar la dificultad de la elección de marcadores moleculares y sus limitaciones, posibilitando realizar inferencias más robustas de las relaciones filogenéticas y los tiempos de divergencia de los clados, para contribuir sustancialmente a las discusiones acerca de las posibles causas de las discordancias entre las clasificaciones, al mismo tiempo que permitan realizar mejores estudios de biogeografía, de filogeografía y de genética de población de este grupo de xenartros.

Filogeografía de *Zaedyus pichiy* en Argentina

En los estudios filogeográficos de *Zaedyus pichiy* solo se utilizaron secuencias que contenían dos repeticiones completas y una trunca (conformación tipo A), ya que la mayoría de los individuos secuenciados

presentaron dicha conformación, por lo cual se asumió que se trataba de la prevalente. De tal modo, las diferencias encontradas en su comparación reflejan la evolución de las poblaciones.

Zaedyus pichiy presenta una particular estructuración geográfica, pudiéndose identificar más de una unidad filogeográfica diferenciada dentro de su amplio rango de distribución (Figura 18). La variabilidad y estructura encontradas en los análisis realizados con los marcadores utilizados en este estudio no permiten identificar claramente las subespecies descritas para esta especie. Los clados recuperados en el análisis filogenético (Figura 17) revelan dos grandes grupos, uno que casi en su totalidad contiene los haplotipos de las poblaciones del norte, entre los 29° y 39° latitud sur y del sur de la distribución de la especie desde los 46° latitud sur (clado A). Mientras que el otro, llamado clado B, contiene las poblaciones del centro de la distribución (provincias de Río Negro y Chubut) entre los 39° y 46° latitud sur. Según los resultados de la reconstrucción demográfica y filogeografía bayesiana, esto sería la consecuencia de dos expansiones relativamente recientes y muy cercanas desde un mismo centro de origen. El clado A se expandió en su inicio hacia el norte para volver y expandirse hacia el noreste y el sur, luego de lo cual fue desplazado por el clado B en el centro de la distribución de la especie, en su propia expansión desde la zona del noroeste de Patagonia (Río Negro) hacia el sur y este de Chubut. En las redes de haplotipos (Figura 19) este clado también aporta haplotipos a poblaciones del norte y sur de la distribución, por lo que se podría inferir que también estaría expandiéndose hacia esas regiones.

Por otro lado, *Zaedyus pichiy* presenta una cierta correspondencia geográfica por regiones, la cual queda en evidencia en el árbol de haplotipos y en las redes de haplotipos con relaciones entre haplotipos de una misma población o de poblaciones de una misma región (se ve en los dos grandes clados aunque con bajo soporte, Figura 17). El clado A tiene más relaciones soportadas y muestra más estructura en las redes en la región norte (Figuras 17 y 19), lo que podría deberse a que es la primera rama de la expansión más antigua. Mientras que en sus poblaciones linderas al clado B (población de Neuquén y norte de Santa Cruz) tiene poca variabilidad haplotípica dentro de ellas y parecen estar relacionados por haplotipos hipotéticos entre ellas y a su vez con haplotipos de poblaciones de Buenos Aires, La Pampa y San Luis, debido probablemente al contacto secundario entre los dos clados. Los haplotipos hipotéticos podrían ser nodos ancestrales relacionados con los haplotipos que produjeron la expansión a las regiones de Neuquén y Santa Cruz, donde luego las poblaciones intermedias fueron dominadas por los haplotipos del clado B. Perdiendo las poblaciones del clado A linderas a la expansión del clado B paulatinamente su diversidad por el desplazamiento de sus haplotipos. Esto coincide con la que muestra la reconstrucción filogeográfica (Figura 25).

A su vez la conexión del clado B con el clado A se realiza a través de haplotipos hipotéticos y por muchos pasos mutacionales, esta diferenciación clara de los dos clados quizás sea debido a que el contacto de sus distribuciones es un contacto secundario luego de expansiones próximas pero diferentes desde un centro de origen con mucha variabilidad donde el clado B tuvo una expansión más lenta, quizás por tener que ir reemplazando al clado A en Patagonia norte, aumentando la diferenciación de sus poblaciones con las del clado A.

Dentro del clado B la población RNP es la que tiene la mayor variabilidad haplotípica y el haplotipo más abundante y, aunque es la más muestreada, esto daría la pauta que es la más antigua de este clado y la más cercana al centro de origen predicho de la expansión según la reconstrucción filogeográfica, que estaría entre el río Neuquén y el río Limay que luego forman el Río Negro, límite entre las provincias de Neuquén y Río Negro.

La zona del centro de origen de las poblaciones actuales *Zaedyus pichiy* obtenido en este estudio concuerda con un refugio pleistocénico identificado para vertebrados y plantas, ubicado en las estribaciones orientales de los Andes entre los 39 ° S a 43 ° S (Sércic *et al.* 2011), siendo el norte del Río Negro uno de los lugares con mayor diversidad genética para vertebrados (Himes *et al.* 2008; Cosacov *et al.* 2010; Lessa *et al.* 2010). Según Sércic y colaboradores (2011) la supervivencia en cercanías a los glaciares patagónicos parece haber sido común en muchas especies en el pleistoceno debido a que los vientos del oeste y los picos de precipitación asociados se desplazaron hacia el norte durante las glaciaciones y hacia el sur durante los períodos interglaciares siendo más estable en latitudes medias y debido a que la capa de hielo estaba confinada a las cumbres de los picos con la mayoría de los bosques de estribaciones sin glaciares. Esta estabilidad junto con la topología del paisaje pueden haber provocado procesos de diferenciación y la mayor diversidad genética de las poblaciones de *Zaedyus pichiy* en esa zona.

La población RNP de Río Negro también tiene un subgrupo de haplotipos divergentes que se separan por varios pasos mutacionales y por haplotipos hipotéticos del resto los haplotipos del clado B, mostrando cierta estructura y pudiendo ser el resultado de su cercanía al centro de origen y de diferentes pulsos de expansión desde dicho centro. Según Hewitt (1996) las poblaciones que persistieron en o cerca de refugios glaciares presentarán una alta diversidad genética y estructuración filogeográfica. En cuanto al resto de las poblaciones del clado, muestran una estructura en estrella en las redes (haplotipo más representado en todas las poblaciones y pocos haplotipos derivados cercanos, es decir, separados por uno o pocos pasos mutacionales) lo que representaría la expansión reciente hacia el este y sur (Figura 19).

Se destaca que los resultados obtenidos por el análisis de varianza, indican cierto grado de diferenciación regional (Tabla 7), ya que las poblaciones de Cuyo presentan diferencias significativas respecto de las poblaciones del norte de la Patagonia y algunas también con poblaciones del centro y sur de Patagonia así como también con las poblaciones de Buenos Aires y La Pampa. En el análisis de redes de haplotipos (Figura 19) también se observa que en cada región se comienza a ver poblaciones con una identidad propia, diferenciándose de las demás. Los test estadísticos realizados muestran una diversidad genética relativamente uniforme en toda la distribución, sin autocorrelación espacial (Figuras 21, 22 y 23). Esto puede deberse a que la diversidad genética es alta necesiándose muestreo mayores para detectar variaciones.

La agrupación por los dos linajes principales recuperados en el análisis filogenético (clado A y B) es la que mejor explica la variación entre grupos (53,69 %), Tabla 8. Sin embargo, la forma de agrupar según las áreas

divididas por los ríos explica, con un porcentaje similar, la variación entre los grupos (47,12 %) resultando ambos porcentajes significativos estadísticamente (Tabla 8). Esto indica que si bien la expansión de los dos linajes explica la diversidad por ser relativamente reciente, la presencia de los ríos sería un quiebre que estructura las poblaciones por regiones. Ya se ha planteado que la dinámica de las cuencas hidrográficas en los ciclos glaciares del Pleistoceno Cuaternario constituyen factores que habrían moldeado la historia evolutiva de los linajes patagónicos, se ha sugerido la concordancia de varias rupturas en la estepa patagónica con cuencas andinas de ríos que actualmente drenan (o que en el pasado drenaban) cruzando la estepa al Océano Atlántico (por ejemplo Río Colorado, Río Neuquén, Río Limay, Río Chubut, etc) con antiguas y poderosas corrientes que descargaban al mar, fragmentado el paisaje y modelando los patrones de biodiversidad (Sércic *et al.* 2011). Por lo tanto, el aumento de caudal de los ríos pasada la última glaciación, pudo actuar como barrera luego de las expansiones desde los andes del norte de Patagonia, pudiendo explicar también la mayor expansión del clado B hacia el este y su poca presencia hacia el norte y sur por haberse originado posteriormente a la expansión del clado A.

A pesar que la variabilidad nucleotídica y haplotípica detectada fue alta en todas las poblaciones Tabla 6, por la divergencia existente es posible detectar gradientes asociados a los principales macroambientes (diferenciados principalmente de oeste a este) en ambos clados (A y B) y de norte a sur de la distribución, mayormente en el clado A que es el que posee una mayor distribución latitudinal. Apoyando las rutas y tiempos de dispersión arrojados por la reconstrucción filogeográfica.

Se detectó señal de expansión poblacional en la especie para todos los estadísticos menos para rg , que fue bajo pero no significativo (Tabla 9 y Figura 24). Cuando se analizaron los clados por separado (Tabla 9 y Figura 24), todos los estadísticos mostraron expansión y, por lo tanto, aquí se considera que el proceso de expansión demográfica está ocurriendo actualmente en la especie aunque no tan pronunciada en el clado A, lo que concuerda con la hipótesis filogeográfica de que este clado fue el primero en tener una gran expansión sobre todo hacia el norte, de hecho el registro arqueológico demuestra que su distribución llegó a ser mucho más amplia que la actual hacia el noroeste y norte y este de la Región Pampeana en el holoceno (Marshall y Sempere 1991; Loponte y Acosta 2012). Actualmente, muestra señales de estructuración en esa región y de desplazamiento en el centro sur por el clado B, mostrando su expansión más actual solo al sur en Santa Cruz. Las evidencias de expansión demográfica en Patagonia ya han sido relacionadas con una historia de colonización postglaciar para otras especies (p.ej., Poljak 2009; Lessa *et al.* 2010).

La reconstrucción demográfica de los análisis bayesianos no logra ajustar a un modelo complejo, por lo que no se cuenta con datos precisos de la evolución del tamaño efectivo poblacional que iría de la mano con la expansión aunque no necesariamente. Tampoco se cuenta con los tiempos de dispersión, aunque se sabe que el inicio de la historia evolutiva de las poblaciones que muestra la matriz utilizada no sería mayor a 40 Ka según la reconstrucción filogeográfica. De tal modo, una explicación plausible es:

En el Pleistoceno tardío previo a la última glaciación las poblaciones de *Zaedyus pichiy* estarían retiradas de la Región Pampeana al noroeste y hacia la Patagonia norte por las condiciones cálidas y húmedas interglaciares siendo probablemente una zona estable en la distribución de *Zaedyus pichiy* a la largo de los ciclos glaciares, mientras que probablemente su distribución sur y norte fluctuaron por los cambios climáticos. En la zona norte de los Andes patagónicos restringido a la zona cercana al origen del río Negro entre el río Neuquén y el río Limay se habría dado una mayor variabilidad y un proceso de diversificación, desde donde con el comienzo de la última glaciación cuando las condiciones empezaron a ponerse más frías y áridas, y disminuyó el caudal de los ríos, se facilitó la expansión hacia el norte y hacia el sur de los clados divergentes en dos oleadas consecutivas, logrando una ocupación mayor del norte de Patagonia y del noroeste y luego del este y del sur llegando a la distribución actual de la especie, Figura 25.

Por lo tanto, y como ya se ha propuesto para este armadillo (Soibelzon *et al.* 2010, 2019), su distribución fluctuó según los ciclos glaciares, retrayendo su distribución al oeste y migrado a latitudes más altas de Patagonia desde la Región Pampeana cuando el clima se volvió a calentar para volver durante el último ciclo frío del Pleistoceno y avanzar nuevamente sobre la Región Pampeana a finales del pleistoceno, habiendo registros en este periodo que ubican a *Zaedyus pichiy* en ella (Scillato-Yané 1982; Tonni y Fidalgo 1982; Deschamps y Borromei 1992; Scillato-Yané *et al.* 1995; Mazzanti y Quintana 1997; Deschamps 2005; Luna y Cruz 2014; Soibelzon *et al.* 2019) y ampliando su distribución aún más hacia el noroeste y este en todo el holoceno, llegando a ser mucho más amplia que en la actualidad según registros arqueológicos (Marshall y Sempere 1991; Salemme y Berón 2004; Abba y Vizcaino 2011; Soibelzon y León 2017). Pero retrayéndose nuevamente de la Región Pampeana y probablemente en todo el extremo norte de su distribución en el Holoceno tardío (según el registro arqueológico Soibelzon *et al.* 2019) por el aumento de las condiciones cálidas y húmedas lo que concuerda con la estructura genética, la reconstrucción demográfica y filogeográfica y la señal baja de expansión en el clado A que estaría representando solo la expansión en el sur de la distribución de la especie (en Patagonia) por las mismas causas de cambio climático.

Puede que haya existido persistencia de otras poblaciones durante el pleistoceno tardío en otras regiones además de la región norte de Patagonia, probablemente en la parte occidental de la Región Pampeana, habiendo registros en el pleistoceno (Soibelzon *et al.* 2010; Cione *et al.* 2015), sin embargo no hay señal de contactos secundarios, no se detecta otro clado más antiguo o haplotipos divergentes ni en el norte ni en el sur, lo que sugiere que la retracción fue homogénea en el borde sur y norte del rango de distribución de la especie o que en su expansión el clado A desplazó completamente las poblaciones preexistentes. Habiendo contacto secundario solo entre el clado A y B y quizás la población divergente dentro del clado B.

En cuanto a la expansión de *Zaedyus pichiy* hacia el sur invadiendo progresivamente la Patagonia central y sur pasado el holoceno temprano debido al aumento de temperatura por el comienzo del ciclo interglaciar, sería la más cercana en el tiempo según la reconstrucción filogeográfica y continuaría en la actualidad según la señal de

expansión del clado A. Esto concuerda con el registro arqueológico y lo propuesto por Abba *et al.* (2014), sobre la progresiva invasión de *Zaedyus pichiy* en la Patagonia durante los últimos 10.000 años debido a su paulatina arbustización y expansión de hábitats propicios por tener adaptaciones metabólicas, de dieta y de comportamiento a los ambientes fríos y secos. Llegando hasta el sur de la provincia de Santa Cruz, donde los datos de esta tesis muestran que se observa la menor diversidad de haplotipos de norte a sur en dicha provincia. De hecho la historia de *Zaedyus pichiy* en la Patagonia, basados en este estudio, revela un grado de variación de oeste a este y de norte a sur como así también dos olas de expansión desde el norte de esta región que seguirían sucediendo en la actualidad la primera en la parte sur (clado a) y la segunda en la parte central de Patagonia (clado B).

La filogeografía de *C. villosus* la otra especie de armadillo que habita la Patagonia en la actualidad, propone que la especie se dispersó desde la Región Pampeana en una sola ola debido a que sus poblaciones en la Patagonia no están estructuradas genéticamente (Poljak *et al.* 2010) y que esto sucedió cuando *Zaedyus pichiy* ya habitaba gran parte de ella, teniendo una historia más antigua en el región, indicando que los cambios climáticos no fueron los únicos factores que actúan sobre la dinámica demográfica de los organismos patagónicos, más bien actuaron en concierto con otros factores como la ecología de las especies dando escenarios más complejos (Avice 2000; Ruzzante *et al.* 2008; Poljak *et al.* 2010, 2018). Esto se ve claramente en las últimas centurias donde a la tendencia general hacia condiciones más áridas y templadas se sumó las perturbaciones provocadas por la presencia humana, causando la retracción de algunas especies de roedores y el aumento de otras (Pardiñas y Teta 2008, 2013; Udrizar 2009; Pardiñas *et al.* 2012; Abba *et al.* 2014). Observándose lo mismo en los armadillos donde *Zaedyus pichiy* habría superado la barrera del río Santa Cruz, facilitada por el hombre, aumentando su distribución (Abba *et al.* 2014). Ocurriendo lo mismo con *Chaetophractus villosus* que se expandió hasta Tierra del Fuego por las mismas causas en Patagonia (Poljak *et al.* 2010).

Los estudios previos que describen la filogeografía de las especies de *Chaetophractus*, evidencian la alternancia de períodos climáticos fríos / áridos y templados / húmedos durante los últimos millones de años en el sur de Sudamérica, los que provocaron en estos armadillos, como en otros grupos, una dinámica de extinción-recolonización de biomas ligada a dichos cambios climáticos y de vegetación cíclicos en periodos glaciares del Pleistoceno. En particular, los resultados de esta tesis solo muestran el último ciclo de retracción/expansión-recolonización de *Zaedyus pichiy* desde lo que sería aproximadamente el centro de su distribución actual en dos olas consecutivas, la primera más rápida, alcanzó una mayor distribución, en tanto que la segunda logró establecerse en la parte norte de la Patagonia reemplazando a la primera. Esto llevó a formar dos unidades filogeográficas diferenciadas (clados A y B), dando una distribución particular de la diversidad de sus haplotipos la cual no siguen un gradiente latitudinal de norte a sur de la distribución de la especie como se planteó al comenzar el estudio.

Para lograr explicar mejor el particular patrón de distribución y diversidad actual de la especie, se debe profundizar este tipo de estudios. Que el marcador D-loop explique solo la historia más reciente de *Zaedyus pichiy*

como de las especies del género *Chaetophractus*, cuando en otros estudios los tiempos evolutivos son mayores, puede estar ligado a la heteroplasmia y al hecho de que la conformación más estable es la que tiene el menor número de repetidos, por lo que probablemente se tenga menor número de mutaciones al ser la parte “más conservada” y no contar con la variación dentro de los repetidos de las conformaciones con más repetidos o de las que se perdieron, ya que la secuencia de los repetidos es la que más varía.

Investigaciones adicionales utilizando todos los marcadores disponibles, en particular marcadores nucleares como los microsatelites, que se han comenzado a emplear en especies de la subfamilia (Nardelli *et al.* 2016) permitirán confirmar la no interferencia de heteroplasmia y/o selección en los marcadores moleculares mitocondriales, que son los más utilizados en los estudios hechos hasta el momento tanto en armadillos (Poljak *et al.* 2010, 2018; este estudio) como en otros *Xenarthra* (Moraes-Barros *et al.* 2006, 2007, 2011). Otra posibilidad para superar dificultades en la selección de marcadores moleculares, sería la aplicación de secuenciación de última generación (Davey *et al.* 2011) que junto con la obtención de un mayor número de muestras de múltiples localidades, facilitado por estudios sobre distribución que puedan ayudar a priorizar las áreas a muestrear (Moraes-Barros yArteaga 2015) probablemente lograrían inferencias más robustas, e incrementarían la comprensión de la evolución no solo de *Z. pichiy* sino también de la subfamilia Euphractinae.

Aportes del análisis estructural del marcador d-loop:

- El fragmento de 80 pb obtenido en las secuencias de la primera porción de la RC en varias especies de armadillos analizadas en este estudio, es motivo de repetición adyacente a la secuencia del dominio TAS de dicha región.
- Los bloques conservados ETAS1 y ETAS2 tienen una distancia variable en las diversas especies, con una longitud de 47 bp (porción parcial del fragmento) en *Dasypus kappleri* a 400 (cinco veces el fragmento de 80 pb) en *Zaedyus pichiy*.
- El número de repeticiones en el dominio TAS en estudios anteriores nunca fue mayor que nueve, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis, en la cual el mayor número de repeticiones fue cinco en una muestra de *Zaedyus pichiy*.
- Debido a que la repetición “imperfecta” trunca flanqueante 3' está presente solamente una vez y nunca se duplica, se concluye que el origen de los repetidos se debe a un deslizamiento de replicación unidireccional en una dirección de 3' a 5'.
- La diferencia en el nivel de variación en las secuencias repetidas entre *Euphractus* y el clado *Zaedyus* + *Chaetophractus* puede deberse a un equilibrio diferente entre la tasa de mutación puntual y la tasa de inserción/eliminación de repeticiones entre estos géneros.
- La casi completa ausencia de variación de secuencia en las repeticiones de *Euphractus* (homogeneización) es probablemente la consecuencia de una tasa sustancialmente mayor de inserción/eliminación de unidades repetidas que la de mutaciones puntuales, lo que podría haber enmascarado las etapas intermedias del proceso de homogeneización.
- En los géneros *Zaedyus* y *Chaetophractus* la homogenización no es patente.
- Las secuencias del repetido 2 de *Zaedyus* y *Chaetophractus* se parecen más entre sí y más a la del repetido trunco que a la del repetido 1 de cada especie, el cual sería el repetido más reciente.
- La hipótesis más parsimoniosa para explicar la evolución de los repetidos con implicancias en la filogenia de la subfamilia, sugiere una mayor afinidad entre *Zaedyus* y *Chaetophractus*, lo cual no concuerda con la filogenia clásica de la subfamilia Euphractinae, sin embargo apoyaría la monofilia del género *Chaetophractus* planteada en la hipótesis 2 rechazando su parafilia (hipótesis 1).
- El análisis de las secuencias de la RC, sin tener en cuenta las repeticiones, no separa claramente a las especies, esto es de esperarse ya que por sus características este marcador no es bueno para discriminar entre especies.

- No se encontró variación en el número de repetidos en *Euphractus* y *Chaetophractus* pero sí en *Zaedyus pichiy*, sugiriendo también diferencias en la tasa de inserción/eliminación de repeticiones entre individuos de esta especie.
- Que los repetidos extra en las secuencias de *Zaedyus pichiy* con más de dos repetidos sean parecidos al repetido 2, sugiere que estas conformaciones serían más antiguas que la de dos repetidos enteros más el trunco, conformación que comparten *Zaedyus pichiy* y *Chaetophractus*.
- Hay heterogeneidad en el número de repeticiones entre las especies: *Euphractus sexcinctus* presenta tres repetidos más el trunco, mientras que las especies de *Chaetophractus* y la conformación más común en *Zaedyus pichiy* tienen dos repetidos más el trunco.
- La aparición de un tercer repetido sería un evento que ha ocurrido al menos dos veces en este grupo, de modo que cabría esperar que apareciera al menos esta conformación en las especies de *Chaetophractus*.
- En cuanto al número de copias favorecido por la estabilidad de la estructura secundaria, al menos en los Euphractinae estaría entre dos a tres repeticiones más la repetición trunca.
- *Zaedyus pichiy* parece presentar heteroplasmia en la RC del D-loop. La mayor frecuencia de heteroplasmia y una gama más amplia de clases de tamaño, reflejarían así una mayor tasa de ganancia y pérdida de unidades repetidas por mecanismos de deslizamiento.
- Lo anterior no se comprobó en otros géneros, teniendo *Chaetophractus* un número considerable de secuencias obtenidas. La diferencia en la heteroplasmia entre las especies de Euphractinae sugiere también diferencias en la tasa de inserción/eliminación de repeticiones entre ellas.
- Teniendo en cuenta el punto anterior, es probable que al menos en *Euphractus sexcinctus*, donde se observa gran homogenización de las repeticiones aumentando el número de secuencias obtenidas, se encuentre heteroplasmia.
- Las regiones menos variables en cuanto a heteroplasmia corresponden frecuentemente a dominios hidrófilos de la membrana en proteínas como COI, el otro marcador utilizado para los análisis llevados a cabo en esta tesis. Según este criterio, se descarta que los análisis realizados tengan algún sesgo por heteroplasmia.
- La heterogeneidad aparente que surge de las posibles explicaciones de lo encontrado entre las diferentes especies de Euphractinae y dentro de cada una de ellas, hace difícil proponer un patrón general de variación en las repeticiones de la RC de D-loop.

Filogenia:

- Los análisis MV, IB, y MP del gen COI no resolvieron las relaciones dentro de la subfamilia Euphractinae.

- Al combinar el gen mitocondrial con dos marcadores nucleares en un análisis Bayesiano particionado, el árbol reconstruido resuelve en parte las relaciones sosteniendo a *Zaedyus pichiy* como la primera especie en divergir, coincidiendo con la hipótesis filogenética tradicional. Sin embargo el clado *Euphractus* + *Chaetophractus* recibe un apoyo moderado, y las relaciones entre sus especies no se resuelven.
- El análisis bayesiano de las diferentes hipótesis de delimitación, junto con la visualización de la densidad de ramas, apoyan también la hipótesis de que *Zaedyus pichiy* es la especie basal del clado que forman las especies actuales de la subfamilia Euphractinae. Esto coincide con el registro fósil, los estudios morfológicos cráneo dentales, y los estudios moleculares de marcadores nucleares codificantes.
- Mientras que las hipótesis que agrupan, en diferentes posibilidades, a las tres especies restantes (*Euphractus sexcintus*, *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*) tienen BPP similares, la que agrupa a *Euphractus sexcintus* con *Chaetophractus villosus* presenta menos ramas ambiguas según la visualización del plot generado por Densitree. Esto apoyaría la parafilia del género *Chaetophractus* (hipótesis 1).
- Hay discrepancias en resultados de marcadores codificantes tanto nucleares como mitocondriales y sus combinaciones no resuelven completamente las relaciones entre las especies de este grupo, descartándose que la inclusión de una sola especie del género *Chaetophractus* o a la tasa evolutiva del marcador utilizado sean responsables de esta situación. Estas discrepancias podrían deberse a la reciente diversificación de la subfamilia Euphractinae.
- El marcador D-loop no se utilizó en los estudios filogenéticos realizados por contener diferente número de un fragmento de secuencia repetido. Sin embargo, el análisis posterior de la variación de las repeticiones halladas permitió aportar información filogenética.
- El resto de la secuencia del marcador sin repeticiones no separa las especies, lo que puede deberse al mecanismo que produce las repeticiones, que borra las mutaciones más recientes. Dado que se estima que la diversificación de la subfamilia Euphractinae es muy reciente, puede haber borrado las mutaciones huella de dicha historia evolutiva.
- El origen del clado que contiene a las especies actuales de Euphractinae se sitúa en los 3,60 Ma (95% HPD: 1,75-7,53), resultando esta edad más reciente que en estudios anteriores, y siendo coincidente con las estimaciones de las últimas etapas del levantamiento andino y la consiguiente formación de biomas secos en el cono sur que han tenido lugar en el Plioceno.
- Se estima que la elevación rápida y significativa de la cordillera con la que alcanzó su elevación actual culminó en torno a 2,7 Ma, lo cual puede explicar el origen de las especies actuales de la subfamilia como así también la separación entre *Zaedyus* y el clado *Euphractus* + *Chaetophractus*, que en este estudio tiene una edad de 2,92 Ma (95% HPD: 1,02-6,16).

- La diferenciación de las especies del género *Chaetophractus* tiene una datación estimada de 2,42 Ma coincidente con el comienzo del Pleistoceno, período que se caracterizó por fluctuaciones del clima hasta aproximadamente el último millón de años, cuando quedaron completamente establecidas las últimas cinco glaciaciones.

- Según los análisis biogeográficos, el origen del clado de las especies actuales de Euphractinae se halla en el área de los desiertos templados del centro de Argentina, dispersándose o dispersándose y vicariando desde allí hacia los bosques tropicales secos del norte de Argentina, Paraguay y sur de Bolivia, y a los desiertos templados/semidesiertos de Cuyo y la Puna de Argentina, dando lugar al área ancestral de *Euphractus* y *Chaetophractus*. Esto coincide con las estimaciones obtenidas por otros autores.

- De acuerdo con el registro fósil, las especies actuales se registran por primera vez en el lapso Plioceno medio-Pleistoceno, lo cual apoya la diversificación del género *Chaetophractus* a principios del Pleistoceno según la edad obtenida.

- Los resultados biogeográficos son concordantes con estudios previos, apoyando la hipótesis de que la actual estructura de la subfamilia Euphractinae está relacionada con eventos de especiación rápidos y recientes que se asocian a los cambios climáticos y el establecimiento de nuevos biomas desencadenados por las últimas etapas del levantamiento andino.

- El origen del clado que contiene a las especies actuales de Euphractinae y de los que señalan el origen de la separación entre sus especies resultaron ser más reciente que en estudios anteriores donde se propone que las especies actuales de la subfamilia Euphractinae tuvieron su origen y radiación temprana en el Mioceno tardío-Plioceno temprano en la Región Pampeana, coincidiendo con los registros más tempranos de sus géneros, siendo esta la hipótesis 3 planteada de este estudio. Sin embargo los resultados en este trabajo rechazan esa hipótesis y acercan dichos orígenes al establecimiento de las especies actuales en el registro fósil, abarcando el intervalo que va desde Plioceno medio al Pleistoceno y proponiendo como el área de ocurrencia los desiertos templados del centro de Argentina

Filogeografía:

- El número de sitios de muestreo y números de muestras en este estudio fueron suficientes para obtener resultados y conclusiones.

- Para los análisis filogeográficos de *Zaedyus pichiy* solo se utilizaron las secuencias que contenían dos repeticiones completas y una trunca, ya que la mayoría de los individuos secuenciados presentaron esta conformación, suponiéndose que es la predominante, y que las diferencias encontradas en su comparación reflejan la evolución de sus poblaciones.

- *Z. pichiy* presenta una particular estructuración geográfica, pudiéndose identificar dos unidades filogeográficas (llamadas en esta tesis clados A y B, respectivamente) diferenciadas dentro de su amplio rango de distribución.
- El clado A reúne casi en su totalidad los haplotipos de las poblaciones del norte entre los 29° y 39° latitud sur, y del sur de la distribución de la especie desde los 46° latitud sur. Por su parte, el clado B reúne las poblaciones del centro de la distribución (de las provincias de Río Negro y Chubut) entre los 39° y 46° latitud sur. Estas distribuciones pueden explicarse como dos expansiones relativamente recientes y muy cercanas desde un mismo centro de origen, donde la primera (clado A) se expande en su inicio hacia el norte para volver y expandirse hacia el noreste y el sur, luego de lo cual es desplazada por la segunda (clado B) en el centro de la distribución de la especie en su propia expansión desde la zona del noroeste de Patagonia (Río Negro) hacia el sur y este de Chubut y, quizás también, hacia el norte y sur de la distribución.
- *Zaedyus pichiy* presenta una cierta correspondencia geográfica por regiones según el análisis de varianza y el árbol y red de haplotipos.
- El clado A tiene más relaciones soportadas y muestra más estructura en las redes en la región norte, lo que podría deberse a que es la primera rama de la expansión más antigua.
- Poblaciones del clado A linderas al clado B (población de Neuquén y del norte de Santa Cruz) tienen poca variabilidad haplotípica y parecen estar relacionadas por haplotipos ancestrales entre ellas y, a su vez, con haplotipos de poblaciones del norte de la distribución debido probablemente al contacto secundario entre los dos clados donde las poblaciones intermedias fueron dominadas por los haplotipos del clado B, perdiendo las poblaciones del clado A linderas a su expansión paulatinamente su diversidad por el desplazamiento de sus haplotipos.
- La conexión del clado B con el clado A es a través de haplotipos hipotéticos por muchos pasos mutacionales debido al contacto secundario luego de expansiones próximas pero diferentes desde un centro de origen con mucha variabilidad donde el clado B tuvo una expansión más lenta, quizás por tener que ir reemplazando al clado A en Patagonia norte, aumentando con el tiempo la diferenciación de sus poblaciones con las del clado A.
- Dentro del clado B, la población RNP es la que tiene mayor variabilidad haplotípica y el haplotipo más abundante. También muestra cierta estructura y un subgrupo de haplotipos divergentes por lo que sería la más antigua de este clado y la más cercana al centro de origen, que estaría entre el río Neuquén y el río Limay, mostrando diferentes pulsos de expansión desde dicho centro. El resto de las poblaciones del clado muestra una estructura en estrella en las redes, lo que representaría la expansión reciente hacia ellas, es decir, hacia el este y sur.
- La zona del centro de origen de las poblaciones actuales *Zaedyus pichiy* obtenido en este estudio concuerda con un refugio pleistocénico identificado para vertebrados y plantas, siendo el norte del Río

*Negro uno de los lugares con mayor diversidad genética para vertebrados debido a su estabilidad en cuanto a los vientos y precipitaciones durante los ciclos glaciares del pleistoceno y a que la capa de hielo permaneció confinada a las cumbres de los picos. Esta estabilidad junto con la topología del paisaje pueden haber provocado procesos de diferenciación y la mayor diversidad genética de las poblaciones de *Zaedyus pichiy* en esa zona.*

- *La agrupación de los dos linajes principales recuperados en el análisis filogenético es la que mejor explica la variación existente. Sin embargo las áreas divididas por los ríos la explica con un porcentaje similar. Es decir, la expansión reciente de los dos linajes explica con fuerza la historia evolutiva de la especie, pero la presencia de los ríos actúa como quiebre, estructurando poblaciones por regiones. El aumento de caudal de los ríos pasada la última glaciación habría actuado como barrera luego de las expansiones desde los Andes del norte de Patagonia, pudiendo explicar también la mayor expansión del clado B hacia el este y su poca presencia hacia el norte y sur por haberse originado posteriormente a la expansión del clado A encontrándose con una barrera mayor.*

- *A pesar que la variabilidad nucleotídica y haplotípica detectada fue alta en todas las poblaciones, es posible detectar gradientes asociados a los principales macroambientes (diferenciados principalmente de oeste a este) en ambos clados (A y B) y también de norte a sur de la distribución, sobre todo en el clado A, que es el que más se distribuye latitudinalmente. Apoyando las rutas y tiempos de dispersión arrojados por la reconstrucción filogeográfica.*

- *Se detectó señal de expansión poblacional en *Zaedyus pichiy*, aunque no tan pronunciada en el clado A por ser el primero en tener una gran expansión sobre todo hacia el norte, llegando a tener una distribución más amplia a la actual según el registro arqueológico. Actualmente se muestran señales de estructuración en esa región y de desplazamiento en el centro sur por el clado B, mostrando su expansión más actual al sur en Santa Cruz.*

- *La historia evolutiva de las poblaciones actuales de *Zaedyus pichiy* no sería mayor a 40 Ka. En el Pleistoceno tardío previo a la última glaciación las poblaciones de *Zaedyus pichiy* estarían retiradas de la Región Pampeana al noroeste y hacia la Patagonia norte siendo probablemente una zona estable en su distribución a la largo de los ciclos glaciares, mientras que probablemente su distribución sur y norte fluctuaron por los cambios climáticos. En la zona cercana al origen del río Negro entre el río Neuquén y el río Limay se habría dado una mayor variabilidad y un proceso de diversificación, desde donde con el comienzo de la última glaciación cuando las condiciones empezaron a ponerse más frías y áridas, y disminuyó el caudal de los ríos, se facilitó la expansión hacia el norte y hacia el sur de los clados divergentes en dos oleadas consecutivas. Por lo tanto según los resultados de este estudio y del registro arqueológico *Zaedyus pichiy* volvió a avanzar nuevamente sobre la Región Pampeana a finales del pleistoceno en terminando la última glaciación, ampliando su distribución aun más hacia el noroeste y este en todo el holoceno pero retrayéndose*

nuevamente dentro de la Región Pampeana y probablemente en todo el extremo norte de su distribución en el Holoceno tardío por el aumento de las condiciones calidas y húmedas.

- La expansión de *Zaedyus pichiy* hacia el sur invadiendo progresivamente la Patagonia central y sur pasado el holoceno temprano debido al aumento de temperatura, siendo la más cercana en el tiempo según la reconstrucción filogeográfica y llegando hasta el sur de la provincia de Santa Cruz, donde se observa la menor diversidad de haplotipos de norte a sur concuerda con el registro arqueológico y lo propuesto por otros autores. Además estaría continuando en la actualidad según la señal de expansión del clado A.

- las mismas causas de aumento de temperatura y cambio en los biomas que habrían generado la retracción en el norte de la distribución habría generado las expansiones en Patagonia que seguirían sucediendo en la actualidad la primera en la parte sur (clado A) y la segunda en la parte central de Patagonia (clado B), lo que se ve en el análisis.

- Puede que haya existido persistencia de otras poblaciones durante el pleistoceno tardío en otras regiones además de la región norte de Patagonia, probablemente en la parte occidental de la Región Pampeana, sin embargo no hay señal de contactos secundarios, no se detecta otro clado más antiguo o haplotipos divergentes ni en el norte ni en el sur de la distribución, lo que sugiere que la retracción fue homogénea en el borde sur y norte del rango de distribución de la especie o que en su expansión el clado A desplazó completamente las poblaciones preexistentes. Habiendo contacto secundario solo entre el clado a y b y quizás la población divergente dentro del clado B.

- A modo de síntesis, los análisis realizados en esta tesis reflejan los efectos del proceso de expansión progresiva en dos oleadas consecutivas: la primera más rápida, alcanzó una mayor distribución, en tanto que la segunda logró establecerse en la parte norte de la Patagonia reemplazando a la primera. El origen de estas expansiones estaría ubicado al norte de río Negro (probablemente ubicado en el límite de las provincias de Neuquén y Río Negro).

- Se hipotetiza que la alternancia de períodos climáticos fríos/áridos y templados/húmedos durante los últimos millones de años en el sur de Sudamérica, provocó en los armadillos, como en muchos otros grupos, una dinámica de extinción-recolonización de biomas ligada a estos cambios climáticos y de vegetación cíclicas debidos a los periodos glaciares del Pleistoceno. En este contexto, los resultados de esta tesis solo muestran el último ciclo de retracción/expansión-recolonización de *Zaedyus pichiy* desde lo que sería aproximadamente el centro de su distribución actual en dos olas consecutivas que llevaron a formar dos unidades filogeográficas diferenciadas (clados A y B) dando una distribución particular de la diversidad de sus haplotipos la cual no siguen un gradiente latitudinal de norte a sur de la distribución de la especie por lo que la hipótesis 4 sería rechazada.

- Abba AM & Vizcaíno SF (2008). Los xenartros (Mammalia: Xenarthra) del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” y del Museo de La Plata (Argentina). *Contribuciones del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 4: 5-37.
- Abba AM & Vizcaino SF (2011). Distribución de los armadillos (Xenarthra: Dasypodidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozoología Neotropical* 18(2):185-206.
- Abba AM, Tognelli MF, Seitz VP, Bender JB & Vizcaíno SF (2012). Distribution of extant xenarthrans (Mammalia: Xenarthra) in Argentina using speciesdistribution models. *Mammalia* 76:123-136.
- Abba AM, Poljak S, Gabrielli M, Teta P & Pardiñas UFJ (2014). Armored invaders in Patagonia: recent southward dispersion of armadillos (Cingulata, Dasypodidae). *Mastozoología Neotropical* 21(2): 311-318.
- Abba AM, Lima E & Superina M (2014a). *Euphractus sexcinctus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.
- Abba AM, Poljak S & Superina M (2014b). *Chaetophractus villosus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.
- Abba AM, Cassini GH, Valverde G, Tilak M-K, Vizcaíno SF, Superina M & Delsuc F (2015). Morphological and molecular systematics of hairy armadillos (Xenarthra; Dasypodidae; Euphractinae) and the taxonomic status of the Andean hairy armadillo (*Chaetophractus nationi*). *Journal of Mammalogy* 96(4): 673–689.
- Abbott RJ, Smith LC, Milne R I, Crawford RMM, Wolff K & Balfour J (2000). Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* 289: 1343-1346.
- Abrantes EAL & Bergqvist LP (2006). Proposta filogenética para os Dasypodidae (Mammalia: Cingulata). Pp. 261-274 en: *Paleontologia de vertebrados: grandes temas e contribuições científicas*. Gallo V, Brito PM, Silva HMA y Figueiredo FJ (eds.). *Interciência Ltda.*, Rio de Janeiro.
- Aljanabi SM & Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.
- Alvarez I & Wendel JF (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.
- Anacleto TCS, Arteaga M, Superina M y Abba AM (2014a). *Dasypus kappleri*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.

- Anacleto TCS, Miranda F, Medri I, Cuellar E, Abba AM y Superina M (2014b). *Priodontes maximus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.
- Anacleto TCS, Moraes Tomas W & Superina M (2014c). *Cabassous unicinctus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.
- Andrés P (2010). Degradación y restauración de los ecosistemas terrestres latinoamericanos. *Revista Ambienta* 92: 58-70.
- Aoki K, Kato M & Murakami N (2008). Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 17: 3276-3289.
- Arnason U, Gullberg A & Janke A (1997). Phylogenetic analyses of mitochondrial DNA suggest a sister group relationship between *Xenarthra* (Edentata) and *Ferungulates*. *Molecular Biology and Evolution* 14(7): 762-768.
- Arnason U, Adegoke JA, Bodin K, Born EW, Esa YB, Gullberg A, Nilsson M, Short RV, Xu X & Janke A (2002). Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12): 8151-8156.
- Arteaga MC, Pinero D, Eguiarte LE, Gasca J & Medellín RA (2012). Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. *Journal of Mammalogy* 93: 547-559.
- Avise JC, Arnold J, Ball MR, Bermingham E, Lamb T, Niegel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987). Intraspecific Phylogeography: The mitochondria DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise JC (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Avise JC (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd ed., Sunderland M.A.: Sinauer Associates 541 pp.
- Avise JC (2009). *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.
- Barros MC, Sampaio I & Schneider H (2003). Phylogenetic analysis of 16S mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. *Genetics and Molecular Biology* 26:5-11.
- Belfiore NM, Liu L & Moritz C (2008). Multilocus phylogenetics of a rapid radiation in the Genus *Thomomys* (Rodentia: Geomyidae). *Systematic Biology* 57(2): 294-310.

- Bergsten J (2005). A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA & Lemey P (2011). SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* 27: 2910-2912.
- Birky CW (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* 35: 125-148.
- Bouckaert RR (2010). DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 26: 1372-1373.
- Brandoni D, Schmidt GI, Candela AM, Jorge I Noriega, Brunetto E & Fiorelli LE (2012). Mammals from The Salicas formation (Late Miocene), La Rioja province, northwestern Argentina: paleobiogeography, age, and paleoenvironment. *Ameghiniana* 49 (3): 375-387.
- Brito PH & Scott EV (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135(3): 439-455.
- Brooks DR, Bilewitch J, Condy C, Evans DC, Folinsbee KE, Fröbisch J, Halas D, Hill S, McLennan DA, Mattern M, Tsuji LA, Ward JL, Wahlberg N, Zamparo D & Zanatta D (2007). Quantitative Phylogenetic Analysis in the 21st Century. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 8(2): 225-252.
- Broughton RE, Milam JE & Roe BA (2001). The complete sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research* 11:1958-1967.
- Brown WM, George Jr M & Wilson AC (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(4): 1967-1971.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C & Sbisà E (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing Región of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192(3): 503-511.
- Bruniard ED (1982). La diagonal árida Argentina: Un límite climático real. *Revista Geográfica* 95:6-20.
- Buroker NE, Brown JR, Gilbert TA, O'Hara PJ, Beckenbach AT, Thomas WK & Smith MJ (1990). Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model. *Genetics* 124:157-163.
- Cao ZM, Ding WD, Wang JX & Bing XW (2015). Study on Mitochondrial DNA Heteroplasmy from Liver, Kidney and Muscle of Common Carp. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry* 3(2):201.
- Carlini AA & Vizcaíno SF (1987). A new record of the armadillo *Chaetophractus vellerosus* in the Buenos Aires province of Argentina: 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 Plioceno de Chapadmalal (Buenos Aires, Argentina). Consideraciones filogenéticas sobre los Euphractini. *Revista del Museo de La Plata* 9:225-238.

Carlini AA & Scillato-Yané GJ (1999). Evolution of quaternary xenarthrans (Mammalia) of Argentina. Pp. 149-176 en: *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. Rabassa J & Salemme MC (Eds.). Balkema, Rotterdam.

Carlini AA, Ciancio MR & Scillato-Yané GJ (2010). Middle Eocene–Early Miocene Dasypodidae (Xenarthra) of southern South America: faunal succession at Gran Barranca—biostratigraphy and paleoecology. Pp. 106–129 en *The paleontology of Gran Barranca: evolution and environmental change through the Middle Cenozoic of Patagonia* (Madden RH, Carlini AA, Vucetich MG & Kay RF, eds.). Cambridge University Press, New York.

Carstens BC & Knowles LL (2007). Estimating phylogeny from gene tree probabilities in *Melanoplus* grasshoppers despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 56: 400-411.

Cerda Cordero J (2014). Ficha Técnica corregida por Secretaría Técnica bajo el Reglamento para Clasificar Especies según Estado de Conservación denominado con la sigla RCE del Ministerio del Medio Ambiente de Chile.

Chaveerach A, Srisamoot N, Nuchadomrong S, Sattayasai N, Chaveerach P, Tanomtong A & Pinthong K (2008). Phylogenetic relationship of wildlife order Carnivora in Thailand inferred from the internal transcribed spacer region. *Journal of Biological Sciences* 8(2): 278-287.

Chen CA, Ablan MCA, MacManus JW, Bell JD, Tuan VS, Cabanban AS & Shao K (2004). Variable numbers of tandem repeats (VNTRs), Heteroplasmy, and sequence variation of the mitochondrial control region in the Threespot *Dascyllus*, *Dascyllus trimaculatus* (Perciformes: Pomacentridae). *Zoological Studies* 43 (4): 803-812.

Ciancio MR (2016). Los armadillos (Dasypodidae, Xenarthra) del Cenozoico temprano-medio de Argentina: Aspectos evolutivos, bioestratigráficos y biogeográficos en: Agnolin FL, Lio GL, Egli FB, Chimento NR, Novas FE (eds) *Historia evolutiva y paleobiogeográfica de los vertebrados de América del Sur. Contribuciones del MACN*, Buenos Aires, pp 231–247

Cione AL & Tonni EP Eds (1999). Biostratigraphy and chronological scale of upper-most Cenozoic in the Pampean Area, Argentina. Pp. 23-51 en: *Quaternary Vertebrate Paleontology in South America, Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*, Volumen especial 12.

Cione AL, Azpelicueta MM, Bond M, Carlini AA, Casciotta JR, Cozzuol MA, Fuente M, Gasparini Z, Goin FJ, Noriega J, Scillato-Yané GJ, Soibelzon L, Tonni EP, Verzi D & Vucetich MG (2000). Miocene vertebrates from Entre Rios province, eastern Argentina. *Serie Correlacion Geológica* 14: 191-237.

- Cione AL, Gasparini GM, Soibelzon E, Soibelzon LH & Tonni EP (2015). *The Great American Biotic Interchange in Southern South America: Land Mammal Biostratigraphy, Climatic Evolution and Faunal Integration*. *Springer Briefs in Earth System Sciences*, New York-London.
- Confalonieri VA, Sequeira AS, Todaro L & Vilaridi JC (1998). Mitochondrial DNA and phylogeography of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. *Heredity* 81: 444-452.
- Cosacov A, Sérsic AN, Sosa V, Johnson LA & Cocucci AA (2010). Molecular evidence of ice-age refugia in the Patagonia steppe and post-glacial colonisation of the Andesslopes: insights from the endemic species *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae). *Journal of Biogeography* 37: 1463-1477.
- Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC (2003). Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2174-2176.
- Crisci J, Katinas L & Posadas P (2000). *Introducción a la teoría y práctica de la biogeografía histórica*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- Cui Z, Liu Y & Chu KH (2010). Broader pattern of tandem repeats in the mitochondrial control region of Perciformes. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28:785-794.
- Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA & Sadler JE (2011). Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 286(29): 25763-25769.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM & Blaxter ML (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews* 12:499-510.
- De Chaine EG & Martin AP (2006). Using coalescent simulations to test the impact of quaternary climate cycles on divergence in an Alpine plant-insect association. *Evolution* 60: 1004-1013.
- Degnan JH & Salter LA (2005). Gene tree distributions under the coalescent process. *Evolution* 59(1): 24-37.
- Delgado Cano DA (2017). *Determinación y análisis de heteroplasmia en las tortugas marinas *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata**. Tesis de Licenciatura en Biología Ambiental. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá 64 p.
- 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. Series B* 268:1605-1615.

- Delsuc F, Scally M, Madsen O, Stanhope MJ, de Jong WW, Catzeflis FM, Springer MS & Douzery EJ (2002). Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. *Molecular Biology and Evolution* 19: 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28:261-275.
- Delsuc F, Vizcaino 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.
- Delsuc F, Superina M, Tilak M, Douzery EJP & Hassanin A (2012). Molecular phylogenetics unveils the ancient evolutionary origins of the enigmatic fairy armadillos. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:673-680.
- Delsuc F, Gibb GC, Kuch M, Billet G, Hautier L, Southon J, Rouillard J-M, Fernicola JC, Vizcaino SF, MacPhee RDE & Poinar HN (2016). The phylogenetic affinities of the extinct glyptodonts. *Current Biology* 26 (4): R155-R156.
- Deschamps CM & Borromei AM (1992). La fauna de vertebrados pleistocénicos del Bajo San José (provincia de Buenos Aires, Argentina). Aspectos paleoambientales. *Ameghiniana* 29(2):177-183.
- Deschamps CM (2005). Late Cenozoic mammal bio-chronostratigraphy in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Ameghiniana* 42(4): 733-750.
- Desmarest AG (1804). Tableau methodique des mammiferes. Pp. 5- 58 in *Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquee aux arts, principalement it l'agriculture et it l'economie rurale et domestique: par une societe de naturalistes et d'agriculteurs: avec des figures tirees des trois regnes de la nature*. Chez Deterville, Paris, France.
- Domínguez-Domínguez O & Vázquez-Domínguez E (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32(1): 59-70.
- Drummond AJ & Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG & Solomon W (2002). Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161: 1307-1320.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B & Pybus OG (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.

- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Edwards SV, Liu L & Pearl DK (2007). High-resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America* 104:5936-5941.
- Ehlers J & Gibbard PL (2007). The extent and chronology of Cenozoic global glaciation. *Quaternary International* 164–165: 6–20.
- Engelmann GF (1985). The phylogeny of the Xenarthra. Pp. 51-63 en: *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas*. Montgomery GG (Ed). Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Esteban G, Nasif N & Montalvo C (2001). Nuevos registros de Dasypodiidae (Xenarthra) del Mioceno tardío de la provincia de La Pampa (Argentina). *Revista Española de Paleontología* 16: 77-87.
- Excoffier L & Lischer HE L (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Faber JE & Stepien CA (1997). The utility of mitochondrial DNA control region sequence for analysing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. Pp 129–143 en: *Molecular systematics of fishes*. Kocher TD & Stepien CA (Eds.). San Diego: Academic Press.
- Farris JS (1970). Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* 19: 83-92.
- Feng X & Papes M (2014). Ecological niche modelling confirms potential north-east range expansion of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in the USA. *Journal of Biogeography* 42(4).
- Felsenstein J (1971). The rate of loss of multiple alleles in finite haploid populations. *Theoretical Population Biology* 2: 391-403.
- Felsenstein J (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 401-410.
- Felsenstein J (2004). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Foran DR, Hixson JE & Brown WM (1988). Comparisons of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. *Nucleic Acids Research* 16: 5841-5861.

- Foster L, Foster P & Gurney SMR (2010). Evaluating length heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region. *International Journal of Legal Medicine* 124:133–142.
- Frechkop S & Yepes J (1949). Etude systématique et zoogéographique des Dasypodidés conservés à l'institut. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 25:1-56.
- Freeland JR (2005). *Molecular ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Fu XY (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L & Hausser J (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution* 13:31–46.
- Gallo JA, Poljak S, Abba AM, Udrizar Sauthier DE, Camino M, Torres RM, Tamburini DM, Decarre J, Soibelzon E, Castro LB & Superina M (2019). *Chaetophractus villosus* en: SAYDS–SAREM (eds) *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción*. Lista Roja de los mamíferos de Argentina, Buenos Aires.
- Gardner AL (2005). Order Cingulata. Pp. 94-99 en: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Wilson DE & Reeder DM (Eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Gardner AL ed (2008). *Mammals of South America, Vol. 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Gaudin TJ & Branham DG (1998). The phylogeny of the Myrmecophagidae (Mammalia, Xenarthra, Vermilingua) and the relationship of *Eurotamandua* to the Vermilingua. *Journal of Mammalian Evolution* 5: 237-265.
- Gaudin TJ & Wible JR (2006). The phylogeny of living and extinct armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): a craniodental analysis. Pp. 153-198 en: *Amniote paleobiology*. Carrano MT, Gaudin TJ, Blob RW & Wible JR (eds). University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Gaudin TJ & Croft DA (2015). Paleogene Xenarthra and the evolution of South American mammals. *Journal of Mammalogy* 96,4: 622–634.
- Gemmell NJ & Akiyama S (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics* 12: 338-339.
- Gemmell NJ, Western PS, Watson JM & Graves JA (1996). Evolution of the mammalian mitochondrial control region—comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. *Molecular Biology and Evolution* 13: 798–808.

- Gibb GC, Condamine FL, Kuch M, Enk J, Moraes-Barros N, Superina M, Poinar HN & Delsuc F (2016). Shotgun Mitogenomics Provides a Reference Phylogenetic Framework and Timescale for Living Xenarthrans. *Molecular Biology and Evolution* 33(3):621–642.
- Gil Á & Sánchez F (2010). *Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición (2 Edición). Acción Médica.*
- Goin FJ, Woodburne MO, Zimicz AN, Martin GM, Chornogubsky L (2015). A Brief History of South American Metatherians. Evolutionary Contexts and Intercontinental Dispersals. *SpringerBriefs in Earth System Sciences*, New York-London.
- Goios A, Amorim A & Pereira L (2006). Mitochondrial DNA pseudogenes in the nuclear genome as possible sources of contamination. *International Congress Series* 1288: 697-699.
- Goloboff PA, Farris JS & Nixon KC (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Goossens B, Chikhi L, Ancrenaz M, Lackman-Ancrenaz I, Andau P & Bruford MW (2006). Genetic signature of anthropogenic population collapse in orang-utans. *PLoS Biology* 4: 285-291.
- Grandcolas P, Deleporte P, Desutter-Grandcolas L & Dauteron C (2001). Phylogenetics and Ecology: as many characters as possible should be included in the cladistic analysis. *Cladistics* 17: 104-110.
- Greenberg BD, Newbold JE & Sugino A (1983). Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21:33-49.
- Greenwood AD, Castresana J, Feldmaier-Fuchs G & Pääbo S (2001). A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 94-103.
- Gregory-Wodzicki K (2000). Uplift history of central and northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin* 112:1091–1105.
- Griffiths RC (1980). Lines of descent in the diffusion approximation of neutral Wright-Fisher models. *Theoretical Population Biology* 17: 40-50.
- Guindon S & Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Guth C (1961). *La région temporelle des Edentés. Doctoral dissertation, University of Paris, Paris.*
- Hall T (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41:95-98.

- Haq BU, Hardenbol J & Vail PR (1987). Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* 235:1156-1167.
- Harding RM (1996). New phylogenies: An introductory look at the coalescent. Pp. 15-22 en: *New uses for new phylogenies*. Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J & Nee S (eds). Oxford University Press, Nueva York.
- Heled J & Drummond AJ (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27:570-580.
- Heled J & Drummond AJ (2012). Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. *Systematic Biology* 61(1): 138-149.
- Heller R, Lorenzen ED, Okello JBA, Masembe C & Siegismund R (2008). Mid-Holocene decline in African buffalos inferred from Bayesian coalescent-based analysis of microsatellites and mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 17: 4845-4858.
- Hennig W (1968). *Elementos de una sistemática filogenética*. Eudeba, Buenos Aires.
- Hernández D (2005). *Relaciones Evolutivas de las Especies del Género Lucifuga (Ophidiiformes: Bythitidae) en Cuba*. Tesis de Maestría en Biología Marina y Acuicultura. Universidad de La Habana. La Habana, 81 p.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hey J & Machado CA (2003). The study of structured populations—new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 53-543.
- Himes CMT, Gallardo MH & Kenagy GJ (2008). Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography* 35: 1415–1424.
- Hirayama M, Mukai T, Miya M, Murata Y, Sekiya Y, Yamashita T, Nishida M, Watabe S, Oda S & Mitani H (2010). Intraspecific variation in the mitochondrial genome among local populations of Medaka *Oryzias latipes*. *Gene* 457:13–24.
- Hrbek T & Farias IP (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31:293–302.
- Huang T (2011). Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy. *Current Protocols in Human Genetics* 71(1): 19.8.1-19.8.12.

- Huchon D, Delsuc F, Catzefli M & Douzery EJP (1999). Armadillos exhibit less genetic polymorphism in North America than in South America: nuclear and mitochondrial data confirm a founder effect in *Dasyypus novemcinctus* (Xenarthra). *Molecular Ecology* 8: 1743-1748.
- Hudson RR (1990). *Gene genealogies and the coalescent process*. Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Futuyma D & Antonovks J (Eds) Vol. 7.
- Hudson RR (2001). Two-locus sampling distribution and their application. *Genetics* 159: 1805-1817.
- Huelsenbeck JP & Rannala B (1997). Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* 276: 227-232.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R & Bollback JP (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-4.
- Iglesias A, Artabe AE, Morel EM (2011). The evolution of Patagonian climate and vegetation from the Mesozoic to the present. *Biol J Linn Soc* 103: 409-422.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ (1990). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc San Diego.
- Ivanova NV, deWaard JR & Hebert PDN (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998-1002.
- IUCN SSC Anteater, Sloth and Armadillo Specialist Group. 2017. *Chaetophractus vellerosus* (amended version of 2016 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017.
- Jorge W, Meritt Jr DA & Benirschke K (1977). Chromosome studies in Edentata. *Cytobios* 18: 157-172.
- Jorge W & Pereira Jr HRJ (2008). Chromosomal studies in the Xenarthra. Pp. 313-318 en: *The Biology of the Xenarthra*. Vizcaino SF & Loughry WJ (eds). University Press of Florida, Florida.
- Kawakami T, Butlin RK, Adams M, Saint KM, Paull DJ & Cooper JB (2007). Differential gene flow of mitochondrial and nuclear DNA markers among chromosomal races of Australian morabine grasshoppers (*Vandiemenella*, viatica species group). *Molecular Ecology* 16:5044-5056.
- Kimura M & Ohta T (1969). The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics* 61: 763-771.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

- Kingman JFC (1982). The Coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13: 235-248.
- Knowles LL & Maddison WP (2002). Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11:2623-2635.
- Knowles LL (2004). The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1-10.
- Knowles LL & Carstens BC (2007). Inferring a population-divergence model for statistical phylogeographic tests in montane grasshoppers. *Evolution* 61: 477-493.
- Knowles LL (2008). Why does a method that fails continue to be used? *Evolution* 62: 2713-2717.
- Kolaczkowski B & Thornton J W (2004). Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature* 431: 980-984.
- Kodandaramaiah U (2009). Vagility: the neglected component in historical biogeography. *Evolutionary Biology* 36: 327-335.
- Krmpotic CM, Ciancio MR, Barbeito C, Mario RC, Carlini AA (2009) Osteoderm morphology in recent and fossil euphractine xenarthrans. *Acta Zool* 90: 339–351
- Lanteri AA & Confalonieri VA (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 185-193 en: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Llorente Bousquets J & Morrone JJ (eds). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- 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. *Journal of Molecular Evolution* 54: 145-155.
- Latorre C, Quade J & McIntosh WC (1997). The expansion of C4 grasses and global change in the late Miocene: stable isotope evidence from the Americas. *Earth and Planetary Science Letters* 146: 83-96.
- Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ & Suchard MA (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology* 5(9): e1000520.
- Lemey P, Rambaut A, Welch JJ & Suchard MA (2010). Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1877-1885.
- Le Roux JP (2012). A review of Tertiary climate changes in southern South America and the Antarctic Peninsula. Part 1: oceanic conditions. *Sedimentary Geology* 247-248: 1-20.
- Le Roux JP (2012). A review of Tertiary climate changes in southern South America and the Antarctic Peninsula. Part 2: continental conditions. *Sedimentary Geology* 247-248: 21-38.

- Lessa EP (1992). Rapid Surveying of DNA Sequence Variation in Natural Populations. *Molecular Biology and Evolution* 9(2): 323-330.
- Lessa EP, D'Elía G & Pardiñas UFJ (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19: 3031-3037.
- Levinson G & Gutman GA (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- Li M, Schönberg A, Schaefer M, Schroeder R, Nasidze I & Stoneking M (2010). Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. *The American Journal of Human Genetics* 87(2): 237-249.
- Liu L & Pearl DK (2007). Speciestrees from gene trees: reconstructing Bayesian posterior distributions of a species phylogeny using estimated gene tree distributions. *Systematic Biology* 56:504-514.
- 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(8): 777-784.
- Loponte D, Acosta A (2012) Nuevos registros de armadillos (Xenarthra: Dasypodidae) del Holoceno tardío en la Región Pampeana, Argentina. *Mastozool Neotropical* 19: 163–178
- Loughry, J, McDonough, C & Abba, AM 2014. *Dasypus novemcinctus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014.
- Ludwig A, May B, Debus L & Jennecken I (2000). Heteroplasmy in mtDNA control region of sturgeon (Acipenser, Huso, Scaphirhynchus). *Genetics* 156:1933–1947.
- Luna CA & Cruz LE (2014). Los mamíferos fósiles del pleistoceno tardío-holoceno temprano del sudeste de la provincia de Córdoba y sus implicancias paleoambientales para el centro de Argentina. *Revista Brasileira de Paleontologia* 17(1):69-82.
- Maddison WP & Knowles LL (2006). Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55:21-30.
- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, De Bry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW & Springer MS (2001). Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals. *Nature* 409: 610-614.
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

- Marshall LG & Sempere T (1991). *The Eocene to Pleistocene vertebrates of Bolivia and their stratigraphic context: a review*. Pp. 631-652 en *Fósiles y Facies de Bolivia- Vol. 1 Vertebrados*. Suárez-Soruco R (ed) *Revista Técnica de Yacimientos Petrolíferos Fiscales de Bolivia* 12.
- Marshall LG & Sempere T (1993). *Evolution of the Neotropical land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic and tectonic context*. Pp. 329-392 en: *Biological relationships between Africa and South America*. Goldblatt P (Ed.). Yale University Press, New Haven.
- Matocq MD, Patton JL & Da Silva MNF (2000). *Population genetic structure of two ecologically distant Amazonian spiny rats: separating history and current ecology*. *Evolution* 54: 1423-1432.
- Mazzanti DL & Quintana CA (1997). *Asociación cultural con fauna extinguida en el sitio arqueológico Cueva Tixi, provincia de Buenos Aires, Argentina*. *Revista Española de Antropología Americana* 27: 11-21.
- Mckenna MC & Bell SK (1997). *Classification of mammals above the species level*. Columbia University Press, New York City, New York.
- Medri ÍM (2008). *Ecología e História Natural do Tatu-peba, Euphractus sexcinctus (Linnaeus, 1758), no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. Tesis doctoral. Universidade de Brasilia*.
- Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, Goodbla A, Eizirik E, Simão TL, Stadler T, Rabosky DL, Honeycutt RL, Flynn JJ, Ingram CM, Steiner C, Williams TL, Robinson TJ, Burk-Herrick A, Westerman M, Ayoub NA, Springer MS & Murphy WJ (2011). *Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification*. *Science* 28 334(6055): 521-524.
- Miller MP (2005). *Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information*. *Journal of Heredity* 96:722-724.
- Miller MA, Pfeiffer W & Schwartz T (2010). *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. Pp. 1-8 en: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans, Louisiana.
- Mitchell KJ, Scanferla A, Soibelzon E, Bonini R, Ochoa J & Cooper A (2016). *Ancient DNA from the extinct South American giant glyptodont Doedicurus sp. (Xenarthra: Glyptodontidae) reveals that glyptodonts evolved from Eocene armadillos*. *Molecular Ecology* 25: 3499–3508.
- Möller-Krull M, Delsuc F, Churakov G, Marker C, Superina M, Brosius J, Douzery EJ & Schmitz J (2007). *Retroposed elements and their flanking regions resolve the evolutionary history of xenarthran mammals (armadillos, anteaters, and sloths)*. *Molecular Biology and Evolution* 24:2573-2582.

- Mora MS, Lessa EP, Cutrera AP, Kittlein MJ & Vassallo AI (2007). Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology* 16: 3453-3465.
- 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). *Genética* 126: 189-198.
- Moraes-Barros N & Stenghel Morgante J (2007). A simple protocol for the extraction and sequence analysis of DNA from study skin of museum collections. *Genetics and Molecular Biology* 30(4): 1181-1185.
- Moraes-Barros N, Silva JAB & Morgante JS (2011). Morphology, molecular phylogeny, and taxonomic inconsistencies in the study of *Bradypus* sloths (Pilosa: Bradypodidae). *Journal of Mammalogy* 92:86-100.
- Moraes-Barros N & Arteaga MC (2015). Genetic diversity in *Xenarthra* and its relevance to patterns of Neotropical biodiversity. *Journal of Mammalogy* 96(4):690-702.
- Moritz C, Dowling TE & Brown WM (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:269-292.
- Morrone JJ (2000). Sistemática, Biogeografía, evolución: los patrones de la diversidad en tiempo-espacio. *Fac. Ciencias, UNAM. México*.
- Murphy WJ, Sun S, Chen Z-Q, Pecon-Slattery J & O'Brien SJ (1999). Extensive Conservation of Sex Chromosome Organization Between Cat and Human Revealed by Parallel Radiation Hybrid Mapping. *Genome Research* 9: 1223-1230.
- Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling EC, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW & Springer MS (2001). Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* 294: 2348-2351.
- Mundy NI, Winchell CS & Woodruff DS (1996). Tandem repeats and heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region of the loggerhead Shrike (*Lanius ludovicianus*). *Heredity* 87:21-26.
- Nahum LA (2001). Evolução dos Genomas. In: Matioli SR, editor *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Ed. Ortíz G, Sivasundar A, Dietz K & Jégu M 2008. Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequence. *Genetics and Molecular Biology* 31:343-351.

- Nardelli M, Ibáñez EA, Dobler D, Justy F, Delsuc F, Abba AM, Cassini MH & Túnez JI (2016). Genetic structuring in a relictual population of screaming hairy armadillo (*Chaetophractus vellerosus*) in Argentina revealed by a set of novel microsatellite loci. *Genetical* 44(4):469-476.
- Neigel JE, Ball RM & Avise JC (1991). Estimation of single generation migrations distances from geographic variation in animal mitochondrial DNA. *Evolution* 45: 423-432.
- Nielsen R & Beaumont MA (2009). Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology* 18: 1034-1047.
- Nordborg M (2000). Coalescent theory. Pp. 1-37 en: *Handbook of statistical genetics*. Balding DJ, Bishop MJ & Cannings C (Eds). John Wiley & Sons, London.
- Noss A, Superina M & Abba AM (2014). *Tolypeutes matacus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*.
- Novelletto A, Testa L, Iacovelli F, Blasi P, Garofalo L, Mingozzi T & Falconi M (2016). Polymorphism in Mitochondrial Coding Regions of Mediterranean Loggerhead Turtles: Evolutionary Relevance and Structural Effects. *Physiological and Biochemical Zoology* 89(6), 473-486.
- Nylander JA, Olsson U, Alstrom P & Sanmartín I (2008). Accounting for Phylogenetic Uncertainty in Biogeography: A Bayesian Approach to Dispersal-Vicariance Analysis of the Thrushes (*Aves: Turdus*). *Systematic Biology* 57(2): 257-268.
- Oliveira EV, Bergqvist LP (1998). A new Paleocene armadillo (Mammalia, Dasypodoidea) from Itaboraí Basin, Brazil. *Asociación Paleontológica Argentina, Publicación Especial* 5: 35-40.
- Ortiz-Jaureguizar E (1998). Paleoeología 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 G (2006). Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments* 66(3): 489-532.
- Page RDM & Holmes EC (1998). *Molecular evolution a phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford.
- Palazzesi L & Barreda VD (2007). Major vegetation trends in the Tertiary of Patagonia (Argentina): a qualitative paleoclimatic approach based on palynological evidence. *Flora* 202: 328-337.
- Palazzesi L & Barreda V (2012). Fossil pollen records reveal a late rise of open-habitat ecosystems in Patagonia. *Nature Communication* 3: 1294.
- Palazzesi L, Barreda VD, Cuitiño JI, Guler MV, Tellería MC & Ventura Santos R (2014). Fossil pollen records indicate that Patagonian desertification was not solely a consequence of Andean uplift. *Nature Communication* 5: 3558.

- Panchal M & Beaumont MA (2007). The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution* 61(6):1466-1480.
- Pardiñas UFJ & Teta P (2008). Small mammals and paleoenvironments around the Pleistocene-Holocene boundary in Patagonia. *Current Research in The Pleistocene* vol. 2008 p. 186 – 188.
- Pardiñas UFJ, Udrizar Sauthier DE & Teta P (2012). Micromammal diversity loss in central-eastern Patagonia over the last 400 years. *Journal of Arid Environments* 85:71-75
- Pardiñas UFJ & Teta P (2013). Holocene stability and recent dramatic change in micromammalian communities of northwestern Patagonia. *Quaternary International* 305:127-140.
- Pascual R & Ortiz Jaureguizar E (1990). Evolving climates and mammal faunas in Cenozoic South America. *Journal of Human Evolution* 19: 23-60.
- Pascual R, Ortiz-Jaureguizar E & Prado JL (1996). Land mammals: Paradigm of Cenozoic South American geobiotic evolution. *Münchner Geowissenschaftliche Abhandlungen* 30: 265-319.
- Pascual R & Ortiz-Jaureguizar E (2007). The Gondwanan and South American Episodes: Two major and unrelated moments in the history of the South American mammals. *Journal of Mammalian Evolution* 14: 75-137.
- Patterson B & Pascual R (1972). The fossil mammal fauna of South America. Pp. 247-309 en: *Evolution, mammals, and southern continents*. Keast A, Erk FC & Glass B (eds). State University of New York Press, Albany.
- Patterson B, Segall W, Turnbull WD & Gaudin TJ (1989). The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia): Parte I. Cingulates. *Fieldiana. Geology* N.S.18: 1-46.
- Patterson B, Segall W, Turnbull WD & Gaudin TJ (1992). The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia): Parte II. Sloths, anteaters, palaeonodons, and a miscellany. *Fieldiana. Geology* N.S.24: 1-79.
- Peña C (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología* 18(2): 265-267.
- Poljak, S, Escobar J, Deferrari G & Lizarralde M (2007). Un nuevo mamífero introducido en la Tierra del Fuego: el peludo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae) en Isla Grande. *Revista Chilena de Historia Natural* 80:285–294.
- Poljak S (2009). Estudios filogeográficos en Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) de Argentina: *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* como modelos de análisis. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

- Poljak S, Confalonieri V, Fasanella M, Gabrielli M & Lizarralde M (2010). Phylogeography of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae Xenarthra): Post-glacial range expansion from Pampas to Patagonia (Argentina). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:38-46.
- Poljak S, Ferreiro AM, Chiappero MB, Sánchez J, Gabrielli M & Lizarralde MS (2018). Phylogeography of screaming hairy armadillo *Chaetophractus vellerosus*: Successive disjunctions and extinctions due to cyclical climatic changes in southern South America. *PLoS ONE* 13(1): e0190944.
- Poljak S, Sánchez J, Lanusse L, & Lizarralde M (2020). Anthropogenic invaders: historical biogeography, current genetic status and distribution range of the “peludo” *Chaetophractus villosus* (Xenarthra) in Patagonia and Tierra del Fuego, southern South America, *Mammalia*, 84(5), 429-438.
- Polzin T & Daneschmand SV (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20.
- Porter CA, Goodman M & Stanhope MJ (1996). Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5(1): 89-101.
- Posada D & Crandall KA (2001). Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580-601.
- Posada D & Buckley TR (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Posada D (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Posadas P, Grossi MA & Ortiz-Jaureguizar E (2013). Where is historical biogeography going? The evolution of the discipline in the first decade of the 21st century. *Progress in Physical Geography* 37(3): 377-396.
- Primmer CR, Borge T, Lindell J & Sætre GP (2002). Singlenucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* 11: 603- 612.
- Rabassa J, Coronato AM & Martínez OA (2011). Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an up-dated review. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 316–335.
- Rambaut A & Drummond AJ (2007). Tracer, version 1.4. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rambaut A (2011). FigTree, version 1.3.1. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ramos A, Santos C, Mateiu L, Gonzalez MdelM, Alvarez L, Azevedo L, Amorim A & Aluja M (2013). Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome. *PLoS ONE* 8: e74636.

- Ramos-Onsins SE & Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Rand DM & Harrison RG (1989). Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics* 121:551-569.
- Rand DM (1993). Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *Journal of Molecular Evolution* 37(3): 281-295.
- Rand DM (1994). Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution* 9(4):125-31.
- Ree RH, Moore BR, Webb CO & Donoghue MJ (2005). A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* 59(11): 2299-2311.
- Ree RH & Smith SA (2008). Maximum Likelihood Inference of Geographic Range Evolution by Dispersal, Local Extinction, and Cladogenesis. *Systematic Biology* 57(1): 4-14.
- Reis EC, Soares LS & Lôbo-Hajdu G (2010). Evidence of olive ridley mitochondrial genome introgression into loggerhead turtle rookeries of Sergipe, Brazil. *Conservation Genetics* 11(4), 1587-1591.
- Rensch RT, Villar D, Horvath J, Odom DT, & Flicek P (2016). Mitochondrial heteroplasmy in vertebrates using ChIP-sequencing data. *Genome Biology* 17(1): 139.
- Riddle BR, Dawson MN, Hadly EA, Hickerson MJ, Mantoosh SJ & Yoder AD (2008). The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography* 32:173-202.
- Roderick GK (1996). Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology* 41: 325-352.
- Rogers AR & Harpending H (1992). Population growth make waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Ronquist F (1997). Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46:195-203.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rozas J, Sánchez-Del Barrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit E, Zmlak TS & Adams DM (2008). Climate control on ancestral population dynamics; insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2234-2244.
- Saccone C, Attimonelli M & Sbisà E (1987). Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 26: 205-211.
- Salemme M & Berón MA (2004). Análisis intrasitio del componente faunístico del sitio 1 de la localidad Tapera Moreira. Diferencias y tendencias. *Actas del XIII Congreso Nacional de Arqueología Argentina, Tomo III*: 325-345. Córdoba.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanmartín I, Mark PV & Ronquist F (2008). Inferring dispersal: a Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *Journal of Biogeography* 35:428-449.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7024-7029.
- Scillato-Yané GJ (1982). Los Dasypodidae (Mammalia, Edentata) del Plioceno y Pleistoceno de Argentina. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata*.
- Scillato-Yané GJ, Carlini AA, Vizcaíno SF & Ortiz Juareguizar E (1995). Los Xenarthros. Pp. 183-209 en: *Evolución climática y biológica 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). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Sersic AN, Cosacov Martinez A, Cocucci AA, Johnson L, Pozner RE, Avila LJ, Sites J, Morando M (2011). Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal Of The Linnean Society*; 103; 2; 475-479.
- Shapiro B, Drummond AJ, Rambaut A, Wilson MC, Matheus PE, Sher AV, Pybus OG, Gilbert MT, Barnes I, Binladen J, Willerslev E, Hansen AJ, Baryshnikov GF, Burns JA, Davydov S, Driver JC, Froese DG, Harington CR, Keddie G, Kosintsev P, Kunz ML, Martin LD, Stephenson RO, Storer J, Tedford R, Zimov S & Cooper A (2004). Rise and fallo f the Beringian steppe bison. *Science* 306: 161-1565.

- Shapiro B, Graham RW, Letts B (2015). A revised evolutionary history of armadillos (*Dasypus*) in North America based on ancient mitochondrial DNA. *Boreas* 44: 14–23.
- Schmidt HA & von Haeseler A (2003). Maximum likelihood analysis using TREE-PUZZLE. Pp. 6.6.1-6.6.23 en: *Current Protocols in Bioinformatics*. Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Stormo G & Stein L (eds). Wiley and Sons, New York.
- Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Sites JW, Morando M (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(2):475 – 494.
- Siddall ME (1998). Success of Parsimony in the Four-Taxon Case: Long-Branch Repulsion by Likelihood in the Farris Zone. *Cladistics* 14: 209-220.
- Skorecki K & Behar D (2016). DNA mitocondrial y enfermedades y rasgos hereditarios. Capítulo 85e en: *Principios de Medicina Interna*. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J & Loscalzo J (eds). Harrison. 19e, New York.
- 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. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie* 12: 734-748.
- Soibelzon E, Miño-Boilini AR, Zurita AE & Krmpotic CM (2010). Los Xenarthra (Mammalia) del Ensenadense (Pleistoceno inferior a medio) de la Región Pampeana (Argentina). *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 27:449-469.
- Soibelzon E, Medina M & Abba AM (2013) Late Holocene armadillos (Mammalia, Dasypodidae) of the sierras of Córdoba, Argentina: zooarchaeology, diagnostic characters and their paleozoological relevance. *Quaternary Internat* 299: 72–79
- Soibelzon E & León DC (2017). Effects of climatic oscillations on the faunas. The Holocene Thermal Maximum and the displacement of armadillos in Argentina: anatomical features and conservation. *J Archaeol Sci: Rep* 11: 90–98
- Soibelzon E (2019). Using Paleoclimate and the Fossil Record to Explain Past and Present Distributions of Armadillos (*Xenarthra*, *Dasypodidae*). *Journal of Mammalian Evolution* 26:61-70.
- Soibelzon, E, Soibelzon, LH, Gasparini, GM & Tonni EP (2019). El Pleistoceno de la provincia de Buenos Aires y sus mamíferos. En: (Nasif et al., eds), Mioceno al Pleistoceno del centro y norte de Argentina, *Opera Lilloana* 52: 606-637.

- Spinks PQ & Shaffer HB (2007). Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (*Geoemydidae*, *Cuora*): mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple nuclear *loci*. *Conservation Genetics* 8: 641-657.
- Spinks PQ, Thomson RC & Shaffer HB (2010). Nuclear gene phylogeography reveals the historical legacy of an ancient inland sea on lineages of the western pond turtle, *Emys marmorata* in California. *Molecular Ecology* 19: 542-556.
- Stanhope MJ, Waddell VG, Madsen O, de Jong W, Hedges SB, Cleven GC, Kao D & Springer MS (1998). Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African insectivore mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(17): 9967-9972.
- Steiner CC, Houck ML & Ryder OA (2011). Species identification and chromosome variation of captive two-toed sloths. *Zoo Biology* 30(6): 623-35.
- Storz JF, Beaumont MA & Alberts SC (2002). Genetic evidence for long-term population decline in a savannah-dwelling primate: inferences from a hierarchical Bayesian model. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1981-1990.
- Strömberg CAE, Dunn RE, Madden RH, KohnMJ & Carlini AA (2013). Decoupling the spread of grasslands from the evolution of grazer-type herbivores in South America. *Nature Communications* 4: 1478.
- Strimmer K & von Haeseler A (1996). Quartet puzzling: A quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13: 64-969.
- Superina M (2008). The ecology of the pichi *Zaedyus pichiy* in western Argentina. Pp. 313-318 en: *The biology of the Xenarthra*. Vizcaino SF & Loughry WJ (eds). University Press of Florida, Gainesville, Florida.
- Superina M, Fernández Campón F, Stevani EL & Carrara R (2009). Summer diet of the pichi *Zaedyus pichiy* (*Xenarthra*: *Dasypodidae*) in Mendoza Province, Argentina. *Journal of Arid Environments* 73:683-686.
- Superina M (2014). A female juvenile *Zaedyus pichiy* from Malargüe Department, Mendoza Province, Argentina. [Fotografía]. Recuperado de Superina M & Abba A M (2014). *Zaedyus pichiy*. *Mammalian Species* 46(905): 1-10.
- Superina M & Abba AM (2014). *Zaedyus pichiy*. *Mammalian Species* 46(905): 1-10.
- Superina M & Abba AM (2014). *Zaedyus pichiy*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014.
- Superina M, Abba AM & Roig VG (2014a). *Chlamyphorus truncatus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014.
- Superina M, Abba AM, Udrizar Sauthier DE, Gallo JA, Soibelzon E, Rogel TG, Agüero AJ, & Albrecht CD (2019). *Zaedyus pichiy*. En: SAyDS-SAREM (eds) *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción*. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.

- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ & Hillis DM (1996). *Phylogenetic inference*. Pp. 407-514 en: *Molecular Systematics*. Hillis DM, Moritz D & Mable BK (eds) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F (1989). *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by AND polymorphism*. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K & Nei M (1993). *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tauber AA (2005). *Mamíferos fósiles y edad de la Formación Salicás (Mioceno tardío) de la sierra de Velasco, La Rioja, Argentina*. *Ameghiniana* 42(2): 443-460.
- Taulman J & Robbins L (2014). *Range expansion and distributional limits of the nine-banded armadillo in the United States: An update of Taulman & Robbins (1996)*. *Journal of Biogeography* 41. 10.1111/jbi.12319.
- Templeton AR (1998). *Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history*. *Molecular Ecology* 7: 381-397.
- Templeton AR (2008). *Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference*. *Molecular Ecology* 17: 1877-1880.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E & Rebelo Porto JI (2012). *Structure and organization of the mitochondrial DNA control region with tandemly repeated sequence in the Amazon ornamental fish*. *Mitochondrial DNA* 24(1): 74-82.
- Thomas O (1928). *Size differences in the little "pichi" armadillos*. *Annals and Magazine of Natural History Series* 10:526-527.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994). *CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tonni E P & 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(1-2):79-108.
- Tonni EP & Carlini AA (2008). *Neogene vertebrates from Argentine Patagonia: Their relationships with the most significant climatic changes*. *Developments in Quaternary Science* 11: 269-283.

- Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, Holland MM, Marino MA & Prenger VL (2000). A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics* 67(2): 432-443.
- Turmelle AS, Kunz TH & Sorenson MD (2011). A tale of two genomes: contrasting patterns of phylogeographic structure in a widely distributed bat. *Molecular Ecology* 20: 357-375.
- Udrizar Sauthier DE (2009). Los micromamíferos y la evolución ambiental durante el Holoceno en el Río Chubut (Chubut, Argentina). Resumen de tesis. *Mastozoología Neotropical* 16(2), 521-523.
- Vázquez-Domínguez E (2002). Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. Pp. 369-378 en: *Protected areas and the regional planning imperative in North America*. Nelson G, Day JC, Sportza LM, Loucky J & Vázquez C (Eds). University of Calgary Press, Canada.
- Vázquez-Domínguez E (2007). Filogeografía y vertebrados. Pp. 441-466 en: *La Ecología molecular de plantas y animales*. Eguiarte L, Souza V & Aguirre X (Eds.). Instituto Nacional de Ecología, México D.F.
- Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K & Wilson AC (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253(5027): 1503-1507.
- Vignieri S (2007). Cryptic behaviours, inverse genetic landscapes, and spatial avoidance of inbreeding in the Pacific jumping mouse. *Molecular Ecology* 16(4): 853-866.
- Vila C, Amorin IR & Leonard JA (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* 8: 2089-2103.
- Vizcaíno SF, Reguero MA, Goin FJ & Pascual R (1998). Antarctica as background for mammalian evolution. Pp. en *Paleógeno de América del Sur y de la Península Antártica*. Asociación Paleontológica Argentina, Publicación Especial 5:199-209.
- Vizcaíno SF (1995). Identificación específica de las "mulitas", género *Dasyopus* L. (Mammalia, Dasyopodidae), del noroeste argentino. Descripción de una nueva especie. *Mastozoología Neotropical* 2:5-13.
- Wallace DC (2005). Mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* 39:359-407.
- Wallace DC (2008). Mitochondria as chi. *Genetics* 179(2):727-35.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR & Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* 360: 1847-1857.

- Wetzel RM (1982). *Systematics, distribution, ecology and conservation of South American edentates*. Pp. 345-375 en: *Mammalian biology in South America*. Mares MA & Genoways HH (eds). University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Wetzel RM (1985a). *The identification and distribution of recent Xenarthra (=Edentata)*. Pp. 5-21 en: *The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas*. Montgomery GG (ed). Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Wetzel RM (1985b). *Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae*. Pp. 5-21 en: *The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas*. Montgomery GG (ed). Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Wheeler QD & Meier R (2000). *Species concepts and phylogenetic theory*. Columbia University Press, Nueva York.
- Wilkinson GS & Chapman AM (1991). *Length and sequence variation in Evening bat D-loop mtDNA*. *Genetics* 128:607–617.
- Woodburne MO, Goin FJ, Raigemborn MS, Heizler M, Gelfo JN & Oliveira ÉV (2014). *Revised timing of the South American early Paleogene land mammal ages*. *Journal of South American Earth Sciences* 54:109–119.
- Yoder AD & Yang Z (2000). *Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1081-1090.
- Yrigoyen MR (1979). *Cordillera principal*. En: *Actas del II Simposio de Geología Regional Argentina*, vol.1, Córdoba, pp. 651–694.
- Yu Y, Harris AJ, Blair C & He XJ (2015). *RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87: 46-49.
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E & Billups K (2001). *Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present*. *Science* 292: 686-693.
- Zhang W, Zhang Z, Shen F, Hou R, LV X & Bisong Y (2006). *Highly conserved d-loop-like nuclear mitochondrial sequences (Numts) in tiger (Panthera tigris)*. *Journal of Genetics* 85:107-116.

Tabla 1: Poblaciones muestreadas y sus coordenadas geográficas.

Tabla 2: Nombre de cebadores utilizados para cada marcador, su secuencia nucleotídica y trabajo en el que fueron publicados.

Tabla 3: Acrónimos para cada especie utilizadas en los análisis.

Tabla 4: Detalles de las diferentes estrategias de alineamiento utilizadas para cada matriz y los árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de ellas. En gris se marcan las que generaron los árboles más óptimos y se muestra el Modelo evolutivo calculado a través del jModelTest para cada una de ellas.

Tabla 5: Información acerca del data sets para cada fragmento génico analizado en el estudio filogenéticos por método bayesiano basado en coalescencia de la subfamilia Euphractinae. *n*, número de individuos analizados para cada fragmento génico; *L*, longitud del alineamiento de secuencias (en pb); *PI*, número de sitios parsimoniosamente informativos; *Modelo*, modelo de evolución molecular; *S*, tasa de sustitución por sitio / Myr / linaje, inferidas por *beast* en este estudio.

Tabla 6: Diversidad genética de *Zaedyus pichiy* para el concatenado y para cada fragmento (COI y D-loop). En cada población (*Pop*) se muestra el número de haplotipos sobre el número de secuencias (N^h/N^n), el número de mutaciones simples o singletons (*S*), la cantidad de mutaciones informativas (*P*), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (*Hd*). Para ver detalles de cada localidad ir a la Tabla 1.

Tabla 7: Tabla de significancia de *Fst* pareados en las poblaciones de *Z. pichiy*, (+) resultados significativos, (-) resultados no significativos.

Tabla 8: Análisis de la Varianza Molecular para: pruebas 1 la agrupación se corresponde con los linajes obtenidos y prueba 2 donde las poblaciones se agruparon según separación de grandes ríos. El asterisco (*) indica una significancia de $p < 0,01$.

Tabla 9: Diversidad genética y estadísticos en los diferentes linajes de *Zaedyus pichiy*, ver linajes en el árbol (Figura 17). Para cada uno se muestra la diversidad haplotípica con su desvió estándar (*Hd_sd*), la diversidad nucleotídica (π), los índices de neutralidad *D* de tajima y *Fs* de *Fu* con sus respectivos valores de significancia y valores asociados a la distribución de las frecuencias de las diferencias pareadas: *SSD*=suma de las desviaciones cuadradas entre las distribuciones de frecuencias observadas y esperadas, *r*= índice de irregularidad (Harpending, 1994), *N°* medio de diferencias y *IC*= intervalos de confianza de los *N°* medios de las diferencias pareadas.

Figura 1: Relaciones filogenéticas del clado Cingulata según Gibb et al. 2016.

Figura 2: Una hembra de *Zaedyus pichiy* juvenil del Departamento de Malargüe, Provincia de Mendoza, Argentina. Por Superina (2014).

Figura 3: En el mapa se muestra la distribución conocida de la especie marcada con líneas grises y con círculos negros las localidades donde se obtuvieron muestras.

Figura 3: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas, obtenidas para el gen COI, traducidas en secuencias aminoacídicas de los haplotipos de las especies de armadillos utilizados.

Figura 5: Esquema de la primera porción de la Región Control y clasificación de las secuencias de armadillos según su estructura.

Figura 6: Alineamiento de secuencias de la primera porción de la Región Control.

Figura 7: Árbol de similitud a través de método Neighbor-joining para alineamiento de repetidos, se muestra el recorte de los Euphractinae.

Figura 8: Representación de la filogenia clásica de la subfamilia Euphractinae mostrando la relación entre sus especies junto con los esquemas de los tipos estructurales de la primera porción de la Región Control, según la clasificación de la Figura 5, que encontrados en cada una de ellas.

Figura 9: Diagramas para: 1) Matriz de secuencias del marcador COI utilizada para el análisis filogenético por métodos tradicionales; 2.a) Matriz de secuencias del marcador COI utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 2.b) Matriz de secuencias del marcador Vwf utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 2.c) Matriz de secuencias del marcador BRCA1 utilizada para el análisis filogenético por método coalescente; 3.a) Matriz de secuencias concatenadas de los marcadores COI+D-loop, con outgroup, utilizada para los análisis filogeográficos; 3.b) Matriz de secuencias del marcador COI+D-loop utilizada para los análisis filogeográficos; 3.c) Matriz de secuencias del marcadores COI utilizada para los análisis filogeográficos; 3.d) Matriz de secuencias del marcadores D-loop utilizada para los análisis filogeográficos.

Figura 10: Consenso estricto (703 pasos) de los 3 árboles obtenidos por máxima parsimonia. En los nodos se muestra el soporte de jackknife con frecuencias absolutas.

Figura 11: Árbol de Máxima Verosimilitud para los armadillos estudiados basado en porción del gen mitocondrial COI. Los valores sobre las ramas son los soportes de bootstrap calculados con 1000 réplicas.

Figura 12: Árbol de Inferencia Bayesiana para los armadillos estudiados basado en porción del gen mitocondrial COI. Los valores sobre las ramas son las probabilidades posteriores.

Figura 13: Topología del árbol obtenido del análisis Bayesiano particionado del conjunto de datos concatenados de los marcadores COI, BRCA1 y VWF2 para los armadillos estudiados. Muestra las edades de los nodos correspondientes a las relaciones entre las especies; barras en los nodo indican intervalos de alta confianza del 95% (HPD) para las edades de los nodos. Nomenclatura de especies ver tabla 2. Los números encima de las ramas indican probabilidades a posteriori (BPP).

Figura 14: Visualización del árbol obtenido del análisis Bayesiano particionado del conjunto de datos concatenados de los marcadores COI, BRCA1 y VWF2 para los armadillos estudiados utilizando el programa DensiTree. Recorte y acercamiento de las relaciones entre las especies de la subfamilia Euphractinae. En Azul se indican las ramas de común acuerdo con la topología del árbol consenso mientras en rojo se muestran las ramas en conflicto con ella.

Figura 15: Árboles de especies obtenidos de los análisis con *bestia y sus plots de densidad de ramas de todas las hipótesis probadas para la subfamilia Euphractinae: (a) la hipótesis 1, (b) la hipótesis 2, (c) la hipótesis 3, (d) la hipótesis 4, (E) 5 hipótesis, y (f) hipótesis 6 (para una descripción de las hipótesis ver Materiales y Métodos). Nomenclatura de especies ver tabla 2. Los números encima de las ramas indican probabilidades a posteriori. Las barras de escala representan sustituciones por sitio. En los plots de Densitree en Azul se indican las ramas de común acuerdo con la topología del árbol consenso mientras en rojo se muestran las ramas en conflicto con ella.

Figura 16: Resultados gráficos de los análisis de S-DIVA y BBM para los armadillos estudiados. (1) Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) por medio de S-DIVA, con un número máximo de 10 áreas para su distribución ancestral; (2) RAA con BBM, con un número máximo de 10 áreas para su distribución ancestral; (3) Análisis con S-DIVA un número máximo de 4 áreas para su distribución ancestral y; (4) Análisis BBM con un número máximo de 4 áreas para su distribución ancestral. Aro rojo: Dispersión, aro verde: Vicarianza y aro amarillo: Extinción. Cada nodo está dividido según la probabilidad de cada distribución representada por su color según la leyenda, en rojo figuran las letras de las distribuciones más probables para los Ephractinos. Cada área fue codificada con una letra según tabla 5.

Figura 17: Árbol de haplotipos de *Z. pichiy*; se observa dos grandes haplogrupos (A y B). Los números que se muestran en los nodos son la medida de soporte, probabilidad posterior, mayores a 0,5.

Figura 18: Mapa de Argentina donde se muestra cada población representada en un gráfico de tortas donde su tamaño es proporcional a su "n". También se muestra la distribución y proporción de los haplogrupos A y B recuperados en el árbol de haplotipos, siendo el clado A representado en rojo y B en amarillo al igual que en los resultados de los otros análisis.

Figura 19: (a) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de COI+D-loop de longitud 967 pb correspondientes a 28 individuos de *Z. pichiy*; (b) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de COI de longitud 492 pb correspondiente a 59 secuencias de *Z. pichiy*; (c) red de haplotipos para el alineamiento de secuencias de D-loop de longitud 405 correspondiente a 75 ejemplares de *Z. pichiy*. El tamaño de la esfera es relativo a la frecuencia del haplotipo que representa y en las ramas se marca con números la cantidad de pasos mutacionales. Los pequeños círculos rojos entre las ramas hacen referencia a haplotipos hipotéticos (no muestreados o extintos).

Figura 20: Mapa de la Argentina que muestra con puntos verdes las poblaciones muestreadas de *Zaedyus pichiy* y en color celeste los cursos de los grandes ríos que atraviesan su distribución, separando dichas poblaciones en cinco grandes áreas.

Figura 21: Para todas las secuencias obtenidas de ambos marcadores concatenados: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias de ambos marcadores concatenados, pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias de ambos marcadores

concatenados, pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

Figura 22: Para todas las secuencias obtenidas del marcador D-loop: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

Figura 23: Para todas las secuencias obtenidas del marcador COI: A.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, A.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y A.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado A: B.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, B.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y B.3) Resultado del Test de Mantel. Para las secuencias del marcador pertenecientes al clado B: C.1) Resultados de la interpolación de la diversidad genética en el paisaje, C.2) Resultado del análisis de autocorrelación espacial y C.3) Resultado del Test de Mantel.

Figura 24: Distribución de las diferencias pareadas en: todas las muestras de *Zaedyus pichiy* (AB), en el linaje A y en el linaje B. En los gráficos se observa con línea color gris la distribución de los datos y con línea color negra la distribución esperada bajo un modelo de expansión demográfica.

Figura 25: Difusión de *Zaedyus Pichiy* a través del tiempo. La reconstrucción bayesiana muestra desde la Figura 1 a 11 diferentes momentos sucesivos en la distribución de la especie desde su probable centro de origen hasta su distribución presente. En las ramas se representa con rojo lo más basal y se va oscureciendo hacia lo más derivado.

Índice de programas utilizados



BioEdit: edición y alineamiento de secuencias



Clustal X: alineamiento de secuencias/cambio de formato



Seaview: alineamiento de secuencias



PhyML: inferencia filogenética por ML.



TreePuzzle: mapeo del likelihood- Información filogenética.



jModeltest: estimación del modelo de evolución molecular (y sus parámetros).



Figtree: visor y editor de árboles.



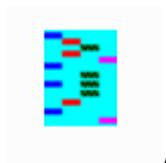
SPREAD: cálculo del Factor de Bayes para detección de asociaciones significativas entre localizaciones geográficas. Generación de archivos para la visualización del proceso de difusión.



Google Earth: visualización del proceso de difusión.



AIS: análisis de aislamiento por distancia (Mantel), autocorrelación espacial y variación genética en el espacio.



DNAsp: pruebas estadísticas (demografía).



Corel: edición de figuras



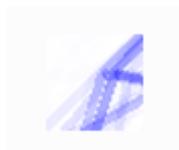
RASP: Análisis biogeográficos (DIVA, DEC, BBM).



Mr Bayes: análisis filogenético por IB.



TNT: análisis filogenético por Parsimonia.



Densitree: análisis cualitativo de arboles.



Arlequín: índices de diversidad, distribución de diferencias pareadas, AMOVA.



Network: construcción red de haplotipos.



DivaGIS: realización de mapas.



Tracer: convergencia, estimadores, factor de Bayes, reconstrucción demográfica.



Paquete BEAST



BEAUti: selección de modelos y priors; especificación de condiciones del análisis; generación del archivo de entrada para el BEAST.



BEAST: optimización de parámetros (análisis de coalescencia).



TreeAnnotator: resumen y anotación de árboles.

Apéndice 1

Lista de las muestras colectadas de *Z. pichiy* para este estudio, con su acrónimo y lugar de colecta (localidad, provincia y coordenadas).

Muestra/acrónimo	Localidad o área	Provincia	Coordenadas	
			Lat.	Long.
BAL1	Pellegrini	Buenos Aires	-36.35	-63.28
BAL2	Pellegrini	Buenos Aires	-36.37	-63.31
BAC1	Laguna Chasico	Buenos Aires	-38.51	-63.32
BAP1	Pedro Luro	Buenos Aires	-39.53	-62.69
BAP2	Pedro Luro	Buenos Aires	-39.53	-62.69
BAP3	Pedro Luro	Buenos Aires	-39.53	-62.69
BAL3	Catriló	La Pampa	-36.41	-63.41
BAL4	Santa Rosa	La Pampa	-36.52	-64.2
BAL5	Atreuco	La Pampa	-37.06	-63.87
BAL6	Conhello	La Pampa	-36.17	-64.44
CHA1	Alto de las Plumas	Chubut	-43.72	-67.29
CHE1	Ea. Talagapa	Chubut	-42.15	-68.25
CHT1	Trelew	Chubut	-43.23	-65.45
CHR1	Rio Chico	Chubut	-45.68	-68.34
CHC1	Cushamen	Chubut	-42.37	-71.03
CHT2	Trelew	Chubut	-43.23	-65.45
CHA2	Alto de las Plumas	Chubut	-43.72	-67.29
CHT3	Trelew	Chubut	-43.23	-65.45
CHT4	Trelew	Chubut	-43.23	-65.45
CHA3	Alto de las Plumas	Chubut	-43.72	-67.29
CHA4	Alto de las Plumas	Chubut	-43.4	-68.77
CHT5	Trelew	Chubut	-43.23	-65.45
CHP1	Península valdés	Chubut	-42.4	-64.77

SCN1	Lagos del Norte	Santa Cruz	-46.9	-70.72
SCS1	Tres Lagos	Santa Cruz	-49.53	-71.45
SCP1	Comandante Luis Piedrabuena	Santa Cruz	-49.93	-69.03
SCN2	Lagos del Norte		-46.71	-71.67
SCN3	Lagos del Norte	Santa Cruz	-46.55	-69.85
SCP2	Comandante Luis Piedrabuena	Santa Cruz	-49.41	-69.84
SCP3	Comandante Luis Piedrabuena	Santa Cruz	-49.93	-69.03
SCC3	Ea. La Olguita	Santa Cruz	-47.98	-71.82
SCN4	Lago del Norte	Santa Cruz	-47.12	-70.87
SCN5	Ea. Lago de Los Cisnes	Santa Cruz	-47.59	-70.83
SCP4	Comandante Luis Piedrabuena	Santa Cruz	-49.59	-68.16
SCC1	Lagos Centro	Santa Cruz	-48.28	-71.61
SCC2	Lagos Centro	Santa Cruz	-48.26	-71.56
SCN6	Perito Moreno	Santa Cruz	-46.87	-70.84
SCN7	Perito Moreno	Santa Cruz	-46.9	-70.78
NJA1	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.84	-70.64
NJA2	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.83	-70.64
NJA3	Junín de Los Andes	Neuquén	-40.22	-70.64
NJA4	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.84	-70.64
NJA5	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.84	-70.64
NJA6	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.74	-70.6
NJA7	Junín de Los Andes	Neuquén	-39.94	-70.96
SLC1	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84
SLC2	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84
SLC3	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84
SLC4	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84
SLC5	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84
SLC6	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.08	-65.87
SLC7	Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)	San Luis	-34.17	-65.84

SLC8	<i>Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)</i>	<i>San Luis</i>	<i>-34.17</i>	<i>-65.84</i>
SLC9	<i>Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)</i>	<i>San Luis</i>	<i>-34.17</i>	<i>-65.8</i>
SLC10	<i>Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)</i>	<i>San Luis</i>	<i>-34.17</i>	<i>-65.84</i>
SLC11	<i>Ea. El Centenario (Gral. Pedernera)</i>	<i>San Luis</i>	<i>-34.17</i>	<i>-65.84</i>
MMA1	<i>Malargüe</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-35.64</i>	<i>-68.58</i>
MMA2	<i>Malargüe</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-35.97</i>	<i>-69.19</i>
MLV1	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.31</i>	<i>-67.71</i>
MLV2	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.26</i>	<i>-67.73</i>
MLV3	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.26</i>	<i>-67.73</i>
MLV4	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.35</i>	<i>-67.91</i>
MCP1	<i>Mendoza</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.85</i>	<i>-68.77</i>
MLV5	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.35</i>	<i>-67.91</i>
MLV6	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.31</i>	<i>-67.66</i>
MLV7	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.31</i>	<i>-67.71</i>
MLV8	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.35</i>	<i>-67.91</i>
MÑA1	<i>Ñacuñán</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-34.05</i>	<i>-67.97</i>
MMA3	<i>Malargüe</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-35.99</i>	<i>-68.94</i>
MMA4	<i>Malargüe</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-36.08</i>	<i>-69.18</i>
MLV9	<i>Lavalle</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-32.31</i>	<i>-67.71</i>
MSR1	<i>San Rafael</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-34.6</i>	<i>-69.02</i>
MMA5	<i>Malargüe</i>	<i>Mendoza</i>	<i>-35.97</i>	<i>-69.19</i>
MLV1	<i>Bermejo (Caucete)</i>	<i>San Juan</i>	<i>-31.6</i>	<i>-67.68</i>
LRP1	<i>Pagancillo (Gral. Lavalle)</i>	<i>La Rioja</i>	<i>-29.54</i>	<i>-68.09</i>
LRP2	<i>Pagancillo (Gral. Lavalle)</i>	<i>La Rioja</i>	<i>-29.54</i>	<i>-68.09</i>
LRP3	<i>Pagancillo (Gral. Lavalle)</i>	<i>La Rioja</i>	<i>-29.54</i>	<i>-68.09</i>
LRP4	<i>Pagancillo (Gral. Lavalle)</i>	<i>La Rioja</i>	<i>-29.54</i>	<i>-68.09</i>
RNM1	<i>Meseta de Somuncuá, Cuatro Cerros</i>	<i>Río Negro</i>	<i>-41.5</i>	<i>-67.02</i>
RNM2	<i>Meseta de Somuncurá, Cerro El Chara</i>	<i>Río Negro</i>	<i>-41.52</i>	<i>-66.78</i>
RNM3	<i>Meseta de Somuncurá, Cerro Corona</i>	<i>Río Negro</i>	<i>-41.45</i>	<i>-66.88</i>

RNP1	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP2	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP3	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP4	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP5	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP6	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP7	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP8	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP9	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.13	-70.72
RNP10	Pilcaniyeu, paraje Cañadón Chileno	Rio Negro	-40.89	-70.03
RNP11	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.05	-70.39
RNP12	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.11	-70.87
RNP13	Pilcaniyeu, Laguna Blanca	Rio Negro	-40.93	-70.08
RNP14	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.03	-70.42
RNP15	Pilcaniyeu, paraje Cañadón Chileno	Rio Negro	-40.89	-70.03
RNP16	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.05	-70.39
RNP17	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.05	-70.39
RNP18	Pilcaniyeu, Laguna Blanca	Rio Negro	-40.93	-70.08
RNP19	Pilcaniyeu, Laguna Blanca	Rio Negro	-40.93	-70.08
RNP20	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.03	-70.42
RNP21	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.11	-70.87
RNP22	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.05	-70.39
RNP23	Pilcaniyeu, Laguna Los Juncos	Rio Negro	-41.06	-71.01
RNP24	Pilcaniyeu	Rio Negro	-40.72	-69.84
RNP25	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.11	-70.8
RNP26	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.03	-70.42
RNP27	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.11	-70.8
RNP28	Pilcaniyeu	Rio Negro	-41.03	-70.42
RNP29	Pilcaniyeu, paraje Cañadón Chileno	Rio Negro	-40.89	-70.03

<i>RNP30</i>	<i>Pilcaniyeu</i>	<i>Rio Negro</i>	<i>-41.13</i>	<i>-70.72</i>
<i>RNP31</i>	<i>Pilcaniyeu</i>	<i>Rio Negro</i>	<i>-41.13</i>	<i>-70.72</i>

Marcadores nucleares: Batería de cebadores testeados perteneciente a intrones y exones de varios genes nucleares obtenidos de la literatura.

<i>FGBSeqF</i>	<i>FGB (I7)</i>	<i>ACWCCATCATCTGTGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>FGBSeqR</i>	<i>FGB (I7)</i>	<i>ACGGCATGTATTCAGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>FGBLcnv</i>	<i>FGB (I7)</i>	<i>ACCACWCCATCATCTGTGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>FGBUcnv</i>	<i>FGB (I7)</i>	<i>ACAACGGCATGTATTCAGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>HPRTSeqTorqF</i>	<i>HPRT (I2)</i>	<i>AAAAGGGAAATGAGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>HPRTSeqTorqR</i>	<i>HPRT (I2)</i>	<i>GGATGCTTCTCTTAA</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>HPRTSEQFF</i>	<i>HPRT (I2)</i>	<i>CTCATGGACTAATTATGG</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>HPRTSEQR</i>	<i>HPRT (I2)</i>	<i>CTTGAGCACACAGAGGGC</i>	<i>Silva S. M. com pers.</i>
<i>PLPSEQF</i>	<i>PLP1 (I2)</i>	<i>CCACTGGATTGTGTTTCT</i>	<i>Murphy et al., 1999</i>
<i>PLPR</i>	<i>PLP1 (I2)</i>	<i>TAGTCGCCAAAGATCTGCCT</i>	<i>Murphy et al., 1999</i>
<i>HNFAL-F</i>	<i>HNFAL(E2)</i>	<i>GCAGCCCTCTACACCTGGTA</i>	<i>Primmer 2002</i>
<i>HNFAL-R</i>	<i>HNFAL(E2)</i>	<i>CAATATCCCCTGACCAGCAT</i>	<i>Primmer 2002</i>
<i>ITSI-F</i>	<i>ITS</i>	<i>TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT</i>	<i>Chaveerach et al.2008</i>
<i>ITSII-R</i>	<i>ITS</i>	<i>GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT</i>	<i>Chaveerach et al.2008</i>
<i>Enol.8Fm F</i>	<i>Enol.</i>	<i>GACTTCAAGTCKCCSGATGACCCCAG</i>	<i>Turmelle et al. 2011</i>
<i>Enol.9Rm R</i>	<i>Enol.</i>	<i>CCAGTCRTCCTGGTCAAAGGGATCTTC</i>	<i>Turmelle et al. 2011</i>
<i>B-1</i>	<i>B</i>	<i>GTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAG</i>	<i>Lessa 1992</i>
<i>B-2</i>	<i>B</i>	<i>CCTGAAGTTCTCAGGATCCACATGCA</i>	<i>Lessa 1992</i>
<i>TBO26 F</i>	<i>TBO</i>	<i>TTCATATGGAACAAGAAAAGACC</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>TBO26 R</i>	<i>TBO</i>	<i>TAG TTC CCT TGC CCA TTT AGTG</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>TBO53 F</i>	<i>TBO</i>	<i>CCAGGA GTA TAG CCT AATGGT AGA GTT C</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>TBO53R</i>	<i>TBO</i>	<i>TTT TTG TGC CAC AGT TTC ACA TTC C</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>TBO64-2 F</i>	<i>TBO</i>	<i>CTGGCT CCCGTC AGC TCT A</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>TBO64-2R</i>	<i>TBO</i>	<i>AAG TTC AAGGCC CATGAC TCA C</i>	<i>Belfiore et al. 2008</i>
<i>RELN61F</i>	<i>RELN</i>	<i>TGAAAGAGTCACTGAAATAAACTGGGAAAC</i>	<i>Spinks et al. 2007</i>
<i>RELN61R</i>	<i>RELN</i>	<i>GCCATGTAATTCCATTATTACTG</i>	<i>Spinks et al. 2007</i>

Secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos: todas las secuencias a excepción de las pertenecientes a la especie *Dasyopus hybridus* se utilizaron para los análisis con el programa *Beast*. Las secuencias del gen *COI* marcadas con (*) se utilizaron en los análisis filogenéticos tradicionales.

Especie	Código GB/BOLD	Gen	Cita
<i>Tamandua tetradactyla</i>	AF284001	BRCA1	Madsen <i>et al.</i> 2001
<i>Tamandua tetradactyla</i>	AF484230	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Cyclopes didactylus</i>	AF484231	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Choloepus didactylus</i>	AF484229	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Cabassous unicinctus</i>	AF484228	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Tolypeutes matacus</i>	AF484227	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Zaedyus pichiy</i>	AF484226	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Priodontes maximus</i>	AF484225	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Euphractus sexcinctus</i>	AF484224	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Dasyopus kappleri</i>	AF484223	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	AF484222	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Bradypus tridactylus</i>	AF284002	BRCA1	Madsen <i>et al.</i> 2001
<i>Chaetophractus villosus</i>	AF284000	BRCA1	Madsen <i>et al.</i> 2001
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	AF283999	BRCA1	Madsen <i>et al.</i> 2001
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	LN613154	BRCA1	Abba <i>et al.</i> 2015
<i>Choloepus hoffmanni</i>	JN414134	BRCA1	Meredith <i>et al.</i> 20011
<i>Chlamyphorus truncatus</i>	FR821708	BRCA1	Delsuc <i>et al.</i> 2012
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Zaedyus pichiy</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus villosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus villosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus villosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Chaetophractus villosus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Euphractus sexcinctus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Euphractus sexcinctus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Euphractus sexcinctus</i>	HQ919697	COI*	iBOL
<i>Chlamyphorus truncatus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Priodontes maximus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Tolypeutes matacus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Tolypeutes matacus</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Cabassous unicinctus</i>	GBMA6371-13	COI*	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	RDATC062-06	COI	iBOL

<i>Dasyopus novemcinctus</i>	GBMA0535-06	COI*	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	JF445350	COI*	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	GBMIN43452-14	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	ECOMA087-13	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	MYPMX310-11	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	ABTVC183-05	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	TOPO426-10	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	TOPO427-10	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	TOPO428-10	COI	iBOL
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	MYPMX097-10	COI	iBOL
<i>Dasyopus kappleri</i>	JF444295	COI*	iBOL
<i>Dasyopus kappleri</i>	ABGYD552-06	COI	iBOL
<i>Dasyopus hybridus</i>		COI*	Este estudio
<i>Dasyopus hybridus</i>		COI*	Este estudio
<i>Dasyopus hybridus</i>		COI*	Este estudio
<i>Dasyopus hybridus</i>		COI*	Este estudio
<i>Dasyopus hybridus</i>		COI*	Este estudio
<i>Tamandua tetradactyla</i>	-	COI*	Este estudio
<i>Tamandua tetradactyla</i>	AJ421450	COI*	Arnason <i>et al.</i> 2002
<i>Tamandua tetradactyla</i>	JF459282	COI*	iBOL
<i>Tamandua tetradactyla</i>	RDATC067-06	COI	iBOL
<i>Tamandua tetradactyla</i>	TOPO423-10	COI	iBOL
<i>Tamandua tetradactyla</i>	GBMA0580-06	COI	iBOL
<i>Tamandua tetradactyla</i>	JF444947	COI*	iBOL
<i>Tamandua tetradactyla</i>	ABFG303-10	COI	iBOL
<i>Cyclopes didactylus</i>	ABECA468-06	COI	iBOL
<i>Bradypus tridactylus</i>	NC_006923	COI*	NCBI
<i>Bradypus tridactylus</i>	CYTC4449-12	COI*	iBOL
<i>Choloepus didactylus</i>	NC_006924	COI	NCBI
<i>Choloepus didactylus</i>	HQ186772	COI	Steiner <i>et al.</i> 2011
<i>Choloepus didactylus</i>	ABFG306-10	COI	iBOL
<i>Choloepus didactylus</i>	HQ186780	COI	Steiner <i>et al.</i> 2011
<i>Choloepus hoffmanni</i>	HQ186766	COI	Steiner <i>et al.</i> 2011
<i>Choloepus hoffmanni</i>	HQ186765	COI	Steiner <i>et al.</i> 2011
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	NM_001281306	VWF	Dang <i>et al.</i> 20011
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	BK007983	VWF	Dang <i>et al.</i> 20011
<i>Choloepus hoffmanni</i>	JN415027	VWF	Meredith <i>et al.</i> 20011
<i>Bradypus tridactylus</i>	BTU31603	VWF	Porter <i>et al.</i> 1996
<i>Bradypus tridactylus</i>	FR821707	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2012
<i>Chaetophractus villosus</i>	FR821706	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2012
<i>Chlamyphorus truncatus</i>	FR821704	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2012
<i>Zaedyus pichiy</i>	AJ427365	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Tolypeutes matacus</i>	AJ427362	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2002
<i>Priodontes maximus</i>	AJ427363	VWF	Delsuc <i>et al.</i> 2002

<i>Euphractus sexcinctus</i>	AJ427364	VWF	Delsuc et al. 2002
<i>Dasypus kappleri</i>	AJ427361	VWF	Delsuc et al. 2002
<i>Tamandua tetradactyla</i>	AJ278161	VWF	Delsuc et al. 2001
<i>Cabassous unicinctus</i>	AJ278159	VWF	Delsuc et al. 2001
<i>Dasypus novemcinctus</i>	AJ278158	VWF	Delsuc et al. 2001
<i>Choloepus didactylus</i>	AJ278160	VWF	Delsuc et al. 2001
<i>Cyclopes didactylus</i>	AJ278156	VWF	Delsuc et al. 2001
<i>Chaetophractus villosus</i>	AF076480	VWF	Stanhope et al. 1998
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	LN613155	VWF	Abba et al. 2015

Apéndices 4

Tabla de codificación de áreas: muestra la presencia de las especies de armadillos estudiados en las áreas determinadas según los principales biomas de América Latina y sus distribuciones. Cod=letras con las que se codifico las áreas en los análisis, las especies siguen la abreviaturas según Tabla 3. La "X" significa que la especie en cuestión habita el área indicada.

Area	Cod	Es	Cve	Cvi	Zp	Ct	Tm	Cu	Pm	Dn	Dk
<i>Desiertos fríos, Argentina</i>	A			X	X						
<i>Sistemas de montaña, Bolivia, norte de Argentina y sur de Perú</i>	B		X								
<i>Bosques subtropicales/Bo sques lluviosos templados, Sureste de Brasil</i>	C	X						X		X	
<i>praderas templadas, Buenos Aires</i>	D		X	X							
<i>praderas templadas Uruguay, Mesopotamia Argentina y sur este de Brasil</i>	E	X								X	
<i>Bosques tropicales secos América Central</i>	F									X	
<i>Bosques tropicales secos costa central de Brasil</i>	G	X								X	
<i>Bosques tropicales secos norte de Argentina, Paraguay y sur</i>	H	X	X	X			X		X	X	

<i>de Bolivia</i>											
<i>praderas tropicales/Sabanas norte Brasil</i>	<i>I</i>							<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>praderas tropicales/Sabanas centro de Brasil</i>	<i>J</i>	<i>X</i>					<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>Bosques tropicales húmedos noreste de Brasil</i>	<i>K</i>	<i>X</i>						<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>
<i>Bosques tropicales húmedos noroeste Brasil</i>	<i>L</i>							<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>
<i>Bosques tropicales húmedos costanera sur Brasil</i>	<i>M</i>	<i>X</i>						<i>X</i>		<i>X</i>	
<i>Desiertos templados/semi-desiertos parte central (sin Buenos Aires) de Argentina</i>	<i>N</i>		<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>					
<i>Desiertos templados/semi-desiertos Cuyo y Puna de Argentina</i>	<i>O</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>		<i>X</i>	<i>X</i>				

Mapa con los principales biomas de América Latina obtenido de Andrés (2009).



Mapas de distribuciones de las especies de armadillos utilizadas en los análisis de filogenia y biogeografía.

