Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: Ctenomys magellanicus, especie nativa y Castor canadensis, especie invasora

Fasanella, Mariana

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fasanella, Mariana. (2012). Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: Ctenomys magellanicus, especie nativa y Castor canadensis, especie invasora. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fasanella, Mariana. "Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: Ctenomys magellanicus, especie nativa y Castor canadensis, especie invasora". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: *Ctenomys magellanicus,* especie nativa y *Castor canadensis,* especie invasora

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Mariana Fasanella

DIRECTOR: Dra. Marta Lizarralde

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Ing. Jorge Adámoli

Lugar de Trabajo: Centro Regional de Estudios Genómicos, UNLP.

Buenos Aires, Marzo 2012.

Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: *Ctenomys magellanicus*, especie nativa y *Castor canadensis*, especie invasora

Resumen

En esta tesis, se analizan a nivel molecular dos especies que habitan el Archipiélago de Tierra del Fuego (ATDF): una especie endémica (*Ctenomys magellanicus*) y una invasora (*Castor canadensis*). *Ctenomys magellanicus* se encuentra en estado Vulnerable según la UICN y es la única especie del género *Ctenomys* que se encuentra en Tierra del Fuego, mientras que el castor es la exótica más importante del ATDF y que genera mayores problemas a nivel ecológico y económico. Utilizando trampas de captura muerta, se capturaron 255 ejemplares de *C. canadensis* muestreados en todo el ATDF incluyendo Chile y Argentina, mientras que se capturaron 60 ejemplares de *C. magellanicus* de la zona norte de la Isla Grande de TDF (Argentina) utilizando trampas de captura viva. Utilizando marcadores moleculares (ADNmt y microsatélites), se estudió la variabilidad genética y la estructura genético poblacional de ambas especies. Para esto se subdividió a la población de castor en 5 subpoblaciones y a la de tucos en dos regiones (REGION NORTE y REGION SUR) según la forma cromosómica y dentro de cada una en 2 y 4 subpoblaciones respectivamente. Para *C. magellanicus* se detectaron 9 haplotipos de ADNmt, 3 exclusivos de la REGION NORTE y 6 exclusivos de la REGION SUR mientras que para castor se encontraron 7 haplotipos distribuidos en casi todas las subpoblaciones. Se encontró una significativa estructuración genética en la población de tucos (tanto con el marcador mitocondrial $\Phi st=0,181$ $p=0,001$ como con el nuclear $Fst=0,108$ $p=0,001$) a diferencia de la población de castores, que no presentó estructuración significativa en ambos marcadores moleculares ($\Phi st=0,058$ $p=0,002$; $Fst=0,052$ $p<0,001$). Los resultados del ADNmt y los microsatélites mostraron una alta variabilidad para tucos mientras que para castor la variabilidad fue menor. Por último, en castor, se identificó a la Isla Dawson (subpob E) como una Unidad de Erradicación (UE) mientras que dentro de la Isla Grande, al haber muy baja estructuración poblacional no se pudieron identificar UE. Debido a que en la Isla Grande no existen barreras a la dispersión para los castores, se deberá realizar un control simultáneo en toda la isla para evitar posibles recolonizaciones. Si bien los datos para *Ctenomys magellanicus* aportan información parcial, se podrían sugerir 5 Unidades de Manejo (UM)

basadas en la estructuración genética: 4 UM para la REGION SUR y 1 UM para la REGION NORTE.

PALABRAS CLAVE: *Castor canadensis*; *Ctenomys magellanicus*; Ecología Molecular; Especies invasoras; Especies endémicas; ADN mitocondrial; D-loop; Microsatélites.

Spatial genetic variability and molecular ecology in two rodent species of the Tierra del Fuego Archipelago: *Ctenomys magellanicus*, a native species and *Castor canadensis*, an invader species

Abstract

In this thesis, we analyze at the molecular level two species that inhabit the Tierra del Fuego Archipelago (TDFA): an endemic (*Ctenomys magellanicus*) and an invasive species (*Castor canadensis*). *Ctenomys magellanicus* is in a Vulnerable state by the UICN and is the only species of the genus *Ctenomys* found in Tierra del Fuego, while the beaver is the most important exotic in the TDFA and generates the biggest problems at the ecological and economic levels. Using killing traps we capture 255 individuals of *C. canadensis* sampled throughout the TDFA including Chile and Argentina, while we capture 60 individuals of *C. magellanicus* from the north of the Isla Grande of TDF (Argentina) live trapping. Using molecular markers (mtDNA and microsatellites), we studied the genetic variability and population genetic structure of both species. For this, beaver population was further divided into 5 sub-populations and *C. magellanicus* was divided into two regions (NORTH REGION and SOUTH REGION) according to the chromosome form and within each into 2 and 4 sub-populations respectively. For *C. magellanicus* we detected 9 mitochondrial haplotypes, 3 exclusive from the NORTH REGION and 6 exclusive from SOUTH REGION while for beaver we found 7 haplotypes in almost all sub-populations. There was a significant population genetic structure in tucos (both with mitochondrial marker $\Phi st=0,181$ $p=0,001$ as with nuclear $Fst=0,108$ $p=0,001$) as opposed to the beaver population which did not present significant structure in both molecular markers ($\Phi st=0,058$ $p=0,002$; $Fst=0,052$ $p<0,001$). Microsatellite and mtADN results showed a high variability in tucos while in beavers the variability was less. Finally, in beavers, we identified Isla Dawson (Subpop E) as an Eradication Unit (EU) while inside the Isla Grande, we could not identified EUs because of the very low population structure. Since on the Isla Grande there are no barriers to dispersal for beavers, it should be performed a simultaneously control on the island to avoid recolonization. While data on *Ctenomys magellanicus* provide partial information, we could suggest 5 Management Units (MU) based on the genetic structure: 4 MU for the SOUTH REGION and 1 MU for the NORTH REGION.

KEY WORDS: *Castor canadensis*; *Ctenomys magellanicus*; Molecular ecology; Invasive species; Endemic species; Mitochondrial DNA; D-loop; Microsatellites.

Abreviaciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNt: ARN de transferencia.

ATDF: Archipiélago de Tierra del Fuego.

BrEt: Bromuro de Etidio.

dNTP: Trifosfato deoxiribonucleótido.

ESU: Unidades Evolutivamente Significativas, del inglés *Evolutionary Significant Units*.

M: Molar.

ml: Mililitros.

MU: Unidades de Manejo, del inglés *Management Units*.

mM: Milimolar.

NaCl: Cloruro de Sodio.

µM: Micromolar.

µl: Microlitros.

ng: Nanogramos.

ng/ul: Nanogramos/microlitro.

Pb: Par de bases nucleotídicas.

PCR: Del inglés *Polimerase Chain Reaction.*

rpm: Revoluciones Por Minuto

TDF: Tierra del Fuego.

UNLP: Universidad Nacional de La Plata.

UNQUI: Universidad Nacional de Quilmes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Marta Lizarralde, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me brindó todo su apoyo y ayuda desde el primer momento. Es más que una directora para mí y siempre le estaré agradecida por la oportunidad que me dio.

A Peter Smouse, quien me ayudó en todos los análisis genéticos y fue el que dio el curso en Bariloche que cambió muchísimo mi forma de pensar…

Al CONICET por haberme otorgado la beca para poder realizar mi doctorado y por financiar parte de mis estudios a partir del PIP 0123/2008. Al iBOL Project. A la Rufford Small Grants, por haberme otorgado mi primer subsidio que fue fundamental para poder llevar adelante el estudio de *Ctenomys magellanicus* en Tierra del Fuego.

A la Secretaría de Ambiente y Recursos Naturales de TDF, al Parque Nacional Tierra del Fuego, al Servicio Agrícola Ganadero y en particular a Nicolás Soto Volkar, Derek Corcorán, Claudio Moraga, Thomas Hanley y Karla Pelz-Serrano por haber cedido las muestras de castor de Argentina, Chile y USA utilizadas en el estudio.

A la gente del Centro Regional de Estudios Genómicos y a la Universidad de La Plata, por haberme dado el espacio físico para poder llevar adelante mi tesis. Especialmente a mis compañeros de laboratorio, Sebastián, Magalí, Diego, Yamila, Cecilia y Luciana y a los de "al lado" principalmente Andrés, gran amigo, Carla, Lucía y Ezequiel.

A la gente del CADIC, principalmente a Julio Escobar quien me acompaño en todas mis salidas de campo y compartió todos sus conocimientos conmigo, no sé qué hubieran sido mis campañas sin él! A Guille Deferrari, que me guardaba todas las muestras de castor en el freezer y llevaba al día el banco de muestras. A Alicia Moretto, quien me prestaba su laboratorio cada vez que iba a Ushuaia. A Nel, Naty, Marce y Guille, las chicas de la Casa A de CADIC quienes eran mi apoyo moral cada vez que iba al Fin del Mundo! Mis días en Ushuaia hubieran sido muy aburridos sin uds! muchas gracias chicas!

A mi familia, especialmente a mis papás que me bancaron durante todos mis años de facultad y que siempre me dejaron elegir lo que quería para mi vida, aconsejándome sabiamente y bancándome en las buenas y en las malas….A mis hermanos, que me supieron acompañar y hacer un poco más feliz mi vida en esta gran ciudad….A mis sobris Pedri y Cata que los amo con toda mi alma!

A Martín, mi gran amor, que con su infinita paciencia, apoyo y alegría estuvo y está siempre caminando al lado mío, acompañándome en cada momento e incluso sosteniéndome cada vez que sentía que me iba a caer, que se me agotaban las pilas, que sentía que todo iba mal…..en estos últimos años siempre estuviste a mi lado ayudándome y te lo agradezco infinitamente! Gracias por hacerme tan feliz! TE AMO!

A mis amigos de la facu….Carmela, Sol, Gri, Euge, Marin, Vero, Flori, Diego y muy especialmente a Lara, amiga incondicional que me apoyó durante todos estos largos años de

facultad! Cuantos recuerdos! Y cuantos momentos vividos juntas! No sé que hubieran sido esos 7 años de facultad sin vos, gracias amiga! Te quiero! A los “vecinos” Andrés y Gabi, amigos pilas y pata si los hay….unos grosos, compañeros de emociones! Grandes consejeros….los quiero mucho! GRACIAS A TODOS MIS AMIGOS!

Al grupo Bariloche Puerta Verde, Mati, Lida, Paula, Silvia, Pablo Uy, Danae y Pablo por bancarme en el curso que nos cambió la vida y por todo su apoyo incondicional. Principalmente al Dr. Mora, quien me ayudó infinitamente en todos los análisis y quien me aconsejó sabiamente. La Dra. Pimper también me ayudó muchísimo en los análisis. Sin su ayuda creo que hoy todavía estaría analizando resultados! El grupo Puerta Verde terminó siendo un grupo de autoayuda fundamental!

Por último, le dedico esta Tesis a Benjamín, aún no te conozco pero te amo con toda mi vida….

INDICE GENERAL

Resumen 2

Abstract 4

Abreviaciones 6

Agradecimientos 7

CAPITULO 1 INTRODUCCION GENERAL *11*

Contexto general del trabajo 12

Contexto y objetivo general de cada capítulo 14

CAPÍTULO 2 INTRODUCCION A LA ECOLOGIA MOLECULAR *17*

Introducción 18

Flujo génico 19

Estructuración genético-espacial 21

Genética de la Conservación 22

Unidades Evolutivamente Significativas y Unidades de Manejo 24

Unidades de Erradicación 25

Marcadores moleculares 26

ADN mitocondrial (ADNmt) 26

Microsatélites (ADNn) 27

CAPITULO 3 AREA DE ESTUDIO: ARCHIPIELAGO DE TIERRA DEL FUEGO *29*

Características generales 30

Complejo andino fueguino 32

Estepa magallánica fueguina 33

Ecotono fueguino 34

Areas de Conservación en el Archipiélago Fueguino 35

Fauna 35

CAPÍTULO 4 LA ESPECIE ENDEMICA: Ctenomys magellanicus *39*

INTRODUCCIÓN 40

Aspectos biológicos del Género *Ctenomys* 40

Aspectos generales de *Ctenomys magellanicus* 41

MATERIALES Y METODOS 49

Área de estudio y captura de individuos 49

Extracción de ADN 52

Amplificación de ADN mitocondrial y secuenciación 53

Amplificación de microsatélites y genotipado 54

Análisis de datos 55

RESULTADOS 59

ADN mitocondrial (D-loop) 59

ADN nuclear (microsatélites) 64

DISCUSIÓN 73

Variabilidad Genética 73

Estructura Poblacional 74

CAPÍTULO 5 LA ESPECIE INVASORA: Castor canadensis 79

INTRODUCCION 80

El problema de las especies exóticas invasoras 80

Aspectos Históricos: Introducción y Colonización del Archipiélago de Tierra del Fuego 82

Aspectos biológicos de *Castor canadensis* 86

Efectos de modificación en el ecosistema fueguino 90

MATERIALES Y MÉTODOS 95

Área de estudio y obtención de las muestras 95

Extracción de ADN 96

Amplificación de ADN mitocondrial y secuenciación 97

Amplificación de microsatélites y genotipado 98

Análisis de datos 99

RESULTADOS 104

ADN mitocondrial (D-loop) 104

ADN nuclear (microsatélites) 111

DISCUSIÓN 119

Estructura poblacional y variabilidad genética 119

CAPÍTULO 6 CONSIDERACIONES FINALES 124

Implicancias para la conservación de *Ctenomys magellanicus* 126

Implicancias para el control/erradicación de *Castor canadensis* en TDF 127

Lineamientos a futuro para ambas especies 129

BIBLIOGRAFÍA 131

ANEXO 146

CAPITULO 1

Introducción General

Contexto general del trabajo

En esta tesis doctoral se analiza la variabilidad genética y la estructura genético-poblacional utilizando como modelo de estudio a 2 especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego (ATDF) con el objetivo general de utilizar los datos genéticos para proponer estrategias que involucren la conservación de especies endémicas y el control de invasoras. Los estudios moleculares resultan primordiales para incrementar el conocimiento de las poblaciones o especies faunísticas de interés para su manejo, conservación o eventualmente para su control, en particular de aquellas que se encuentran aisladas o en situaciones similares a las del estudio de esta tesis doctoral.

La elección de las 2 especies como modelos de estudio para esta tesis no ha sido fortuito dado que representan a roedores emblemáticos del contexto fueguino: el tuco tuco *C. magellanicus* es la única especie cavadora "viviente" en la Isla Grande de TDF, considerada en estado de Vulnerabilidad según los últimos registros (Bidau *et al.* 2008). El castor, *Castor canadensis,* es una invasora problemática para su control, considerada un "ingeniero en ecosistemas", que sin duda ha demostrado una notable expansión sobre todo el ATDF (Lizarralde 1993; Lizarralde *et al.* 2004, 2008a, 2008b; Anderson *et al.* 2009; Wallem *et al.* 2010). Por ende, la elección de ambas especies resulta ventajosa desde varios puntos de vista particularmente, porque en ambas deberían manifestarse los efectos más notorios del aislamiento en las poblaciones animales, es decir, la pérdida de variabilidad genética debido al efecto fundador o a un cuello de botella. Estos 2 procesos se deben a situaciones diferentes se trate de una especie nativa o de una exótica, y sus efectos son considerados muchas veces severos porque reducen numéricamente el tamaño poblacional lo cual pone en situación de riesgo o vulnerabilidad a las especies endémicas, tal es el caso de *Ctenomys magellanicus* en el ATDF. O, contrariamente, la notable capacidad invasiva de muchas especies exóticas introducidas en lugares remotos, indica que el efecto fundador no tiene consecuencias drásticas sobre la viabilidad y fertilidad en estas especies (Sax y Brown 2000; Frankham 2005). Sin duda, este es el caso del *Castor canadensis* en el ATDF. Por ende, el análisis de los modelos de estudio propuestos permitirá, utilizando las mismas herramientas moleculares, dilucidar la estructura genética, evaluar patrones de dispersión, obtener datos sobre la presencia de flujo génico y/o aislamiento entre subpoblaciones e identificar Unidades para la conservación de especies endémicas como *C. magellanicus* o contrariamente Unidades de Manejo o de Erradicación para el control de invasoras como *C. canadensis*. Por último, si bien siempre se relacionó a los estudios de variabilidad genética y estructuración genético-poblacional con estudios de

especies en peligro de extinción y su aplicación a planes de conservación, es importante destacar y demostrar que también este tipo de análisis y herramientas moleculares pueden ser utilizados para estudiar especies invasoras y aplicar esta información para diseñar futuros planes de erradicación o control (Schwartz *et al.* 2007).

El ATDF se caracteriza por presentar ecosistemas frágiles, que se establecieron luego de los últimos avances glaciarios del Holoceno, ha sido categorizado como una de las ecorregiones más prístinas del mundo y es un área prioritaria de conservación de la biodiversidad global por sus ecosistemas forestales de frontera y la presencia de fauna endémica (Brooks *et al.* 2006). El ecosistema subantártico, por su origen geomorfológico, las condiciones insulares y la influencia antártica que determinan un clima extremo, posee condiciones prácticamente marginales para el desarrollo de pocas especies, donde cualquier disturbio o alteración (como por ejemplo la introducción de fauna exótica) produce cambios ambientales irreversibles o que perduran en el ecosistema por décadas, cientos o miles de años (Lizarralde y Escobar 2000; Lizarralde *et al.* 2004).

Si bien en varias especies del Género *Ctenomys* existe extensa información a nivel genético, cromosómico y molecular (Ortells 1995; Lessa y Cook 1998; Giménez *et al.* 2002; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Fernández-Stolz 2007; Mora 2008; Fornel 2010; Mapelli 2010; Mirol *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010; Tomasco y Lessa 2011; entre otros), particularmente en *Ctenomys magellanicus*, la información existente a nivel cromosómico y alozímico es escasa (Kiblisky y Reig 1968; Reig y Kiblisky 1969; Gallardo 1979; Reig *et al.* 1990; Lizarralde *et al.* 2001, 2003) y no existe información a nivel genético-molecular como en otras especies del genero. Incluso es necesario actualizar su distribución regional reportada por Bidau *et al.* (2008) a partir de la recopilación de referencias, la cual debería ser validada con datos actuales. Por otro lado, si bien *Castor canadensis* es la invasora más problemática de TDF, la mayoría de los estudios se han focalizado en la ecología y biología de la especie (Lizarralde 1989, 1993; Busher 1996; Lizarralde y Escobar 2000; Breck *et al.* 2001; Collen y Gibson 2001; Müller-Schwarze y Sun 2003; Swafford *et al.* 2003; Curtis y Jensen 2004; entre otros), los efectos que la especie produce sobre el ambiente (Lizarralde *et al.* 1996, 2004; Anderson *et al.* 2006; Martínez Pastur *et al.* 2006; Anderson y Rosemond 2007; Anderson *et al.* 2009; Wallem *et al.* 2010; entre otros) y los posibles planes de manejo y control (Lizarralde y Escobar 1999; McPeake y Pledger 2001; Garriz y Lizarralde 2007; Parkes *et al.* 2008; Silva y Saavedra 2008; Anderson *et al*. 2011), mientras que los aspectos genéticos y moleculares están siendo explorados recientemente (Lizarralde *et al.* 2008a). Estudios genético-moleculares en *Castor canadensis* se realizaron en

poblaciones del Hemisferio Norte principalmente utilizando microsatélites (Crawford *et al.* 2007, 2008, 2009; Pelz-Serrano *et al.* 2009), existiendo algunos pocos estudios moleculares sobre *Castor fiber* en Europa (Ducroz *et al.* 2004, Durka *et. al.* 2005). Es importante destacar que los resultados de la variabilidad genética y la estructura genética-poblacional obtenidos en esta tesis son novedosos considerados los primeros datos sobre la estructura genético-poblacional de *C. magellanicus y C. canadensis* en el ATDF, los cuales podrán ser utilizados para el diseño de estrategias de conservación y control según corresponda.

Contexto y objetivo general de cada capítulo

La tesis ha sido estructurada en capítulos específicos para una mejor organización de los datos, y diagramación de los resultados obtenidos. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos. El **Capítulo 2 (Introducción a la Ecología Molecular)** tiene como objetivo describir los temas específicos que definen la Ecología Molecular y sus herramientas moleculares de análisis en las que se basa el desarrollo metodológico y experimental de esta tesis. La presencia de la genética y los marcadores moleculares en la ecología y la biología evolutiva no ha dejado de crecer en las últimas décadas razón por la cual la aplicación de marcadores moleculares ha resultado sumamente eficaz aportando información sobre la historia evolutiva, la demografía, la ecología y el diseño de estrategias de conservación (Eguiarte *et al.* 2007). Se desataca el uso de estos marcadores que han permitido documentar los cambios genéticos que las poblaciones sufren como consecuencia de la fragmentación y las reducciones en el tamaño poblacional, confirmando las consecuencias negativas que éstos pueden tener sobre la viabilidad poblacional. Recientemente, la genética de la conservación ha sido impulsada por la aparición de nuevos marcadores, el uso de muestras degradadas o antiguas y por avances significativos en los métodos de análisis de datos que son descriptos (Godoy 2009). Se mencionan además aspectos relevantes del estudio vinculados al flujo génico, la estructura genético-poblacional, los marcadores moleculares, la genética de la conservación y el uso de las herramientas moleculares para definir Unidades Evolutivamente Significativas, Unidades de Manejo y Unidades de Erradicación (Moritz 1994; Robertson y Gemell 2004).

El **Capítulo 3 (Área de estudio: El Archipiélago de Tierra del Fuego)**, tiene como objetivo describir el Área de Estudio y las características ambientales relevantes que contextualizan el estudio. Se presentan las características climáticas, geomorfológicas y ecológico-ambientales relevantes del ATDF. Se presenta información sobre la fauna silvestre caracterizada por muy pocas especies de mamíferos, de las cuales el 60⁄ son introducidas (Anderson *et al.* 2008). Dentro de los mamíferos, el Orden más representado en el ATDF es el de los Roedores, con 7

especies nativas (*Oligoryzomys longicaudatus*, *Myocastor coypus*, *Abrothrix longipilis*, *Akodon hershkovitzi*, *Abrothrix xhantorrinus*, *Euneomys chinchilloides* y *Ctenomys magellanicus*) y 5 especies introducidas (*Ondatra zibethica*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* y *Castor canadensis*) (Lizarralde y Escobar 2000). Entre las especies de roedores nativos, *Ctenomys magellanicus* es la única una especie cavadora-subterránea existente en Tierra del Fuego. Mientras que *Castor canadensis* es la especie exótica que genera los mayores desastres ecológicos y económicos en el ATDF, además de ser el animal más emblemático de la provincia.

El **Capítulo 4 (La especie endémica: *Ctenomys magellanicus*)** se relaciona con el género *Ctenomys*, y particularmente con *Ctenomys magellanicus* en el ATDF. Se resalta que *C. magellanicus* es la única especie de roedor cavador viviente en la Isla Grande de Tierra del Fuego, extremo austral de distribución del grupo; es un complejo de 2 formas cromosómicas (*Cm*34 y *Cm*36) distribuidas clinal y parapátricamente, representando un caso activo de especiación cromosómica característica del grupo *Ctenomys* (Reig 1983; Bidau *et al.* 1996; Lizarralde *et al.* 2001, 2003). La distribución de estas "especies cromosómicas" coincide con 2 zonas biogeográficas de la Isla Grande de Tierra del Fuego: 1) *Cm34* se distribuye exclusivamente en el norte y 2) *Cm36* lo hace en el centro. Estos demes "especiogénicos" están compuestos por un número pequeño de individuos reproductores donde actuaría la deriva genética, una alta tasa de endocruza y la selección interdémica. Las subpoblaciones están separadas por amplias áreas (aprox. 50 km,) donde no se detectan zonas híbridas ni evidencias de procesos de expansión o migración, lo que sugiere la ausencia de flujo génico entre los aislados y semiaislados. Factores actuales como la estructura de la vegetación y las condiciones del suelo (textura, microtopografía, humedad, entre otros), además de los paleoclimáticos, han contribuido a la discontinuidad y fragmentación de la población. Informes históricos indican que los *tucos* "eran" una especie abundante y el principal alimento de los nativos de la zona norte de la Isla Grande antes de la introducción del ganado (Gusinde 1982). Sin duda, estos factores habrían producido la retracción y reducción poblacional detectada años atrás por Lizarralde *et al.* (2001). Se analiza la variabilidad genética y la estructura genético-poblacional de *Ctenomys magellanicus* en Tierra del Fuego para cada forma cromosómica y para cada una de las subpoblaciones definidas en Tierra del Fuego.

El **Capítulo 5 (La especie invasora: *Castor canadensis*)** se vincula a las especies invasoras y principalmente la introducción de castor en el ATDF. Las invasiones biológicas constituyen la amenaza más significativa y de mayor tasa de crecimiento para la conservación de la biodiversidad. Si bien, la mayoría de las exóticas no consiguen establecerse en las nuevas

localidades, algunas se convierten en colonizadoras “exitosas” avanzando sobre sistemas naturales y convirtiéndose en “invasoras” generando alteraciones significativas sobre los ecosistemas. El Archipiélago de Tierra del Fuego (ATDF) contiene un significativo número de estas especies (Lizarralde y Escobar 2000), destacándose por su abundancia e impacto el castor norteamericano *Castor canadensis*. Introducido en la Isla Grande en 1946, el castor se expandió en pocos años al resto del archipiélago a partir de un pequeño núcleo de 25 parejas fundadoras (Lizarralde 1993; Lizarralde y Elisetch 2001; Lizarralde y Venegas 2002). En la actualidad la población del archipiélago bordearía los 100.000 individuos, presentando tasas de avance de 2 a 6 Km lineales por año (Lizarralde *et al.* 2004, 2008a). La presencia de castores se constató recientemente en el Continente; desde 1994 se identificaron focos en Península Brunswick (Chile). Frente a esta problemática agudizada por su presencia continental, recientemente se propuso la necesidad de adoptar medidas de control/erradicación. Sin duda, desde la perspectiva planteada, es importante contar con información detallada y sistematizada acerca del proceso de invasión de esta especie a nivel regional. Al igual que en el capítulo anterior, se analiza la variabilidad genética y la estructura genético-poblacional en subpoblaciones definidas en el ATDF.

Finalmente, en el **Capítulo 6 (Consideraciones finales)** se desarrollan las discusiones y consideraciones finales sobre el tema, comparando la estructura genético-poblacional de una especie invasora y la de una especie endémica, se discuten los resultados obtenidos en esta tesis y su posible aplicación en planes de erradicación, control o conservación y por último, se plantean lineamientos sobre la continuidad de estudios futuros en ambas especies.

CAPÍTULO 2

Introducción a la ecología molecular

Introducción

La Ecología Molecular como disciplina, es relativamente reciente; su nombre surge a finales de los años '90. Es una novedosa rama de la Ecología que se basa en el empleo de herramientas moleculares para resolver problemas ecológicos. Principalmente se enfoca en el uso de marcadores genéticos para resolver problemas poblacionales como por ejemplo: ¿cómo definir los límites de una población?, ¿cómo definir a una especie?, ¿cómo analizar los casos de hibridismo? y ¿cuáles son realmente las especies que les dieron origen? Otros temas de la disciplina son: análisis de paternidad, evolución de los sistemas reproductivos y la selección sexual, estimación directa del flujo génico, entre otros. Por el lado de la filogenia, la Ecología Molecular puede dar elementos para realizar estudios comparativos y entender la evolución de las adaptaciones y la morfología (Eguiarte *et al.* 2007).

Hoy en día, los biólogos evolutivos usan tanto datos morfológicos como moleculares para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, para estimar la variación dentro de las poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas (Garant y Kruuk 2005). El principal argumento a favor de la utilización de caracteres moleculares es que son universales (Selkoe y Toonen 2006). Los datos moleculares también tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos se asume. Es importante destacar que tanto los acercamientos moleculares como morfológicos tienen ventajas y desventajas; ambos enfoques siguen desempeñando un papel crucial en casi todos los grupos de organismos y hasta la actualidad, las especies se describen y se identifican con base en ambas clases de datos (Eguiarte *et al.* 2007).

Existen dos factores importantes que contribuyen a los avances recientes en la Ecología Molecular: 1) las técnicas de laboratorio son más económicas en la actualidad, permitiendo el uso de un gran número de muestras y muchos *loci* y 2) los avances en la tecnología informática permiten que se puedan utilizar aproximaciones estadísticas como por ejemplo Índice de Máxima Verosimilitud, Teoría de Probabilidades Bayesianas y simulaciones de la Cadena de Monte Carlo, que hace unos años era imposible llevarlas a cabo (Selkoe y Toonen 2006).

Flujo génico

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. El patrón del flujo génico puede tener gran influencia en la trayectoria evolutiva de las poblaciones, sin embargo, los patrones de dispersión permanecen como uno de los parámetros más enigmáticos en ecología poblacional y biología de la conservación (Waser y Strobeck 1998). Esto es debido a que la dispersión y el flujo génico son parámetros difíciles de estimar por métodos tradicionales (captura-marca-recaptura, transmisores satelitales y de radio), ya que se necesita un período de tiempo muy largo para poder calcularlos. Por ejemplo, en especies de roedores cavadores resulta muy dificultoso obtener medidas directas de tasas de dispersión en estudios de campo (Patton y Smith 1990; Cutrera *et al.* 2005). Sin embargo, los recientes avances en el campo de la genética ecológica y del paisaje, simplifican y determinan con mayor velocidad los parámetros de dispersión y flujo génico en poblaciones naturales (Berry *et al.* 2004). Tal vez, estas herramientas sean las únicas aproximaciones que pueden utilizarse para caracterizar el patrón de dispersión y estructura poblacional en especies de hábitos muy poco conspicuos y esquivos.

Los niveles de flujo génico pueden determinar la persistencia y adaptación de poblaciones locales, las tasas de extinción de las especies, la evolución de los rangos de distribución de las especies, entre otras (Eguiarte *et al.* 2007). Por ejemplo, si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas las poblaciones evolucionarán de manera conjunta, mientras que si es muy bajo, las poblaciones empezarán a divergir, contribuyendo al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin 1985). Por lo tanto, los estudios de flujo génico podrían ser la única alternativa para obtener datos que posibiliten el manejo exitoso de especies amenazadas que habitan ambientes muy fragmentados (Mapelli 2010) o de especies introducidas que se desee erradicar o controlar (Robertson y Gemell 2004).

Es posible estudiar el flujo génico mediante métodos directos o indirectos. Los métodos directos se basan en observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión de gametos o individuos, por ejemplo con la captura y recaptura de individuos marcados. Este tipo de métodos, implican mucho tiempo de seguimiento de la especie, dinero y muchas veces las marcas, transmisores o radio collares se pierden, se rompen o se agotan, perdiéndose de esta manera, toda la información. Los métodos directos subestiman la frecuencia de la dispersión a larga distancia, no tienen en cuenta las extinciones y las recolonizaciones como una fuente de flujo génico y no detectan eventos raros que pueden ser importantes (Slatkin

1985). Además, las medidas directas de dispersión no necesariamente reflejan el movimiento de genes, ya que no se sabe si el migrante se reproduce exitosamente (Eguiarte *et al.* 2007). Sin embargo, al reflejar el flujo génico instantáneo, son apropiados para el estudio del movimiento de genes a una escala ecológica o fina. Por otro lado, los métodos indirectos se basan en datos moleculares y por lo tanto reflejan flujo génico histórico y no el flujo génico que está ocurriendo en el presente. Tienen la ventaja de poder incorporar los efectos de todos los componentes históricos de la dispersión y generar un promedio de la variación en la dispersión a través del tiempo (Eguiarte *et al.* 2007). Dependiendo del tipo de marcador molecular utilizado, el flujo génico será histórico (ADNmt) o más reciente (microsatélites) (ver más adelante en este Capítulo).

Gracias al desarrollo de técnicas y análisis moleculares, es posible estimar el flujo génico de una manera detallada y con mayor resolución. Estos análisis se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones. La mayoría de los modelos teóricos de flujo génico surgen de los conceptos desarrollados por Sewall Wright y suponen que los organismos están formando poblaciones discretas (modelo de islas) que se diferencian por mutación y deriva génica (Wright 1943) o bien que forman poblaciones con una distribución continua (modelos de aislamiento por distancia) en donde la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia espacial. El modelo usado comúnmente para estimar flujo génico es el modelo de islas infinitas de Wright (1951). Para organismos con vagilidad limitada, el flujo génico puede estar restringido sólo por la distancia dentro de cada subpoblación, este tipo de efecto fue denominado por Wright (1943) Aislamiento por Distancia y se basa en la relación del flujo génico entre pares de poblaciones con la distancia geográfica.

El índice más utilizado para estudiar el flujo génico y por lo tanto el grado de estructuración de una población, es el Fst (índice que toma valores entre 0 y 1). Si este índice toma valores cercanos a cero, indica que la población no se encuentra estructurada y por lo tanto el flujo génico entre poblaciones es significativo, si el valor de Fst oscila entre 0,05 y 0,25 la población se encuentra levemente estructurada, mientras que valores superiores a 0,25 demuestran una diferenciación significativa entre poblaciones con flujo génico restringido (Wright 1978). Si el Fst es igual a 1, las poblaciones se encuentran completamente aisladas y no existe flujo génico entre ellas.

Estructuración genético-espacial

La estructuración de la variabilidad genética en poblaciones naturales y la relación espacial de los individuos dentro de unidades poblacionales es de sumo interés para la biología evolutiva y de la conservación. Éstas pueden dar indicios tanto del pasado como del potencial evolutivo de las especies (Hanski y Gilpin 1997), señalando problemas de baja variabilidad genética que limitan la respuesta a cambios en el ambiente (Lande 1988; Lande y Shannon 1996), o que son el resultado de reducciones históricas en el tamaño poblacional (Frankham 1995; Luikart *et al.* 1998). En general y al igual que en la fragmentación del hábitat, la estructuración genético-espacial conduce a que la mayoría de las especies presenten una organización espacial en grupos poblacionales locales con alto grado de aislamiento (Gaggiotti y Hanski 2004), llevando muchas veces a la pérdida de variación genética en la población.

La estructura genético-espacial puede ser estudiada: (1) a gran escala (entre poblaciones) utilizando el estadístico Fst o (2) a escala fina (dentro de las subpoblaciones) realizando análisis de autocorrelación espacial, utilizados para caracterizar la estructura genética de numerosas especies (Epperson y Li 1996; Epperson *et al.* 1999; Smouse y Peakall 1999; Cassens *et al.* 2000; Peakall *et al.* 2003). En este tipo de análisis, se estudia un set de estadísticos que muestran las consecuencias genéticas de la dispersión a escalas espaciales pequeñas, dentro de las subpoblaciones (Hardy y Vekemans 1999). Generalmente, estos análisis se han realizado en plantas ya que presentan un flujo génico restringido y por lo tanto exhiben una estructura genética local (Wright 1978), aunque algunas poblaciones de animales también presentan una estructura genética a pequeña escala. Si bien resulta poco probable la presencia de una estructura genético-espacial a escala fina en especies animales con alta tasa de dispersión, en otras con un fuerte componente social y alta territorialidad (como es el caso de los castores) pueden estar caracterizados por una estructura genética local positiva a pequeña escala espacial (Epperson 1990; Smouse y Peakall 1999; Peakall *et al.* 2003).

La habilidad de las especies para persistir en paisajes fragmentados está positivamente relacionada con las habilidades dispersivas y la capacidad de colonización. Los tucos, roedores subterráneos territoriales, son un buen modelo de estudio para estos análisis ya que presentan limitadas capacidades dispersivas (Busch *et al.* 2000), están comúnmente agrupados en pequeños *demes* poblacionales con baja variación genética y alta divergencia interpoblacional (Wlasiuk *et al.* 2003; Mora 2008), presentan un bajo tamaño poblacional efectivo y sus poblaciones están fuertemente estructuradas en el espacio (Cutrera *et al.* 2005; Mora *et al.* 2007, 2010).

Genética de la Conservación

En los últimos años se han hecho una infinidad de estudios para comprender los procesos ecológicos y evolutivos por los que atraviesan las especies y tratar de proponer estrategias de conservación que sean exitosas. Se ha sugerido que para preservar de la mejor manera las especies, se requiere de un trabajo "transdiciplinario", donde se involucren profesionales tanto de las ciencias naturales como sociales (Eguiarte *et al.* 2007). Dentro de las ciencias naturales se requieren especialistas de diversas disciplinas como la taxonomía, la ecología, la botánica, la zoología y la biología evolutiva. En este sentido, la genética de poblaciones es una parte fundamental de la teoría evolutiva moderna, y sus aportes a la biología de la conservación fueron integrándose a la disciplina que en la actualidad se conoce como Genética de la Conservación (Eguiarte y Piñero 1990).

Los orígenes de la Genética de la Conservación se dan poco después de haber surgido la biología de la conservación, cuando se hicieron evidentes varios problemas genéticos asociados con las especies en peligro de extinción. Por ejemplo, se resaltó que la disminución en los tamaños poblacionales iba acompañada a la pérdida de diversidad genética y que la fragmentación de los hábitats tenía un efecto en la estructura poblacional. Desde el punto de vista evolutivo, se hizo necesario entender los procesos de extinción de las especies (Simberloff 1988; Eguiarte y Piñero 1990). El avance en el uso de los marcadores moleculares permitió a su vez una espectacular recopilación de datos genéticos de las poblaciones naturales de especies amenazadas o en peligro y mostró la relevancia de los factores genéticos, particularmente en casos como la depresión por endogamia (Eguiarte y Piñeiro 1990; Meffe y Carroll 1994; Primack *et al.* 2001). En la década de los ´90 los principales avances estuvieron relacionados con los nuevos métodos moleculares y computacionales que permitieron nuevos análisis y predicciones, dando mayor importancia al reconocimiento de las unidades fundamentales de conservación (especies, subespecies y Unidades Evolutivamente Significativas).

Uno de los objetivos clave de la genética de la conservación es ayudar a minimizar las extinciones evitando los problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños, la endogamia y la pérdida de diversidad. Los análisis genéticos también permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas, dar solución a problemas de tipo taxonómico como por ejemplo establecer especies prioritarias para la conservación, definir unidades evolutivamente significativas y unidades de manejo, identificación de material biológico y su procedencia y, en casos ideales, también puede

ayudar a proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz 2002). El objetivo central de la Genética de la Conservación en los últimos años ha sido entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones pequeñas. Existen numerosos ejemplos donde los factores genéticos parecen estar implicados en la disminución de poblaciones de animales (O´Brien 1994; Hedrick 1995; Frankham *et al.* 2002). Entre los factores genéticos que se han reconocido, la pérdida de variación genética y la depresión por endogamia han recibido la mayor atención. Cuando las poblaciones son pequeñas, son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos como demográficos, ambientales y catástrofes) aceleran su decline y las llevan a los llamados vórtices de extinción (Primack *et al.* 2001; Frankham *et al.* 2002).

Tanto el **efecto fundador** como los **cuellos de botella** son reducciones drásticas en los tamaños efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética. Si las poblaciones permanecen pequeñas por largos períodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo. Esto genera cambios al azar en las frecuencias alélicas, lo que se conoce como deriva génica (Hartl y Clark 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que mantengan niveles de variación genética mayores que en las poblaciones pequeñas. Cuando comenzaron a acumularse evidencias de las causas genéticas de la extinción, los estudios genéticos comenzaron a cobrar importancia en los programas de conservación. Sin embargo, en 1988 Lande publicó un artículo en el que concluyó que no sólo se deben usar los datos genéticos sino también otros aspectos de la ecología de poblaciones. Así mismo, Mills y Smouse (1994) resaltan que tanto la genética como la ecología deben ser tomadas en cuenta, así como las interacciones entre ellas.

La diversidad genética es sin lugar a dudas la materia prima para la evolución, ya que de ella dependen tanto la adaptación como la especiación. Los niveles altos de diversidad pueden dar la habilidad para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales (Hedrick 2001) y fue por ello que los primeros trabajos de conservación buscaban simplemente mantener niveles de diversidad altos. Al parecer, no se puede generalizar la regla de que altos niveles de diversidad significan buen estado evolutivo. Por ejemplo, se encuentran especies con poca variación genética que son muy abundantes e incluso que se comportan como invasoras y especies con mucha variación genética y cuyas poblaciones están declinando (Baur y Schmid 1996; Amos y Harwood 1998).

Dado que los recursos tanto físicos como monetarios necesarios para la conservación de especies son enormes, resulta necesario tomar medidas de la manera más pragmática posible,

ya que por una parte la retención de pocos individuos puede tener efectos genéticos deletéreos, pero también puede resultar contraproducente destinar demasiados recursos a una sola especie.

Unidades Evolutivamente Significativas y Unidades de Manejo

El conocimiento de la estructura genética de una especie posibilita identificar la unidad evolutiva y la unidad de manejo de la especie (Moritz 1994). La idea de proponer políticas de conservación en unidades por debajo del nivel de especie utilizando datos moleculares cobró importancia significativa cuando se generó el concepto de **Unidades Evolutivas Significativas** (ESUs por sus siglas en inglés, Ryder 1986). Según la definición de Ryder (1986), las ESUs son unidades poblacionales que merecen manejo propio y que tienen una alta prioridad de conservación. Fueron definidas para proporcionar un enfoque objetivo en la elección de las unidades de conservación prioritarias por debajo del nivel de especie y deben dar una idea acerca de los procesos evolutivos y la distribución de la diversidad genética para llevar a cabo estrategias de conservación (Fraser y Bernatchez 2001; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009). En este sentido, la diferenciación dentro de las especies hace que se tengan que conservar más poblaciones para asegurar que se mantenga suficiente variación genética para asegurar la supervivencia de la especie. Estas unidades pueden tratarse de poblaciones distintas genéticamente del resto o que han estado históricamente aisladas.

Desde los orígenes de la definición propuesta por Ryder (1986), el concepto ha ido cambiando en función de las necesidades prácticas y las limitaciones de los conceptos actuales (Avise 1994; Moritz 1994; Fraser y Bernatchez 2001). Una de las definiciones más utilizadas en la literatura es la propuesta por Moritz (1994, 2002) en donde define a una ESU como un grupo de individuos o poblaciones que presentan monofilia recíproca para marcadores mitocondriales y divergencias significativas en las frecuencias alélicas de *loci* nucleares, pudiéndose referir a poblaciones, especies o subespecies, y considerando también el tiempo de aislamiento de dichas poblaciones. Es importante destacar que aún en la actualidad este concepto es muy criticado debido a las dificultades que genera aplicarlo (Ver Capítulo 5).

Para los casos en los que la monofilia recíproca no fue alcanzada entre los linajes, se formalizó el concepto de **Unidad de Manejo** (UM; Moritz 1994) que fue definido para poblaciones (o grupo de poblaciones) identificadas por la divergencia significativa en las frecuencias alélicas de *loci* neutros (nucleares o mitocondriales) independientemente de las relaciones filogenéticas entre los alelos. Por lo tanto, las UMs son un grupo de individuos entre los cuales

el grado de conectividad ecológica y genética es suficientemente bajo por lo que cada grupo (subpoblación) debería ser monitoreado y manejado separadamente (Palsbøll *et al.* 2006). Las UMs se han utilizado principalmente cuando se conoce la estructura poblacional actual y no la estructura histórica (Moritz 1994). Estas unidades intentan integrar la diversidad genética y la demografía de distintas poblaciones, las cuales tienen que ser manejadas de manera independiente para asegurar la viabilidad de una ESU (Moritz 2002).

Unidades de Erradicación

La determinación de las capacidades de migración interinsular de especies plaga y la delimitación de Unidades de Erradicación hace posible que las campañas de erradicación sean más viables a largo plazo porque se evita la recolonización desde islas vecinas (Abdelkrim *et al.* 2005). En islas, uno de los mayores riesgos de que el programa de erradicación fracase es la habilidad de las especies para recolonizar desde islas adyacentes o desde el continente. Los grupos de islas interconectados o geográficamente cercanos entre sí como para permitir la migración, han sido llamados "Unidades de Erradicación UE (o EU siglas en inglés)" (Robertson y Gemmell 2004). Estas UE pueden ser definidas como unidades genéticamente aisladas con grupos (o clúster) de poblaciones que deben ser erradicados al mismo tiempo para maximizar el éxito de la operación a largo plazo. La identificación de UE no es fácil dado que los patrones de dispersión dependen de múltiples factores biológicos, geográficos y humanos. Por lo tanto, analizar la estructura poblacional de la especie en estudio entre los clústers de islas e interpretarlo en términos de flujo génico puede proveer una aproximación para identificar las Unidades de Erradicación. La determinación de las capacidades de dispersión interinsular de especies plaga y la delimitación de UE hace posible que las campañas de erradicación sean más viables a largo plazo porque se evita la recolonización recurrente de islas vecinas.

La erradicación y control de especies invasoras/plaga es una importante herramienta en la conservación y restauración ecológica ya que provee los medios para aliviar y/o remover los efectos perjudiciales que típicamente generan las especies exóticas en los nuevos ecosistemas. Para que un programa de erradicación pueda ser aplicado exitosamente, debe estar claramente definida la Unidad de Erradicación (población objetivo) (Robertson y Gemell 2004). Las poblaciones de islas pequeñas o las que se encuentran "aisladas" están intrínsecamente bien definidas como Unidades de Erradicación (por ejemplo, las erradicaciones de mamíferos en Nueva Zelanda en islas cercanas a la costa; Towns y Broome 2003), mientras que las poblaciones de islas más grandes o aquellas que no presentan una estructuración, son más problemáticas a la hora de definir la UE y por lo tanto, de erradicar las especies. Si bien las

erradicaciones a gran escala son posibles (Taylor *et al.* 2000; Towns y Broome 2003), son logísticamente difíciles y muy costosas. El éxito de la erradicación requiere de una planificación considerable, no solamente hay que basar la estrategia en definir las unidades que sean de un tamaño considerable y con un bajo riesgo de recolonización sino que también hay que tener en cuenta numerosos aspectos. Por ejemplo, tratar de erradicar una fracción de la población o una población sumidero dentro de una dinámica de población fuente-sumidero no identificada, llevaría inevitablemente a una rápida recolonización y por lo tanto a una pérdida de dinero. Es importante destacar que sólo unos pocos migrantes por generación pueden disminuir la diferenciación genética entre poblaciones. Debido a esto, para que la erradicación de una especie sea exitosa, es muy importante asegurarse de eliminar todos los individuos o al menos impedir el flujo entre poblaciones. En este sentido, conocer las rutas naturales de dispersión es importante al momento de definir las Unidades de Erradicación (Robertson y Gemell 2004). Es importante destacar que con el aumento de los programas de erradicación exitosos en islas (Courchamp *et al.* 2003), en la actualidad el foco está puesto en los planes de manejo de especies plaga en hábitats continuos (Ji *et al.* 2000).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta útil y necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Si bien surgieron hace varias décadas, los marcadores genéticos como las alozimas, microsatélites y secuencias de ADN mitocondriales y nucleares son ampliamente utilizados en la actualidad para estimar muchos parámetros de interés para los ecólogos, como por ejemplo tasas de migración, tamaño poblacional, cuellos de botella y parentesco, identificación de híbridos entre especies, estructura poblacional, flujo génico, entre otras. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Eguiarte *et al.* 2007). En esta tesis doctoral se utilizan dos tipos de marcadores moleculares: ADN mitocondrial (ADNmt) y nuclear (ADNn), en particular: D-loop (ADNmt) y microsatélites (ADNn).

ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADNmt de vertebrados es una molécula circular, relativamente chica (16-20 kb de largo; Brown *et al.* 1979) y se encuentra formada por 37 genes que llevan la información para la síntesis de: 22 ARNs de transferencia (tARNs), 2 ARN ribosomales (rARNs) y 13 ARN mensajeros (mARNs) que codifican para proteínas involucradas en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, procesos que tienen lugar en la membrana mitocondrial (Jobling *et al.*

2004). La única región no codificante del ADNmt es la región control o D-loop (Page y Holmes 1998; Jobling *et al.* 2004), de aproximadamente 1 kb de largo y que se encuentra involucrada en el proceso de iniciación y transcripción del ADNmt y en procesos de regulación.

Las moléculas de mitocondrias son especialmente importantes para trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional estrechamente relacionada al linaje dado que: son de herencia uniparental (materna), no recombinan y poseen una tasa de evolución rápida (entre 1-10 veces mayor que cualquier copia simple de ADN nuclear; Brown *et al.* 1979). También nos permite inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Dirienzo y Wilson 1991). Dado que el genoma mitocondrial es transmitido sin recombinación y como una sola unidad, las secuencias de ADNmt usualmente se refieren a haplotipos y no a alelos.

La Región Control (D-loop) es la más utilizada en estudios de vertebrados dado que presenta una tasa de sustitución de nucleótidos alta y un grado importante de polimorfismo intraespecífico, constituyendo una herramienta ideal para estudios enfocados en patrones de variabilidad intraespecífica y relaciones filogenéticas entre especies muy cercanas. En el caso de los mamíferos, esta región oscila entre 880 a 1400 pb. (Sbisà *et al.* 1997). El D-loop será uno de los marcadores moleculares utilizados en esta tesis para estudiar la variabilidad genética y la estructura poblacional de las especies en estudio.

Microsatélites (ADNn)

Los microsatélites surgieron como una de las alternativas más populares para los estudios ecológicos ya que presentan un gran potencial para estimar las tasas de dispersión contemporáneas y porque pueden estimar la relación de parentesco entre individuos. Dado su elevado nivel de polimorfismo, su carácter de codominancia y su fácil manipulación, los microsatélites resultan muy útiles para definir un único genotipo *multilocus*, siendo de gran importancia en estudios con una escala muy fina de resolución (permiten estimar la estructura genética de la población aún cuando existe un alto flujo génico y la diferenciación entre las poblaciones es baja; Waples 1998) y en donde otros marcadores podrían presentar ciertas limitaciones (Selkoe y Toonen 2006). Al ser marcadores nucleares, aportan información sobre el flujo génico más reciente, a diferencia del ADNmt que aporta información sobre el flujo génico histórico.

Los microsatélites o secuencias simples repetidas son secuencias de ADN formadas de 1 a 5 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (T)n, dinucleótidos (AT)n, o tetranucleótidos (AAGG) que forman fragmentos de ADN que raramente superan los 200pb. Fueron detectados

en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para: estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos, definir unidades de manejo, estimar el tamaño poblacional efectivo, determinar el origen de la población o individuos, entre otros (Hedrick 2004; Foerster *et al.* 2006; Crawford *et al.* 2008). Es importante destacar que el análisis genético de las poblaciones naturales ha permitido a los biólogos hacerse una gran variedad de preguntas que anteriormente sólo podían ser respondidas por observaciones del grupo en cuestión.

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs y RAPDs debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) segregan de manera mendeliana y son codominantes; iii) se encuentran en grandes cantidades y están uniformemente espaciados a lo largo del genoma y iv) son selectivamente neutros (Eguiarte *et al.* 2007). Además, son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo. Presentan una alta tasa de mutación (1x10-3 a 1x10-6; Weber y Wong 1993), incluso más altas que las que se presentan en el ADN del cloroplasto (Provan *et al.* 1999). Por último, es importante destacar que previo a la utilización de microsatélites, estas secuencias repetitivas y sus secuencias flanqueantes, deben ser aislados del genoma y que cuando no se encuentran disponibles en la literatura, las mismas deben ser clonadas y aisladas y es un trabajo muy laborioso que no puede ser evitado.

CAPITULO 3

Área de estudio:

Archipiélago de Tierra del Fuego

Características generales

La Isla Grande de Tierra del Fuego se sitúa entre los 52º30´ y 56º de latitud Sur y 63º30´y 72º de longitud Oeste (Figura 1) y forma parte del archipiélago más austral de América, el Archipiélago Fueguino, conformado por gran número de islas dispersas entre los Océanos Atlántico y Pacífico, separado del resto del continente por el Estrecho de Magallanes. La Isla Grande de Tierra del Fuego es la más importante y es la única compartida por Argentina y Chile. Las islas Hoste, Navarino y Dawson en Chile e Isla de los Estados (Argentina) le siguen en tamaño.

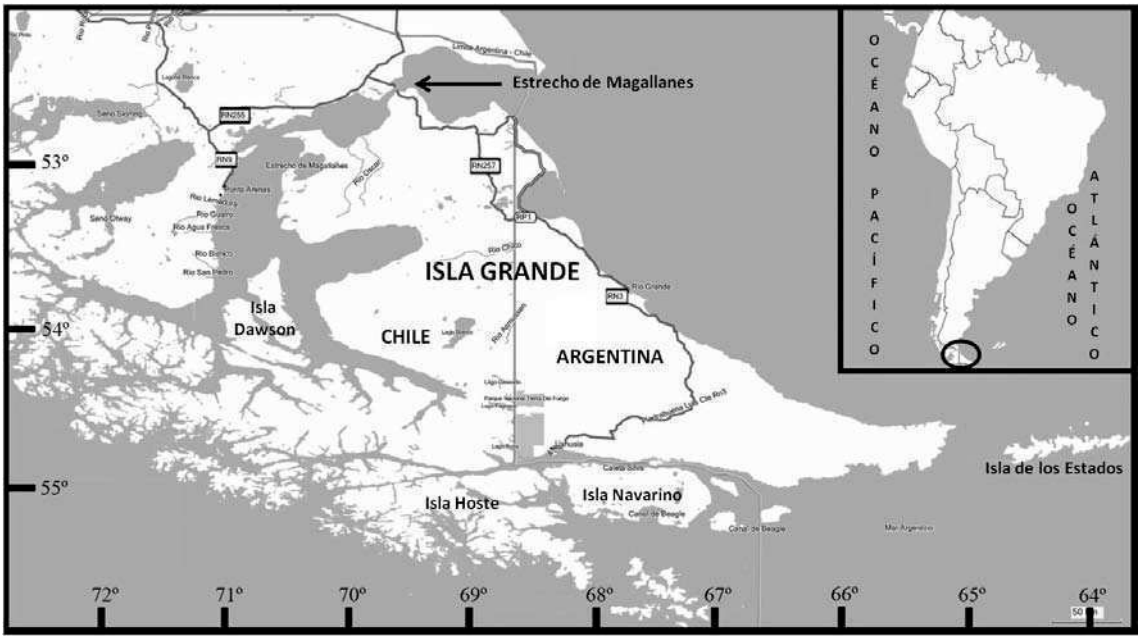

Figura 1. Ubicación geográfica del Archipiélago Fueguino incluyendo la Isla Grande de Tierra del Fuego (Argentina y Chile) e islas aledañas. Arriba a la derecha se destaca la ubicación de la zona ampliada.

El clima de la Isla Grande es templado-frío, con categoría de sub-húmedo en el Norte y oceánico en los bosques cordilleranos (Rabassa *et al.* 2000). Las temperaturas se encuadran dentro de los climas sin verano, siendo la media anual de 5,3º C. Enero se presenta como el mes más cálido con 9,3ºC y Julio como el mes más frío con 1,1ºC sobre cero; registrándose una mínima amplitud entre estaciones (Tuhkanen *et al.* 1989). La amplitud de las variaciones diarias, estacionales y de plazos mayores está atenuada por la magnitud de las masas oceánicas que rodean a Tierra del Fuego y el consiguiente efecto moderador por lo que no hay una continentalidad marcada (Bujalesky 2007). Uno de los rasgos más notables del régimen de temperaturas es la ausencia de condiciones veraniegas realmente cálidas, no habiendo temporadas templadas largas y continuas, sino series de días templados interrumpidos por

frío. Debido a la latitud, en la región existen grandes diferencias entre invierno y verano en cuanto a la cantidad de horas de luz: 7hs 10 minutos en el solsticio de invierno y 17hs 20 minutos en el de verano.

Todo el Archipiélago Fueguino está dominado por la corriente de vientos del Oeste, al igual que el resto de la Patagonia. Durante todo el año las condiciones del tiempo dependen de la circulación atmosférica proveniente de esa dirección, afectando tanto la distribución de las precipitaciones como el viento y la temperatura (Tuhkanen *et al.* 1989). Existe un gradiente de lluvias de Oeste a Este asociado a la disposición de la Cordillera de los Andes. El promedio anual de precipitaciones es de 550 mm para el área de Ushuaia con importantes nevadas al Sur del paralelo 54º (Rabassa *et al.* 2000).

La Cordillera de los Andes en el extremo Sur cambia su orientación Norte-Sur por la de Oeste-Este, atravesando Tierra del Fuego hasta la Isla de los Estados y diferenciando dos áreas con características propias: el **área andina** y la **extraandina** (Rabassa *et al.* 2000). El **área andina** presenta una fuerte acción glaciaria con grandes valles de descarga de dirección Oeste-Este, unas veces ocupados por el mar y otras por lagos o turbales. Las llanuras son onduladas, muy castigadas por el viento y cubiertas con una vegetación de arbustos y pastos. El **área extraandina** corresponde a la continuación de la meseta patagónica, en donde la topografía es producto de acumulaciones marinas del Terciario afectada por las acciones climáticas del Cuaternario (en particular las glaciaciones), que en su retroceso dejaron mantos de rodados y depósitos de arena y arcillas cubiertos por acumulaciones aluviales recientes. La cara Sur de Los Andes se introduce directamente en el Canal Beagle formando una costa muy recortada, con bosques espesos y con influencia del ambiente subantártico (Bujalesky 2007).

El sistema hidrográfico en la región andina se caracteriza por presentar cuencas de reducido tamaño con origen en las altas cumbres, producto de la fusión de hielo y nieve. Los cursos superiores son encajonados, de gran pendiente y de caudal variable dependiente del derretimiento de las nieves en primavera y de las precipitaciones (Ej. Lasifashaj, Moat, Lapataia, Olivia, Pipo, entre otros.) (Rabassa *et al.* 2000; Coronato *et al*. 2003). Los cursos medios a veces inexistentes e inferiores, están en su mayoría asociados a turbales y lagunas, siendo anchos y de escasa pendiente. Son abundantes los cursos cortos y torrenciales, muchos con desagüe directo al mar o al Lago Fagnano que es la principal cuenca colectora con 600 km^2 (Ej. Claro, Ewan, Mimica, entre otros; Coronato *et al.* 2003.). Los ríos extraandinos presentan en sus tramos superiores características cordilleranas, sin embargo estas cualidades desaparecen con rapidez de Sur a Norte y pasan a ser reemplazadas por un paisaje aterrazado,

presentando valles anchos de origen fluvioglaciar con escasa pendiente. Otro resultado importante de la glaciación fue la formación del Canal Beagle, el cual ocupa un valle excavado por un glaciar y conecta los océanos Atlántico y Pacífico. Dicho canal presenta una profundidad máxima de 450 m y su ancho promedio es de 5 km alcanzando su valor mínimo de 1,4 km en el denominado Paso Mackinlay entre las islas Gable y Navarino (Bujalesky *et al.* 2004).

El sector Argentino de la Isla Grande ocupa 22.000 de los 48.000 km^2 de su superficie total y se puede dividir en tres áreas ecológicas con características muy diferentes (Bondel 1988): El área boscosa cordillerana o el **Complejo andino fueguino**, la E**stepa magallánica fueguina** y un área de transición, el **Ecotono fueguino** (Figura 2; Lizarralde 1993). A continuación se describe cada una de las áreas.

Complejo andino fueguino

Incluye la región de serranías y valles glaciarios, integrados por las sierras de Valdivieso, Sorondo, Lucio López, Alvear, Beauvoir y Nogueras, modeladas por la acción glaciaria del Pleistoceno. Los valles de origen glaciario-glacifluvial, se distribuyen en todo el paisaje serrano, desembocando sobre el Canal Beagle, el Océano Pacífico y el Atlántico. Los principales cuerpos de agua dulce de Tierra del Fuego se encuentran en esta región, destacándose los lagos Yehuín, Chepelmut, Escondido y Fagnano (Coronato *et al.* 2003). La actividad ganadera principal es la bovina, que se realiza en las veranadas y en la costa del Canal Beagle, del Atlántico y del Lago Fagnano. La industria maderera es la principal actividad económica del área, a partir de la explotación de la lenga (*Nothofagus pumilio*) y en menor medida, del guindo (*Nothofagus betuloides*) (Ramírez Silva 2006).

Con respecto a los suelos, en las áreas donde el relieve y los sedimentos glaciales permiten un drenaje razonable, se forman podsoles y suelos castaños forestales ácidos. Gran parte de la región presenta substratos de rocas ígneas que se degradan lentamente y dan lugar a suelos someros, pobres en nutrientes, ácidos y saturados de agua. Estos suelos soportan vegetación de tundra o turbera, típica de esta zona (Rabassa *et al.* 2000). A mayores alturas, el congelamiento genera fracturas en las rocas y acumulaciones de materiales gruesos.

La Ecoregión de los Bosques Magallánicos Subantárticos es dominada sólo por tres especies de árboles del género *Nothofagus*: dos son deciduos (*N. pumilio* y *N. antartica*) y el restante es siempreverde o perenne (*N. betuloides*) (Pisano 1977; Anderson *et al.* 2008). Estas especies se encuentran en laderas y valles con praderas, semidesiertos de altura y desiertos de roca cubiertos de hielos eternos. El límite altitudinal desciende hasta los 600 mts a esta latitud. El

área incluye extensas áreas de turberas, lagunas y zonas bajas que acumulan materia orgánica no descompuesta de musgos. Estos turbales están compuestos principalmente por las especies *Donatia fascicularis* y *Sphagnum magellanicum* (Roig 2000). Es importante destacar que los bosques siempreverdes de guindos, están mucho mejor representados que en la Patagonia Continental.

Los ecosistemas ribereños y de humedales presentan una alta proporción de especies que sólo se hallan en estos lugares. Un tercio (33⁄) de las especies de plantas en estos tipos de ambientes son exclusivas de los ecosistemas de ribera y humedales (Lencinas 2005).

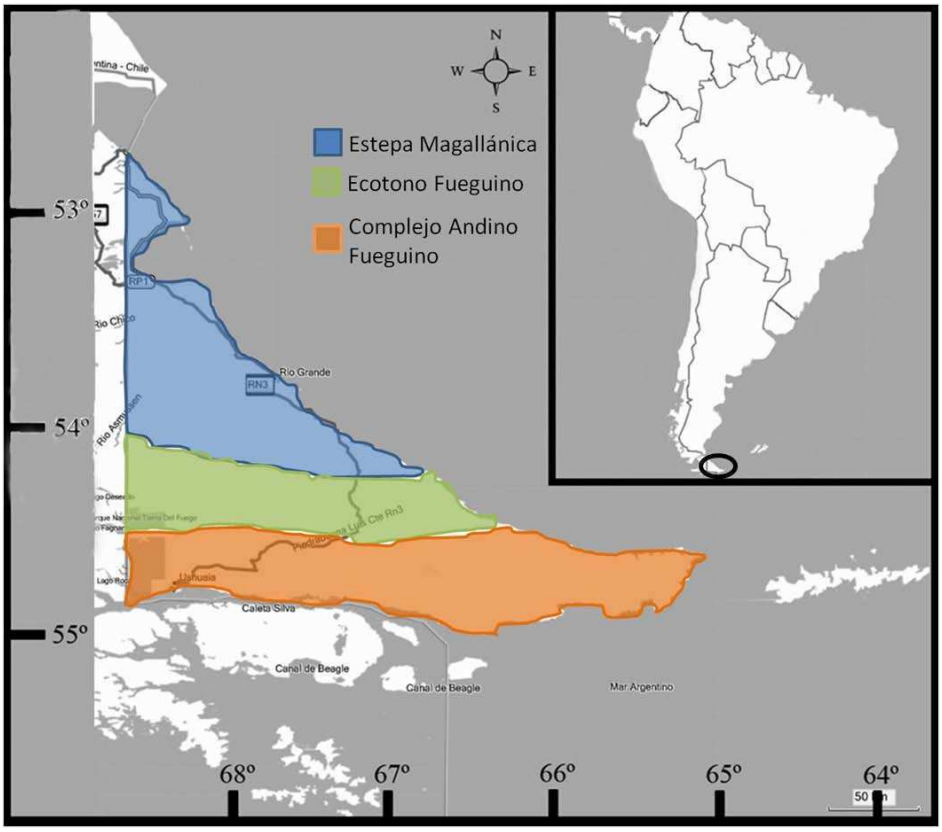

Figura 2. Ecorregiones de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Argentina. Arriba a la derecha se destaca la zona del mapa que fue ampliada.

Estepa magallánica fueguina

Esta unidad de vegetación que ocupa el Norte de Tierra del Fuego es equivalente a la Estepa magallánica húmeda en su porción continental. Fisonómicamente, es una estepa graminosa de coirón fueguino (*Festuca gracillima*) con áreas dominadas por mata fueguina (*Chilliotrichum diffusum*) y otras en las cuales existen arbustos rojizos rastreros de murtilla (*Empetrum rubrum*). El paisaje es ondulado, desarrollado sobre terrazas de origen glacial, planicies glacifluviales y morenas cuaternarias. También hay áreas planas sobre sustratos de mesetas

sedimentarias terciarias. Los mallines se desarrollan en forma dendrítica y ocupan un 5-10% de la superficie.

Collantes *et al.* (1989) estudiaron estos suelos y establecieron que las planicies fluvioglaciales, morenas y terrazas marinas están formadas por suelos oligotróficos ácidos (pH de 4 a 6) de origen cuaternario. Los paisajes terciarios dan lugar a suelos autróficos con pH >6. En una posición intermedia están los suelos mesotróficos desarrollados sobre morenas.

En cuanto a la vegetación, el coirón fueguino (*Festuca gracillima*) es dominante, con una cobertura de hasta el 70% , acompañado por numerosas gramíneas de diversos géneros, representando una cobertura total del 90% . En áreas muy impactadas por la hacienda, los coirones son reemplazados en forma total o en parches por praderas de pastos cortos dominados por *Poa pratensis*, una gramínea introducida que se beneficia con la compactación y la elevada fertilidad inducida por los animales (Posse *et al.* 2000). Las laderas de exposición sur y los suelos de menor compactación suelen estar dominados por matorrales de mata negra fueguina (*Chilliotrichum diffusum*) acompañada principalmente por calafate (*Berberis buxifolia*). Las vegas o mallines están dominadas por graminoides del género *Juncus* y *Carex* y gramíneas como *Poa pratensis*, mientras que los bajos están dominados por cola de zorro (*Hordeum publiflorum*) (Anderson *et al.* 2008).

Ecotono fueguino

Es una unidad ecológica que representa una transición entre la Estepa magallánica y el Complejo Andino. En la Isla de Tierra del Fuego se produce un ecosistema de transición muy particular, en forma de bosques aislados de ñire (*Nothofagus antartica*) que se alternan con áreas de estepa húmeda de coirón fueguino (*Festuca gracillima*) y extensos mallines o vegas de ciperáceas que en zonas más deprimidas dan lugar a turberas (Lizarralde 1993).

Los suelos desarrollados en paisajes con colinas son profundos (más de un metro), bien provistos de materia orgánica (6-12%) y en general están bien drenados. En los paisajes aterrazados de los ríos Ewan y Fuego, se encuentran suelos desarrollados sobre mantos de gravas fluviales con escaso desarrollo, mal drenados pero con buena provisión de materia orgánica (12%), con una profundidad de 35 cm, mientras que los suelos de los mallines son profundos, de naturaleza turbosa, muy bien provistos de materia orgánica (36%), ácidos y con baja saturación de bases (Collantes *et al.* 1989; Coronato *et al.* 2003).

Los bosques están dominados por ñire, una especie que tiene plasticidad suficiente para ocupar desde el límite árido del bosque hasta áreas de vega inundadas y turbales, ambientes que la lenga y el guindo no pueden colonizar (Lizarralde *et al.* 1996). Los árboles raramente superan los 6 m de altura y tienen troncos retorcidos y ramosos (Pisano 1977). Muchas especies de porte arbustivo están asociadas a este sistema, entre ellas el calafate (*Berberis buxifolia*), la mata negra fueguina (*Chiliotrichum diffusum*) y la parrilla (*Ribes magellanicum*) (Anderson *et al.* 2008). Estos bosques abiertos dan lugar a un estrato herbáceo de gran importancia forrajera, compuesta principalmente por gramíneas. En las áreas con napa freática cercana a la superficie se desarrollan vegas que en apariencia son similares a las de la estepa, pero que están dominadas por especies del género *Carex.*

Areas de Conservación en el Archipiélago Fueguino

Debido a las características únicas y prístinas de la región, el Archipiélago Fueguino cuenta con numerosas áreas protegidas cuyo principal objetivo es conservar la biodiversidad y el ecosistema fueguino. El 33,3% de las 7.375.300 ha. de superficie total se encuentra bajo algún sistema de protección. En el sector argentino existen un total de 13 áreas protegidas o de reserva que abarcan un 31,6% del área total (un Parque Nacional, dos Reservas Naturales, dos Reservas Provinciales, dos Sitios Ramsar, dos Áreas Naturales, una Reserva Recreativa, un Refugio Privado y dos Reservas de Usos Múltiples), mientras que en Chile hay 6 áreas protegidas representando un 33,9% de la superficie total (dos Parques Nacionales, un Parque Etnobotánico, dos Monumentos Naturales y un Parque Natural Privado) (Valenzuela 2011). A pesar del gran porcentaje de áreas protegidas presentes en la zona, en muchos casos la falta de planes de manejo, personal e infraestructura adecuados provocan que la biodiversidad protegida sufra amenazas tanto globales como locales, como el cambio climático, las especies invasoras y el desarrollo económico, incluyendo al turismo (Anderson *et al.* 2009).

Fauna

Si bien en el Archipiélago existen numerosas especies de animales, nos centraremos en los vertebrados y principalmente en los mamíferos terrestres. El ensamble de vertebrados que se halla en los ecosistemas terrestres y dulceacuícolas del archipiélago incluye aves, mamíferos, peces y una especie de lagartija (*Liolaemus magellanicus*) que se encuentra sólo en la Isla Grande (Parera 2002). No se encuentran anfibios en el Archipiélago.

Las aves son las más abundantes y diversas de estos grupos de vertebrados. La avifauna muestra una riqueza característica en las orillas de los arroyos y humedales que es similar a la de los bosques de las tierras altas adyacentes. Las aves más comúnmente observadas en la zona ribereña y humedales (*Aphrastura spinicauda* y *Carduelis barbata*) son también especies comunes en los bosques adyacentes (Lencinas 2005). Los peces de agua dulce son un grupo relativamente pobre en especies, constituido por ocho taxa nativos y tres especies de truchas exóticas (Moorman 2007).

El ensamble de mamíferos del archipiélago comprende sólo 13 especies nativas y 20 especies introducidas deliberadamente por el hombre (desde el continente o de otras partes del mundo) (Anderson *et al.* 2008), representando poco más del 60% de especies introducidas (Tabla 1). Es importante destacar que el número de especies introducidas fue teniendo en cuenta las especies domesticadas como por ejemplo los caballos, ganado bovino y ovino, pero eliminando a las más de 30 especies de mamíferos marinos.

Entre los mamíferos más característicos del territorio fueguino se destaca el zorro colorado, con una subespecie endémica de las islas del Atlántico Sur: el zorro colorado fueguino (*Pseudalopex culpaeus lycoides*). Este carnívoro es uno de los más grandes de los cánidos de Sudamérica, superado en tamaño únicamente por el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en el norte argentino. Su color rojizo ventral es característico y lo diferencia de su pariente cercano, el zorro gris (*Pseudalopex griseaus*), introducido en la isla por el hombre. Este último es mucho más pequeño, de casi la mitad de tamaño que el autóctono (Massoia y Chébez 1993).

Tabla 1. Listado de las especies de mamíferos en Tierra del Fuego (Argentina). Se detallan las especies nativas y las introducidas con su fecha de introducción.

ORDEN	ESPECIES NATIVAS	ESPECIES EXÓTICAS	FECHA DE INTRODUCCIÓN
Artiodactyla	Guanaco (*Lama guanicoe*)	Reno (*Rangifer tarandus*)	1911/1925/1948
		Ciervo colorado (*Cervus elaphus*)	1973
		Ganado vacuno asivelstrado	siglo XIX
		Ganado ovino asilvestrado	siglo XIX
		Ganado caprino asilvestrado	1856
		Llama	1991
Carnivora	Huillín (*Lontra provocax*)	Visón (*Mustela vison*)	1940
	Zorro colorado fueguino (*Pseudalopex culpaeus*)	Zorro gris (*Pseudalopex griseus*)	1950
	Nutria de mar (*Lontra felina*)	Zorro plateado (especie de criadero)	1948
		Zorro azul (especie de criadero)	1995
		Perro doméstico asilvestrado	siglo XIX
		Gato doméstico asilvestrado	siglo XIX
Quiroptera	Murciélago orejudo (*Histiotus montanus*)		
	Murciélago pardo austral (*Myotis chiloensis*)		
Lagomorpha		Conejo (*Orytolagus cuniculus*)	1936
Rodentia	Colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*)	Castor (*Castor canadensis*)	1946
	Coipo (*Myocastor coypus*)	Rata almizclera (*Ondatra zibethica*)	1946
	Ratón de pelo largo (*Abrothrix longipilis*)	Rata negra (*Rattus rattus*)	siglo XVIII
	Ratón del Cabo (*Akodon hershkovitzi*)	Rata parda (*Rattus norvegicus*)	siglo XVIII
	Ratón de hocico amarillo (*Abrothrix xanthorrinus*)	Ratón doméstico (*Mus musculus*)	siglo XVIII
	Ratón chinchilla (*Euneomys chinchilloides*)		
	Tuco tuco (*Ctenomys magellanicus*)		
Perisodactyla		Caballo doméstico asilvestrado	siglo XIX
Xenarthra		Armadillo (*Chaetophractus villosus*)	estimado en la década del 90
TOTAL	**13 especies nativas (39,3⁄)**	**20 especies exóticas (60,7⁄)**	

Otro carnívoro propio del lugar, aunque su presencia requiere confirmación, es un pequeño lobito llamado chungungo (*Lontra felina*), la especie más pequeña del género *Lontra* (Massoia

y Chébez 1993). Este lobito o gato de mar, convive en la zona con su pariente cercano, el huillín (*Lontra provocax*), más abundante en otros sectores del bosque subantártico pero de presencia confirmada (al menos en el Parque Nacional Tierra del Fuego). El mayor de los mamíferos del archipiélago es el guanaco (*Lama guanicoe*). Su pelaje es largo y grueso, de color ocre o amarillento, y su altura hasta la cruz es de alrededor de 1.10 m (Massoia y Chébez 1993). Es una especie típica de los ambientes abiertos, pero en Tierra del Fuego suele penetrar en los bosques, y en el verano asciende hasta los 600 m de altura en la zona más ondulada de la región. Otro mamífero endémico es el tuco fueguino o magallánico *Ctenomys magellanicus*, que se distribuye en el extremo Sur de Sudamérica, incluyendo Sur de Chile y Argentina y es la única especie del grupo *Ctenomys* presente en la Isla Grande de Tierra del Fuego (TDF) (Lizarralde *et al*. 2001) (Ver Capítulo 3). Dada la baja proporción de especies nativas, es fundamental su conservación.

Por último, las especies de fauna introducidas son, entre otras, el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), el visón norteamericano (*Mustela vison*), el zorro gris (*Pseudalopex grisaeus*), el castor canadiense (*Castor canadensis*) y, hace unos 30 años aproximadamente, se detectó la presencia de armadillos (*Chaetophractus villosus*) en la Isla Grande (Lizarralde y Escobar 2000; Poljak *et al*. 2007). Las especies exóticas pueden perjudicar a las especies nativas y a los ecosistemas de numerosas maneras, muchas veces de forma irreversible, produciendo grandes pérdidas económicas, ya sea por afectar las actividades económicas directamente o por la necesidad de asignar recursos para la aplicación de medidas para revertir sus efectos (Pimentel *et al.* 2000). La introducción del castor en el Archipiélago de Tierra del Fuego afectó dramáticamente al ecosistema sub-antártico, produciendo cambios irreversibles en la estructura y función de las comunidades biológicas (Lizarralde *et al.* 1996, 2004). Es considerado un ingeniero ecosistémico, ya que altera el estado de factores bióticos y abióticos, mediante alteraciones no tróficas, modificando sustancialmente los ecosistemas que habita (Naiman *et al.* 1981;Lizarralde 1993; Busher 1996; Müller-Schwarze y Sun 2003, entre otros).

CAPÍTULO 4

La especie endémica:

Ctenomys magellanicus

INTRODUCCIÓN

Aspectos biológicos del Género *Ctenomys*

El Género *Ctenomys* se distribuye en todo el cono sur de Sudamérica (Reig *et al.* 1990) constituyendo el grupo más especiado de todos los roedores subterráneos (Reig *et al*. 1990; Lessa 2000; Mirol *et al.* 2010). El género apareció durante el Mioceno tardío o Plioceno temprano (Reig *et al.* 1990; Verzi 2002) y se diversificó en 62 especies vivientes, representando de esta forma el 45⁄ de todas las especies de roedores subterráneos (Mirol *et al.* 2010). *Ctenomys* se encuentra distribuido desde el sur de Bolivia y Perú hasta Tierra del Fuego (Argentina-Chile) y se extiende altitudinalmente desde el nivel del mar hasta más de 4000 m.s.n.m. en los Andes Peruanos (Reig *et al*. 1990; Novak 1999; Mirol *et al.* 2010). Su extraordinaria tasa de divergencia ha sido atribuida al efecto combinado de varios factores: (a) distribución en parches y aislamiento espacial; (b) movilidad restringida; (c) territorialidad; (d) tamaño efectivo poblacional pequeño; (e) sistema de apareamiento estructurado y (f) un cariotipo poco estable que determina una gran variación cromosómica.

Estos roedores muestran convergencia adaptativa por la vida subterránea (Nevo 1979) son típicamente herbívoros, presentan baja movilidad, y pasan la mayor parte de su vida en sus cuevas abandonándolas por periodos muy cortos aunque sin alejarse mucho de ellas, lo que les provee de una eficaz estrategia anti-predatoria. Pasan la mayor parte de sus vidas bajo la superficie de la tierra, en sistemas de túneles (Novak 1999) que pueden ser construidos por uno o varios individuos (Lacey *et al.* 1998; Lacey 2000). La estructura de estos sistemas consiste de una galería principal con varias ramificaciones, que pueden terminar en aberturas o en fondos ciegos. Los túneles se encuentran cerrados, proporcionando no sólo protección contra los depredadores, sino también condiciones más estables que las del medio externo: menor fluctuación de temperatura y alto grado de humedad relativa, entre otros (McNab 1966; Cutrera y Antinuchi 2004). Si bien el tipo de vida subterránea, permitiría a estos roedores colonizar gran diversidad de hábitats, la mayoría de las especies del género muestran una alta especificidad de hábitat (dado los altos costos de sus actividades excavatorias) (Contreras 1973; Busch *et al.* 2000) restringiéndose a suelos bien drenados, arenosos y poco compactos (Antinucci *et al.* 2007), presentando fuertes restricciones en la ocupación de hábitat asociadas al grado de cobertura vegetal.

Se alimentan especialmente de gramíneas (raíces, tallos y hojas), son generalistas en la mayoría de los casos y como realizan numerosas cuevas, tienen una gran influencia sobre las comunidades de plantas de las regiones que habitan (Altuna *et al.* 1999; Busch *et al.* 2000). Otras características son su marcada territorialidad, baja dispersión de los individuos (Busch *et al*. 2000), la distribución en parches de poblaciones locales y extensiva variación cariotípica, con números diploides que varían entre 10 a 70 cromosomas (Mirol *et al.* 2010). Si bien poseen gran similitud morfológica, presentan gran diversidad en cuanto a tamaños corporales, desde 100 gr. en *C. pundti* a 1000 gr. de peso corporal en *C. conoveri* (Reig *et al*. 1990). Debido a sus hábitos subterráneos, existe escasa información en cuanto al comportamiento. Las especies de *Ctenomys* son principalmente solitarias, aunque existen al menos tres especies donde se han reportado cuevas compartidas entre adultos, y al menos en un caso, *C. sociabilis*, la presencia de un sistema social complejo (Lacey *et al*. 1997; Lacey 2000). Es común que los territorios defendidos por los machos se encuentren parcialmente solapados en sus áreas de acción con más de una hembra (Mora *et al.* 2007). En este sentido, el avance en el uso de marcadores moleculares en especies subterráneas, de hábitos nocturnos o difíciles de estudiar ha facilitado el estudio comportamental de dichas especies (Mapelli 2010; Mora 2008).

Los tucos presentan limitadas capacidades dispersivas (Busch *et al.* 2000); todas sus especies se encuentran comúnmente agrupadas en pequeños *demes* poblacionales con poca variación genética y alta divergencia interpoblacional (Fernández-Stolz 2007; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Wlasiuk *et al.* 2003; Kittlein y Gaggiotti 2008; Mora 2008). Generalmente, las poblaciones tienen bajos tamaños efectivos y presentan una marcada estructuración espacial (Busch *et al.* 2000; Lacey 2000; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Fernández-Stolz 2007; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Mora *et al.* 2007, 2010) y en general, las restricciones en el uso del hábitat determinan distribuciones discontinuas (Mora *et al.* 2006, 2007). En consecuencia, es probable que los patrones de estructuración poblacional en roedores subterráneos sean principalmente determinados por diferenciación local bajo flujo génico limitado (El Jundi y Freitas 2004; Opazo *et al.* 2008).

Aspectos generales de *Ctenomys magellanicus*

El tuco fueguino o magallánico *Ctenomys magellanicus*, se distribuye en el extremo Sur de Sudamérica, incluyendo Sur de Chile y Argentina y es la única especie del grupo *Ctenomys* presente en la Isla Grande de Tierra del Fuego (TDF) (Lizarralde *et al*. 2001; Bidau *et al.* 2008). En la Figura 6 se detalla en color rojo la distribución de *C. magellanicus* según Bidau *et al.* (2008) y en azul la obtenida a través de las campañas realizadas para esta tesis, ampliando

hacia el sur la distribución de la especie para Tierra del Fuego (Argentina). En Argentina, la especie se distribuye al Norte del Lago Fagnano hasta 20 km al norte de la localidad de San Sebastián (Fasanella *et al.* inédito).

Figura 3. Tuqueras observadas en la Población con cariotipo 2n=36. Izq: Tuqueras a la vera de la Ruta B; Der: Tuqueras en un ambiente más ecotonal.

Al igual que todas las especies del género, *C. magellanicus* es una especie cavícola que habita principalmente suelos arenosos aunque en Tierra del Fuego (Argentina) se han encontrado cuevas en suelos húmedos dentro de pequeños bosques (zona ecotonal, observación personal; Figura 3). La profundidad de los túneles, depende del tipo de suelo (*i.e.* en suelos con mucha piedra y arena, las cuevas son poco profundas, mientras que en suelos más blandos y húmedos, las cuevas son más profundas y descienden abruptamente, observación personal). Las cuevas son fácilmente reconocibles por las remociones de suelo que aparecen en las bocas de las mismas como resultado de la excavación producida por estos animales. Estas remociones aparecen como "pequeños montículos" de aprox. 40 cm de diámetro que son claramente visibles en la época de primavera-verano donde contrastan con el color verde amarillento del suelo (Figura 4). De hábitos crepusculares, sólo sale de sus cuevas para alimentarse pero sin alejarse mucho de ellas. Su alimentación es herbívora ramoneando principalmente la vegetación que rodea a las cuevas (pastos y pequeños arbustos) (Álvarez y Lizarralde 1998). De aspecto compacto, en la cabeza se destacan dos incisivos de color anaranjado y sus ojos y orejas son pequeños. La coloración es en la parte dorsal gris-amarronada aclarándose en la zona ventral (Figura 5). En cuanto al largo y peso varía dependiendo del sexo, siendo siempre los machos de mayor tamaño (≈350 gr y ≈30 cm) que las hembras (≈250 gr y ≈28 cm) (Álvarez y Lizarralde 1998).

Figura 4. Cuevas activas detectadas en la zona. Se destaca la presencia de tierra fresca removida recientemente y las huellas de los individuos cerca de la entrada a la cueva (Der.).

Figura 5. Ejemplares de *Ctenomys magellanicus* de Tierra del Fuego.

Al igual que la mayoría de las especies del género, C*tenomys magellanicus* es una especie cromosómicamente politípica, que se encuentra subdividida en aislados o *demes* (Reig *et al.* 1990; Lizarralde *et al.* 2001), cuya distribución coincide con dos zonas biogeográficas: la

provincia Patagónica en el Norte (2n=34) y la Sub-antártica en el Sur de TDF (2n=36). Entre ambas zonas biogeográficas, hasta el momento no se han encontrado híbridos (Lizarralde *et al.* 2003) ni evidencias de migración, lo que sugiere la ausencia de flujo génico (Álvarez y Lizarralde 1998). A partir de este punto, la zona que se extiende al norte del Río Grande que presentan individuos con 34 mismo río que presentan individuos con 36 cromosomas será denominada REGION SUR. La REGION NORTE presenta una distribución de tuqueras más homogénea y más continua que la REGION SUR en donde se observan numerosos parches o *demes* de cuevas en toda la distribución (Lizarralde *et al.* 2001). Ambas zonas se encuentran separadas por el Río Grande y entre ellas hay unos 40 km en donde no se observan rastros de tuqueras recientes o antiguas, lo cual indicaría que la especie no estaría presente en dicha área (Fasanella obs. pers.).

Los primeros ejemplares de *Ctenomys* con 36 cromosomas fueron descriptos por Reig y Kiblisky (1968), provenientes de la localidad de Río Grande, mientras que el cariotipo con 34 cromosomas fue descripto por Gallardo (1979) en ejemplares provenientes del Norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego, en el sector chileno. Si bien ambos cariotipos presentan el mismo número fundamental (NF=68), se diferencian por reordenamientos estructurales, lo que permite inferir que representaría un caso activo de especiación cromosómica característica de *Ctenomys* (Lizarralde *et al.* 2001). Gallardo (1979) menciona como mecanismo más probable para explicar la aparición de los dos pares telocéntricos en el cariotipo 2n=36, un proceso robertsoniano. A su vez, Lizarralde *et al.* (2003) concluye en su trabajo que la forma cromosómica 2n=36 derivaría de la forma 2n=34 debido a un evento de fisión.

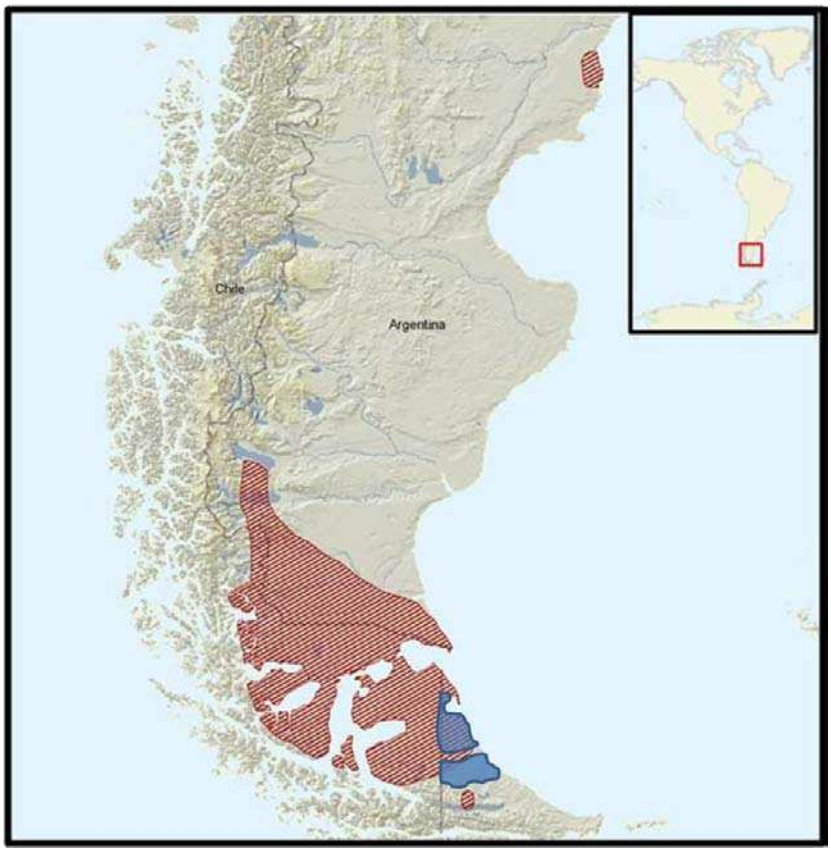

Figura 6. Distribución de *Ctenomys magellanicus* en Sudamérica. En rayado y en rojo se muestra la distribución según Bidau *et al.* (2008) y en azul la distribución para la Isla Grande de Tierra del Fuego (Argentina) obtenida a través de las campañas para esta tesis. Arriba a la derecha se destaca la zona del mapa que fue ampliada.

En cuanto al estado poblacional de *Ctenomys magellanicus*, informes históricos indican que los *tucos* "eran" una especie abundante y el principal alimento de los nativos de la zona norte de la Isla Grande (Selk´nam u Onas) antes de la introducción del ganado (Gusinde 1982; Jaksic y Castro 2010). Es importante destacar que los cambios en la estructura de la vegetación y condiciones del suelo producidos por factores antrópicos durante aprox. los últimos 100 años en TDF (entre otros introducción del ganado ovino/bovino, creación de caminos, modificación de la vegetación y el suelo; Figura 7), podrían haber contribuido a la discontinuidad y fragmentación del paisaje utilizado por *C. magellanicus* (Lizarralde *et al.* 2001). Si bien no existen estudios anteriores sobre el efecto de la fragmentación del paisaje en *Ctenomys magellanicus*, es evidente que la presencia del ganado hizo que la especie se distribuya entre los alambrados de los campos y las rutas, restringiendo de esta manera su hábitat (Figura 8). Si bien en el año 1996 la especie estaba categorizada como en riesgo menor/menor preocupación, en el año 2000 tanto la UICN como la SAREM en su Libro Rojo de Mamíferos de Argentina la subieron a la categoría Vulnerable (Lizarralde 2000; Bidau *et al.* 2008).

Figura 7. Fragmentación del paisaje, presencia de ganado bovino y ovino en campos de Tierra del Fuego, Argentina.

La fragmentación de hábitat es la alteración ambiental producida por el hombre, asociada frecuentemente a declinación poblacional e incremento del riesgo de extinción de especies, por lo tanto es considerada como una de las mayores amenazas para la pérdida de biodiversidad (Opdam *et al.* 1993; Laurance y Bierregaard 1997). No sólo reduce la superficie total de hábitat, sino que modifica la conectividad entre fragmentos, generando paisajes heterogéneos y limitando el movimiento de individuos y genes (Taylor *et al.* 1993). No obstante, muchas especies parecen ser capaces de sobrevivir en ambientes fragmentados mediante el establecimiento de sistemas metapoblacionales, con poblaciones locales restringidas a un simple parche de hábitat pero conectadas en diferente grado por migración (Hanski 1999).

Figura 8. Tuqueras observadas en la Zona de San Sebastián, Población con cariotipo 2n=34. Izq: Tuqueras observadas al costado de la Ruta Nacional N°3; Der: Tuqueras ubicadas entre el camino y el alambrado, del otro lado del alambrado se destaca la presencia de ganado.

Cuando las poblaciones quedan fragmentadas y la migración entre subpoblaciones disminuye o es eliminada, hay un consecuente incremento en la endogamia y la pérdida de variación genética y potencial evolutivo (Frankham *et al.* 1999; Hurston *et al*. 2009), que conjuntamente con la estocasticidad ambiental y demográfica, pueden tener serios efectos negativos en la viabilidad a largo plazo de las poblaciones locales, y por extensión, de la metapoblación en su conjunto (Sherwin y Moritz 2000; Coulon *et al* 2004). Los estudios de diferenciación genética en paisajes fragmentados pueden identificar apropiadas unidades de manejo y determinar unidades genéticas independientes (Shaffer *et al.* 2000; Cegelski *et al.* 2003). En consecuencia, el estudio de la estructura poblacional en ambientes fragmentados se ha vuelto prioritario en investigaciones de genética ecológica y biología de la conservación.

El flujo génico en las poblaciones fragmentadas de animales es el resultado de dos procesos. A) TRANSFERENCIA denota el proceso por el cual los individuos emigran desde su parche natal o *deme*, dispersan a lo largo de áreas inhabitables, y finalmente se asientan permanentemente en otro parche o *deme* (Ims y Yoccoz 1997) y B) La DISPERSIÓN DE GAMETAS es el resultado del movimiento por corto tiempo de los individuos apareándose fuera de su parche natal y luego retornando al mismo. Es importante destacar que los migrantes que no se reproducen en dicha población, no contribuyen al flujo génico.

Aars e Ims (1999) encontraron que la frecuencia observada de los heterocigotas en los *demes* que están conectados por corredores excede la frecuencia esperada basada en el patrón de transferencia. Otros autores (Foltz y Hoogland 1983; Chesser 1991) también encontraron un exceso de heterocigotas en grupos endogámicos de poblaciones naturales y espacialmente subdivididas de pequeños mamíferos. Se ha propuesto que este tipo de disenso (el llamado *efecto wahlund*, Wahlund 1928) entre la demografía y la genética de *demes* locales puede ser debido a la dispersión de gametas. El efecto wahlund es el resultado del apareamiento no aleatorio en donde las poblaciones individuales (o *demes*) pueden estar en equilibrio pero las frecuencias genotípicas de la población en su conjunto no corresponderán a las frecuencias esperadas para equilibrio de Hardy-Weinberg en una población uniforme (Eguiarte *et al.* 2007). Como resultado de esto, las frecuencias observadas de la población mostrarán un exceso de homocigotas y menos heterocigotas que lo esperado o *viceversa*.

El estudio de los patrones y procesos de flujo génico es crucial, no sólo en función de brindar conocimiento sobre la ecología y dinámica poblacional de las especies, sino también para el manejo apropiado de la diversidad genética de poblaciones amenazadas o en peligro (Manel *et al.* 2003, 2005). En este sentido, los roedores subterráneos como los *Ctenomys*, presentan un

conjunto de características ecológicas realmente interesantes como modelos de estudios evolutivos y de diferenciación poblacional: 1) representan una de las más recientes invasiones al nicho subterráneo, 2) sus poblaciones se distribuyen en parches, que en general presentan un alto grado de aislamiento (Nevo 1979; Reig *et al.* 1990) y 3) presentan capacidades dispersivas limitadas (Patton y Smith 1990).

Si bien la variabilidad genética ha sido ampliamente reconocida como un componente clave de las poblaciones y la conservación genética, se conoce muy poco sobre la propia estructura genética de *Ctenomys magellanicus*. Existe poca información sobre los patrones y modalidad de dispersión en este grupo, principalmente a causa de las dificultades asociadas a la cuantificación directa de la migración en estudios de campo (Busch *et al.* 2000). En gran medida el uso de aproximaciones indirectas basadas en marcadores genéticos hipervariables (*e.g.* microsatélites) ayuda a superar estas dificultades, brindando nuevas oportunidades de tener cuantificaciones confiables de las tasas de dispersión en roedores subterráneos.

Los objetivos de este capítulo son: 1) Cuantificar los niveles de variación genética intra e interpoblacional y 2) caracterizar la estructura genético-espacial entre regiones y dentro de cada región de *Ctenomys magellanicus* en Tierra del Fuego (Argentina).

Los objetivos específicos son: 1) Cuantificar la variabilidad genética de la población endémica de tuco-tuco de TDF combinando análisis de secuencias de D-loop (ADN mitocondrial) y microsatélites (ADN nuclear) y 2) Caracterizar la estructura genético-espacial determinando el flujo génico entre y dentro de las regiones de *Ctenomys magellanicus*. Para ello, la hipótesis es que *C. magellanicus* (ambas formas cromosómicas) está estructurada genéticamente. Por todo lo explicado anteriormente, las predicciones son: 1) la variabilidad genética *Ctenomys* será baja, al igual que en la mayoría de las especies del Género, 2) el flujo génico entre ambas regiones (REGION NORTE y REGION SUR) será nulo o muy bajo, ya que se encuentran separadas por el Río Grande (barrera a la dispersión) y 3) la REGION NORTE presentará mayor flujo génico que la REGION SUR.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio y captura de individuos

La distribución de *C. magellanicus* se divide en 2 áreas geográficas: (1) la zona de estepa de la Isla Grande de Tierra del Fuego (Argentina) correspondiente a la forma 2n=34, REGION NORTE y (2) la zona ecotonal correspondiente a la forma cromosómica 2n=36, REGION SUR. Si bien las características ambientales de ambas áreas fueron reportadas previamente (Lizarralde *et al.* 2001) (Ver Capítulo 2) brevemente, la REGION NORTE se encuentra en la estepa, donde los suelos son más secos y la vegetación dominante son los coirones y algunas especies de arbustos mientras que la REGION SUR se encuentra en el ecotono donde el suelo es un poco más húmedo y se encuentran tuqueras en zonas de bosque. En la REGION NORTE se observó que las tuqueras se encuentran dispuestas más homogéneamente, mientras que en la REGION SUR las tuqueras se encuentran espaciadas en parches.

El muestreo se realizó desde el sur de la localidad de Tolhuin (54°33´13,02” S; 67°13´58,52” O) hasta 20 km al norte de la localidad de San Sebastián (52°54´9,25” S; 68°24´10,22” O), abarcando toda la distribución de la especie en TDF (Argentina) (Figura 9). Como se mencionó en la introducción de este Capítulo, ambas regiones se encuentran separadas entre sí por el Río Grande, habiendo más de 40 km en línea recta entre ellas. Dentro de cada región (REGION NORTE y REGION SUR) se determinaron *a priori* 6 subpoblaciones (2 para la REGION NORTE y 4 para la REGION SUR). Los individuos fueron agrupados en subpoblaciones según la distancia entre los individuos capturados, es decir, si la distancia entre individuos era menor a 10 km, se consideraba a esos individuos pertenecientes a una misma subpoblación (Ver Figura 9). Es importante destacar que el menor número de subpoblaciones en la REGION NORTE también está asociado a que dicha población es más homogénea en cuanto a la distribución de las cuevas que la REGION SUR.

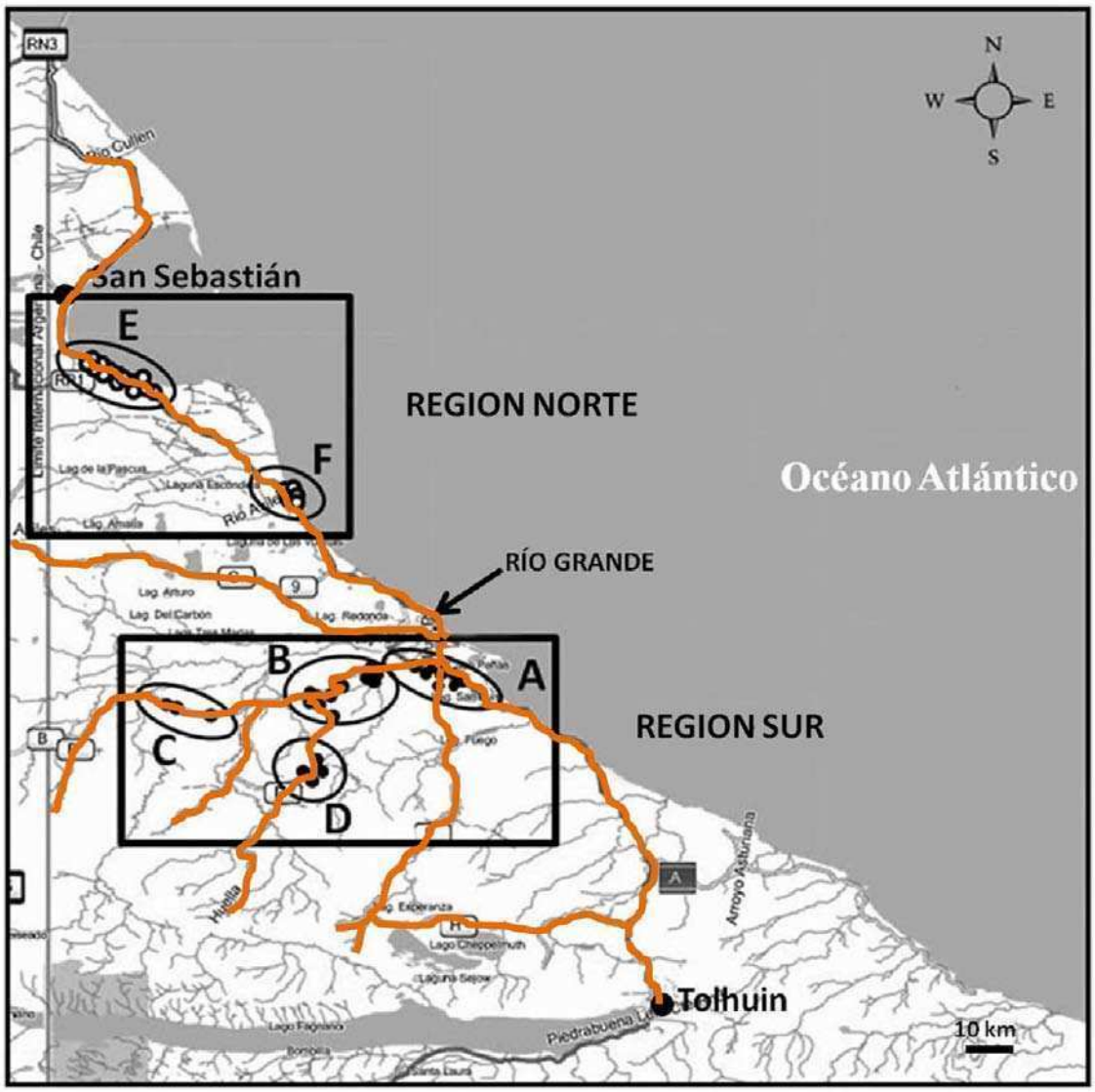

Figura 9. Distribución geográfica de las muestras de *Ctenomys magellanicus* a lo largo del área de estudio. Los rectángulos sobre el mapa indican cada una de las regiones: hacia el Norte se ubica la REGION NORTE (individuos con número cromosómico 2n=34) y hacia el Sur la de número cromosómico 2n=36 (REGION SUR). A su vez, cada región se dividió en subpoblaciones (subpoblaciones E y F para la REGION NORTE y subpoblaciones A, B, C y D para la REGION SUR). Se muestran las localidades de Tolhuin y San Sebastián y el Río Grande. En naranja se detallan las rutas recorridas durante las campañas.

Se realizaron 3 campañas (octubre y diciembre 2009 y febrero 2010) en el norte de la Isla Grande, desde Tolhuin hasta 20 km al norte de San Sebastián, recorriendo un total de 1500 km de rutas para actualizar la distribución de *C. magellanicus* (Figura 9). Se relevaron ambos lados de las rutas para determinar la actividad de tucos, reconocida por la remoción fresca de tierra en las bocas de las cuevas. En los sitios de alta probabilidad de actividad, se relevó caminando

desde el borde de la ruta hasta los alambrados de las estancias, y tomando nota del tipo de actividad (reciente, antigua o sin actividad). En particular, en la zona de San Sebastián, se relevó también dentro de los campos, desde el alambrado hasta 100 metros hacia adentro ya que la mayoría no presentaba ganado al momento del relevamiento. Esto permitió actualizar la distribución del tuco-tuco magellánico en Tierra del Fuego, Argentina. Es importante destacar que tanto la subpoblación F como la D fueron detectadas en las campañas realizadas para esta tesis y que no se encontraban presentes en la década de los ´90.

Luego de localizar los lugares con actividad o aquellos dudosos, se realizaron los trampeos, que diferían según el tipo de trampa utilizada (cepos o tubos de pvc). En la 1er. campaña, los 2 primeros días se utilizaron los tubos de pvc, pero no resultaron eficientes, ya que los animales entraban en la trampa, pero podían salir antes del cierre de la misma. Por esa razón, se decidió utilizar trampas de captura viva Oneida Victor N°0 (Oneida Victor, Inc., Ltd., Eastlake, Ohio, USA) recubiertas con goma para proteger las patas del animal al quedar atrapado o tratar de escapar (Figura 10). La experiencia propia y de otros autores indica que este procedimiento no afecta la supervivencia ni la actividad excavatoria de los individuos (Zenuto y Busch 1998; Mora *et al.* 2006). Antes de colocar las trampas, se recorría el área en busca de las cuevas más activas, que se detectaban muy fácilmente debido a la presencia de tierra fresca y/o de huellas en los alrededores (Figura 4). Las trampas fueron colocadas removiendo la tierra fresca que tapaba la boca, y ubicándolas manualmente en el túnel dentro de la cueva (Figura 10). Las trampas, se revisaron cada 2 horas; cuando un animal era capturado, se lo sacaba suavemente de la cueva para no lastimarlo y se le tomaba una pequeña muestra del extremo distal de la cola, que se colocaba en un tubo con alcohol 96⁄ para posteriores análisis genéticos (Figura 11). Además, se tomaron fotografías del animal y cuando fue posible se definió el sexo del mismo. Este trabajo se realizó en forma rápida para que el animal no se estresara demasiado. Una vez tomada la muestra de tejido y el dato de GPS, se liberó al individuo en el mismo lugar en donde fue capturado. Si bien en las 3 campañas se volvió a muestrear en sitios cercanos en donde se habían realizado capturas previas, no fue necesario marcar a los individuos capturados por temor a una posible recaptura. Al cortar el extremo distal de la cola, se consideró a esto como una especie de marcado. Experiencias previas del grupo demuestran que las marcas en las orejas no son eficientes dado que los individuos las pierden rápidamente.

Se colectaron 40 individuos, 20 de cada región y se utilizaron muestras de tejido de otros 20 individuos (10 de cada área de estudio) existentes en el Banco de Tejidos del Laboratorio de Ecología Molecular y que fueron colectados en campañas de campo realizadas en los años ´94 y ´95 por la Dra. Marta Lizarralde, directora de la Tesis.

Figura 10. Izq: colocando los tubos de pvc; Der: Cepos Oneida Victor modificados.

Figura 11. Izq: Material para la toma de muestras de tejido; Der: Tomando muestras de tejido a campo.

Extracción de ADN

Se utilizaron muestras de tejido fresco (músculo, para los individuos capturados en el ´94-´95 y trozos de cola para los individuos capturados en 2009-2010). Si bien las muestras fueron colectadas a lo largo de 15 años (aproximadamente), se realizó un AMOVA entre las muestras de las diferentes colectas (años 1994-1995 vs 2009-2010) en donde no se observaron diferencias significativas, lo cual corroboró que podían ser estudiadas como un mismo pool de

muestras y que las frecuencias alélicas se mantuvieron a lo largo del tiempo. Para la extracción de ADN, se modificó el protocolo descrito por Aljanabi y Martínez (1997) que incluye digestión con Proteinasa K, precipitación de proteínas con NaCl y posterior precipitación con isopropanol (Ver Anexo). Para algunas muestras que presentaron dificultad para ser amplificadas, se extrajo ADN siguiendo el protocolo de Sambrook *et al*. (1989) utilizando fenol-cloroformo el cual es un método más eficaz para extraer ADN de numerosos tipos de tejido (Ver Anexo). Se modificaron los volúmenes de extracción proporcionalmente al tamaño de la muestra. Una vez precipitado el ADN, se lo disolvió en Buffer TE y se lo sembró en geles de agarosa al 1⁄ para calcular la concentración de ADN (ng/µl) de cada individuo (Figura 12). Todas las muestras de ADN fueron depositadas en la colección del Laboratorio de Ecología Molecular, Centro Regional de Estudios Genómicos, UNLP y se conservan en tubos eppendorf a -20°C para futuros análisis genéticos.

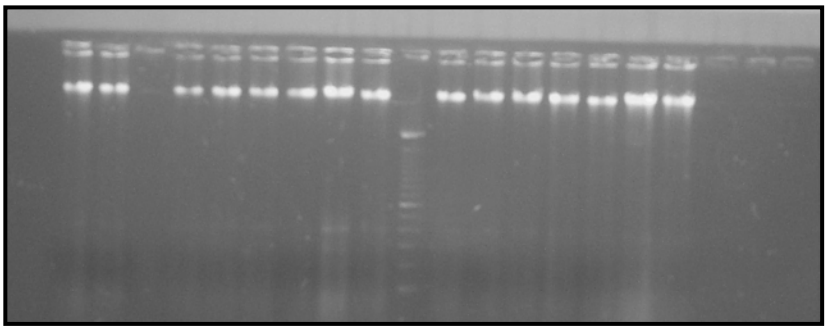

Figura 12. Gel de agarosa al 1⁄ con 16 muestras de ADN de *Ctenomys magellanicus*. El brillo de las bandas está relacionado con la concentración de ADN; a mayor brillo, mayor concentración. En el centro del gel se sembró un marcador de 100 pb.

Amplificación de ADN mitocondrial y secuenciación

Se amplificó un fragmento del D-loop de aprox. 500 pb. (Figura 13), utilizando los primers TucoPro (5'-TTC TAA TTA AAC TAT TTC TTG-3', Tomasco y Lessa 2006) y DL-H16340 (5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG- 3', Vilà et al.1999). La reacción de PCR se modificó a partir del protocolo descrito en Mora *et al.* (2006). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo los siguientes componentes: 25-100 ng de ADN, 1x Buffer Taq Polimerasa, 1.5 mM Cl_2Mg, 200 µM de cada dNTP´s, 25 mM de primer y 1.25 U Taq Polimerasa (UNQUI PB-L). La reacción de PCR se llevó a cabo en un ciclador THERMO HYBAID MBS 0.2S y el perfil térmico consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, 34 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. de annealing a 45°C, 45 seg. de extensión a 74°C y una extensión final a 74°C durante 6 minutos. Se realizaron 2 reacciones de PCR de 25 µl por cada individuo para obtener una cantidad de producto adecuada a la extensión del fragmento a secuenciar. Se

purificaron los fragmentos de PCR por precipitación alcohólica y secuenciaron ambas cadenas (forward y reverse) en MACROGEN, Inc., Corea. Las secuencias y cromatogramas fueron editados y alineados mediante el programa BIOEDIT 7.0 (Hall 1999). El alineamiento se realizó con los valores por defecto en los parámetros de alineación.

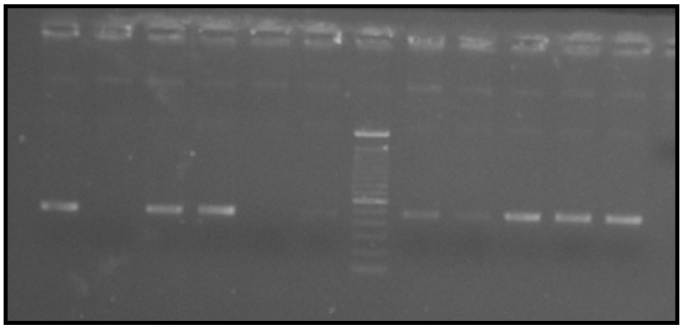

Figura 13. Fragmento de D-loop amplificado exitosamente en 9 de 11 muestras. El brillo de las bandas está relacionado con la concentración del fragmento amplificado; a mayor brillo, mayor concentración. En el centro del gel se encuentra un marcador de 100 pb, en donde se verifica que el fragmento amplificado es de aproximadamente 400 pb.

Amplificación de microsatélites y genotipado

Para la amplificación de los microsatélites, se tomó una submuestra de 20 individuos de cada región (REGION NORTE y REGION SUR) y que a la vez fuera representativa de cada una de las subpoblaciones (A, B, C, D, E y F). Se amplificaron 5 microsatélites diseñados originalmente para *Ctenomys haigi* (Hai8 y Hai11; Lacey y Maldonado 1999) y *Ctenomys sociabilis* (Soc4, Soc5 y Soc6; Lacey 2001) (Tabla 5). La cadena forward de cada uno de los microsatélites presenta un fluorocromo (HEX o FAM). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 15 µl conteniendo 50-150 ng de ADN, 1x Buffer Taq Polimerasa, 1.5 mM Cl_2Mg, 200 µM de cada dNTP´s, 25 mM de primer y 1.25 U de Taq Polimerasa (UNQUI PB-L). Las condiciones de ciclado de la PCR fueron las descriptas en Lacey y Maldonado (1999): desnaturalización inicial 5 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 94°C, 30 seg. de annealing a 56-64°C, 45 seg. de extensión a 74°C y una extensión final a 74°C durante 5 minutos. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos. Las condiciones óptimas de la PCR, se determinaron por las temperaturas de annealing de cada microsatélite realizando (para cada microsatélite por separado) una reacción de PCR en un ciclador de tipo gradiente, donde se amplificó un pool de 3 muestras de ADN a distintas temperaturas (desde 44°C hasta 66°C). Luego, se sembraron todas las reacciones en geles de agarosa al 2⁄ y se determinó la temperatura óptima de annealing de cada primer en función del tamaño y claridad de la banda

(Ver Tabla 5). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo para cada *locus* por separado. Los productos de PCR marcados con fluorescencia fueron analizados con un secuenciador de capilares ABI3100 (MACROGEN, Inc., Corea) con el estándar de tamaño 400HD. Para la reacción en cadena de la polimerasa en secuenciador, se utilizaron dos combinaciones diferentes de fluoróforos marcados ("multiplexing"), una combinación de tres *loci* (Hai8, Hai11 y Soc4) y otra de dos (Soc5 y Soc6). Las combinaciones fueron determinadas *a priori* conociendo los tamaños y el color del fluorocromo de cada microsatélite. Para las combinaciones, se eligieron productos de microsatélites de tamaño similar pero con distinto fluorocromo o productos de microsatélites de tamaños muy diferentes con un mismo fluorocromo (Tabla 5).

Análisis de datos

ADN mitocondrial

La diversidad genética de las poblaciones, se estimó con los parámetros de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) mediante el programa DNAsp 4.10 (Rozas *et al.* 2003). La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos secuencias de ADNmt tomadas al azar de una población sean diferentes mientras que la diversidad nucleotídica es el número de diferencias nucleotídicas entre dos pares de secuencias tomadas al azar. Se realizó una red de haplotipos utilizando el método "median-joining" (MJ) del programa NETWORK 4.6.0.0. (Fluxus Technology Ltd. 1999-2011). Las redes de haplotipos (definidas como gráficos conectados por círculos) son más apropiadas para representar las relaciones dentro de una especie.

Para estudiar la demografía histórica de *C. magellanicus*, se analizó la distribución de diferencias pareadas observadas entre sitios nucleotídicos en la muestra total de haplotipos ("mismatch distribution"). Cuando la distribución es de tipo bimodal, las muestras provienen de poblaciones que se han mantenido en equilibrio demográfico suficiente tiempo, en cambio, si la distribución es unimodal, la población ha experimentado procesos de expansión poblacional recientes. Además, se utilizaron pruebas de neutralidad de Fs de Fu (Fu 1997) y D de Tajima (Tajima 1989). Si las poblaciones se han mantenido estables por largos periodos de tiempo, los estadísticos D y Fs son cercanos a cero (desviaciones significativas de cero permiten rechazar la hipótesis de estabilidad poblacional). Valores negativos (menores a -2), indican que las poblaciones experimentaron recientes procesos de expansión poblacional, debido a que los alelos raros son más numerosos de lo esperado; si los valores son positivos (mayores a 2), la población está atravesando un cuello de botella y por lo tanto los alelos raros

son menos numerosos de lo esperado (Tajima 1989). Para los análisis de neutralidad y distribución de diferencias pareadas se utilizó el programa DNAsp 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

El grado de diferenciación de cada uno de los sitios de muestreo respecto al conjunto de las muestras, se determinó por análisis jerárquicos de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006). El análisis considera las distancias genéticas entre los haplotipos y sus frecuencias, definiendo grupos de poblaciones a fin de evaluar si la estructura genética planteada por el operador es significativa. El AMOVA descompone la varianza en: a) diferencias en la composición de haplotipos entre individuos de diferentes poblaciones (**varianza dentro de una población**); b) diferencias en la composición de haplotipos de individuos de diferentes poblaciones (**varianza entre poblaciones**) y c) diferencias en la composición de haplotipos entre grupos de poblaciones (**varianza entre regiones**). Para este análisis, se dividió a la población de tucos en dos grandes regiones REGION SUR y REGION NORTE y dentro de cada región se subdividió en subpoblaciones. La REGION NORTE, se dividió en dos subpoblaciones mientras que la REGION SUR se dividió en 4 subpoblaciones. Los valores de Φst que arroja el programa son una medida del grado de diferenciación genética de cada una de las subpoblaciones locales respecto al conjunto de la metapoblación, y se interpreta como una medida del grado de flujo génico que cada subpoblación mantiene con el resto del sistema. Valores altos de Φst (estimados a partir de marcadores neutrales) indican una fuerte diferenciación de la población local, sugiriendo fuertes efectos de la deriva génica y bajo intercambio de migrantes con el resto de las localidades muestreadas. Por último, para estudiar la relación entre la distancia geográfica y la distancia genética de las subpoblaciones, se realizó un Test de Mantel utilizando el programa GenAiEX 6.0.

ADN nuclear

Los niveles de variabilidad genética en cada área de estudio fueron estimados calculando el número total de alelos por locus (NA), el número promedio de alelos (A), la heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) que fueron estimadas según Nei (1987) por medio de los programas Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) y GenAiEX 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) se basa en la ausencia de cualquier fuerza evolutiva que cambie la frecuencia alélica y genotípica en una población mientras se mantenga un apareamiento aleatorio entre los individuos que la conforman. La desviación del equilibrio de H-W se calculó usando la prueba exacta de Fisher a través de Cadenas de Markov (Raymond y

Rousset 1995) con 5000 iteraciones, aplicando la corrección secuencial de Bonferroni utilizando los programas GENAIEX 6.0 (Peakall y Smouse 2006) y ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). La segregación independiente de alelos, se analizó por el desequilibrio de ligamiento entre cada par de *locus* para cada área implementando el método de Cadenas de Markov con 5000 iteraciones, y entre cada *locus* para todo el área en conjunto implementando la prueba exacta de Fisher del programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), aplicando en cada caso la corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples. Es importante destacar que el desequilibrio por ligamiento puede estar aumentado debido a factores demográficos como por ejemplo endogamia, estructura poblacional y/o cuellos de botella.

El análisis de los alelos nulos es uno de los problemas más comunes a la hora de trabajar con microsatélites, ya que muchas veces son los que pueden provocar un exceso de homocigotas. Los alelos nulos aparecen cuando un alelo no es amplificado correctamente debido a mutaciones en una de las zonas flanqueantes de los primers y/o problemas técnicos asociados a las amplificaciones. Como resultado de esto, algunos heterocigotas son genotipados como homocigotas y algunos individuos pueden fallar en la amplificación de algún alelo en particular. Frecuentemente las mutaciones que causan alelos nulos, solamente ocurren en una o varias poblaciones, por lo tanto el déficit de heterocigotas podría no ser evidente en todas las poblaciones (Selkoe y Toonen 2006). Los alelos nulos son la causa más común de las desviaciones aparentes del equilibrio de H-W en *loci* microsatélites. Para la detección de alelos nulos se utilizó el programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al*. 2007) tomando en cuenta un valor de corte de 0,05. Este programa, provee estimaciones de frecuencias de alelos nulos con un algoritmo basado en las diferencias entre frecuencias de homocigosis.

Utilizando el programa de agrupamientos STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), se estimó el número más probable de poblaciones (k) y se asignó a cada una de ellas los individuos muestreados. La aproximación del STRUCTURE (totalmente bayesiana) agrupa los individuos muestreados (independientemente de la información previa sobre sus ubicaciones originales en las muestras) en un número de agrupamientos (k) con el objetivo de minimizar las desviaciones del equilibrio de H-W y del desequilibrio de ligamiento dentro de cada uno de los agrupamientos y estima las frecuencias alélicas en cada uno de los grupos. En el modelo más simple, “no-admixture model”, se asume que cada individuo pertenece a un grupo simple, mientras que en el modelo más general, “admixture model”, se estiman proporciones de mezcla para cada individuo. El software utiliza cadenas de Markov con un procedimiento de Monte Carlo (MCMC) para estimar la probabilidad posterior de que los datos concuerden con

la hipótesis de k agrupamientos genéticos. Al mismo tiempo calcula el valor de pertenencia (Q) de cada uno de los individuos en cada uno de los agrupamientos.

Para la corrida del programa se utilizaron los parámetros por default (modelo de mezcla y frecuencias correlacionadas), utilizando 50.000 pasos iniciales de calentamiento seguidos de 100.000 simulaciones. Se realizaron 10 corridas independientes para cada uno de los k supuestos (k=1, 2, 3, 4, 5 y 6) y se utilizó un valor de Q>0.7 como valor de corte para la asignación de individuos a poblaciones. Para poder determinar el valor de k correcto, se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl 2011).

Por último, para estudiar la estructuración espacial de los agrupamientos genéticos definidos por el programa STRUCTURE se realizó un AMOVA utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

RESULTADOS

ADN mitocondrial (D-loop)

Se amplificó un fragmento de 454 pb. en 60 individuos de ambas formas cromosómicas (30 de cada región, REGION NORTE y REGION SUR). El alineamiento de las 60 secuencias analizadas mostró un total de 11 sitios variables (10 transiciones del tipo T/C y una transversión A/G) (Tabla 2). No se encontraron gaps (inserciones o deleciones) en las 60 secuencias analizadas. En la Figura 14 se muestra un fragmento de un cromatograma de un individuo analizado. Se identificaron 9 haplotipos (Tabla 2), de los cuales 3 fueron exclusivos de la REGION NORTE y el resto se detectaron únicamente en la REGION SUR (Tabla 3). No se encontraron haplotipos compartidos entre las poblaciones, indicando que el flujo génico entre las poblaciones es muy bajo.

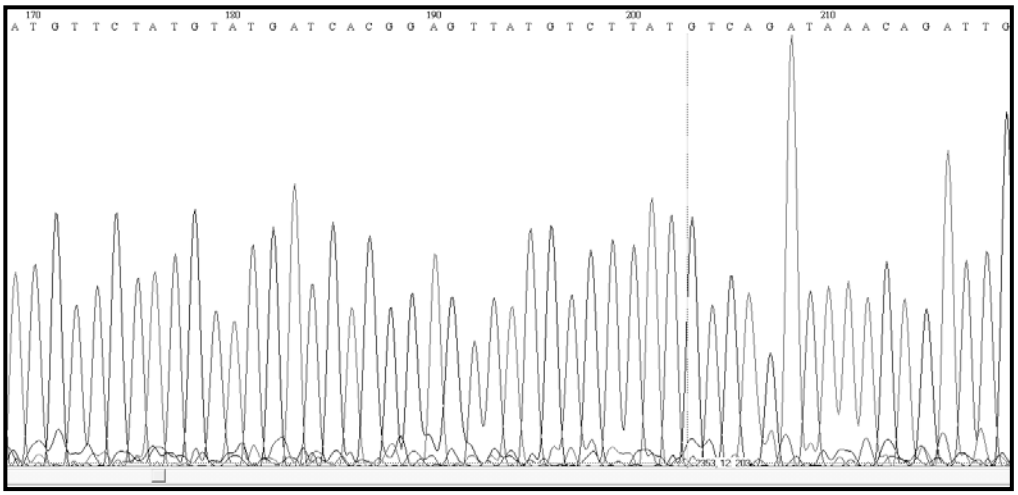

Figura 14. Cromatograma de una secuencia de D-loop de *Ctenomys magellanicus*.

Tabla 2. Detalle de los 11 sitios polimórficos encontrados en el fragmento de 454 pb de D-loop de *Ctenomys magellanicus*. Se detalla el número de acceso al GenBank de cada haplotipo depositado.

	Posición nucleotídica											
	41	59	135	137	142	167	189	218	226	296	334	Acceso GenBank
HAPLOTIPO 1	T	T	A	T	G	C	A	C	C	T	C	HQ262415
HAPLOTIPO 2	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	HQ262416
HAPLOTIPO 3	C	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	HQ262417
HAPLOTIPO 4	.	.	.	C	A	.	G	.	.	.	.	HQ262418
HAPLOTIPO 5	.	.	.	.	.	.	G	.	G	C	.	HQ262419
HAPLOTIPO 6	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	HQ262420
HAPLOTIPO 7	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	HQ262421
HAPLOTIPO 8	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	T	HQ262422
HAPLOTIPO 9	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	T	HQ262423

Tabla 3. Cantidad de individuos por haplotipo, región (REGION NORTE y REGION SUR) y subpoblación (A, B, C, D, E y F).

REGION	**SUBPOBLACION**	**HAPLOTIPOS**									**TOTAL**
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	
REGION NORTE	**E**	5				11		9			25
	F					4		1			5
REGION SUR	**A**		5	3			4				12
	B						10		1		11
	C									3	3
	D				3		1				4
TOTAL		5	5	3	3	15	15	10	1	3	60

En la muestra total (60 secuencias), la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) fue de 0,836 y 0,004 respectivamente, indicando una alta diversidad haplotípica y una diversidad nucleotídica baja. La diversidad haplotípica (h) a nivel de poblaciones fue superior en la REGION SUR (h=0,715) con respecto a la REGION NORTE (h=0,653), lo que concuerda con la mayor cantidad de haplotipos encontrados en la REGION SUR. Por otro lado, los valores de diversidad nucleotídica fueron de 0,004 y 0,003 para la REGION SUR y REGION NORTE respectivamente. Estos valores son muy similares entre sí y está relacionado con el número de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos (k=1,959). En la Tabla 3 se puede observar la cantidad de individuos para cada subpoblación y los haplotipos encontrados en cada una de

ellas. Tanto el haplotipo 5 como el 6 fueron los más frecuentes. El haplotipo 6 fue el más compartido entre las subpoblaciones de la REGION SUR (presente en 3 de las 4 subpoblaciones; Tabla 3).

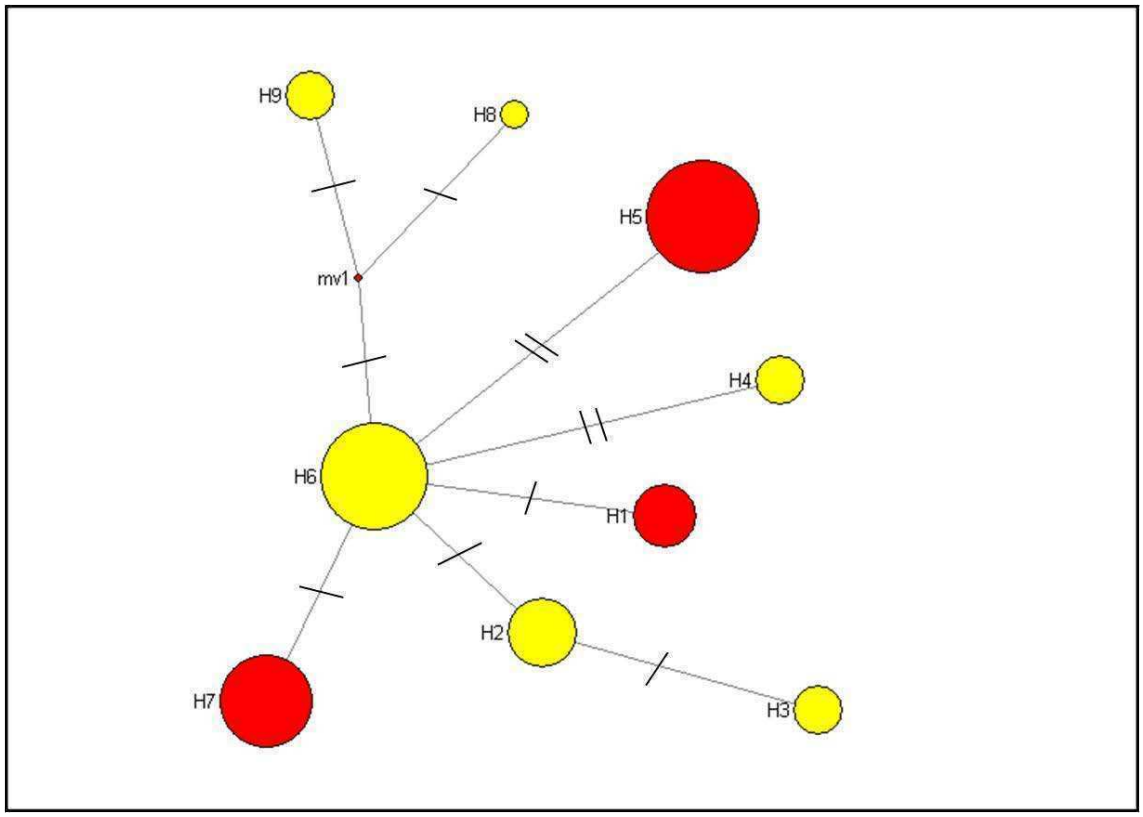

Figura 15. Red de haplotipos de ADNmt de *Ctenomys magellanicus* en Tierra del Fuego, Argentina. El área de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Las líneas cruzadas entre los círculos representan las diferencias nucleotídicas existentes entre los haplotipos. Los círculos en color rojo pertenecen a los haplotipos encontrados en la REGION NORTE y en amarillo a los de la REGION SUR. Entre los haplotipos H9 y H6 y H8 y H6 hay un haplotipo hipotético (mv1).

En la Figura 15 se muestra la Red de haplotipos donde se observa que los mismos no son compartidos entre las regiones, evidenciando una fuerte estructura poblacional. Además, se destacan los haplotipos más frecuentes (H5, H6 y H7) en donde el Haplotipo 6, encontrado en la REGION SUR, sería el haplotipo ancestral de *Ctenomys magellanicus*, ya que de él parte la mayor cantidad de haplotipos. A su vez, dicho haplotipo fue el más compartido entre las subpoblaciones (Tabla 3). En la Red se observa un haplotipo hipotético entre los H6 y H9 y H6 y H8, denominado mv1. Probablemente, este haplotipo hipotético podría encontrarse si se ampliara el muestreo.

Los test para el D de Tajima y el Fs de Fu no fueron significativos a nivel global (ambas regiones juntas; D=0,838 p>0,100 y Fs=-0,950 p=0,123) ni tampoco cuando se analizaron las regiones por separado (REGION NORTE: D=1,05 p>0,100, Fs=1,997 p=0,165; REGION SUR: D=0,577 p>0,100, Fs=-0,545 p=0,178). Estos valores cercanos a cero y no significativos no podrían asegurar que las poblaciones se encuentran estables. Sin embargo, la distribución de frecuencias pareadas (para ambas poblaciones) presentó una distribución unimodal (Figura 16) lo cual sugiere una historia reciente de expansión poblacional. Esto se evidencia también por el valor bajo en el número promedio de diferencias nucleotídicas (k=1,959) que caracteriza a este tipo de eventos demográficos. Cuando se analizan por separado las regiones, también la distribución fue unimodal, con un número de diferencias nucleotídicas bajo (k=1,756 REGION SUR; k=1,455 REGION NORTE).

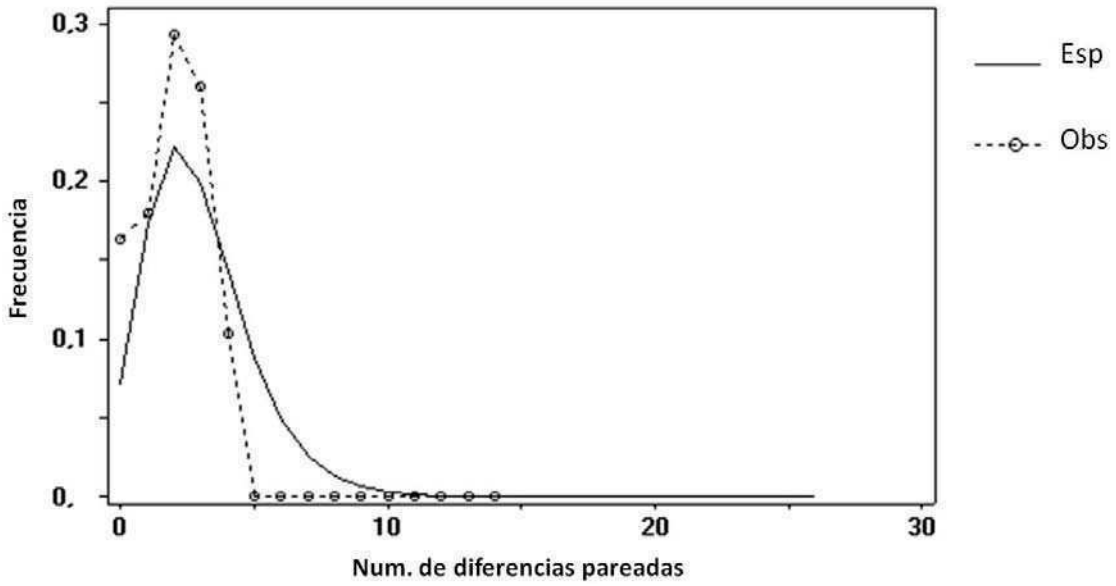

Figura 16. Distribuciones observadas y esperadas de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para *C. magellanicus* (REGION NORTE + REGION SUR). Línea punteada: distribución observada; línea llena: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Por otro lado, se realizó un AMOVA con las 60 muestras (Figura 17), utilizando 6 subpoblaciones como muestra la Figura 9 y como fueron definidas en Materiales y Métodos. La diferencia entre regiones (REGION SUR vs REGION NORTE) fue del 18% , mientras que la diferencia entre subpoblaciones fue del 29% . Es importante destacar que la variación dentro de cada una de las subpoblaciones fue muy alta (53%).

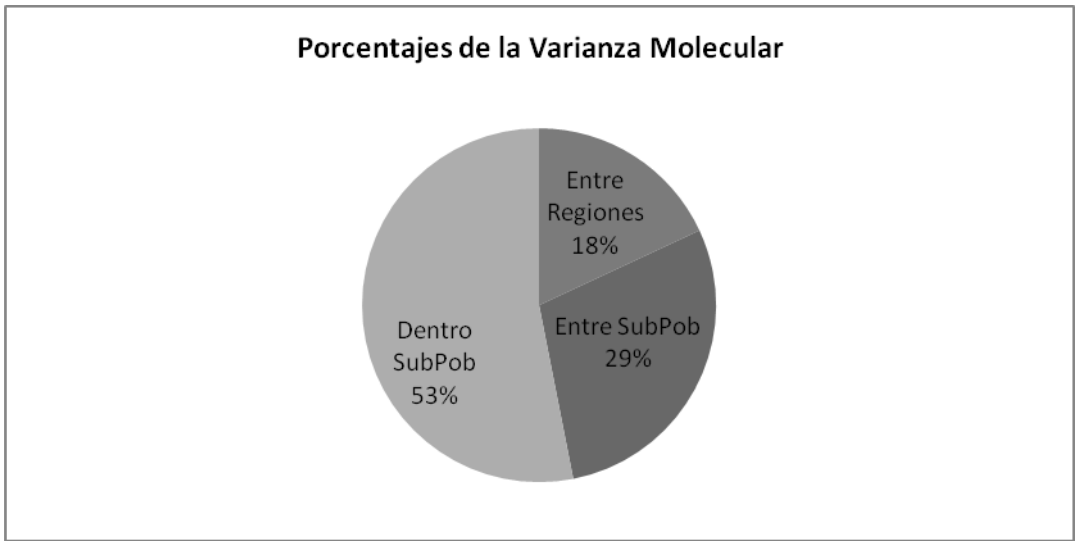

Figura 17. Resultado del AMOVA considerando la división en 6 subpoblaciones. En el gráfico se detalla el porcentaje de variación dentro de cada subpoblación, entre subpoblaciones y entre regiones.

Tabla 4. Resultados del AMOVA. Debajo de la diagonal se encuentran los valores de Φst, arriba de la diagonal se encuentra el valor estadístico de p para cada par de subpoblaciones. En negrita se destacan los valores de Φst que fueron significativos.

		REGION SUR				REGION NORTE	
		SubPob A	**SubPob B**	**SubPob C**	**SubPob D**	**SubPob E**	**SubPob F**
REGION SUR	**SubPob A**	–	0,002	0,009	0,026	0,001	0,001
	SubPob B	**0,350**	–	0,002	0,006	0,001	0,001
	SubPob C	**0,476**	**0,854**	–	0,069	0,002	0,027
	SubPob D	**0,304**	**0,643**	0,707	–	0,001	0,018
REGION NORTE	**SubPob E**	**0,316**	**0,520**	**0,481**	**0,383**	–	0,365
	SubPob F	**0,403**	**0,747**	**0,742**	**0,555**	0,035	–

El valor de Φst entre formas cromosómicas (REGION NORTE vs REGION SUR) fue de 0,181 (p=0,001), mientras que entre subpoblaciones fue de 0,352 (p=0,001). En la Tabla 4, se observa que todas las subpoblaciones del Sur presentaron valores de Φst superiores a 0,3 y significativos (a excepción del par C-D que fue p=0,069), indicando que la REGION SUR se encuentra fuertemente estructurada, a diferencia de la REGION NORTE en donde el flujo génico entre las dos subpoblaciones es mayor (Φst=0,035, p=0,365). Las subpoblaciones que se encuentran más aisladas dentro de la REGION SUR son la subpoblación C y la B (Φst=0,854,

p=0,002). Dicho valor indica que, a pesar de encontrarse geográficamente cerca (≈20 km), el flujo génico entre ambas es prácticamente nulo. Por último, las subpoblaciones del Sur también se encuentran aisladas de las del Norte, aunque los valores de Φst no necesariamente son superiores a los valores registrados entre las subpoblaciones del Sur. Por ejemplo, entre la subpoblación A y la F el valor de Φst es de 0,403 (p=0,001) y la distancia geográfica es superior a 70 km, mientras que entre la subpoblación B y D (ambas subpoblaciones pertenecientes a la POB SUR) el valor de Φst es de 0,643 (p=0,006) y la distancia geográfica es menor de 20 km. Esto indicaría que el aislamiento poblacional no estaría relacionado con la distancia geográfica dado que hay subpoblaciones que presentan mayor flujo génico (por lo tanto menor valor de Φst) y mayor distancia geográfica. Esto también se observa en los resultados del Test de Mantel (r=-0,103 p=0,385), el cual fue no significativo, por lo tanto la población de *Ctenomys* no se ajusta a un modelo de Aislamiento por Distancia. No se observa una relación directa entre la distancia geográfica y la distancia genética (Figura 18) ya que a mayor distancia geográfica no se observa mayor distancia genética.

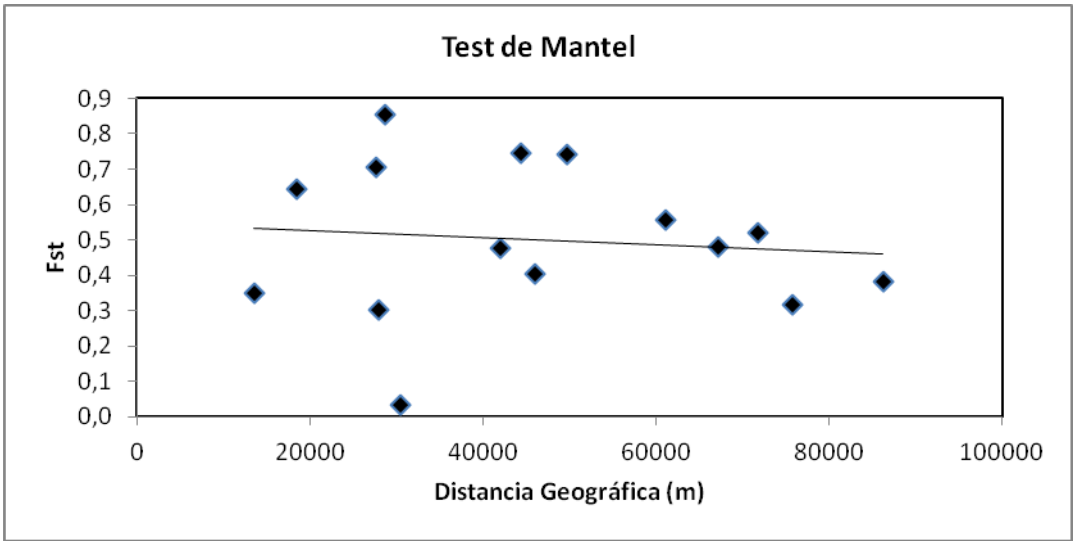

Figura 18. Resultado del Test de Mantel. Se grafica la relación entre la Distancia Geográfica (m) y la Distancia Genética entre pares de subpoblaciones. Se observa claramente que no hay una relación entre las variables. (r=-0,103, p=0,385).

ADN nuclear (microsatélites)

La lectura de los picos de microsatélites se realizó utilizando el programa PeakScanner 1.0 (Applied Biosystems) (Figura 19). Para ambas regiones REGION NORTE y REGION SUR se

amplificaron 5 *loci* de microsatélites en 20 individuos de cada región. Los tamaños genotipados para cada microsatélite y la temperatura de annealing se muestran en la Tabla 5. Es importante destacar que para el caso de la REGION NORTE y del microsatélite Hai8 y luego de numerosos intentos, no se pudieron amplificar 2 individuos, con lo cual existe un 10⁄ de datos faltantes para dicho microsatélite y dicha región.

Tabla 5. Listado de los microsatélites amplificados. Se detalla el nombre del microsatélite, el tamaño del fragmento amplificado según Lacey *et al*. (1997) y Lacey (2000), el fluorocromo con que se marcó cada microsatélite, el tamaño de fragmento amplificado (pb) observado en los geles de agarosa, el tamaño del fragmento genotipado (pb), las temperaturas de annealing según los trabajos de Lacey *et al*. (1997) y Lacey (2000) y las temperaturas utilizadas para esta Tesis.

Microsatelite	Tamaño estimado	Fluorocromo	Tamaño amplificado (pb, aprox)	Tamaño genotipado (pb)	T paper (°C)	T annealing (°C)
Hai8	125-153	HEX	**200**	**123-157**	56	**58**
Hai11	132-154	FAM	**200**	**165-185**	60	**60**
Soc4	350-370	FAM	**400**	**394-404**	58	**58**
Soc5	218-250	FAM	**300**	**268-292**	62	**64**
Soc6	175-195	HEX	**250**	**226-240**	62	**62**

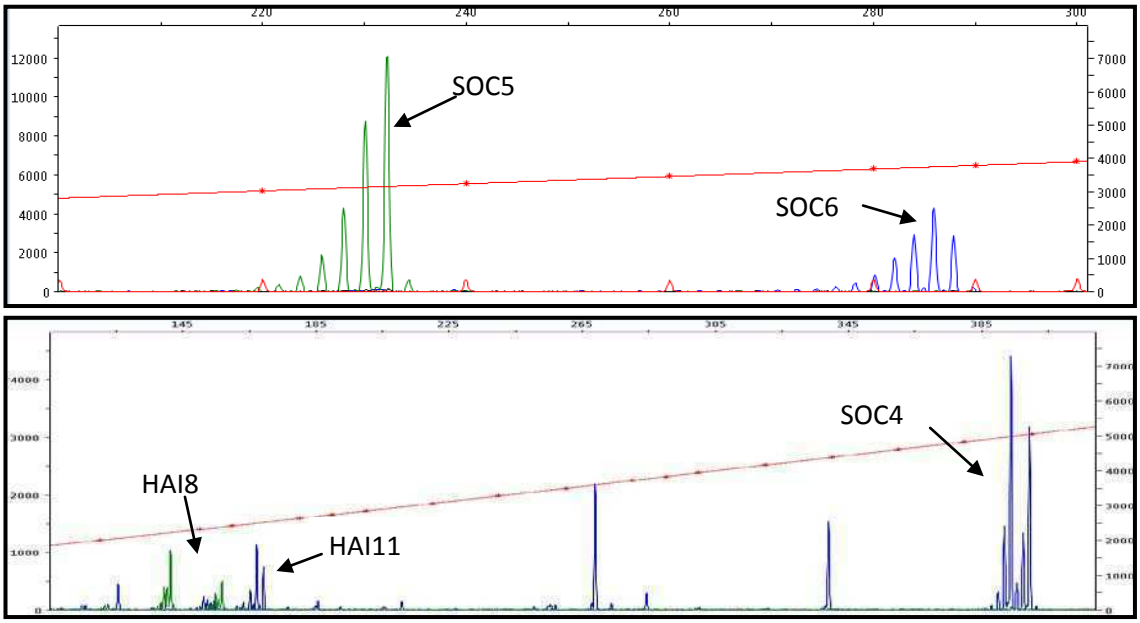

Figura 19. Electroforetogramas de los 5 microsatélites amplificados en este estudio. Arriba: a la izquierda se detalla el microsatélite SOC5 (268-292 pb) y a la derecha el SOC6 (226-240 pb). Abajo: se destaca el microsatélite HAI8 (123-157 pb) y HAI11 (165-185 pb) y a la derecha SOC4 (394-404 pb).

Polimorfismo de microsatélites y variabilidad genética

En una primera etapa, para el estudio de los alelos nulos como el desequilibrio de ligamiento se consideró simultáneamente ambas regiones (n=40). Sólo un *locus* (Soc5) de los cinco estudiados presentó una frecuencia no significativa de alelos nulos (F=-0,023 p>0,050), el resto de los *loci* presentaron frecuencias significativas de alelos nulos (F_{Soc6}=0,243 p<0,005; F_{Soc4}=0,192 p<0,005; F_{Hai8}=0,311 p<0,005; F_{Hai11}=0,081 p<0,005). El *locus* Soc5 fue el único que mostró un exceso de genotipos heterocigotas. Cuando se analizaron las dos regiones por separado (REGION NORTE y REGION SUR), el *locus* Soc5 continuó presentando mayor frecuencia de heterocigotas ($F_{REGION\ NORTE}$=-0,103 p>0,005; $F_{REGION\ SUR}$=0,014 p>0,005). El resto de los *loci* sólo presentaron frecuencias significativas (F_{Soc6}=0,195 p<0,005; F_{Soc4}=0,540 p<0,005; F_{Hai8}=0,479 p<0,005; F_{Hai11}=0,053 p<0,05) de alelos nulos para la REGION SUR mientras que para la REGION NORTE las frecuencias fueron no significativas (F_{Soc6}=0,018 p>0,050; F_{Soc4}=-0,011 p>0,059; F_{Hai8}=0,098 p>0,050; F_{Hai11}=0,044 p>0,050). Si la frecuencia de alelos nulos se debiera a la no amplificación de ciertos alelos, los resultados serían más consistentes entre poblaciones, por lo tanto y aun existiendo la posibilidad de que existan alelos que no amplifiquen en la muestra, ninguno de los *loci* fue descartado para el resto de los análisis. El hecho de que la mayoría de los *loci* (4 de 5) presenten una frecuencia significativa de alelos nulos en la REGION SUR, podría deberse al tipo de reproducción y/o a una fuerte estructura poblacional, y por ende no sería consecuencia de la no amplificación sistemática de alelos. Sólo 5 comparaciones pareadas evidenciaron desequilibrio de ligamiento, las cuales no estuvieron asociadas con ningún *loci* en particular (SOC5-SOC6 p=0,018, SOC6-HAI8 p=0,001, SOC4-HAI8 p=0,002, SOC6-HAI11 p=0,001, HAI8-HAI11 p=0,001) y como sucede en otros estudios de *Ctenomys,* estos mismos microsatélites no han presentado desvíos significativos por ligamiento (Cutrera *et al.* 2005, 2006; Mora 2008; Mapelli 2010), por lo tanto los 5 *loci* utilizados en este trabajo fueron considerados “marcadores independientes”.

El resumen de los análisis estadísticos para todos los *loci* y regiones se presenta en la Tabla 6 y las frecuencias alélicas de los microsatélites en la Tabla 7. Todos los *loci* fueron polimórficos con un número total de alelos por *locus* entre 5 y 15 y un número efectivo entre 2,898 y 4,432 (Tabla 6), para la REGION NORTE y SUR respectivamente. El promedio de alelos por *locus* fue de 9,8; la REGION NORTE presentó menor número de alelos por *locus* (6) mientras que la REGION SUR presentó un promedio de 7,4 alelos por *locus*. Es de destacar que los valores de Heterocigosidad Esperada (He) siempre fueron superiores a los de Heterocigosidad Observada (Ho), a excepción del *locus* Soc5 (para la REGION NORTE) que presentó mayor cantidad de heterocigotas observados que esperados, con lo cual no mostró una desviación significativa del

equilibrio de H-W. El resto de los *loci* presentaron desviaciones significativas (p<0,050; Tabla 6).

Tabla 6. Variación genética en los microsatélites de *C. magellanicus* para cada región. Número de alelos por *locus* (**At**), número de alelos por región (**Ni**), número de alelos efectivos por región (**Ne**), Heterocigosidad Observada (**Ho**) y Heterocigosidad Esperada (**He**, según Nei 1978), por *locus* para cada región (Norte y Sur). **A**, promedio del número de alelos (Riqueza Alélica); **⁄ P**, porcentaje de *loci* polimórficos; **Nt**, número total de individuos. En negrita se resaltan las desviaciones significativas entre los niveles observados y esperados de heterocigosidad en cada región y *locus* por *locus*. * P<0.050; ** P<0.010 y *** P<0.001.

		REGION NORTE				REGION SUR			
Locus	**At**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**
SOC4	5	4	1,713	0,400	0,416	3	1,512	**0,100*** **	0,339
SOC5	10	8	3,883	0,900	0,743	8	5,333	0,800	0,813
SOC6	9	5	1,536	**0,350***	0,349	8	4,020	**0,500** **	0,751
HAI8	15	9	5,226	**0,667** **	0,809	10	7,018	**0,300*** **	0,858
HAI11	10	4	2,133	0,500	0,531	8	4,278	**0,700** **	0,766
Media				0,600	0,570			0,800	0,705
A	9,8	6	2,898			7,4	4,432		
⁄ P				100				100	
Nt				20				20	

Tabla 7. Frecuencias alélicas para los *locus* de cada microsatélite por región. Se destaca el valor de N para cada región. Es importante destacar que en la REGION NORTE hay un 10⁄ de datos faltantes para el microsatélite Hai8.

***Locus*/Alelos**	**Reg NORTE**	**Reg SUR**	**Locus/Alelos**	**Reg NORTE**	**Reg SUR**
N	**20**	**20**	**N**	**20**	**20**
Soc4			**Hai8**		
394	0,750	0,800	**123**	0,000	0,250
396	0,000	0,125	**125**	0,000	0,125
400	0,100	0,075	**127**	0,000	0,150
402	0,075	0,000	**139**	0,056	0,000
404	0,075	0,000	**141**	0,194	0,000
Soc5			**145**	0,056	0,000
268	0,050	0,000	**147**	0,000	0,150
274	0,000	0,100	**149**	0,139	0,050
276	0,000	0,025	**151**	0,111	0,075
278	0,025	0,100	**153**	0,000	0,075
280	0,275	0,325	**155**	0,333	0,050
282	0,050	0,150	**157**	0,056	0,025
284	0,100	0,175	**159**	0,000	0,050

286	0,400	0,075	**161**	0,028	0,000
288	0,075	0,050	**163**	0,028	0,000
292	0,025	0,000	**Hai11**		
Soc6			**123**	0,000	0,025
224	0,000	0,025	**127**	0,000	0,025
226	0,050	0,000	**167**	0,600	0,375
228	0,050	0,050	**169**	0,325	0,150
230	0,075	0,425	**171**	0,000	0,125
232	0,800	0,175	**177**	0,050	0,000
234	0,000	0,125	**179**	0,000	0,050
236	0,000	0,125	**183**	0,025	0,000
238	0,000	0,025	**185**	0,000	0,225
240	0,025	0,050	**187**	0,000	0,025

Estructura poblacional

El análisis utilizando el programa STRUCTURE identificó claramente estructuración poblacional dentro del área de muestreo, resultando el valor de agrupamiento K=4 el que mejor ajustó a los datos (Figura 20). Por otro lado, utilizando el modelo de Evanno *et al.* (2005), el valor de agrupamiento que mejor ajustó fue el de K=3 (Figura 21). Si bien el agrupamiento K=3 no presenta el valor de máxima probabilidad posterior [Ln P(D)], este modelo está soportado por el máximo valor de ΔK (Evanno *et al.* 2005), lo que implica la presencia de 3 grupos genéticamente distintos. Es importante destacar que las 10 corridas en k=3 mostraron idénticas soluciones de agrupamiento con valores similares de probabilidad de pertenencia (Q) para todos los individuos. Además, con el valor de agrupamiento K=3, el 85% de los datos presentaron un valor de Q>0,7 mientras que si el k es igual a 4, sólo el 62,5% de los datos presentaron un valor de Q superior a 0,7.

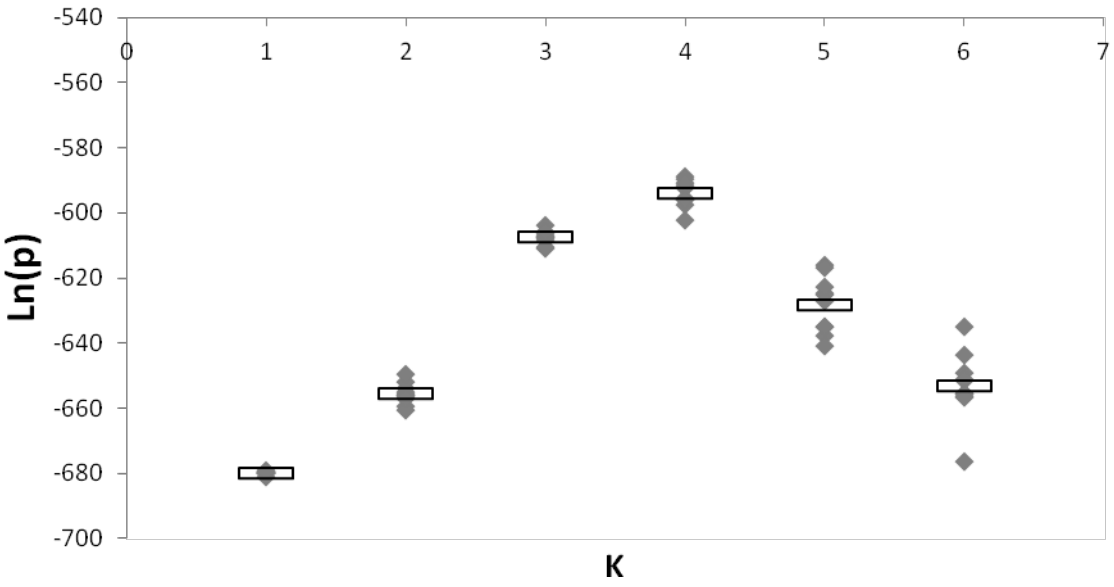

Figura 20. Relación entre la verosimilitud del modelo Ln (P) y el número de agrupamientos (K). En la figura se muestran las 10 corridas realizadas para cada valor de K (ver Materiales y Métodos), y la línea horizontal muestra el promedio de los valores de verosimilitud. El valor de agrupamiento k=4 es el que mejor se ajustó a los datos.

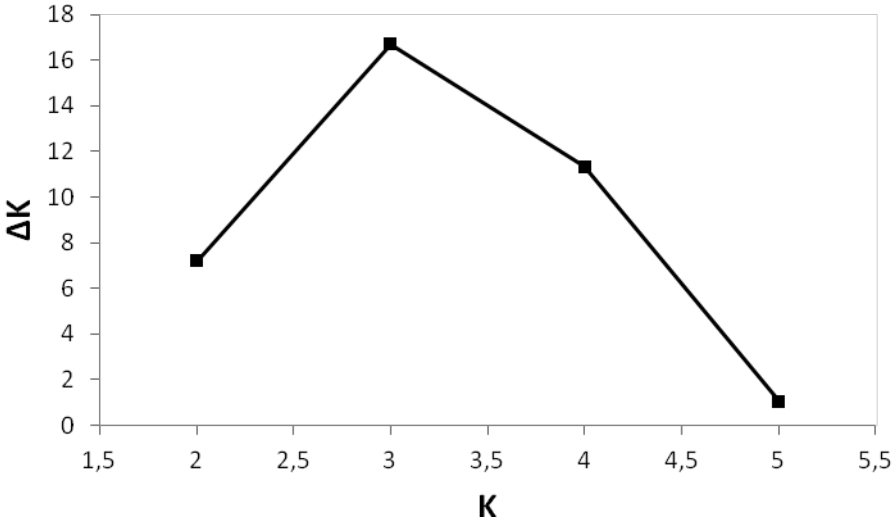

Figura 21. Relación entre el ΔK y el número de agrupamiento (K) según el modelo de Evanno *et al.* (2005). El valor de agrupamiento k=3 es el que mejor se ajustó a los datos.

Cada agrupamiento genético realizado por el programa STRUCTURE se encontró conformado por distinto número de individuos: agrupamiento verde (5 individuos), agrupamiento rojo (18 individuos) y agrupamiento azul (17 individuos) (Figura 22). El primer agrupamiento (color rojo) se encuentra conformado 89⁄ de individuos (16 individuos) de la REGION SUR, todos los

individuos presentaron un valor de Q≥0,75. El segundo agrupamiento genético (color verde) consistió en el 100⁄ de los individuos pertenecientes a la REGION NORTE. Estos cinco individuos presentaron un valor de Q>0,9, con lo cual este agrupamiento se encuentra fuertemente consolidado. Por último, el tercer agrupamiento (color azul) fue el único que se encontró conformado por individuos de ambas regiones. Presentó un 65⁄ (11 individuos) de la REGION NORTE con un valor de Q≥0,78 y un 12⁄ (2 individuos) de la REGION SUR con un valor de Q≥0,7. Los dos individuos de la REGION SUR pertenecen a la subpoblación B. Seis individuos no pudieron ser asignados claramente a ningún agrupamiento genético (Q<0,7); de éstos dos pertenecieron al primer agrupamiento y el resto al tercero.

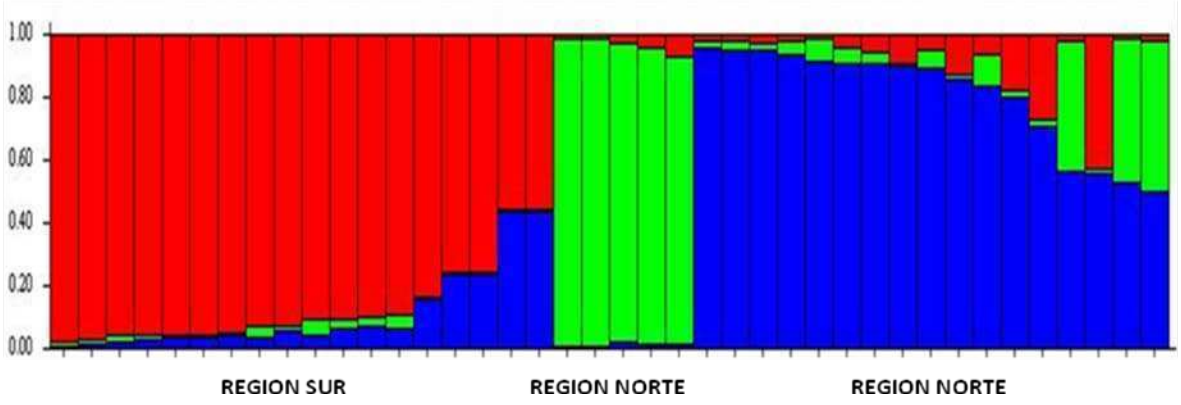

Figura 22. Probabilidades posteriores de asignación (Q) para los 3 agrupamientos genéticos según STRUCTURE. Cada individuo es representado por una barra vertical. Los tres colores corresponden a los tres agrupamientos genéticos detectados.

Los resultados de este estudio muestran que *Ctenomys magellanicus* estaría dividida en 3 subpoblaciones, 2 subpoblaciones al Norte del Río Grande y 1 subpoblación al Sur. Además, muestran una alta congruencia entre los agrupamientos genéticos identificados por STRUCTURE y la localización geográfica, a excepción de dos individuos pertenecientes a la REGION SUR que fueron asignados a una de las 2 subpoblaciones de la REGION NORTE. Esto indicaría que esos individuos, muestreados en la REGION SUR, serían genéticamente más parecidos a los de la REGION NORTE. Hipotéticamente, dicha migración podría haberse dado en el transcurso de varias generaciones y durante un proceso de expansión hacia el norte. Es importante aclarar que el programa utiliza una hipótesis genética en base a los genotipos multilocus de cada individuo y lo que hace es minimizar el desequilibrio de H-W y el desequilibrio de ligamiento.

Cuando se analizan los valores de Fis y de equilibrio de H-W para cada una de las subpoblaciones definidas en STRUCTURE, sólo la Pob. Roja (REGION SUR) presentó desviaciones significativas del equilibrio de H-W (*locus* Soc4, Soc6, Hai8 y Hai11) y valores de Fis positivos y significativos (Fis=0,314; p<0,0001). Estos resultados sugieren que la REGION SUR presentaría niveles mayores de endogamia y se encontraría aislada del resto de las subpoblaciones, esto podría explicar que la mayoría de los loci en la REGION SUR hayan presentado una frecuencia significativa de alelos nulos. Las dos subpoblaciones del Norte presentaron valores de Fis pequeños y no significativos (Pob. Verde: Fis=0,09 p=0,572; Pob azul: Fis=0,003 p=0,189), con lo cual en la REGION NORTE no habría endogamia y cada subpoblación se comportaría como una subpoblación panmíctica.

Por último, se realizó un AMOVA utilizando el programa GenAIEx 6.0 para las 3 agrupaciones genéticas definidas según el programa STRUCTURE sin tener en cuenta los dos migrantes (Figura 23). Los resultados del AMOVA indican que la mayor varianza se encuentra dentro de cada subpoblación (70⁄). La diferenciación entre subpoblaciones (roja, verde y azul) es del 11⁄ mientras que la diferenciación entre regiones es del 19⁄ .

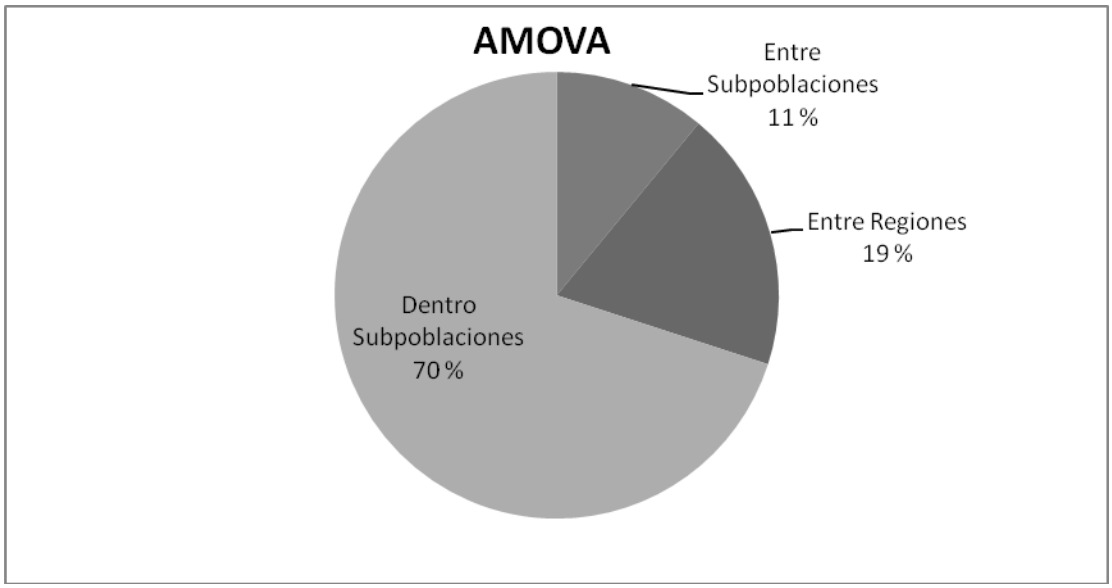

Figura 23. Resultados del AMOVA. En el gráfico se detalla el porcentaje de variación entre regiones, entre subpoblaciones (roja, verde y azul) y dentro de cada subpoblación.

El valor de Fst entre las 3 subpoblaciones definidas por STRUCTURE fue de 0,108 (p=0,001) valor inferior al registrado con D-loop (Φst=0,181, p=0,001) entre ambas formas

cromosómicas, mientras que el valor de Fis fue de 0,212 (p=0,001). Estos índices indican que la población de *Ctenomys* en Tierra del Fuego se encuentra significativamente estructurada y presenta niveles de endogamia. Por último, cuando se analizan las subpoblaciones de a pares, se observa que entre las 2 subpoblaciones del Norte el valor de Fst es muy bajo y no significativo (Fst=0,009, p=0,281) mientras que entre las subpoblaciones del Norte y la del Sur, el valor de Fst es superior a 0,1 y significativo ($Fst_{VERDE\text{-}ROJA}$=0,140 p=0,001 Y $Fst_{AZUL\text{-}ROJA}$=0,116 p=0,001). Estos resultados son similares a los obtenidos con el marcador mitocondrial, en donde se ve que entre las dos subpoblaciones del Norte el flujo génico es relativamente alto. Los valores de Fst calculados a partir de los datos de microsatélites son menores a los registrados con los datos de ADN mitocondrial, lo cual indicaría diferencias entre el flujo génico histórico (D-loop) y el más reciente (microsatélites).

DISCUSIÓN

Variabilidad Genética

En cuanto al marcador mitocondrial, once (11) sitios variables fueron detectados en la Región Control (0,025⁄ de sitios polimórficos) y 9 haplotipos fueron identificados en la muestra de 60 individuos. Estos valores fueron superiores a los registrados por Fernández-Stolz (2007) (0,015⁄ de sitios polimórficos, 7 haplotipos en 89 muestras) pero inferiores a los reportados por Mora (2008) (0,047⁄ de sitios polimórficos, 24 haplotipos en 70 individuos), mostrando que la variabilidad genética en *C. magellanicus* (a nivel mitocondrial) sería moderada. Si bien los índices de Tajima y de Fu dieron cercanos a cero y no significativos, el resto de los índices analizados mostraron que la población de *C. magellanicus* estaría atravesando un proceso de expansión poblacional reciente. *Ctenomys magellanicus* presentó un patrón de baja diversidad nucleotídica (0,0043) y alta diversidad haplotípica (0,836), indicando que los haplotipos se encuentran estrechamente relacionados; en efecto, el número promedio de cambios nucleotídicos fue de casi 2 pares de bases. Un patrón de baja diversidad nucleotídica y alta diversidad haplotípica es consistente con un tamaño poblacional efectivo histórico seguido por expansión poblacional (Grant y Bowen 1998). Este patrón también se observó en la distribución unimodal de las frecuencias pareadas, la cual también sugiere una historia reciente de expansión poblacional (tanto para la población global de *C. magellanicus* como para cada región). Es importante destacar que las pruebas para detectar estabilidad poblacional (Prueba de neutralidad de Tajima y Fu) presentaron valores no significativos. Habitualmente estas pruebas dan resultados significativos cuando los valores de los índices son mayores a 2 o menores a -2; en esta tesis, los resultados fueron cercanos a cero y no significativos.

A diferencia de lo esperado (ver predicciones), los niveles de variabilidad encontrados en los microsatélites de *Ctenomys magellanicus* se ubican dentro de los más grandes del género *Ctenomys*. El número promedio de alelos por locus fue de 9,8, oscilando entre 5 y 15 alelos. Otras especies del género presentaron un número promedio de alelos de 13 (*Grupo perrensi*, rango 5-19; Mirol *et al.* 2010); 9,3 (*C. minutus*, rango 5-15; Gava y Freitas 2004); 7,5 (*C. haigi*, rango 3-13; Lacey 2001); 4,3 (*C. australis*, rango 3-6; Mora *et al.* 2010), entre otros. Este resultado podría indicar que *C. magellanicus* presentaría altos niveles de diversidad genética lo cual es muy importante para los programas de conservación ya que lo que se pretende es conservar la mayor cantidad posible de diversidad con el fin de conseguir la viabilidad de la

especie a largo plazo, si bien, como se discutió en el Capítulo 1, una alta variabilidad a nivel genético no es lo único que sería necesario para salvar a una especie de la extinción.

Estructura Poblacional

Si bien no era un objetivo de esta tesis, las campañas realizadas para colectar muestras (octubre 2009-febrero 2010) permitieron actualizar la distribución de *Ctenomys magellanicus* en Tierra del Fuego (Argentina). Aunque el impacto antrópico se encuentra en continuo aumento (cada año se observan más campos con ganado), se podría considerar que la especie se encuentra estable en cuanto al status de conservación ya que si bien no fue encontrada en algunos sitios antiguos detectados por Lizarralde *et al.* (2001, 2003), fue encontrada en nuevas zonas donde hace 15 años no había sido encontrada (*e.g.* Subpoblación F). Si bien la distribución de *C. magellanicus* según Bidau *et al.* (2008) incluye zonas en territorio continental (provincia de Santa Cruz y Chubut) son registros aislados de datos indirectos que aún no fueron corroborados. En un futuro, es necesario realizar campañas exploratorias en las provincias de Santa Cruz y Chubut para corroborar la presencia de la especie y por lo tanto actualizar su distribución. Estas campañas servirán para verificar la presencia de la especie en el continente y por lo tanto el estado de conservación, ya que de no encontrarse *C. magellanicus* en el continente, la distribución de la especie se vería restringida a la Isla Grande de Tierra del Fuego y por lo tanto la necesidad de conservar a la especie será mayor.

Las muestras utilizadas para este trabajo fueron colectadas en períodos de muestreo diferentes: durante 1994-1995 (fueron almacenadas en el Banco de Tejidos del Lab. de Ecología Molecular del CREG hasta este estudio) y durante 2009-2010 (como parte de nuevas colectas en terreno realizadas por la tesista). Entre ambas colectas se registró una variación en la extensión del área ocupada por la especie que podría deberse a: 1) presencia/ausencia de ganado, 2) movimiento de tierra para la construcción de rutas y/o 3) movimientos migratorios *per se* de la especie. Principalmente en la REGION SUR, se registraron nuevos sitios (subpoblación D) y no se encontraron ejemplares en sitios donde fueron colectados en años anteriores (Ej. Estancia Guazú Cue). En cambio, en la REGION NORTE se detectó un nuevo sitio (Subpoblación F; 30 km hacia el sur de otros identificados en los años ´94 y ´95) y la permanencia de sitios antiguos en los alrededores de San Sebastián. Si bien no resulta claro el o los procesos que marcan las diferencias registradas, se podría inferir movimientos específicos en cada área de distribución, debidos a factores antrópicos y a movimientos de la especie.

Diversos efectos antrópicos influyen sobre la presencia y/o ocupación de nuevos sitios por *C. magellanicus*: el ganado operaría como un factor negativo para la presencia de la especie y los movimientos de suelo que podrían generar nuevos sitios de ocupación. Las actividades humanas no producirían, necesariamente, impactos negativos en la especie (por lo menos en el área estudiada). Según Mapelli (2010), a pesar del incremento en el grado de fragmentación del hábitat en la provincia de Buenos Aires en los últimos años, las poblaciones de *Ctenomys porteousi* no sufrieron significativamente los efectos de los cambios antrópicos en el uso del suelo; sólo dos poblaciones mostraron una significativa reducción en el tamaño poblacional. Este patrón también fue observado en este trabajo para *C. magellanicus*.

La distribución de *Ctenomys magellanicus* de Tierra del Fuego, está conformada por dos regiones con distinto número cromosómico, una zona al Norte con 34 cromosomas (REGION NORTE) y otra al Sur con 36 cromosomas (REGION SUR). Si bien nunca se han encontrado híbridos a nivel cromosómico (Lizarralde *et al.* 2001, 2003), el estudio realizado en esta tesis demuestra que a nivel genético tampoco se encontraron haplotipos de D-loop compartidos entre ambas formas "cromosómicas". Este resultado también está sustentado por la falta de tuqueras entre ambas regiones (REGION NORTE y REGION SUR); en los 40 km aprox. que separan ambas regiones, no hay indicios de presencia de tucos, lo cual indicaría la falta de flujo génico entre ambas por lo tanto no se tendrían que encontrar haplotipos de ADNmt compartidos entre ambas regiones.

Los resultados de este Capítulo evidencian un marcado grado de estructuración poblacional, con muy bajos valores de flujo génico entre regiones. El valor de Φst encontrado con el marcador neutro (D-loop) fue de 0,181 (p=0,001), mientras que el valor de Fst encontrado con los microsatélites fue de 0,108 (p=0,001), relativamente inferior, pero igualmente ambos valores muestran una estructuración genética-espacial significativa. Cuando se analizaron a las subpoblaciones dentro de la REGION NORTE y REGION SUR, se observó que el flujo génico dentro de la REGION NORTE es superior al de la REGION SUR, la cual se encuentra fuertemente estructurada. Este patrón se corresponde tanto con el marcador mitocondrial (en donde se dividió a la REGION NORTE en 2 subpoblaciones y a la REGION SUR en 4) como con los microsatélites (REGION NORTE formada por 2 subpoblaciones y la REGION SUR sin subpoblaciones). Si bien cuando se analizó la estructura genético-poblacional utilizando los microsatélites se definieron 3 subpoblaciones y no 6 como con el D-loop, los valores de Fst dentro de la REGION NORTE siempre fueron inferiores a los valores de Fst entre las subpoblaciones del Norte con las de Sur. Además, la REGION SUR fue la única que presentó un

valor de Fis positivo y significativo, indicando grandes niveles de endogamia (esto también se ve sustentado en los valores de Φst encontrados (con ADNmt) entre las subpoblaciones de la REGION SUR). Finalmente, los resultados permiten concluir que la REGION SUR se encuentra formada por pequeñas subpoblaciones o *demes* aislados entre sí, generando una población endogámica, con alelos y haplotipos únicos mientras que la REGION NORTE presentaría un flujo génico mayor. Este mayor flujo génico (y dado que no se observaron tuqueras entre las subpoblaciones E y F) podría deberse a que los individuos de la subpoblación F probablemente provengan de la subpoblación E y hayan sido "arrastrados" en esos movimientos de tierra, con lo cual la subpoblación F habría surgido a partir de la subpoblación E. Las diferencias registradas en los índices entre los marcadores moleculares podrían deberse a las distintas tasas de mutación de los marcadores. Las tasas de mutación estimadas para el ADN mitocondrial son del orden de 10^{-8}–10^{-9} por sitio por generación (Su *et al*. 2001) y para microsatélites oscilan entre 10^{-3}–10^{-4} (Matocq 2004). Como se mencionó en el Capítulo 2, los marcadores mitocondriales son usualmente utilizados para inferir patrones demográficos históricos, mientras que los *loci* de microsatélites estiman patrones demográficos recientes (Dionne *et al.* 2008; Lada *et al.* 2008), con lo cual, estos resultados indicarían que el flujo entre las regiones es mayor en la actualidad que en el pasado.

No existen estudios ni trabajos previos publicados sobre la estructura genético-poblacional de *C. magellanicus*, por lo cual los resultados obtenidos debieron ser comparados con otras poblaciones de tucos. En la mayoría de las especies estudiadas, se encontró una fuerte estructura genético-espacial. Por ejemplo, en *C. porteusi* Mapelli (2010) encontró valores de Fst entre dos poblaciones separadas por 10 km de 0,16 y 0,11 para el D-loop y los microsatélites respectivamente. En el *Grupo "perrensi"*, Mirol *et al.* (2010) utilizaron microsatélites y también encontraron una fuerte estructuración poblacional, con valores de Fst oscilando entre 0,04 y 0,87; si bien este grupo está compuesto por tres especies (*C. roigi*, *C. perrensi* y *C. dorbignyi*), se encontraron 8 subpoblaciones, algunas conectadas entre sí (valores bajos de Fst) y por lo tanto se produce hibridización y otras subpoblaciones que permanecen aisladas (valores altos de Fst) donde puede ocurrir divergencia genética. Dada las discontinuidades de hábitat entre los sitios de muestreo, la poca movilidad de los roedores subterráneos y considerando los valores de estructuración genético-poblacional reportados para otros tucos a pequeña escala geográfica (*Ctenomys flamarioni* en Fernández-Stolz *et al.* 2007 y *Ctenomys australis* en Mora *et al.* 2010), *C. magellanicus* presentó un grado de estructuración genético-poblacional semejante al de otras poblaciones de tucos.

Los resultados de este estudio soportan el marco teórico descripto en la introducción y coinciden con otros autores. En particular, la población de tucos presentó (A) subpoblaciones con poca variación genética y alta divergencia interpoblacional como en *C. rionegrensis* (Wlasiuk *et al*. 2003) y *C. australis* (Mora 2008), (B) poblaciones con marcada estructuración espacial (Busch *et al.* 2000; Lacey 2000; Mora *et al.* 2007) y (C) distribución discontinua como en *C. australis* (Mora *et al.* 2006) y *C. talarum* (Mora *et al.* 2007). La población de *Ctenomys magellanicus* de Tierra del Fuego muestra claramente el denominado "Efecto Wahlund", dado que se observó en la REGION NORTE pocas subpoblaciones (dos) con reducido número de haplotipos (tres) y flujo génico entre ambas subpoblaciones y en la REGION SUR un mayor número de subpoblaciones (cuatro) con mayor número de haplotipos (seis) y flujo génico más restringido entre las subpoblaciones. Si bien en la REGION SUR hay mayor endogamia que en la REGION NORTE y por lo tanto uno esperaría encontrar menor variabilidad, la mayor cantidad de haplotipos encontrados en la REGION SUR (mayor variabilidad haplotípica) podría deberse a la presencia de haplotipos raros, característicos de poblaciones que presentan altos niveles de endogamia.

No se detectó un patrón de Aislamiento por Distancia (APD) ya que la distancia genética (valores de Fst) no presentó ninguna relación con la distancia geográfica. Se registraron subpoblaciones cercanas geográficamente pero con valores muy altos de Fst y subpoblaciones más distanciadas y con valores de Fst más bajos. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en la naturaleza, ya que en la REGION SUR se registraron valores altos de Fst entre las cuatro subpoblaciones, observándose en el paisaje un ambiente más heterogéneo, con numerosos parches aislados entre sí, mientras que en la REGION NORTE el valor de Fst entre ambas subpoblaciones fue mucho menor y no significativo, siendo un ambiente más homogéneo con tuqueras más cercanas entre sí. Si bien, en especies con capacidades dispersivas restringidas que presentan equilibrio entre deriva y mutación, se espera una correlación entre la distancia genética entre pares de poblaciones y la distancia geográfica que las separa, es decir un patrón de APD (Kittlein y Gaggiotti 2008), la ausencia del mismo podría ser interpretado de varias formas: 1) como evidencia de falta de equilibrio, porque las especies recientemente colonizaron la actual distribución (Slatkin 1993) o expandieron su área de distribución y/o colonización de nuevos hábitats (Wlasiuk *et al.* 2003; Mora *et al.* 2006), 2) cuando el rango de expansión es aún más gradual, el patrón de APD entre *demes* cercanos puede llegar a ser demasiado débil para ser detectado o 3) por la existencia de un factor ambiental (inundaciones, sequías, epidemias) que afecte la relación entre la distancia geográfica y la genética. Sin duda, los resultados obtenidos en esta tesis demostrarían que la

ausencia de un patrón de aislamiento por distancia podría deberse a que *Ctenomys magellanicus* estaría expandiendo su área de distribución (tal como fuera registrado por Mora *et al.* 2006 y Mora 2008 para *C. australis*). Esto sugiere que la especie se encuentra lejos de llegar a un equilibrio entre flujo génico y deriva genética, habiendo colonizado su actual área de distribución en un pasado muy reciente (Wlasiuk *et al.* 2003).

Es importante destacar que entre la REGION NORTE y la REGION SUR se encuentra el Río Grande, uno de los ríos más importantes de TDF y de mayor caudal y que representaría una barrera geográfica en el pasado ya que se observa bajo flujo génico a nivel mitocondrial entre ambas regiones mientras que con microsatélites el flujo entre las regiones sería mayor. Por lo tanto, estos resultados indican que en la actualidad el río no representaría una barrera al flujo génico como lo era en el pasado.

CAPÍTULO 5

La especie invasora:

Castor canadensis

INTRODUCCION

El problema de las especies exóticas invasoras

En la antigüedad, las primeras introducciones intencionales de especies exóticas acompañaron a las primeras migraciones humanas; sin embargo, la magnitud y frecuencia de estas primeras introducciones era menor en comparación con las actuales, asociadas con el comercio mundial y el movimiento de personas. Actualmente, las especies exóticas invasoras son la segunda causa de amenaza y extinción de especies, precedida tan sólo por la pérdida de hábitat (IUCN 2011). Entre los vertebrados introducidos, las ratas son conocidas por ser invasores extremadamente eficientes; se han introducido en más del 80⁄ de las islas del mundo, siendo *Rattus rattus* una de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo según la UICN (Lowe *et al.* 2004). La introducción de especies por parte de los seres humanos es un proceso global que ha estado ocurriendo por varios siglos o incluso milenios. No obstante, la tasa y extensión actual de las introducciones, junto con la alteración a gran escala de los hábitats, amenaza con producir una biota planetaria cada vez más homogénea (McKinney y Lockwood 1999), aún cuando a nivel local y regional las introducciones puedan incluso aumentar la riqueza de las especies (Sax y Gaines 2003).

Según la UICN, las introducciones pueden ser accidentales o intencionales. Las introducciones accidentales pueden ser debido a fugas/escapes o por causas naturales, mientras que las intencionales pueden ser con fines económicos, comestibles, deportivos, estéticos, paisajísticos y/o culturales (UICN 2011). Si bien existen numerosos casos de introducciones de especies, no todas son exitosas. La carencia de pre-adaptación a un nuevo clima, disturbio, competencia o depredación por las especies nativas y las enfermedades, a menudo son citadas como las razones para que las invasiones fallen (Moyle 1986; Sakai *et al.* 2001; Allendorf y Lundquist 2003). Si bien la mayoría de las especies introducidas no se establece de manera permanente o tiene muy pocos efectos sobre los ecosistemas, muchas otras especies sí lo hacen y su impacto, siempre perjudicial, puede ser sumamente variable pero en la mayoría de estos casos se transforman en invasoras. Algunos de los ejemplos de las invasiones más exitosas a nivel mundial son: hormiga argentina (*Linepithema humile*), jabalí (*Sus scrofa*), jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), ligustro (*Ligustrum robustum*), ciervo (*Cervus elaphus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), almeja asiática (*Potamocorbula amurensis*), rata negra (*Rattus rattus*), entre otros (Lowe *et al.* 2004).

Los procesos evolutivos y genéticos pueden ser factores clave para determinar si una especie invasora se establece y esparce. En la etapa temprana del proceso de invasión se introduce diversidad genética desde el rango nativo de las especies y por lo tanto, se espera que las poblaciones introducidas presenten una variación genética reducida con respecto a las poblaciones en su rango nativo (Sakai *et al.* 2001; Kolbe *et al.* 2004; Frankham 2005). Entre los principios genéticos que pueden ayudar a determinar el grado de invasividad de una especie introducida pueden citarse: hibridación, auto-fertilización, deriva genética, numerosas invasiones, selección natural y adaptación (Ellstrand y Schierenbeck 2000; Tsuitsui *et al.* 2000; Allendorf y Lundquist 2003). Es importante destacar que existe un dilema genético en cuanto a las invasiones biológicas ya que generalmente sufren un efecto de cuello de botella o efecto fundador que típicamente llevaría a las poblaciones a presentar una baja variabilidad genética, un bajo potencial evolutivo y potencialmente un bajo fitness reproductivo y sin embargo, las poblaciones se convierten igualmente en invasoras exitosas (Frankham 2005). Algunas soluciones a este dilema incluyen: especies asexuales o con auto-fertilización (Sakai *et al.* 2001), especies con alta tasa reproductiva, especies que pueden purgar los alelos deletéreos que causan la depresión por endogamia y especies que presentan una alta tasa de migración con repetidas introducciones (Frankham 2005). Por ejemplo, cuando la invasión se produce en distintos eventos migratorios, es decir cuando se introduce a la especie varias veces en el mismo lugar, la variabilidad de la especie invasora será muy alta inclusive aún mayor a la detectada en sus poblaciones de origen (Frankham 1997; Sakai *et al.* 2001; Kolbe *et al.* 2004). Muchas especies exóticas, plantas en particular, poseen auto-fertilización e incluso de forma asexual, con lo cual un efecto cuello de botella puede ser muy severo y por lo tanto, la probabilidad de una divergencia evolutiva es mínima. Sin embargo, la reducción en la diversidad genética de las poblaciones introducidas frecuentemente es modesta (Sakai *et al.* 2001). Por ejemplo, una revisión de 29 estudios con animales demostró un promedio de reducción de la heterocigosidad de sólo el 17⁄ (Wares *et al.* 2005). Es importante destacar que la reducción en la diversidad genética puede llevar a la depresión endogámica limitando el crecimiento de la población y la habilidad de la población para evolucionar (Nieminen *et al.* 2001). Aún en plantas con auto-fertilización, las poblaciones introducidas pueden presentar disminuciones en la diversidad génica que son mínimas, o incluso, si se producen múltiples eventos de introducción, podría no haber reducción alguna en la heterocigosidad.

Algunas especies introducidas muestran un decrecimiento antes de que se produzca la rápida expansión; esto puede ser debido a una etapa temprana de crecimiento exponencial, a extinciones estocásticas de los propágulos o a la adaptación genética al nuevo ambiente (Sakai

et al. 2001), es por esto que es imprescindible y deseable eliminar a las especies invasoras antes de que se adapten al ambiente y antes de que sucedan nuevas invasiones (Kolbe *et al.* 2004). Para comprender las amenazas que plantean las especies invasoras los estudios genéticos han demostrado ser una herramienta muy útil y es por ello que se han realizado diversos estudios genéticos en poblaciones invasoras (Tsuitsui *et al*. 2000; Lee 2002; Kolbe *et al.* 2004; Lindholm *et al.* 2005; Darling y Blum 2007; Zalewski *et al.* 2009; Abdelkrim *et al.* 2010, entre otros). Por ejemplo, los marcadores genéticos han sido utilizados para identificar especies introducidas dentro de grupos de especies crípticas y han ayudado a clarificar los orígenes geográficos de las introducciones (Carvalho *et al.* 2009), también pueden ser utilizados para medir la cantidad de diversidad genética en la población invasora, las rutas de migración/invasión (Vellend *et al.* 2007) y la estructura genético-espacial y los patrones de flujo génico (Azurro *et al.* 2006; Lecis *et al.* 2007; Rusell *et al.* 2009; Abdelkrim *et al.* 2010;entre otros). Estos últimos han sido utilizados para entender la dinámica poblacional de las especies con el objetivo de fortalecer las decisiones en el manejo de las especies exóticas y detectar las Unidades de Erradicación (Robertson y Gemmell 2004; Abdelkrim *et al.* 2005), que son poblaciones conectadas entre sí y que por lo tanto deben ser erradicadas simultáneamente para evitar la recolonización (ver Capítulo 1). Como se presentó en el Capítulo 1, el castor es una de las especies exóticas de Tierra del Fuego que genera mayores inconvenientes a nivel ecológico y económico, con lo cual en este Capítulo se estudiará la variabilidad genética y la estructura genética-poblacional para poder detectar posibles Unidades de Erradicación.

Aspectos Históricos: Introducción y Colonización del Archipiélago de Tierra del Fuego

La historia de la introducción de mamíferos silvestres en Argentina es caótica dado que, lejos de cumplir el objetivo de su importación, las especies introducidas se establecieron siempre produciendo serios perjuicios (Lizarralde y Escobar 2000). Si bien al Archipiélago de Tierra del Fuego se lo considera una de las últimas zonas silvestres prístinas y remotas del mundo, no ha escapado al patrón global de invasión de especies exóticas, en donde algunas son consideradas dañinas (Lizarralde y Escobar 2000; Anderson *et al.* 2006). La introducción de especies es uno de los temas más discutidos en ecología desde el trabajo de Elton (1958) ya que es de gran relevancia para la conservación biológica, debido a la pérdida de biodiversidad que ocasiona (Sala *et al.* 2000; Vázquez 2002) y los grandes costos económicos que genera (Pimentel *et al.* 2000; Curtis y Jensen 2004).

Dentro de las innumerables especies que han sido introducidas de hábitats foráneos, alrededor del 10% tienen la capacidad de aumentar su población, representando un éxito de

invasión (Kolar y Lodge 2001), el *Castor canadensis* es una de ellas. Los ecosistemas insulares, que han evolucionado aislados, a menudo tienen pocas plantas, herbívoros, carnívoros y descomponedores para sustentar los procesos esenciales, y por lo tanto son los más vulnerables a una invasión (Lever 1994).

En noviembre de 1946, 25 parejas de *Castor canadensis* provenientes de Canadá, fueron liberadas en el sector noreste del Lago Fagnano (Río Claro) en la parte Argentina de Tierra del Fuego (Lizarralde 1993). Dicha introducción se realizó con la finalidad de su aprovechamiento comercial en la industria peletera y fue avalada por el Ministerio de Marina de la República Argentina. La existencia de hábitat y recursos alimenticios adecuados, además de la ausencia de predadores y competidores naturales en la zona, facilitaron su expansión, incremento poblacional y establecimiento como una especie invasora del ecosistema austral. El avance de la especie fue detectado en numerosos sitios. En 1964 se registró la presencia de castores en la parte chilena del Lago Fagnano (extremo oeste) y a mediados de los ´60 los castores habían cruzado el Canal de Beagle, invadiendo la Isla Navarino (Anderson *et al.* 2011). La colonización del Parque Nacional Tierra del Fuego (ubicado al sur del Lago Fagnano) parece haber ocurrido durante la década del ´70, ya que no se observan colonias ni signos de impacto en las fotografías aéreas de la zona de 1970 (Lizarralde 1993). En 1979 se encontraron ejemplares en el sector de San Sebastián y más tarde, en 1986 se los observó en el área de China Creek, Puesto Calafate y Río Marazzi (Chile). La población introducida invadió progresivamente las islas vecinas de Navarino, Hoste, Picton, Nueva y Lennox (Anderson *et al.* 2009), hasta que a mediados de los ´90 alcanzan la zona continental, especialmente en la Península de Brunswick en Chile (Wallem *et al.* 2007). Hasta la fecha, no se ha confirmado la presencia de castores en las islas Wollaston (Parque Nacional Cabo de Hornos, Chile) y tampoco en la porción oeste del Archipiélago (Parque Nacional D´Agostini, Chile) (Anderson *et al.* 2006; Moorman *et al.* 2006).

Si bien en la mayoría de los estudios se ha propuesto que en la Isla Grande, el hábitat óptimo para la especie es el bosque subantártico de *Nothofagus* (Lizarralde 1993; Lizarralde *et al.* 1996, 2004, 2008a, 2008b; Martínez Pastur *et al.* 2006; Wallem *et al.* 2007; Anderson *et al.* 2009), los castores han colonizado ambientes más abiertos como el Ecotono fueguino (centro de la Isla Grande) y la estepa magallánica (Norte de la Isla Grande) (Figura 2). Esto concuerda con estudios realizados en el Hemisferio Norte en donde se ha registrado una preferencia del castor por ambientes de tipo matorral o sin vegetación leñosa (Barnes y Malik 1997; Susuki y McComb 1998).

Skewes *et al.* (1999) estimaron la velocidad de avance (lineal) del poblamiento de castores expresada en km/año considerando el año de introducción en la Isla Grande de TDF (Argentina) y luego calculando la distancia lineal hasta lugares con información sobre su aparición. Por ejemplo, la velocidad de avance desde el sitio de introducción (cuenca del Río Claro, Argentina) hasta la Estancia Fagnano fue de 3,8 km/año, mientras que en la zona norte de la Isla, los castores recorrieron 50 km en 8 años, con lo cual la velocidad de avance fue de 6,3 km/año, valor superior al resto de los ambientes estudiados. Aún cuando estas estimaciones de velocidad de avance representan sólo una aproximación, se observa que la velocidad no ha sido uniforme entre sectores; las mayores velocidades de avance se encuentran en la zona norte (6,3 km/año) y zona sur (5,7 km/año) (Skewes *et al.* 1999).

Las variaciones de velocidad entre sectores pueden ser explicadas en función de las principales dimensiones de nicho de la especie, como riqueza hídrica (refugio y traslado) y boscosa (alimento). La mayor velocidad de avance se verifica en el norte de Tierra del Fuego, en donde estas condiciones serían las más desfavorables, tanto por su pobreza boscosa como por su carácter estepario. Esta aparente contradicción puede encontrar explicación por un lado en la relativa alta cantidad de cursos de agua del sector que suman 2.042 km lineales contra 1.711 km de la zona central y de 3.630 km de la zona suroeste y boscosa (Coronato *et al.* 2003). Por otro lado, el rápido avance en la zona norte podría deberse a las bajas condiciones forrajeras y a las dificultades para la construcción de castoreras (en este sector sólo hay arbustos de pequeño tamaño) que llevaron a los castores a la búsqueda de mejores ambientes. Esta situación de movilidad, no se presentaría en la zona sur donde el castor dispone de abundante forraje arbóreo. Los bajos valores de densidad poblacional detectados para la zona norte, aún cuando contiene una importante red hidrográfica, indican que la sola presencia de los cursos de agua no es suficiente para el establecimiento masivo del castor (Skewes *et al.* 1999). La ausencia de bosque es uno de los factores limitantes de su avance. Por ejemplo, Briones *et al.* (2001) constataron asociaciones entre pendiente, vegetación ribereña, ancho del curso de agua y composición arbórea de las riberas para establecimiento de castor. Si bien en Suecia, la velocidad y patrón de dispersión del castor europeo (*Castor fiber*) está principalmente asociada a las cuencas hidrográficas (Hartman 1995), en Tierra del Fuego la ausencia de éstas no es un impedimento para el establecimiento del castor (Skewes *et al.* 1999).

El límite norte de la distribución en Tierra del Fuego habría sido alcanzado, probablemente acotado por la escasa biomasa vegetal asociada a los cursos de agua. Su límite altitudinal está dado por la presencia de vegetación, especialmente arbórea. El castor habita hasta las mismas

desembocaduras de los ríos, encontrándose castoreras en ríos a menos de 50 metros del mar. Su eventual presencia en agua salobre es posible y explicaría la colonización de las islas del Archipiélago (Ramírez Silva 2006). Desde la Isla Dawson se prevé el mayor riesgo de avance del castor hacia el continente, no sólo porque desde la misma se accede hacia el continente desde la distancia más corta, también por la alta densidad poblacional en Dawson y fundamentalmente porque desde 1994 se registra la presencia de castores (aunque en forma azarosa) en la zona de Península de Brunswick, sobre el área continental de Chile (Lizarralde *com. pers*.).

Respecto de la colonización del sur del continente, debe considerarse que la expansión de castor en zonas vírgenes es del tipo secuencial, lo que significa que se encuentran individuos nuevos en sitios muy distantes del área de origen. La falta de depredadores en la zona podría ocasionar cambios conductuales (por ejemplo aumentar el tiempo de forrajeo), permitiendo que los castores ampliaran su ámbito de hogar y por lo tanto que una colonia explote mayores áreas de bosque (Wallem *et al.* 2007). Sin embargo, la presencia en las zonas continentales de un gran depredador como el puma (*Felis concolor*), podría contribuir a frenar su avance y también a disminuir las posibilidades de desplazamiento tanto para forrajeo como para la construcción de refugios de castor. Los cambios comportamentales en los individuos de las poblaciones invasoras con respecto a las nativas no se ha realizado para castor y sería interesante hacerlo.

A pesar de que en el año 1983 el Gobierno de la Provincia de Tierra del Fuego comenzó a regular la caza comercial de castores y que se realizaron y realizan diversas campañas de control, la especie se expandió rápidamente por todo el Archipiélago Fueguino, ocupando más del 98⁄ de las cuencas de la Isla Grande y alcanzando una abundancia aproximada de 100.000 ejemplares (Lizarralde *et al.* 2004, 2008a, 2008b). Si bien no existe información precisa sobre el desarrollo de la invasión durante los últimos años, puede afirmarse que en la actualidad la dinámica de ocupación incluye la reocupación de sitios abandonados debido a la colmatación de los embalses, la colonización de partes altas de cuencas en la zona andina (no utilizadas en los períodos iniciales de la colonización) y la dispersión hacia zonas de estepa (Escobar com. pers.). Debido al impacto que produce en todo el archipiélago, el castor es considerado una especie invasora dañina y organismos gubernamentales de Argentina y Chile, organizaciones conservacionistas e investigadores están interesados en implementar y evaluar medidas que conduzcan a su erradicación del extremo austral de América del Sur. Con este panorama, es

fundamental diseñar un plan de manejo o control efectivo en donde se evite que el castor colonice nuevos sitios, especialmente en el continente.

Aspectos biológicos de *Castor canadensis*

El castor es el segundo roedor más grande en tamaño después del carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*), taxonómicamente pertenece a la familia Castoridae dentro del orden Rodentia. En la actualidad existen 2 especies vivientes con diferente distribución: *Castor canadensis* en Norteamérica y *Castor fiber* en Eurasia. La distribución nativa del *C. canadensis* va desde Alaska hasta el Golfo de México (Müller-Schwarze y Sun 2003) aunque se ha introducido la especie en otras regiones como por ejemplo la Península Escandinava, Finlandia y Tierra del Fuego (Figura 24). Como consecuencia de la introducción de *C. canadensis* en Europa, *C. fiber* se encuentra en la actualidad desplazado en ciertas regiones (Durka *et al.* 2005).

Los castores se caracterizan por construir diques asociados a cursos de agua que forman estanques y madrigueras en la parte central de estos cuerpos de agua, donde se alojan y almacenan alimentos. Debido a los cambios que realiza en el ecosistema, se lo considera un ingeniero en ecosistemas y una especie clave (Lizarralde 1989, 1993; Lizarralde *et al.* 2008b; Anderson *et al.* 2009), alterando la dinámica y estructura de un ecosistema más allá de sus requerimientos inmediatos de comida y espacio (Naiman *et al.* 1986; Wright *et al.* 2002). Los castores no presentan dimorfismo sexual, los órganos sexuales son internos, con lo cual la detección del sexo es por palpación (en el caso de los machos) y en la época de lactancia (en el caso de las hembras). En el Archipiélago Fueguino, el período reproductivo comienza en Junio y se extiende hasta Septiembre, con un período de gestación de 90 a 100 días (Lizarralde y Escobar 1999). Las crías se empiezan a observar entrada la primavera. El número medio de la camada es de 3,37 animales, con un rango de 3-7 crías. No se conocen evidencias de que tengan más de una camada por año (Lizarralde *et al.* 1996; Lizarralde y Escobar 1999). En Tierra del Fuego, el peso de los adultos es de entre 14 y 30 kg, registrándose un promedio de 17,88 ± 7,51 kg. El largo total máximo es de 120 cm, con una media de 101,85 ± 7,48 cm. La característica más notable de la especie es la cola aplanada en forma de remo, la cual puede alcanzar 23-33 cm de largo y 11-18 cm de ancho (Figura 25).

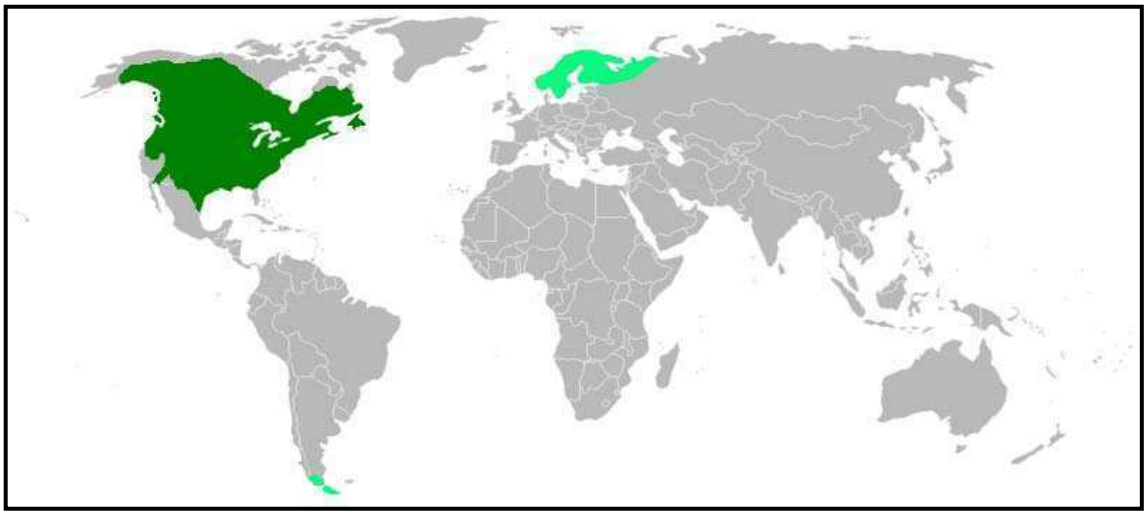

Figura 24. Distribución nativa y exótica de *Castor canadensis*. En verde oscuro se detalla la distribución nativa. En verde claro la exótica.

En cuanto a la organización social, la colonia está constituida por un grupo o familia que ocupan un estanque o una sucesión de varios estanques en un curso de agua y utilizan un área alimenticia común: el "comedero". El número de animales por colonia se estima en 5 individuos (rango 4-6) (Lizarralde *et al.* 1996). Son monógamos y la colonia o madriguera se encuentra constituida por la pareja de padres, las crías menores de 2 años y las nacidas durante dicho período (Figura 26). Es importante destacar que el número y composición de la colonia puede variar de acuerdo a la calidad del hábitat; registrándose colonias de mayor tamaño en la zona boscosa y de menor tamaño en la estepa (Lizarralde *obs. pers.*).

Figura 25. Ejemplar de *Castor canadensis*.

Lizarralde (1993) y Briones *et al.* (2001) informaron para la Isla Grande un rango de densidades de colonias de entre 0,2 y 5,8 colonias/ km, mientras que en la Isla Navarino la densidad de colonias fue de 1,1 colonia/km (Skewes *et al.* 2006). En comparación, las densidades descritas para el Hemisferio Norte están entre 0,08 y 1,4 colonias/km (Robel y Fox 1993), valores muy inferiores a los encontrados en Tierra del Fuego. Esto indicaría que los castores en TDF carecen de factores de control presentes en su hábitat natural.

Figura 26. Madriguera de castor en la estepa. Estancia Sara, Tierra del Fuego.

La alimentación es exclusivamente vegetariana e incluye fundamentalmente corteza, hojas y ramas de especies leñosas. Son herbívoros generalistas que consumen al menos 80 especies leñosas y 149 plantas herbáceas en su rango nativo (Collen y Gibson 2001). Estas plantas le aportan tres usos diferentes: 1) una fuente directa de alimento, 2) una reserva de alimento para el invierno y 3) material de construcción de madrigueras y diques (Busher 1996). En Tierra del Fuego, la dieta de verano de los castores está principalmente compuesta por especies herbáceas mientras que en invierno predominan las especies leñosas (Castillo 2006). El ñire (*Nothofagus antartica*), la lenga (*N. pumilio*), el guindo (*N. betuloides*) y arbustos de los géneros *Pernettya, Berberis, Chiliotrichum y Juncus* constituyen las principales especies vegetales sobre las que forrajean los castores en Tierra del Fuego (Ramírez Silva 2006). Según un estudio de Mella *et al.* (1995), *Nothofagus pumilio* fue el único alimento que se consumió en mayor proporción que su disponibilidad natural, mientras que *Drimys winteri* y *Mayenus magellanica* parecen ser evitados (Wallem *et al.* 2007). Estas preferencias alimenticias se corresponden en general con el patrón de colonización que muestra el castor en el

archipiélago. Las zonas más meridionales en las islas Wollaston (Parque Nacional Cabo de Hornos) y occidentales (PN Alberto D´Agostini) de la región insular continúan aparentemente libres de castores (Anderson *et al.* 2006; Moorman *et al*. 2006) y esto podría estar relacionado a que estas zonas carecen de *N. pumilio*.

La tala de árboles y arbustos en TDF es más intensa durante el otoño (Figura 27), cuando el material es trozado y almacenado bajo el agua, en cercanía a la madriguera, como reservorio alimenticio para el invierno y constituyendo los "comederos" (Lizarralde y Escobar 1999). La dentadura de los castores se caracteriza por sus incisivos largos, agudos y fuertes, lo que les permite voltear árboles de más de 1 metro de diámetro. Además, sus labios pueden cerrarse por detrás de los incisivos, por lo que pueden roer debajo del agua (Massoia y Chébez 1993; Müller-Schwarze y Sun 2003).

Figura 27. Izq: Ejemplar de *Nothofagus pumilio* en proceso de ser derribado por los castores. Der: Tronco de lenga en forma de "Punta de lápiz".

Efectos de modificación en el ecosistema fueguino

La habilidad para construir diques y expandir el área inundada, aumenta la cantidad de hábitat disponible y el abastecimiento de alimentos, además ofrece protección contra depredadores, como puede ser *Canis lupus* (lobo) en el Hemisferio Norte y potencialmente los zorros (*Pseudalopex culpaeus lycoides*) en el Hemisferio Sur. Si bien no se ha encontrado que el castor

sea parte de la dieta de los zorros (Jaksic *et al.* 1983), se ha documentado la presencia de cicatrices en castores de la Isla Grande (Andrade 2005).

Los diques construidos por castores (Figura 28) cambian el régimen de descarga anual de un río, disminuyen la velocidad de la corriente otorgándole un gradiente escalonado, expanden áreas de suelos inundados y aumentan la retención de sedimentos y materia orgánica (Naiman *et al.* 1988). Según el Estudio de Impacto Ambiental del Proyecto Río Cóndor (Chile, 1997), citado por Iriarte (2000) y el Programa de Control del Castor americano (APN 2006), la introducción del castor ha traído diferentes consecuencias para los ecosistemas de Tierra del Fuego. Entre los efectos negativos más importantes sobre los ecosistemas fueguinos se destacan: 1) la destrucción del bosque de ribera, lo cual produce la desestabilización del suelo y marcados efectos erosivos en el resto del bosque; 2) la alteración al régimen de luz por apertura de claros, las laderas quedan expuestas a los efectos erosivos del viento y la lluvia y a la fuerte insolación, modificando el microclima de esas superficies; 3) la modificación de la estructura del hábitat y de la biota acuática; 4) la expansión de humedales, valles y vegas húmedas por los cambios en el drenaje y en la profundidad de la napa freática; 5) cambios en la temperatura, nutrientes y flujo de agua, lo que afecta negativamente a las especies nativas de peces y 6) acumulación de sedimento y materia orgánica, modificando los principales ciclos de nutrientes de las cuencas y áreas de ribera (Lizarralde *et al.* 1996, 2004). Estas alteraciones ecológicas permanecen como parte del paisaje por décadas o siglos, incluso indefinidamente. Los residuos vegetales provenientes de la tala de especies y la posterior erosión de las zonas deforestadas, provocan una acumulación de productos orgánicos e inorgánicos que enriquecen y acidifican la composición química del agua, el suelo del estanque y su zona de influencia (Lizarralde *et al.* 1989). Asimismo, se produce un gravísimo impacto sobre la dinámica natural del bosque, ya que el poder de recuperación del mismo en las zonas inundadas es muy bajo. La regeneración natural debe competir con especies herbáceas de sotobosque de dinámica más agresiva, que suelen colonizar exitosamente las superficies desprovistas de árboles (Lencinas *et al.* 2001). Es importante destacar que si bien las comunidades bióticas del archipiélago austral son relativamente pobres respecto de la mayoría de los grupos taxonómicos grandes (vertebrados terrestres y plantas vasculares), las plantas no vasculares son una excepción importante con una diversidad relativamente alta (Goffinet *et al.* 2006; Rozzi *et al*. 2008).

Figura 28. Dique de castor ubicado en la ecorregión Bosque subantártico, Tierra del Fuego (Argentina).

Los impactos negativos producidos por el castor, se reflejan en las cuencas que ocupa, como la pérdida de árboles y modificación del suelo, ya sea por la acción directa sobre ellos (fuente de alimentación o derribo de árboles para construir el dique), como de manera indirecta por la inundación de que son objeto (Figura 29). Los bosques de *Nothofagus* representan el ecosistema más afectado, especialmente los bosques productivos de *N. pumilio* puesto que la lenga representa el recurso alimenticio principal del castor en TDF. En toda la Patagonia, los bosques de *N. pumilio* y *N. betuloides* se adaptan a alteraciones de gran escala, como por ejemplo incendios, caídas por los vientos o deslizamientos de terreno, pero parecen ser extremadamente vulnerables a la invasión de castores (Silva y Saavedra 2008).

Otro disturbio notable se observa en los caminos, alcantarillas, puentes y cercos, los cuales se ven regularmente interrumpidos, debilitados y cortados por la acción del castor (Nolte *et al.* 2005). La dinámica de uso, agotamiento y abandono de los sitios ocupados por castores se asocia, posteriormente, con la colonización de especies vegetales muchas veces exóticas al sitio. Por otro lado, la fauna asociada a estos ambientes alterados puede verse impactada en forma indirecta, como por ejemplo, el pato de los torrentes (*Mergannetta armata*) que podría haber sido desplazado a las zonas más altas de los ríos y arroyos (Massoia y Chébez 1993).

Figura 29. Castorera abandonada. Se destaca el bosque inundado y los árboles muertos de pie.

Entre los impactos positivos cabe destacar la generación de ambientes para la residencia de peces y aves, especialmente del Orden Anseriformes, que también aprovechan los islotes como refugio para la reproducción así como también la apertura de parches en el bosque denso, los que actúan como claros y favorecen el crecimiento de renovales y el anidamiento de aves migratorias (Silva y Saavedra 2008). Por ejemplo, Wright *et al*. (2002) encontraron que las modificaciones en el hábitat generadas por el castor, aumentaron un 33⁄ el número de especies de plantas herbáceas de la zona ribereña de Estados Unidos. Por último, se estima que en poco más de medio siglo, el castor americano ha modificado cerca de 25.000 ha de bosque o el equivalente de la biomasa de bosques transformada para la agricultura (Lizarralde 1993).

A pesar de que los castores generan grandes impactos económicos y ecológicos en Tierra del Fuego, se conoce muy poco sobre la genética de poblaciones de esta especie invasora en el ATDF (Lizarralde *et al.* 2008a). En la actualidad, la información genética de las poblaciones y su estructura genético-poblacional podría servir para distinguir diferentes unidades poblacionales, muy útiles para delimitar la escala de los programas de control de especies invasoras en grandes áreas (Abdelkrim *et al.* 2010). Por ejemplo, si el flujo génico es limitado entre las subpoblaciones, se pueden realizar controles locales más intensivos y puntuales a escalas más pequeñas; por el contrario, si el flujo génico entre subpoblaciones es significativo, sugiriendo una población continua, se deberán realizar controles regulares en todo el área para mantener a la población invasora en bajas densidades. En este último caso, la erradicación es prácticamente imposible. Por lo tanto y de acuerdo a lo descripto en el Capítulo 2 y 3, los objetivos de este capítulo son: 1) cuantificar los niveles de variación genética intra e interpoblacional en *Castor canadensis* y 2) estudiar la estructura genético-poblacional en *Castor canadensis*. Para ello, los objetivos específicos son: 1) dilucidar la estructura y variabilidad genética de la población invasora combinando análisis de secuencias de D-loop (ADN mitocondrial) y microsatélites (ADN nuclear) y 2) determinar el flujo génico entre las subpoblaciones de castor del ATDF. Para ello la hipótesis es: 1) la población invasora presenta una estructuración genético-poblacional significativa con baja variabilidad genética. Las predicciones serán: 1) las subpoblaciones que se encuentren en las islas aledañas serán más diferentes genéticamente con respecto a las de la Isla Grande que las subpoblaciones que se encuentran dentro de la Isla Grande y 2) dado que es una especie invasora y que la población de castores del ATDF partió de una sola invasión de 25 parejas, la variabilidad genética será baja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y obtención de las muestras

El área de estudio es el Archipiélago Fueguino, incluyendo el sector Argentino y el Chileno (Ver Capítulo 2). Dado que la especie es invasora en Tierra del Fuego numerosos castores fueron colectados por personal de la Dirección de Recursos Naturales (DRN), por cazadores habilitados y por personal del PNTDF con trampas de captura muerta (Conibear) o con armas de fuego. Las trampas de captura muerta tipo Conibear 330 son diseñadas específicamente para el trampeo de castor, resultando sumamente selectivas y con un alto grado de eficiencia que cumplimenta los criterios de mejores prácticas y la normativa ISOTC191 (Lizarralde *et al.* 1996; Lizarralde y Elisecht 2002). Una de las principales ventajas es que permite capturar animales sin modificar el embalse, minimizando la pérdida de sedimentos y nutrientes y favoreciendo la recolonización vegetal. Entre otras ventajas, se destaca la mayor efectividad de trampeo; el menor tiempo hombre (el tiempo necesario para su colocación no supera los 30 minutos) y el trampeo adecuado a las normas internacionales de caza, que evita el sufrimiento innecesario de los animales y resguarda la seguridad de las personas (Lizarralde y Elisetch 2002). Las capturas con armas de fuego en general se realizan al atardecer, donde la probabilidad de ver ejemplares en actividad es mayor, rompiendo sectores del dique con el objeto de disminuir el nivel del embalse y obligar al castor a salir de su escondite para reparar los daños, quedando expuesto a la vista del cazador. Es importante destacar que esta metodología es muy poco eficiente y en nada comparable al trampeo con Conibear (Lizarralde y Elisetch 2002).

Las muestras de tejido para el estudio molecular (hígado, bazo, músculo y piel seca) fijadas en etanol:metanol (1:1) o preservadas a -20°C, fueron obtenidas de muestreos del proyecto o cedidas por cazadores habilitados por la Secretaría de Medio Ambiente de la provincia de Tierra del Fuego y personal de la Asociación Parques Nacionales (APN). Muestras procedentes del sector Chileno, Isla Dawson, y sectores de Península Brunswick, fueron cedidas por Nicolás Soto (SAG, Chile), Derek Corcorán (Universidad Católica de Chile) y Claudio Moraga (Wildlife Conservation Society, WCS). Todas las muestras fueron georreferenciadas, a excepción de las de los cazadores en donde la localización fue estimada a partir de los datos cedidos por los mismos cazadores (Figura 30). Todas las muestras de tejido de castor se encuentran depositadas en el Banco de Muestras del Laboratorio de Ecología Molecular del Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG), UNLP.

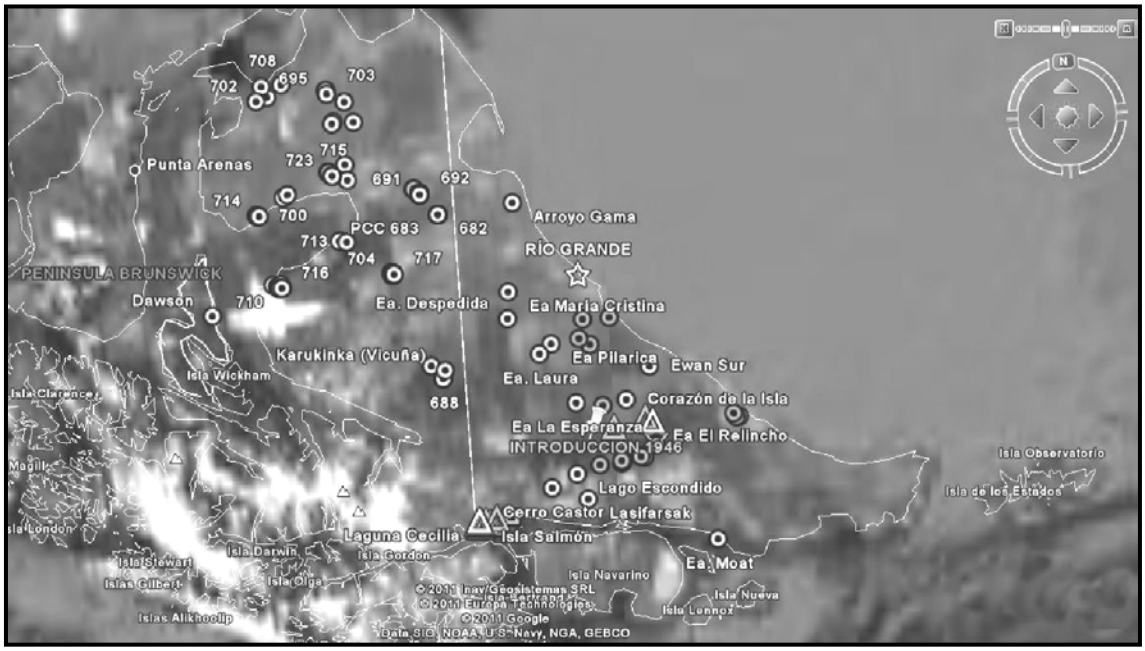

Figura 30. Ubicación geográfica de las muestras utilizadas en este trabajo. Se destaca el sitio de introducción (pinche amarillo).

Extracción de ADN

El ADN fue extraído siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.* (1989) con pequeñas modificaciones en tiempos y concentraciones según el tipo de tejido. Mientras que para las muestras más frescas (colectadas semanas antes de la extracción), se usó el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997), método de extracción donde se utilizan sales en lugar de Fenol y Cloroformo. Particularmente para las muestras de piel seca (cola), se realizó una digestión con RNAsa y precipitación con alcohol isoamílico. Los protocolos utilizados se encuentran detallados en el Anexo. El ADN precipitado, se disolvió en Buffer TE y sembró en geles de agarosa al 1⁄ para estimar su concentración (ng/µl) (Figura 31). Los stocks de ADN fueron depositados en el Banco de muestras y ADN del Laboratorio de Ecología Molecular, CREG (UNLP) a -20°C para posteriores análisis genéticos.

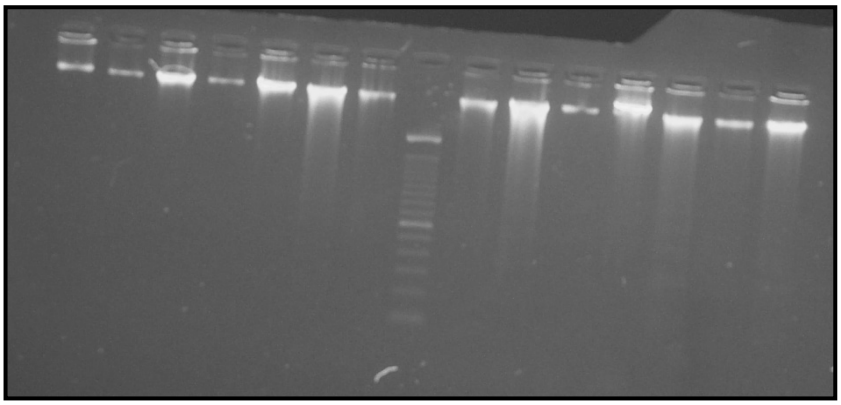

Figura 31. Gel de agarosa al 1⁄ con 14 muestras de ADN de *Castor canadensis*. El brillo de las bandas está relacionado con la concentración de ADN; a mayor brillo, mayor concentración. En el centro del gel se sembró un marcador de 100 pb.

Amplificación de ADN mitocondrial y secuenciación

Se amplificó un fragmento de D-loop (500 pb; Figura 32) utilizando los primers universales: Thr-L15926 (5´ CAATTCCCCGGTCTTGTAAACC-3´), ubicado en las proximidades del gen de la prolina tRNA, y DL-H16340 (5´CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3´), según Vilà *et al.* (1999). La reacción de PCR se llevó a cabo según el protocolo descripto en Fasanella *et al.* (2010). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo los siguientes componentes: 25-100 ng de ADN, 1x Buffer Taq Polimerasa, 1.5 mM Cl_2Mg, 200 µM de cada dNTP´s, 25 mM de primer y 1.25 U Taq Polimerasa (UNQUI, INVITROGEN). La reacción de PCR se llevó a cabo en un ciclador automático THERMO HYBAID MBS o.2S y consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. de annealing a 55-57°C, 1 minuto de extensión a 72-74°C y una extensión final a 72-74°C durante 5 minutos. Se llevaron a cabo 2 reacciones de PCR de 25 µl por cada individuo. Se purificaron los fragmentos de PCR por precipitación alcohólica y se secuenciaron ambas cadenas (forward y reverse) en MACROGEN, Inc., Corea. Las secuencias y cromatogramas fueron editados y alineados mediante el programa BIOEDIT 7.0 (Hall 1999). El alineamiento se realizó con los valores por defecto en los parámetros de alineación.

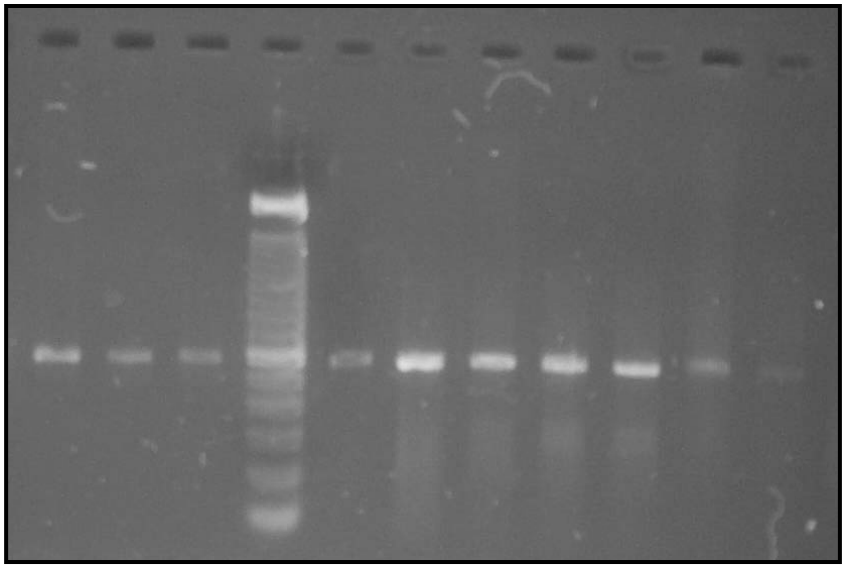

Figura 32. Fragmento de D-loop amplificado exitosamente en todas las muestras sembradas. El brillo de las bandas está relacionado con la concentración del fragmento amplificado; a mayor brillo, mayor concentración. En la cuarta calle se sembró el marcador de 100 pb, en donde se verifica que el fragmento amplificado es de aproximadamente 500 pb.

Amplificación de microsatélites y genotipado

Para los análisis de microsatélites se tomó una submuestra de 20 individuos de cada subpoblación. Se probaron 10 microsatélites diseñados específicamente para *Castor canadensis* diseñados por Crawford *et al.* (2007) [Cca4, Cca5, Cca8, Cca9, Cca10, Cca13 y Cca19] y Pelz-Serrano *et al.* (2009) [Cca56, Cca76 y Cca112]. La cadena forward de cada microsatélite presentaba un fluorocromo (HEX o FAM). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen de 15 µl conteniendo 50-100 ng de ADN, 1x Buffer Taq Polimerasa, 1.5 mM Cl_2Mg, 200 µM de cada dNTP´s, 25 mM de primer y 1.25 U de Taq Polimerasa (UNQUI). Se siguieron las condiciones de ciclado descriptas en Crawford *et al.* (2007): desnaturalización inicial 5 minutos a 95°C, 36 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 95°C, 30 seg. de annealing a 52-61 °C, 2 minutos de extensión a 74°C y una extensión final a 74°C durante 10 minutos. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos, en donde se incorporaron todos los reactivos menos la alícuota de ADN. Para establecer las condiciones óptimas de la PCR, se determinaron las temperaturas de annealing de cada microsatélite realizando (para cada microsatélite por separado) una reacción de PCR en un ciclador de tipo gradiente, en donde se amplificaron un pool de 3 muestras de ADN a distintas temperaturas (desde 44°C hasta 66°C). Se sembraron todas las reacciones en geles de agarosa al 2⁄ y se determinó la temperatura óptima de annealing de cada primer en función del tamaño y

claridad de la banda (Ver Tabla 13). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo para cada *locus* por separado. Los productos de PCR marcados con fluorescencia fueron analizados con un secuenciador de capilares ABI3100 (MACROGEN, Inc., Corea) con el estándar de tamaño 400 HD. Para la reacción en cadena de la polimerasa en secuenciador, se utilizaron diferentes combinaciones de microsatélites. Las combinaciones fueron determinados *a priori* conociendo los tamaños y el color del fluorocromo de cada microsatélite. Para realizar las combinaciones, se eligieron productos de microsatélites de tamaños muy diferentes con un mismo fluorocromo o de tamaños similares con distinto fluorocromo (Tabla 13).

Análisis de datos

ADN mitocondrial

Para estudiar la diversidad genética de las poblaciones, se estimaron los parámetros de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) mediante el programa DNAsp 4.10 (Rozas *et al.* 2003). La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos secuencias de ADNmt tomadas al azar de una población sean diferentes mientras que la diversidad nucleotídica es el número de diferencias nucleotídicas entre dos pares de secuencias tomadas al azar. Se realizó una red de haplotipos utilizando el método “median-joining” implementado en el programa NETWORK 4.6.0.0. (Fluxus Techonology Ltd. 1999-2011). Las redes de haplotipos (definidas como gráficos conectados por círculos) son más apropiadas para representar las relaciones dentro de una especie.

Se analizó la distribución de diferencias pareadas observadas entre sitios nucleotídicos en la muestra total de haplotipos (“mismatch distribution”). Cuando la distribución es de tipo bimodal, las muestras provienen de poblaciones que se han mantenido en equilibrio demográfico suficiente tiempo, en cambio, si la distribución es unimodal, la población ha experimentado recientes procesos de expansión poblacional. Además, se utilizaron pruebas de neutralidad de Fs de Fu (Fu 1997) y D de Tajima (Tajima 1989). Si las poblaciones se han mantenido estables por largos periodos de tiempo, los estadísticos D y Fs son cercanos a cero (desviaciones significativas de cero permiten rechazar la hipótesis de estabilidad poblacional). Valores negativos (menores a -2), indican que las poblaciones experimentaron recientes procesos de expansión poblacional, debido a que los alelos raros son más numerosos de lo esperado; si los valores son positivos (mayores a 2), la población está atravesando un cuello de botella y por lo tanto los alelos raros son menos numerosos de lo esperado (Tajima 1989). Para

los análisis de neutralidad y distribución de diferencias pareadas se utilizó el programa DNAsp 4.0. (Rozas *et al.* 2003).

Para investigar diferentes niveles de estructura poblacional, se realizaron análisis jerárquicos de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006). El análisis considera las distancias genéticas entre los haplotipos y sus frecuencias, para ello se debe definir grupos de poblaciones a fin de evaluar si la estructura genética planteada por el operador es significativa. El AMOVA descompone la varianza en: a) diferencias en la composición de haplotipos entre individuos de una misma población (**varianza dentro de una población**); b) diferencias en la composición de haplotipos de individuos de diferentes poblaciones (**varianza entre poblaciones**) y c) diferencias en la composición de haplotipos entre grupos de poblaciones (**varianza entre regiones**).

Para el AMOVA, se subdividió a la población de castor según los siguientes criterios: el mapa de avance de la invasión de castor (Anderson *et al.* 2009) y la densidad de colonias por km, el tipo de geomorfología de cuencas y el área geográfica (Lizarralde 1993). Anderson *et al.* (2009) realizó un mapa de avance de la colonización del castor en función de los años en que se fue registrando la presencia de castores en las diferentes áreas. La primer zona invadida (1946-1950) se encontró alrededor de la cuenca del Río Claro y del Lago Fagnano, luego se expandió hacia los alrededores del Lago Fagnano (en la década del ´60) y para la década del ´70 ya había invadido casi todo el territorio argentino y parte del sector chileno de la Isla Grande, en la década del ´80-´90 se encontraba prácticamente en toda la Isla Grande y la Isla Dawson, mientras que para el año 2000 ya había invadido el extremo norte de la Isla Grande y se registraron los primeros ejemplares en la zona de Península Brunswick (área continental chilena). Lizarralde (1993) determina que la zona boscosa al sur del Lago Fagnano es la de mayor productividad (4,72-5,85 sitios de col/km) en contraposición al extremo norte de la Isla Grande (0,2 col/km). En el mismo estudio, se describe un sistema de clasificación de áreas para el manejo basadas en abundancia de áreas y cuencas ocupadas. Considerando entonces los criterios de los autores mencionados y datos demográficos obtenidos durante este trabajo de tesis, se determinaron 5 unidades “poblacionales”: 1- SubpobA (n=67) representativa del área “buffer” del sitio de introducción (Río Claro), resultando la población fundadora, 2- SubpobB (n=87) representativa del área boscosa y de humedales, con mayor densidad (4,72-5,85 sitios de col/km; Lizarralde 1993), 3- SubpobC (n=35) representativa del ecotono donde la densidad es intermedia (2 sitios col/km; Lizarralde 1993), 4 - SubpobD (n=45) representativa de la estepa, donde la densidad es menor que en las otras áreas (0,2 sitios col/km; Lizarralde 1993),

con ríos anchos y de escasa pendiente y 5- SubpobE (n=21) ubicada en la Isla Dawson (Chile) y representativa de la estepa (Figura 33). Cabe destacar que todas las muestras de la Isla Dawson conformaron la SubpobE.

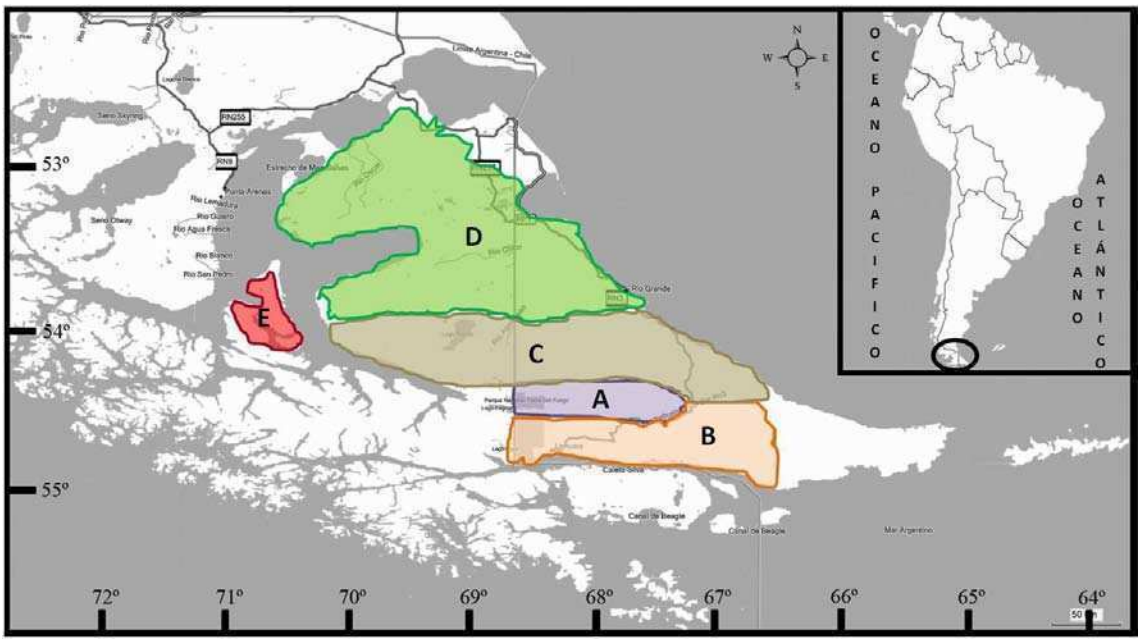

Figura 33. Ubicación de las 5 subpoblaciones (A-E) en el Archipiélago de Tierra del Fuego. Arriba a la derecha se detalla la zona ampliada.

Para determinar si existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, se realizó un Análisis de Autocorrelación Espacial para las muestras del Parque Nacional Tierra del Fuego (PNTDF). El PNTDF se encuentra dentro de la subpoblación B y es la única zona en donde se cuenta con numerosas muestras (n=72) muy cercanas geográficamente. Los correlogramas muestran el índice de correlación (r) el cual provee una medida de similitud genética entre pares de individuos cuya separación espacial cae dentro de una clase de distancia de amplitud especificada. El análisis se realizó utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006). Dado que no existe una manera *a priori* de predecir la estructura genética, se generaron 9 clases de distancia de manera tal que en cada una de ellas esté presente una cantidad similar de muestras asociadas (0-800, 801-1300, 1301-2000, 2001-3000, 3001-4000, 4001-5000, 5001-6000, 6001-7000 y 7001-10500 m). Los test de significancia para el valor de “r” fueron calculados para cada clase de distancia, definiendo los límites superior e inferior del intervalo de confianza. El procedimiento estadístico se encuentra descripto en Peakall y Smouse (2006). Cuando los valores de “r” son positivos (r>0), la autocorrelación es positiva y significa que los

individuos más cercanos genéticamente son los más cercanos geográficamente. Por el contrario, si r<0, la autocorrelación espacial es negativa y por lo tanto los individuos genéticamente similares están más alejados geográficamente.

Para poder evaluar la relación entre los haplotipos de *Castor canadensis* de las poblaciones introducidas en el ATDF (Argentina-Chile) y las poblaciones de Hemisferio Norte, se realizó una red de haplotipos utilizando el software NETWORK 4.6.0.0. (Fluxus Technology Ltd. 1999-2011). Se utilizaron muestras del HN y haplotipos de D-loop del HN depositados en el GenBank (Ducroz *et al.* 2005). Para las muestras del Hemisferio Norte, se utilizaron 3 haplotipos de *C. canadensis* depositados en el GenBank (Ca1, Ca2 y Ca3; Ducroz *et al.* 2005) y además se amplificaron muestras de *C. canadensis* provenientes de Alaska (USA) y Minnesota (USA) cedidas por Thomas Hanley (US Forest Service, Juneau, Alaska, USA) y Karla Pelz-Serrano (School of Natural Resources, University of Arizona, USA) respectivamente.

ADN nuclear

Los niveles de variabilidad genética para cada subpoblación fueron estimados calculando el número total de alelos por locus (NA), el número promedio de alelos (A), la heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) que fueron estimadas según Nei (1987) por medio de los programas Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) y GENAIEX 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó usando la prueba exacta de Fisher a través de Cadenas de Markov (Raymond y Rousset 1995) con 5000 iteraciones, aplicando la corrección secuencial de Bonferroni utilizando los programas GENAIEX 6.0 (Peakall y Smouse 2006) y ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Para estudiar la segregación independiente de alelos, se probó desequilibrio de ligamiento entre cada par de *loci* para cada área implementando el método de Cadenas de Markov con 5000 iteraciones, y entre cada *locus* para todo el área en conjunto implementando la prueba exacta de Fisher, utilizando el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), aplicando en cada caso la corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples. Es importante destacar que el desequilibrio por ligamiento puede estar aumentado debido a factores demográficos como por ejemplo endogamia, estructura poblacional y/o cuellos de botella.

Los alelos nulos son la causa más común de las desviaciones aparentes del equilibrio de H-W en *loci* microsatélites. Para la detección de alelos nulos se utilizó el programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al*. 2007) tomando en cuenta un valor de corte de 0,05. Este programa, provee

estimaciones de frecuencias de alelos nulos con un algoritmo basado en las diferencias entre frecuencias de homocigosis.

Por último, para investigar diferentes niveles de estructura poblacional, se realizó un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006). Para este análisis, al igual que con los datos de ADNmt, se dividió a la población de *Castor canadensis* (Argentina-Chile) en 5 subpoblaciones definidas en la Figura 33.

RESULTADOS

ADN mitocondrial (D-loop)

Se analizaron un total de 255 ejemplares pertenecientes al Archipiélago de Tierra del Fuego (Argentina y Chile) a los cuales se amplificó un fragmento de D-loop de 500 pb aproximadamente. En la Figura 34 se muestra un fragmento de un cromatograma. Para la muestra total (255 secuencias), la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) fue de 0,684 y 0,004 respectivamente, indicando una alta diversidad haplotípica y una diversidad nucleotídica relativamente moderada. La mayor diversidad haplotípica (h) a nivel de subpoblaciones se encontró en la subpoblación B (h=0,765), que fue la única subpoblación que presentó los 7 haplotipos. Por otro lado, los valores de diversidad nucleotídica oscilaron entre 0,004 y 0,005, valores muy similares entre sí. Dicho índice está relacionado con el número de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos, que en promedio fue de 1,87.

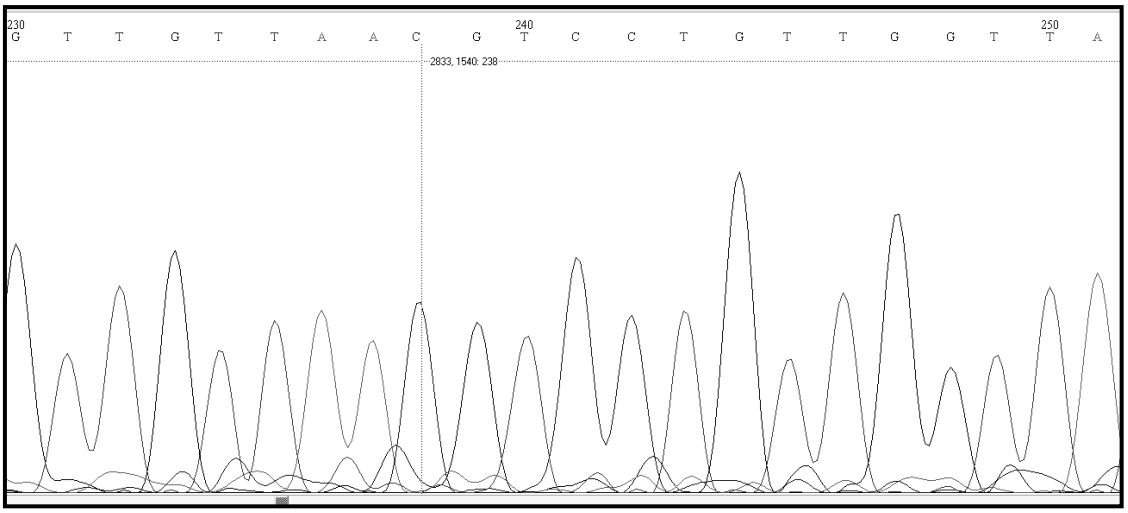

Figura 34. Cromatograma de una secuencia de D-loop de *Castor canadensis*.

Se identificaron 7 haplotipos de ADNmt (Haplotipo A–F y Haplotipo H, que fueron depositados en el GenBank) diferenciados por 6 sitios polimórficos en las posiciones 39, 114, 128, 201, 212 y 236 (todas transiciones, Tabla 8). Los haplotipos B (≈40%), D (≈20%) y H (≈34%) fueron los más abundantes, el resto de los haplotipos representa un porcentaje menor al 2,5% (Tabla 9). Todas las subpoblaciones comparten los haplotipos B, D y H, dos subpoblaciones comparten 4 haplotipos (B, D, F y H) mientras que sólo la subpoblación B presenta los 7 haplotipos detectados.

Tabla 8. Detalle de los 6 sitios polimórficos encontrados en el fragmento de D-loop de *Castor canadensis*. Se detalla el número de acceso al GenBank de cada haplotipo depositado.

	Posición nucleotídica						
	39	114	128	201	212	236	Acceso GenBank
HAPLOTIPO A	A	C	C	G	T	G	AY787822
HAPLOTIPO B	.	.	.	.	.	A	AY787823
HAPLOTIPO C	G	.	.	.	.	.	AY787824
HAPLOTIPO D	.	.	T	A	.	A	AY787825
HAPLOTIPO E	.	.	T	A	.	.	AY787826
HAPLOTIPO F	.	T	.	A	C	.	AY787827
HAPLOTIPO H	.	T	.	A	C	A	EU476079

Tabla 9. Cantidad de ejemplares por subpoblación y por haplotipo. En la última fila se destaca el porcentaje total de cada haplotipo.

HAPLOTIPO	A	B	C	D	E	F	H
SubpobA		35		15		1	16
SubpobB	6	21	2	24	4	2	28
SubpobC		13		5			17
SubpobD		24		5			16
SubpobE		10		1			10
Porcentaje (/)	**2,3**	**40,4**	**0,8**	**19,6**	**1,6**	**1,2**	**34,1**

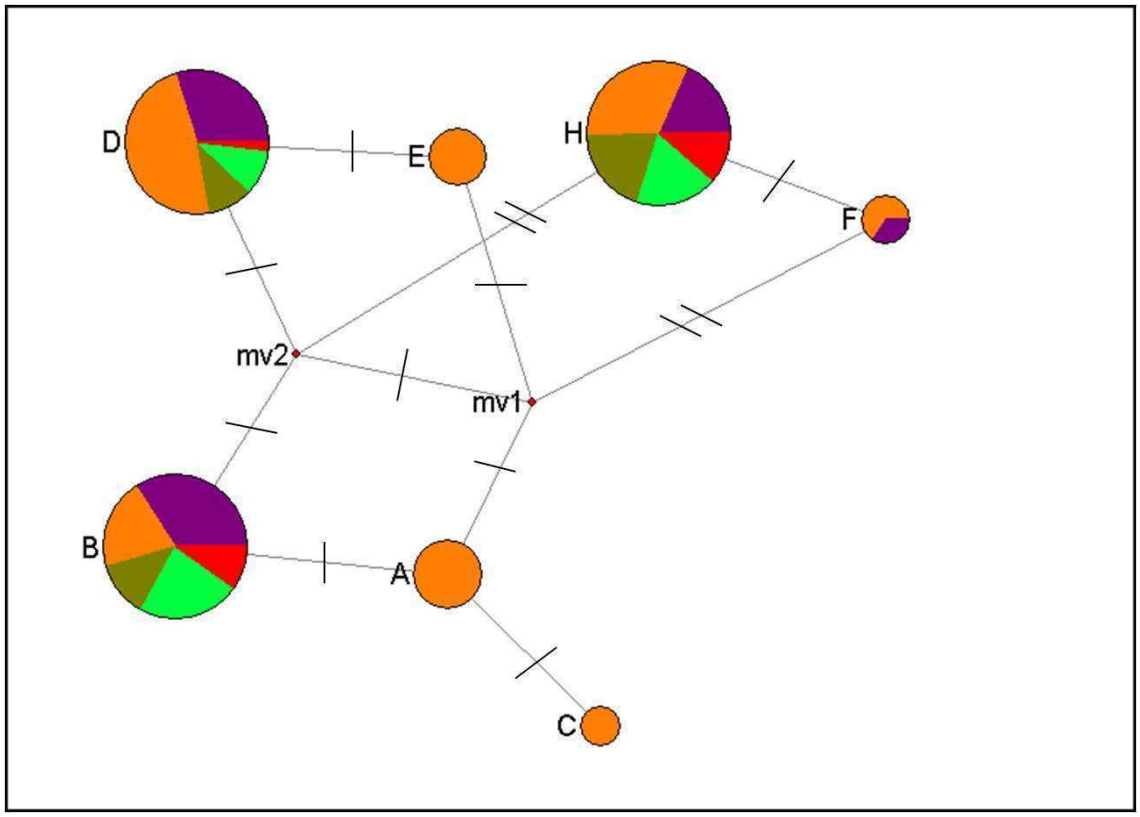

Figura 35. Red de haplotipos. La figura muestra una red de 7 haplotipos de ADNmt de *Castor canadensis* en el Archipiélago de Tierra del Fuego. El área de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotípicas. Las líneas cruzadas entre los círculos representan las diferencias nucleotídicas existentes entre los haplotipos. Los colores indican las subpoblaciones. Subpob A (violeta), Subpob B (naranja), Subpob C (beige), Subpob D (verde) y Subpob E (rojo). Entre los haplotipos D-B-H y A-E-F hay dos haplotipos hipotéticos (mv1 y mv2).

En la Figura 35 se muestra la red de haplotipos en donde se observa que hay 3 haplotipos exclusivos de la Subpoblación B y el resto de los haplotipos son compartidos por las 5 subpoblaciones, a excepción del haplotipo F que es compartido por la Subpoblación A y B. Se observa que los dos haplotipos hipotéticos podrían ser los haplotipos ancestrales, ya que conectan al resto de los haplotipos. Estos haplotipos hipotéticos puede ser: a) que estén en la población y que no hayan sido muestreados, b) que hayan sido introducidos en Tierra del Fuego pero que se hayan extinguido o c) que directamente nunca estuvieron en la población introducida y que se encuentren en la población del Hemisferio Norte (población fundadora).

Los test para el D de Tajima y el Fs de Fu fueron no significativos (D=1,789 p>0,100 y Fs=2,108 p=0,206), si bien los valores son cercanos a cero (indicando que las poblaciones se han mantenido estables), los mismos presentaron valores no significativos, con lo cual no se puede asegurar que las poblaciones se encuentren estables. Por otro lado, la distribución de

frecuencias pareadas presentó una distribución unimodal (Figura 36) que sugiere una historia reciente de expansión poblacional. Esto se evidencia también por el valor bajo en el número promedio de diferencias nucleotídicas (k=1,873) que caracteriza a este tipo de eventos demográficos. Que la población se encuentre en un proceso de expansión reciente tiene sentido biológico dado que es una población invasora.

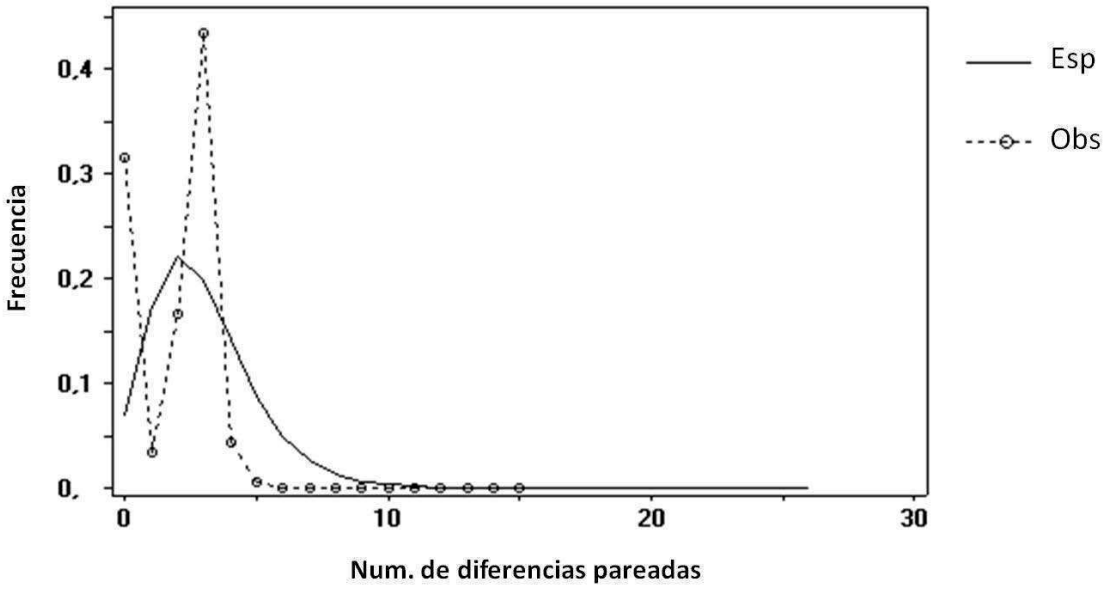

Figura 36. Distribuciones observadas y esperadas de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para *C. canadensis*. Línea punteada: distribución observada; línea llena: distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional.

Para estudiar la estructura poblacional, se realizó un AMOVA utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006) en donde se registró una diferencia entre subpoblaciones del 6% mientras que dentro de cada subpoblación la diversidad fue del 94% (Figura 37). La diferencia entre las 5 subpoblaciones fue de Φ_{st}=0,058 (p=0,002) indicando que la población se encuentra levemente estructurada. Si se analizan de a pares de subpoblaciones, se observa que el flujo génico es menor entre la subpoblación B y C (Φ_{st}=0,100, p=0,001), seguida por la subpoblación B y E (Φ_{st}=0,091, p=0,007), que son las subpoblaciones que se encuentran más distanciadas entre sí, separadas por el Estrecho de Magallanes, el cual podría ser una barrera para la dispersión. Ambas subpoblaciones son muy diferentes en cuanto al tipo de paisaje y densidad de colonias/km. La subpoblación B se encuentra en la zona boscosa de TDF y presenta la mayor cantidad de colonias/km mientras que la subpoblación E se encuentra en la estepa y

presenta la menor densidad de colonias/km. En resumen, la subpoblación B es la que presenta mayores diferencias a nivel genético con respecto al resto de las subpoblaciones (Tabla 10).

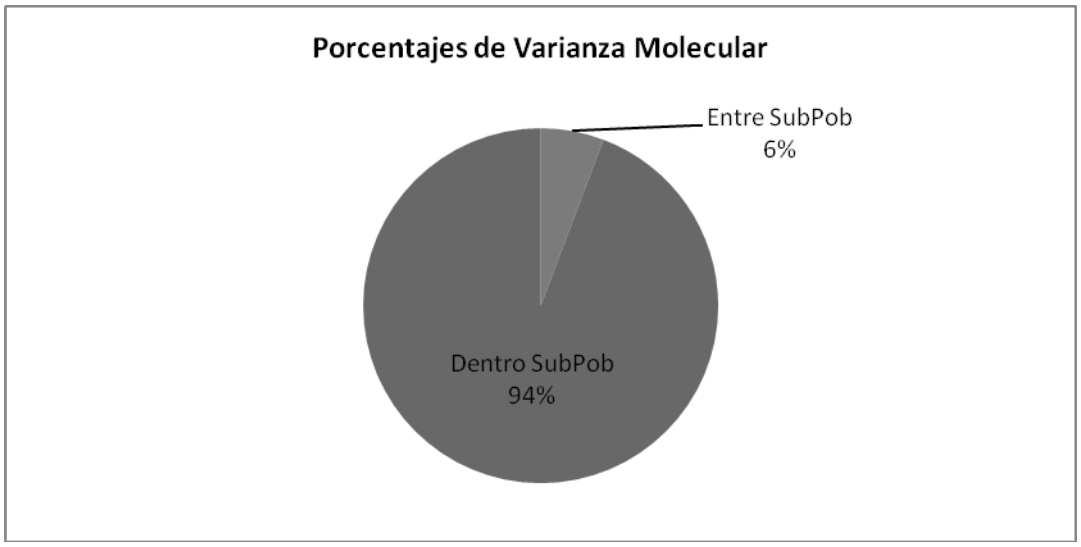

Figura 37. Resultado del AMOVA. Porcentajes de variación entre subpoblaciones y dentro de cada subpoblación.

Tabla 10. Valores de Φ_{st} entre pares de subpoblaciones. Los valores de Φ_{st} se encuentran por debajo de la diagonal mientras que los valores de p se encuentran por arriba de la diagonal. En negrita se destacan los valores de Φ_{st} que fueron significativos.

	SubPob A	**SubPob B**	**SubPob C**	**SubPob D**	**SubPob E**
SubPob A	–	0,069	0,358	0,291	0,323
SubPob B	0,032	–	**0,001**	**0,001**	**0,007**
SubPob C	0,000	**0,100**	–	**0,019**	0,079
SubPob D	0,003	**0,082**	**0,053**	–	0,354
SubPob E	0,002	**0,091**	0,050	0,000	–

Autocorrelación Espacial

El Análisis de Autocorrelación Espacial entre los individuos del PNTDF mostró una ligera pero significativa relación positiva entre la distancia genética y la geográfica (r=0,094, P=0,002; Figura 38 y Tabla 11). Este patrón también se observa (aunque no es significativo) en las dos primeras clases de distancia (hasta 1,3 km) donde el coeficiente de correlación es positivo pero

no significativo. Con lo cual los castores que se encuentran distanciados 5 km, están más relacionados genéticamente entre sí que los que se encuentran a mayores y menores distancias. Por el contrario, los castores que se encuentran entre los 2 y 5 km de distancia y a distancias mayores a 6 km, presentan un coeficiente de correlación negativo, no significativo.

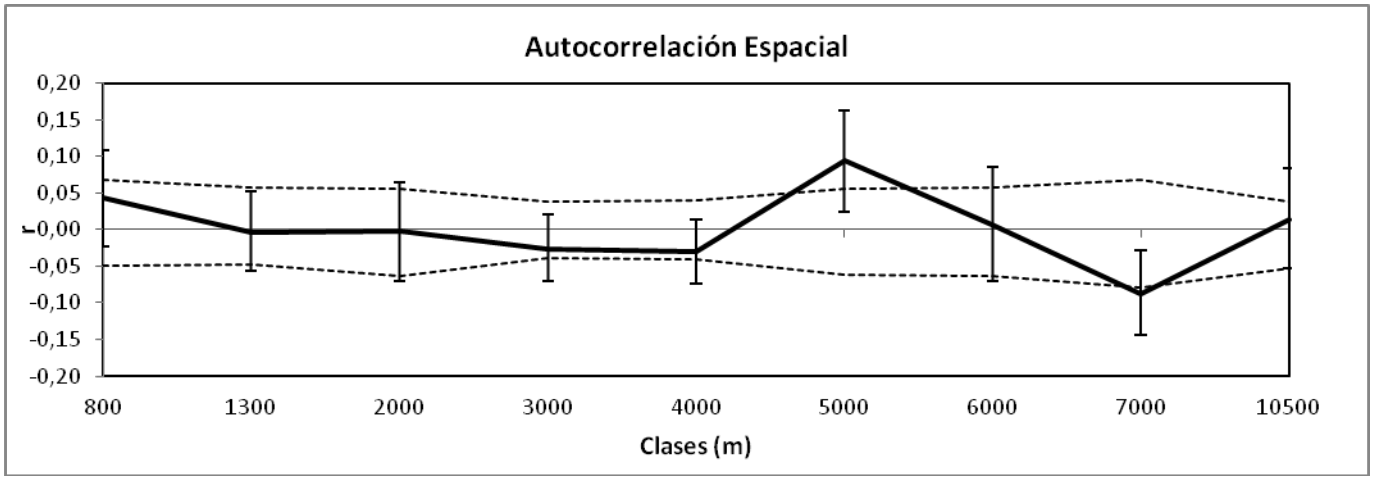

Figura 38. Análisis de Autocorrelación Espacial para las muestras del PNTDF. La línea negra indica el valor estimado de r para las diferentes clases de distancia y las líneas punteadas indican el Intervalo de Confianza al 95⁄ . Además se destacan las barras de error estadístico de cada clase de distancia.

Tabla 11. Resultados del Análisis de Autocorrelación Espacial. En la tabla se destaca el valor N para cada clase de distancia, las 9 clases de distancia, el coeficiente r, el valor superior (U) e inferior (L) del intervalo de confianza y el valor estadístico de p para cada clase de distancia.

N	253	271	241	427	433	263	225	163	280
Clases de Distancia (m)	**800**	**1300**	**2000**	**3000**	**4000**	**5000**	**6000**	**7000**	**10500**
r	0,043	-0,004	-0,002	-0,027	-0,029	**0,094**	0,006	-0,089	0,014
U	0,067	0,057	0,056	0,038	0,040	0,055	0,057	0,068	0,038
L	-0,049	-0,049	-0,063	-0,039	-0,040	-0,063	-0,064	-0,079	-0,052
P	0,088	0,544	0,543	0,921	0,931	**0,002**	0,410	0,989	0,282

Relación entre los haplotipos del Hemisferio Norte y del ATDF

Para el ATDF se utilizaron los 7 haplotipos descritos anteriormente mientras que para las muestras del Hemisferio Norte se detectaron 3 nuevos haplotipos además de los 3 ya depositados en el GenBank por Ducroz *et al.* (2005). Las 10 muestras provenientes de Alaska (USA) presentaron el mismo haplotipo (Haplotipo G) mientras que de las 5 muestras de Minnesota (USA), 4 presentaron el haplotipo MN2 y 1 el haplotipo MN3. Todos los haplotipos fueron depositados en el GenBank (Tabla 12).

Tabla 12. Detalle de los 20 sitios polimórficos encontrados en el fragmento de D-loop de *Castor canadensis* del ATDF y el HN. Se detalla el número de acceso al GenBank de cada haplotipo.

	Posición nucleotídica																				
	39	114	128	144	201	205	212	223	233	236	268	276	300	353	354	401	416	420	421	422	Acceso GenBank
HAPLOTIPO A	A	C	C	T	G	T	T	C	G	G	C	G	A	T	C	A	A	C	T	C	AY787822
HAPLOTIPO B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY787823
HAPLOTIPO C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY787824
HAPLOTIPO D	.	.	T	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY787825
HAPLOTIPO E	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY787826
HAPLOTIPO F	.	T	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY787827
HAPLOTIPO G	.	.	.	.	A	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY968083
HAPLOTIPO H	.	T	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	EU476079
MN2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	JN655158
MN3	.	T	.	C	A	.	.	T	A	A	T	.	.	C	T	.	.	.	.	.	JN655159
CA1	.	.	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	T	C	T	AY623644
CA2	.	.	.	.	A	C	.	.	.	A	.	A	.	.	.	-	C	T	C	T	AY623645
CA3	.	.	.	.	A	C	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	C	T	C	T	AY623646

Para la red de haplotipos se utilizaron los 7 encontrados en el ATDF (Haplotipos A-F y Haplotipo H) y 6 del HN (Haplotipo G, Ca1, Ca2, Ca3, MN2 y MN3) (Figura 39). Se puede observar que los haplotipos encontrados en el ATDF están muy relacionados entre sí, con un promedio de nucleótidos entre haplotipos de 1,873 mientras que los del Hemisferio Norte presentan mayor número de cambios entre haplotipos (k=6,733). Si bien ninguno de los haplotipos detectados en el ATDF fue encontrado en los haplotipos del HN, se observa en la red que los haplotipos D, H y B, del ATDF, están más cercanos a 2 haplotipos encontrados en el HN (Haplotipo G y MN2), existiendo entre ellos 3 sitios polimórficos (*e.g.* Hap H vs MN2; Hap B vs Hap G). Dado el corto tiempo de invasión es poco probable que se hayan generado nuevos

haplotipos en el ATDF debido a mutaciones, contrariamente los haplotipos encontrados en el Archipiélago deberían encontrarse en el Hemisferio Norte.

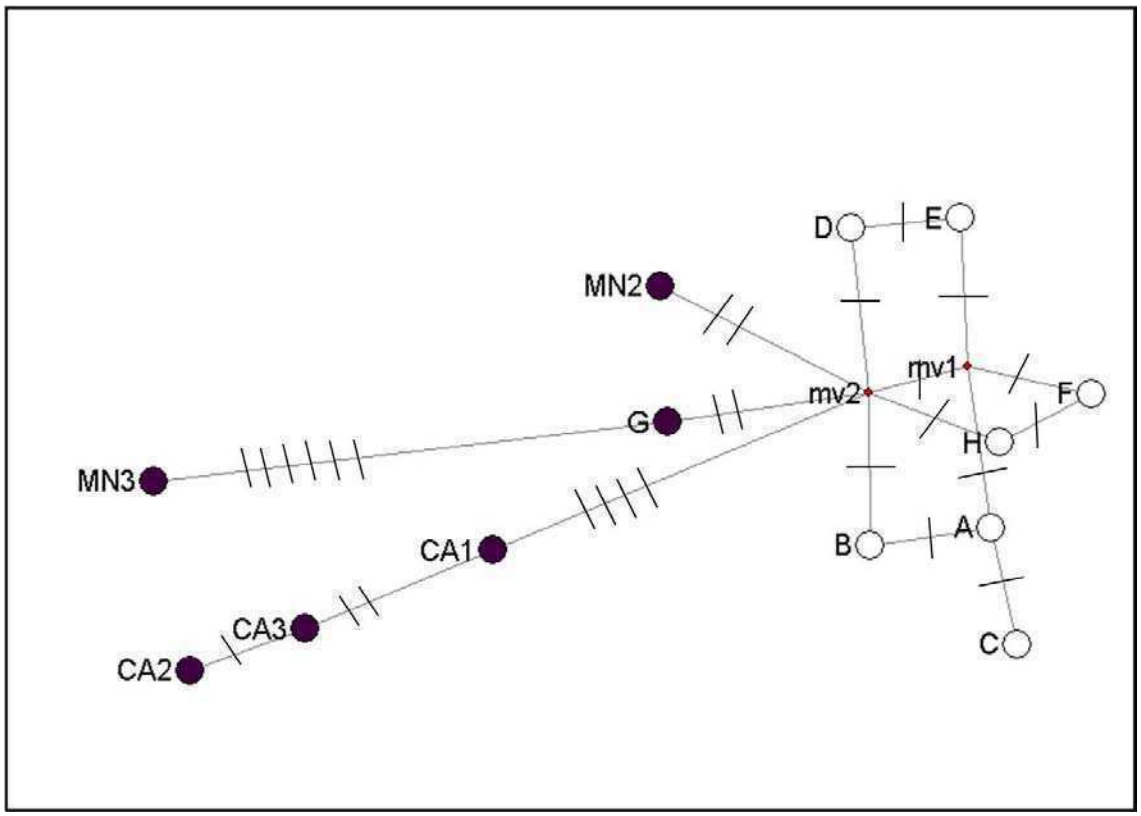

Figura 39. Red de haplotipos. La figura muestra una red de 13 haplotipos de D-loop de *Castor canadensis* de los cuales 7 pertenecen a Tierra del Fuego (color blanco) y el resto pertenecen al Hemisferio Norte (color negro). Entre los haplotipos D-B-H y A-E-F hay dos haplotipos hipotéticos (mv1 y mv2). Las líneas cruzadas entre los círculos representan las diferencias nucleotídicas existentes entre los haplotipos.

ADN nuclear (microsatélites)

Se amplificaron 10 microsatélites diseñados específicamente para la especie (Crawford *et al*. 2009), de los cuales 3 fueron monomórficos (Cca56, Cca76 y Cca112) y por lo tanto fueron excluidos de los análisis ya que no resultan informativos. Se amplificaron 7 microsatélites (Tabla 13) para cada una de las 5 subpoblaciones; para cada subpoblación se tomó una muestra representativa de individuos: para la subpoblación A y la E se utilizaron 19 individuos mientras que para el resto de las subpoblaciones se utilizaron 20. La lectura de los picos de los microsatélites se realizó utilizando el programa PeakScanner 1.0 (Applied Biosystems) (Figura 40).

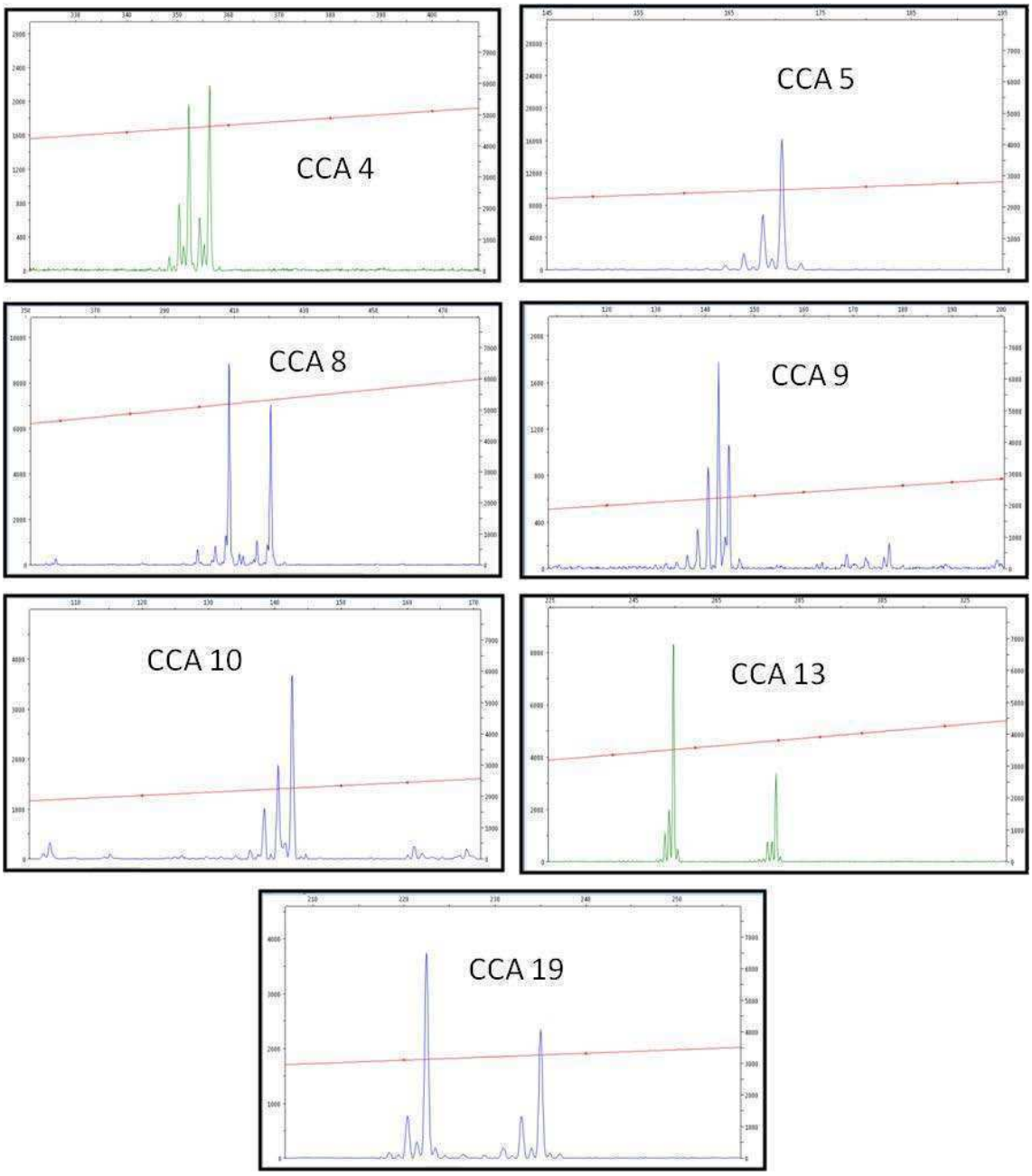

Figura 40. Electroforetogramas de los 7 microsatélites amplificados en este estudio con diferentes fluorocromos (HEX y FAMl). Se muestra un electroforetograma típico de cada microsatélite. CCA4 (344-372 pb), CCA5 (166-178 pb), CCA8 (404-420 pb), CCA9 (140-144 pb), CCA10 (128-146 pb), CCA13 (255-279 pb) y CCA19 (222-272 pb).

Tabla 13. Listado de los microsatélites amplificados. Se detalla el nombre del microsatélite, el tamaño del fragmento amplificado según Crawford *et al.* (2007), el fluorocromo con que se marcó cada microsatélite, el tamaño de fragmento amplificado (pb) observado en los geles de agarosa, el tamaño del fragmento genotipado (pb), las temperaturas de annealing según el trabajo de Crawford *et al.* (2007) y las temperaturas utilizadas para esta Tesis.

Microsatelite	Repetición	Tamaño estimado	Fluorocromo	Tamaño amplificado (aprox)	Tamaño genotipado	T paper (°C)	T annealing real (°C)
Cca 4	**AC**	352-364	HEX	**350**	**344-372**	61	**61**
Cca 5	**CT**	157-185	FAM	**150-200**	**166-178**	61	**54**
Cca 8	**GATA**	356-426	FAM	**400**	**404-420**	61	**63**
Cca 9	**TG**	136-156	FAM	**150**	**140-144**	60	**57**
Cca 10	**TC**	120-154	HEX	**100-150**	**128-146**	60	**54**
Cca 13	**GT GT**	277-295	HEX	**200-300**	**255-279**	60	**52**
Cca 19	**TG AC**	220-266	FAM	**200-300**	**222-272**	59	**52**

Polimorfismo de los microsatélites y variabilidad genética

El único *locus* que presentó una frecuencia significativa de alelos nulos fue Cca19 (F=-0,197, p=0,001), el resto de los *loci* presentaron frecuencias no significativas de alelos nulos (F_{CCA4}=0,083, F_{CCA5}=0,093, F_{CCA8}=0,021, F_{CCA9}=-0,040, F_{CCA10}=0,119, F_{CCA13}=0,004; p>0,05). A excepción del *locus* Cca9, el resto de los *loci* mostró un exceso de genotipos heterocigotas, lo cual demuestra el gran flujo génico que existe en la población de castores de Tierra del Fuego. Sólo 5 comparaciones pareadas evidenciaron desequilibrio de ligamiento, las cuales no estuvieron asociadas con ningún *locus* ni con ninguna subpoblación en particular (SubpobC CCA4-CCA13 p=0,005 y CCA8-CCA9 p=0,024; SubpobD CCA9-CCA10 p=0,040; SubpobG CCA5-CCA10 p=0,011 y CCA9-CCA19 p=0,021), con lo cual los 7 *loci* utilizados en este trabajo fueron considerados “marcadores independientes”.

El resumen de los estadísticos para todos los *loci* y subpoblaciones se encuentra en la Tabla 14 mientras que las frecuencias alélicas de los microsatélites se encuentran en la Tabla 15. Todos los *loci* fueron polimórficos con un número total de alelos por *locus* entre 3 y 9 (promedio=5 alelos por *locus*) (Tabla 14). El número promedio de alelos efectivos por subpoblación osciló entre 2,372 y 2,921, valor bajo comparado con el número de alelos registrados. Esto puede deberse a que la población de castores se generó a partir de unos pocos individuos (efecto fundador) y que el flujo génico es muy alto. El promedio de alelos por *locus* fue de 5 y para cada subpoblación osciló entre 3,57 y 4,71. La subpoblación A fue la que presentó mayor número de alelos por *locus* (4,71) mientras que la B presentó la menor cantidad (3,57). Es importante destacar que para el marcador mitocondrial, la subpoblación B fue la que presentó

mayor diversidad de haplotipos con respecto al resto de las subpoblaciones. Las heterocigocidades observadas y esperadas presentaron grandes diferencias entre las subpoblaciones oscilando entre 0,263-0,850 y 0,321-0,818, respectivamente. Tres *loci* (Cca5 y Cca10 para la subpoblación A; Cca10 para la subpoblación C y Cca19 para las subpoblaciones D y E) mostraron desviaciones significativas del equilibrio de H-W ($p<0,05$; Tabla 14). De esos 3 *loci*, Cca19 fue el único que presentó mayor frecuencia de heterocigotas observados que los esperados para todas las subpoblaciones, lo cual indicaría que este *locus* se comportaría como un *locus* dialélico. En la Tabla 14 se observa que el *locus* Cca19 presentó sólo 3 alelos en todas las subpoblaciones, de los cuales los alelos 222 y 272 son los más frecuentes.

Tabla 14. Variación genética en los microsatélites de *C. canadensis*. Número de alelos por *locus* (**At**), número de alelos por subpoblación (**Ni**), número de alelos efectivos por subpoblación (**Ne**), Heterocigosidad Observada (**Ho**) y Heterocigosidad Esperada (**He**, según Nei 1978), por *locus* para cada subpoblación (A, B, C, D y E). **A**, promedio del número de alelos (Riqueza Alélica); **/ P**, porcentaje de *loci* polimórficos; **Nt**, número total de individuos. En negrita se resaltan las desviaciones significativas entre los niveles observados y esperados de heterocigosidad en cada subpoblación y *locus* por *locus*. * P<0.05; y *** P<0.001.

		SubPob A				**SubPob B**				**SubPob C**				**SubPob D**				**SubPob E**			
Locus	**At**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**	**Ni**	**Ne**	**Ho**	**He**
CCA4	**7**	6	3,223	0,632	0,690	5	3,653	0,800	0,726	5	2,857	0,350	0,650	7	5,479	0,750	0,818	6	3,153	0,632	0,683
CCA5	**3**	3	2,447	**0,316***	0,591	3	2,133	0,450	0,531	3	2,266	0,500	0,559	3	2,360	0,600	0,576	3	2,725	0,632	0,633
CCA8	**5**	4	3,267	0,737	0,694	4	2,623	0,550	0,619	5	2,402	0,600	0,584	4	3,213	0,800	0,689	4	2,935	0,632	0,659
CCA9	**4**	4	2,704	0,579	0,630	3	2,632	0,750	0,620	4	2,367	0,500	0,578	4	2,524	0,750	0,604	3	2,307	0,684	0,566
CCA10	**9**	9	5,270	**0,632***	0,810	4	3,101	0,700	0,678	5	2,787	**0,500***	0,641	7	3,279	0,600	0,695	5	1,473	0,263	0,321
CCA13	**4**	4	1,637	0,368	0,389	3	1,504	0,300	0,335	3	1,766	0,450	0,434	3	1,559	0,350	0,359	2	1,915	0,579	0,478
CCA19	**3**	3	1,828	0,579	0,453	3	2,156	0,750	0,536	3	2,156	0,750	0,536	3	2,036	**0,850***	0,509	3	2,278	**0,842***	0,561
Media				0,549	0,608			0,614	0,578			0,521	0,569			0,671	0,607			0,609	0,557
A	**5**	4,714	2,911			3,571	2,543			4	2,372			4,429	2,921			3,714	2,398		
/ P		100				100				100				100				100			
Nt		19				20				20				20				19			

Tabla 15. Frecuencias alélicas para los *loci* de cada microsatélite por subpoblación. Se destaca el valor de N para cada subpoblación.

Locus/Alelos	SubPob A	SubPob B	SubPob C	SubPob D	SubPob E	*Locus*/Alelos	SubPob A	SubPob B	SubPob C	SubPob D	SubPob E
N	**19**	**20**	**20**	**20**	**19**	**N**	**19**	**20**	**20**	**20**	**19**
Cca4						**Cca10**					
344	0,184	0,100	0,000	0,100	0,105	**120**	0,105	0,125	0,075	0,175	0,026
352	0,474	0,375	0,475	0,250	0,263	**126**	0,053	0,000	0,000	0,025	0,026
354	0,026	0,000	0,025	0,150	0,000	**128**	0,079	0,175	0,100	0,075	0,026
356	0,211	0,300	0,325	0,225	0,474	**134**	0,079	0,000	0,000	0,100	0,000
360	0,079	0,175	0,050	0,075	0,105	**136**	0,105	0,225	0,175	0,075	0,000
372	0,026	0,050	0,125	0,175	0,026	**140**	0,342	0,475	0,550	0,500	0,816
400	0,000	0,000	0,000	0,025	0,026	**142**	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
Cca5						**144**	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
166	0,263	0,125	0,075	0,250	0,184	**146**	0,184	0,000	0,100	0,050	0,105
168	0,184	0,250	0,400	0,175	0,421	**Cca13**					
170	0,553	0,625	0,525	0,575	0,395	**255**	0,763	0,800	0,725	0,775	0,605
Cca8						**257**	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
404	0,184	0,100	0,175	0,075	0,026	**279**	0,158	0,150	0,175	0,200	0,395
408	0,289	0,300	0,050	0,425	0,237	**287**	0,053	0,050	0,100	0,025	0,000
412	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	**Cca19**					
416	0,421	0,525	0,600	0,250	0,447	**222**	0,711	0,625	0,625	0,575	0,526
420	0,105	0,075	0,150	0,250	0,289	**236**	0,158	0,225	0,150	0,025	0,079
Cca9						**272**	0,132	0,150	0,225	0,400	0,395
140	0,395	0,300	0,525	0,400	0,421						
142	0,447	0,500	0,375	0,475	0,500						
144	0,105	0,200	0,075	0,100	0,079						
154	0,053	0,000	0,025	0,025	0,000						

Para estudiar la estructura genético-poblacional (con los datos de los microsatélites) se realizó un AMOVA utilizando el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006) en donde se registró una diferencia entre subpoblaciones del 5% mientras que dentro de cada subpoblación la diversidad fue del 95% (Figura 41), registrando un valor de Fst=0,052, p<0,001. Esto demuestra, que al igual que para los datos de D-loop, la población de castor en Tierra del Fuego se encuentra levemente estructurada. Según Wrjght (1978) si el valor de Fst oscila entre 0,05 y 0,25 la población se encuentra levemente estructurada (Ver Capítulo 1). Para analizar si la población presenta divergencia poblacional o panmixia, en teoría para marcadores diploides y si la población se encuentra en equilibrio, si 4Ne(m+μ)<1 se debería observar una fuerte

divergencia en la población, mientras que si 4Ne(m+μ)>1 la población debería ser panmíctica. Utilizando los resultados obtenidos, se observa que: **4 x 4,598 = 18,392 >> 1**, con lo cual, la población de castores de Tierra del Fuego se comporta como una población panmíctica, es decir el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local.

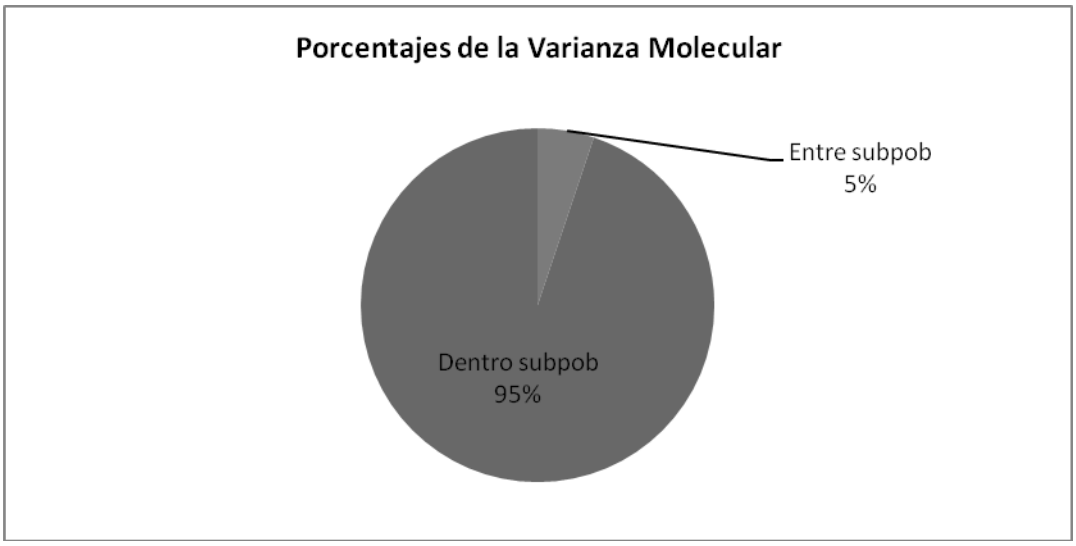

Figura 41. Resultado del AMOVA. Porcentajes de variación entre subpoblaciones y dentro de cada subpoblación.

Cuando se analizan los valores de Fst entre pares de subpoblaciones (Tabla 16), se observa que las subpoblaciones más divergentes entre sí (a nivel de estructura genética) son la subpoblación A y la E (Fst=0,057, p=0,003), seguida por la subpoblación B y E (Fst=0,050, p=0,001). Es importante destacar que la subpoblación E pertenece a la Isla Dawson y se encuentra separada del resto de las subpoblaciones por el Estrecho de Magallanes. Si bien los valores de Fst son bajos, la subpoblación E fue la única que presentó valores significativos de Fst en relación con las otras subpoblaciones, lo cual indicaría que la subpoblación E sería la más diferente de las subpoblaciones a nivel genético.

Tabla 16. Valores de Fst entre pares de subpoblaciones. Los valores de Fst se encuentran por debajo de la diagonal mientras que los valores de p se encuentran por arriba de la diagonal. En negrita se destacan los valores de Fst que fueron significativos.

	Subpob A	**Subpob B**	**Subpob C**	**Subpob D**	**Subpob E**
Subpob A	**-**	0,435	0,117	0,094	0,003
Subpob B	0,000	**-**	0,174	0,033	0,001
Subpob C	0,012	0,009	**-**	0,002	0,020
Subpob D	0,013	**0,022**	**0,041**	-	0,010
Subpob E	**0,057**	**0,050**	**0,031**	**0,035**	**-**

DISCUSIÓN

Estructura poblacional y variabilidad genética

De acuerdo a Lizarralde *et al.* (2008a), hipotéticamente un máximo de 25 linajes mitocondriales podrían ser los fundadores de la población invasora del ATDF, de los cuales sólo 7 linajes (7 haplotipos de ADNmt) fueron reportados en este trabajo. Seguramente, los 25 linajes supuestos podrían (1) no haber estado presentes en la población fundadora, o (2) si originalmente estuvieron presentes en los fundadores, podrían haber desaparecido o extinguido durante el proceso de colonización, expansión e invasión. La red de haplotipos mostró que 3 (haplotipos B, D y H) fueron los más abundantes y se detectaron en las 5 subpoblaciones, mientras que el resto se registraron en menor proporción en 1 ó 2 subpoblaciones. Se detectaron también 2 haplotipos hipotéticos, que consideraríamos "ancestrales" ya que conectan a todos los haplotipos, y podría haber ocurrido que: a) existan realmente en la población pero que no hayan sido muestreados, b) hayan sido introducidos originalmente en TDF pero se han extinguido o c) se encuentren sólo en las poblaciones existentes en el HN. La red de haplotipos se construyó incluyendo los haplotipos del HN junto con los encontrados en la población del ATDF. Uno de los haplotipos hipotéticos (mv2) se conectó directamente con los del HN, lo cual corroboraría que estos haplotipos hipotéticos podrían ser los haplotipos ancestrales. Además, los 3 haplotipos más abundantes (B, D y H) (conectados directamente al haplotipo ancestral mv2) sólo difieren de éste en un par de bases, indicando que los haplotipos más cercanos al HN resultan ser los más comunes en el ADTF. El haplotipo hipotético mv2 puede ser considerado como el más ancestral ya que del mismo surgen 6 haplotipos. Este haplotipo hipotético debería encontrarse en Alberta (Canadá) de donde proviene el stock fundador.

Generalmente, la colonización de nuevas áreas produce un marcado efecto fundador con deriva génica que reduce la variación genética dentro de las poblaciones y aumenta la diferenciación genética entre las poblaciones (Wang *et al.* 2008). Sin embargo, en la población de castores de Tierra del Fuego, utilizando el marcador mitocondrial, se encontró una alta variación intrapoblacional (94%) y una baja diferenciación genética entre poblaciones (6%). Cuando se estudió la estructuración genética-espacial utilizando el D-loop, se registró una muy baja pero significativa divergencia entre las subpoblaciones del ATDF (Φst=0,058, p=0,002). Asumiendo un modelo de islas, Wright (1978) propuso que valores de Fst>0,25 estarían mostrando una gran diferenciación entre las poblaciones; valores entre 0,15 y 0,25 representan una moderada diferenciación, mientras que la diferenciación no es apreciable

para valores de Fst menores a 0,05. En la práctica, el valor de Fst raramente es mayor a 0,5, contrariamente es mucho menor (a excepción de poblaciones con capacidades dispersivas muy limitadas o con una fuerte estructuración poblacional como el caso de *Ctenomys magellanicus* que se estudió en el Capítulo 3). La compleja red hidrográfica en el Archipiélago facilitaría a que los castores se muevan libremente por la región, comportándose como una gran población panmíctica. La manera en la cual los animales utilizan el paisaje es determinada tanto por los requerimientos del hábitat como por la estructura social; por lo tanto, las poblaciones pueden exhibir una estructura genético espacial aún en ausencia de barreras físicas (Latch *et al*. 2008). Por ejemplo, las diferencias en el tipo de hábitat (bosque, ecotono o estepa) podrían representar barreras parciales al flujo génico, las cuales no necesariamente deben ser drásticas (Abdelkrim *et al.* 2010). En esta tesis, cuando se trabajó con el marcador mitocondrial, las subpoblaciones que presentaron menor flujo génico fueron la B y C (Φst=0,100 p=0,001) y la B y E (Φst=0,091 p=0,007), que son las que se encuentran más alejadas geográficamente. Tanto las subpoblaciones B, C y E son muy diferentes en cuanto al tipo de paisaje y densidad de colonias/km. La subpoblación B se encuentra en la zona boscosa de TDF y presenta la mayor cantidad de colonias/km, la subpoblación C se encuentra en la zona del ecotono en donde la densidad de colonias/km es intermedia, mientras que la subpoblación E se encuentra en la estepa y presenta la menor densidad de colonias/km (Lizarralde 1993). Los resultados genéticos obtenidos, junto con los datos de avance del castor en el ATDF (Anderson *et al.* 2009) podrían indicar que la ruta que podrían haber utilizado los castores para colonizar la Isla Dawson haya sido por el sector centro-oeste de la Isla Grande ya que el valor de Φst entre la subpoblación D y E es igual a cero. Es importante destacar que los valores más bajos de Φst entre subpoblaciones indican que el flujo génico entre ellas es mayor (es decir son subpoblaciones que se encuentran más conectadas entre sí). Si bien el Estrecho de Magallanes podría ser una barrera a la dispersión (Hoffman 1985), los castores podrían haber cruzado a la Isla Dawson por el Estrecho. Existen relatos de personas que han visto castores nadando por el Estrecho, y de hecho se han observado castoreras muy cerca del mar, con lo cual según Ramírez Silva (2006), su eventual presencia en agua salobre es posible y explicaría la colonización de las islas del Archipiélago.

El Análisis de Autocorrelación Espacial (utilizando ADNmt) mostró una estructuración genético-poblacional a una escala más fina. Según este estudio, los castores que se encuentran distanciados a 5 km (en línea recta) son más parecidos genéticamente entre sí que los que se encuentran a menores o mayores distancias. Esto podría indicar que los juveniles que dispersan de la colonia materna para formar su propia colonia, lo harían en un radio de unos 5

km. Estos resultados concuerdan con los valores de dispersión encontrados en el Hemisferio Norte en donde un estudio de radiotelemetría con castores en Illinois (EEUU) encontró que los juveniles de castor se dispersan en promedio 5,9 km de su colonia natal si tienen un libre acceso a las cuencas, mientras que la distancia de dispersión es mucho menor (1,7 km) cuando el acceso es más restringido (McNew y Woolf 2005). Cabe destacar que los castores en el ATDF tienen libre acceso a las cuencas dado que no tienen ningún tipo de predador. Este dato es importante a la hora de tomar decisiones en la erradicación/control de la especie ya que no existían datos en la literatura sobre el rango de dispersión de los juveniles en el ATDF.

Estudios en poblaciones de *Castor canadensis* del Hemisferio Norte revelaron marcadas diferencias en la composición de las colonias, la dispersión y el comportamiento reproductivo entre las poblaciones (Crawford *et al.* 2008, 2009). Si bien los castores tradicionalmente han sido considerados como una especie monógama (basados en estudios comportamentales y en la composición de las colonias), estudios genéticos recientes sugieren que los castores no siempre son genéticamente monógamos, pudiendo adoptar estrategias de apareamiento promiscuas cuando hay una gran disponibilidad de parejas (Crawford *et al.* 2008). Este tipo de comportamiento podría ocurrir en la población invasora del Archipiélago, ya que la variabilidad mostrada por los microsatélites es moderada considerando que partió de un único evento fundador (25 parejas) y que en la actualidad está formada por más de 100.000 ejemplares. Esta variabilidad podría ocurrir por la existencia de apareamientos promiscuos entre los castores del ATDF, aunque debería ser confirmada en futuros estudios de parentesco.

El número total de alelos encontrados en los microsatélites osciló entre 3 y 9 (con un promedio de 5 alelos por *locus*), siendo Cca10 el microsatélite que presentó mayor número de alelos y Cca19 el menor. Estudios de variabilidad genética en microsatélites en otras poblaciones de especies introducidas encontraron valores similares a los registrados en esta tesis, por ejemplo en la población invasora de *Rattus rattus* en Nueva Zelanda (4,62 a 5,16 alelos por *locus*; Abdelkrim *et al.* 2010); en la población invasora de *Mustela vison* de Escocia (3,6 a 5,6 alelos por locus; Zalewski *et al.* 2009); en poblaciones introducidas de visones en España (3,9 a 4,7 alelos por locus; Lecis *et al.* 2007) mientras que el promedio de alelos por *locus* fue menor (2 a 4) en la población invasora de *Rattus norvegicus* en Noruega (Rusell *et al.* 2009). Es importante destacar que la cantidad de alelos detectados en la población de castores del Archipiélago siempre fue menor a la detectada en el Hemisferio Norte, en donde se encontraron entre 4 y 15 (con un promedio de 7 a 7,57 alelos por *locus*) (Crawford *et al.* 2007, 2008, 2009). Esta

diferencia puede deberse a que en las poblaciones introducidas generalmente la variabilidad genética es mucho menor que en las poblaciones originarias.

Cuando se analizó la estructura poblacional utilizando microsatélites, la varianza intrapoblacional fue de 95% mientras que la diferencia entre subpoblaciones fue del 5% , con un valor de Fst de 0,052 ($p<0,001$). Cuando se comparó entre subpoblaciones, las subpoblaciones A-E (Fst=0,057, p=0,003) y B-E (Fst=0,050, p=0,001) fueron las que presentaron menor flujo génico. Cabe destacar que para el marcador mitocondrial, las subpoblaciones B y E también fueron las que presentaron menor flujo génico, con lo cual estos resultados indicarían que la subpoblación E se encontraría más aislada del resto de las subpoblaciones definidas en este estudio. Es importante destacar que cuando se analizó la estructura genético-espacial a nivel global (5 subpoblaciones) para ambos marcadores (nuclear y mitocondrial), los valores fueron muy similares ($\Phi st=0,058$ p=0,002 para D-loop y Fst=0,052 $p<0,001$ para microsatélites) por lo tanto, los microsatélites no aportaron mayor información que el ADNmt. Otros estudios en especies invasoras, presentaron valores de Fst similares y siempre menores a 0,2. Por ejemplo, en la población introducida de *Mustela vison* de España los valores de Fst registrados oscilaron entre 0,049 y 0,148 (Lecis *et al.* 2007) mientras que en la población invasora de la misma especie pero en Escocia el Fst osciló entre 0,05 y 0,15 (Zalewski *et al.* 2009) y en la población invasora de *Rattus rattus* en Nueva Zelanda oscilaron entre 0,022 y 0,052 (Abdelkrim *et al.* 2010). Por lo tanto, estos resultados demostrarían que generalmente las especies invasoras no presentan una estructura genética-poblacional significativa y tal como que fue discutido en los trabajos de Sax y Brown (2000) y Frankham (2005), en donde se plantea la paradoja de las invasiones biológicas, tampoco necesitarían presentar una alta variabilidad genética para convertirse en invasoras.

Por último, si bien los valores de Fu y Tajima mostraron valores cercanos a cero y no significativos, no se puede asegurar que la población se encuentre estable. Por el contrario, la distribución unimodal de las frecuencias pareadas, demostró que la población de castor se encuentra en expansión, lo cual era de esperarse dado su gran capacidad de avance en el Archipiélago. Estos resultados indican que la población invasora de castores se propagó rápidamente y que aún no ha tenido tiempo ni aislamiento suficiente para presentar una estructura genético-poblacional significativa, por lo tanto, la población del Archipiélago se comportaría como una población panmíctica. Debido a esto y dado a que prácticamente no hay estructuración poblacional no se pudo utilizar el programa STRUCTURE para identificar unidades genéticas.

Los resultados obtenidos en esta tesis con el marcador mitocondrial fueron publicados en:

- FASANELLA M., S. POLJAK Y M. LIZARRALDE. 2010. Invasive North American Beaver (*Castor canadensis*): the distribution of mitochondrial variation across the Archipelago of Tierra del Fuego. Mastozoología Neotropical. 17(1):43-52.

- FASANELLA M. Y M.S. LIZARRALDE. 2011. The invasive Beaver *Castor canadensis* in the Tierra del Fuego Archipelago: A mitochondrial DNA and spatial genetic structure analysis for controlling population expansion. BLANCO J.J. Y A.T. FERNANDES (eds.) En: Invasive species: Threats, Ecological Impact and Control methods. Nova Publishers.

CAPÍTULO 6

Consideraciones finales

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudió la variabilidad genética y la estructura genético-poblacional en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego (ATDF), utilizados como modelo de estudio: una especie endémica (*Ctenomys magellanicus*) y una especie introducida (*Castor canadensis*). Como se mencionó en el Capítulo 1, ambas especies presentan diferencias en cuanto a la historia de vida. *Ctenomys magellanicus* presentó una fuerte estructuración genética entre regiones y dentro de cada región, mientras que *Castor canadensis* no presentó una estructuración genético-poblacional significativa. Estas diferencias se deberían a que *C. canadensis* es una especie introducida en el ATDF tan sólo 60 años atrás mientras que los tucos son endémicos de Tierra del Fuego. La variabilidad observada en la población de castores fue menor a la registrada en poblaciones del Hemisferio Norte, evidentemente porque la población de castor de TDF se originó a partir de 25 parejas fundadoras en un único evento de introducción, siendo esperable una baja variabilidad molecular (tanto a nivel mitocondrial como nuclear). En cambio, *C. magellanicus* si bien presentó niveles de endogamia (principalmente en la REGION SUR) los niveles de variabilidad son altos dentro del Género, sobre todo en los microsatélites. Sin duda, entre varios factores, la situación de especie nativa o invasora involucra tiempos y procesos evolutivos distintos. Si bien la población de tucos demostró estar en expansión poblacional, la fuerte estructura genético-poblacional, los niveles de endogamia registrados y el tipo de vida subterránea permitirían predecir que los niveles de estructuración no variarán. Por el contrario, la población de castor, al ser una especie invasora, se encuentra constantemente en un proceso de expansión y al no presentar una estructuración genético-poblacional significativa, es de esperar que debido al gran flujo génico que presenta la estructuración genético-poblacional se vea modificada en el futuro; sobre todo si se comienza un plan de control/erradicación en donde se modificará la variabilidad genética debido a la extracción de ejemplares.

Por otro lado, los datos obtenidos en esta tesis resultaron insuficientes para identificar Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), por lo que será necesario realizar estudios filogeográficos y filogenéticos futuros no comprendidos en el alcance de esta tesis. Es importante mencionar que para que los conceptos teóricos de la genética de la conservación resulten de utilidad en el diseño de estrategias de manejo, tienen que ser prácticos para su aplicación. Los datos moleculares deben ser cuidadosamente evaluados junto con datos históricos, ecológicos, de genética de población y del paisaje, sociales, de distribución, etológicos, ambientales (entre otros) con la finalidad de obtener una perspectiva más realista y acertada (Crandall *et al.* 2000). En otras palabras, para poder diseñar un plan de manejo

sostenido en el tiempo, el trabajo debe ser multidisciplinario. En consecuencia, se comentarán algunas consideraciones para el manejo de las 2 especies estudiadas en esta tesis, cuyos datos potencialmente podrán aplicarse para la conservación o erradicación, según se trate del manejo de la especie endémica o el control de la especie invasora.

Implicancias para la conservación de *Ctenomys magellanicus*

Como se mencionó anteriormente, si bien los datos aportan información parcial, se podrían sugerir Unidades de Manejo para la conservación de los tucos en Tierra del Fuego. Los resultados de esta tesis demuestran que *Ctenomys magellanicus* presenta una estructuración genético-poblacional significativa, con flujo génico limitado entre ambas regiones y con diferencias dentro de cada región, indicando que la REGION SUR está más estructurada a nivel genético que la REGION NORTE. Sin embargo, dado que *Ctenomys magellanicus* presenta dos formas cromosómicas, resulta necesario conservar los individuos de ambas regiones. Según Moritz (1994), las Unidades de Manejo se definen como poblaciones que presentan una significativa divergencia de frecuencias alélicas en *loci* nucleares y mitocondriales. Por lo tanto, en la REGION SUR cada subpoblación podría ser definida como una Unidad de Manejo ya que entre ellas presentaron valores de Fst pareados elevados (es decir una gran divergencia entre subpoblaciones; todos los valores de divergencia entre las subpoblaciones fueron mayores a 0,3). Además, las 4 subpoblaciones de la REGION SUR presentaron haplotipos únicos que no fueron compartidos ni con subpoblaciones de la misma región ni con la REGION NORTE (*i.e.* los Haplotipos 2 y 3 sólo se encontraron en la subpob A; el Haplotipo 8 en la subpob B; el Haplotipo 9 en la subpob C y el Haplotipo 4 en la subpob D), por lo tanto, de extinguirse alguna de estas subpoblaciones, se extinguirían haplotipos únicos, que sería imposible recuperarlos. Por otro lado, en la REGION NORTE la divergencia no fue elevada y por lo tanto toda la región podría ser considerada como una Unidad de Manejo. A nivel logístico, y dado que la subpoblación F habría surgido de la E, se podría considerar sólo a la subpoblación E como una Unidad de Manejo y de esta manera reducir los esfuerzos de conservación para la REGION NORTE. Futuros planes de manejo y conservación para esta especie deberían contemplar los aspectos de diferenciación genética presentados en esta tesis, ya que si se extinguiese alguna de las 5 Unidades de Manejo identificadas, se estaría perdiendo gran parte de la información genética de la especie. Es importante destacar que en la REGION NORTE, muy cercano adonde se distribuyen los tucos (Cm34) se encuentra el Refugio Privado de Vida Silvestre DICKY (53°19´S, 68°23´O, www.ambiente.gov.ar), el cual estaría “protegiendo” la zona, mientras que

en la REGION SUR no existe ningún tipo de Área Protegida o Reserva, con lo cual sería imprescindible conservar dicha región.

Implicancias para el control/erradicación de *Castor canadensis* en TDF

El castor tuvo una sorprendente expansión poblacional poco tiempo después de su introducción, lo que produjo alteraciones ambientales de importancia y magnitud. Sin duda, su control, erradicación o si la especie debe ser tolerada es una decisión compleja. En primer lugar porque es una invasora establecida exitosamente desde hace varios años en el archipiélago, luego por la falta de predadores y competidores, además de las condiciones ambientales, la inaccesibilidad de muchas áreas donde se ha establecido y la enorme y compleja red hidrográfica que facilita la continua invasión son algunos de los aspectos que decididamente confluyen para que cualquier acción de manejo deba ser decidida en función de un equilibrio entre una multiplicidad de factores ambientales y sociales. Por ejemplo, si se decide erradicar el castor se desconoce qué efectos tendría sobre el funcionamiento de los ecosistemas actuales de TDF. Por lo cual, es imprescindible analizar y estudiar estos efectos en forma complementaria: inundaciones de vastas áreas del bosque por rotura de diques, dispersión de la enorme cantidad de sedimentos retenidos en los diques que serían arrastrados por ríos y arroyos corriente abajo e incluso vertidos al mar, restauración de las áreas impactadas y los tiempos de recuperación en función de los ciclos biogeoquímcios, entre otros temas.

Los programas de erradicación de mamíferos que realmente resultaron exitosos en el mundo son pocos y en general ocurrieron en islas o poblaciones de pequeño tamaño (Towns y Broome 2003; Clout y Rusell 2006; Martins *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2006). Por ende decidir exclusivamente la erradicación del castor en la Isla Grande, con una superficie de cobertura de aprox. 48.000 km^2, representaría una estrategia de esfuerzo de dos órdenes de magnitud mayor que cualquier programa de erradicación exitoso realizado en roedores (Ej. 110 km^2; Towns y Broome 2003) y quizás sería la alternativa menos conveniente desde el punto de vista logístico. Por lo tanto, y para que un potencial programa de erradicación del castor sea exitoso sería prioritario detectar barreras a la dispersión (naturales o artificiales) que impidan la dispersión de los individuos y que por lo tanto, cada población discreta (<110 km^2) pueda ser considerada como una Unidad de Erradicación (Robertson y Gemell 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que no es posible detectar claramente este tipo de Unidades en la Isla Grande, pues no se encontró una estructura genético-poblacional significativa. Un escenario similar al encontrado en Tierra del Fuego para invasoras como los castores se

encontró en Nueva Zelanda con mamíferos predadores (Saunders y Norton 2001) y *Rattus rattus* (Abdelkrim *et al.* 2010) en donde no encontraron una estructuración genético-poblacional significativa ni pudieron identificar barreras a la dispersión. Si bien Nueva Zelanda presenta una larga historia de erradicaciones exitosas, las mismas fueron siempre llevadas a cabo en pequeñas áreas geográficas. En cambio, en estos dos ejemplos, los límites para las unidades de erradicación no eran claros, el área a erradicar era inmensa (≈200.000 km^2) y por lo tanto plantear un programa de erradicación era confuso. Los autores plantearon que en este tipo de escenario, el control probablemente sea más fácil de lograr y más realista que la erradicación.

Como se mencionó anteriormente, para poder diseñar un plan de erradicación efectivo, es necesario definir las Unidades de Erradicación basadas en la ausencia de flujo génico entre ellas y para que sea exitoso a largo plazo, es importante que se erradiquen todas las Unidades al mismo tiempo para evitar recolonizaciones. En este estudio, hemos demostrado que la población del ATDF no presenta una fuerte estructuración genética, no pudiendo detectarse Unidades de Erradicación, especialmente dentro de la Isla Grande ya que no se encontraron barreras a la dispersión y por lo tanto el movimiento entre las subpoblaciones es constante. Sin embargo, la Isla Dawson (Subpoblación E) podría ser considerada como una Unidad de Erradicación dado que presentó una mayor divergencia con respecto al resto de las subpoblaciones de la Isla Grande, su tamaño es acotado (1.290 km^2) y se encuentra rodeada por el Estrecho de Magallanes. Es decir, esta subpoblación sería la más fácil de erradicar logísticamente. De encontrarse castores luego de la erradicación, los mismos podrán ser examinados genéticamente utilizando test de asignación y ser identificados como sobrevivientes de la erradicación (indicando que el protocolo ha fallado) o como re-invasores (destacando rutas de dispersión despreciadas) (Robertson y Gemmell 2004), de esta manera se podrá poner a prueba si la erradicación de la Isla Dawson ha funcionado o si aún tiene fallas.

El resto de las subpoblaciones de la Isla Grande, al comportarse como una población panmíctica, no sería posible definir Unidades de Erradicación, con lo cual el control sería lo más fácil de lograr a largo plazo. Básicamente, si bien a nivel genético los datos no permiten detectar Unidades de Manejo, las subpoblaciones A, B, C y D podrían ser consideradas inicialmente como Unidades para controlar a la especie en la Isla Grande y evitar que la población se expanda y eventualmente erradicar en subpoblaciones de castor que se encuentren en islas de pequeño tamaño. Es fundamental realizar el control en toda la Isla Grande al mismo tiempo, ya que si se realiza por subpoblaciones, debido a la gran cantidad de

movimiento que existe entre ellas, las mismas serán continuamente invadidas por nuevos castores. Los resultados de esta tesis demuestran que la erradicación de *Castor canadensis* en la Isla Grande de Tierra del Fuego es imposible debido a que los castores no presentan ningún tipo de barrera y que se mueven libremente de una cuenca a otra, por lo tanto el control sería lo más apropiado.

Lineamientos a futuro para ambas especies

Ctenomys magellanicus

Sin duda es necesario conocer el estado de conservación de la especie para lo cual deberían realizarse campañas en las provincias de Santa Cruz y Chubut donde, verificar la presencia de la misma mencionada por Bidau *et al.* (2008) y de esta forma confirmar si su distribución se restringiría o no a la Isla Grande de Tierra del Fuego. De acuerdo a los resultados de esta tesis, ambas formas cromosómicas se encontrarían aisladas (no existen haplotipos de ADNmt en común) y por lo expresado en capítulos anteriores, esta situación podría llevar a un proceso de especiación. Indudablemente será necesario realizar estudios futuros a nivel filogenéticos y morfológicos, los cuales podrán confirmar si ambas formas cromosómicas son la misma especie o se encuentran en un proceso de especiación activa como ha sido mencionado por Lizarralde *et al.* (2001, 2003). También sería necesario verificar si las dos formas cromosómicas generan híbridos y si los mismos son viables. Si bien en la naturaleza no se han encontrado, sería interesante cruzar *ex-situ* ambas formas cromosómicas para verificar la viabilidad. Por otro lado, habría que realizar estudios a nivel de fragmentación de hábitat para estudiar si el impacto antrópico es positivo, negativo o sin efecto en el crecimiento poblacional de la especie. Por lo tanto, para completar el estudio en *Ctenomys magellanicus*, será necesario:

1) Amplificar el D-loop entero y otro marcador mitocondrial (para poder realizar filogenias) y amplificar mayor cantidad de microsatélites para completar la información genética generada para así poder determinar ESUs.

2) Realizar estudios morfológicos y filogenéticos para poder determinar si ambas formas cromosómicas siguen perteneciendo a *C. magellanicus*.

Castor canadensis

Recientemente, la invasión de castor registrada en la parte continental de Chile (Península Brunswick) movilizó a los organismos de gestión de ambos países quienes en septiembre de

2008 firmaron un acuerdo Binacional para la restauración de los ecosistemas australes afectados por el castor. Indudablemente, la invasión del castor es un tema complejo y la herramienta molecular permitiría conjugar distintas estrategias para asegurar el éxito en el corto y mediano plazo de la erradicación y control, que además necesitará la participación de la comunidad científica, del sector privado y de organizaciones no gubernamentales. Si bien no se encontró una estructuración genético-poblacional significativa, es necesario seguir adelante con los estudios genéticos, especialmente de microsatélites, ya que podrían aportar información de las rutas de invasión y por ende la dirección de la invasión. Además, sería interesante conseguir muestras de Península Brunswick (área continental) para poder dilucidar cuál fue la ruta de invasión utilizada para llegar al continente y de esta manera controlar esos sitios para que los individuos no continúen invadiendo el continente. Por lo tanto, para completar el estudio en *Castor canadensis*, será necesario:

1) Amplificar mayor cantidad de *loci* de microsatélites para poder estudiar mejor la variabilidad genética, las rutas de invasión y realizar estudios de parentesco. Probablemente, aumentando la cantidad de *loci* de microsatélites se podrá aumentar la variabilidad genética y por lo tanto se podría llegar a detectar una estructuración genético-poblacional.

2) De encontrarse una mayor estructuración genético-poblacional aumentando la cantidad de marcadores, se podrán definir UMs dentro de la Isla Grande para utilizarlas en un futuro plan de manejo del castor en el Archipiélago.

BIBLIOGRAFÍA

AARS J. Y R.A. IMS. 1999. The effect of habitat corridors on rates of transfer and interbreeding between vole demes. Ecology. 80(5):1648-1655.

ABDELKRIM J., A.E. BYROM Y N.J. GEMMELL. 2010. Fine-scale genetic structure of mainland invasive Rattus rattus populations: implications for restoration of forested conservation areas in New Zealand. Conservation Genetics. 11:1953-1946.

ABDELKRIM J., M. PASCAL, C. CALMET Y S. SAMADI. 2005. Importance of assessing population genetic structure before eradication of invasive species: examples from insular Norway rat populations. Conservation Biology. 19:1509-1518.

ADMINISTRACIÓN DE PARQUES NACIONALES (APN). 2006. Programa de Control de "Castor Americano" *Castor canadensis*. 20 pp.

ALJANABI S.M. E I. MARTÍNEZ. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. Nucleic Acids Research. 25:4692-4693.

ALLENDORF F.W. Y L.L. LUNDQUIST. 2003. Population Biology, evolution and control of invasive species. Conservation Biology. 17(1):24-30.

ALTUNA CA., G. FRANCESCOLI, B. TASSINO E I. IZQUIERDO. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: El caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. Etología, vol. 7, p. 47-54.

ÁLVAREZ S.E. Y M.S. LIZARRALDE. 1998. Biología evolutiva del género *Ctenomys* en Tierra del Fuego: patrón filogeográfico de las 2 formas cromosómicas de *C. magellanicus* basado en estudios de ADN mitocondrial y morfométricos. Informe técnico CADIC-CONICET. Ushuaia, Tierra del Fuego. 41 pp.

AMOS W. Y J. HARWOOD. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. Phil. Trans. Royal Soc. London B 353:177-186.

AMSELLEM L., J.L. NOYER, T. LE BOURGEOIS Y M. HOSSAERT-MCKEY. 2000. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Molecular Ecology. 9:443-455.

ANDERSON C.B. Y A.D. ROSEMOND. 2007. Ecosystem engineering by invasive exotic beavers reduces in-stream diversity and enhances ecosystem function in Cape Horn, Chile. Oecologia. 154:141-153.

ANDERSON C.B., C.R. GRIFFITH, A.D. ROSEMOND, R. ROZZI Y O. DOLLENZ. 2006. The effects of invasive North American beavers on riparian plant communities in Cape Horn, Chile - Do exotic beavers engineer differently in sub-Antarctic ecosystems? Biological Conservation 128(4): 467-474.

ANDERSON C.B., G. MARTÍNEZ PASTUR, M.V. LENCINAS, P.K. WALLEM Y M.C. MOORMAN. 2008. Implicancias de restauración de la remoción del castor en el Archipiélago Austral de Chile y Argentina: comprendiendo el rol ecológico del *Castor canadensis* como un ingeniero de ecosistemas exótico. En: SILVA C.A. Y B. SAAVEDRA. 2008. Actas del Taller Internacional para el Control de Castores en la Patagonia. Edición digital. Wildlife Conservation Society-Chile.

ANDERSON C.B., G. MARTÍNEZ PASTUR, M.V. LENCINAS, P.K. WALLEM, M.C. MOORMAN Y A.D. ROSEMOND. 2009. Do introduced North American beavers engineer differently in southern South America? An overview with implications for restoration. Mammal Review. 39:33–52.

ANDERSON C.H, N. SOTO, J.L. CABELLO, G. MARTÍNEZ PASTUR, M.V. LENCINAS, P. WALLEM, D. ANTÚNEZ Y E. DAVIS. 2011. Building effective alliances between research and management to mitigate the impacts of an invasive ecosystem engineer: Lessons from the pioneering example of the study and control of North American beaver in the Fuegian archipelago. En: A handbook of global freshwater invasive species (R. Francis, Ed.). Earthscan Press, London, UK. Section 5, Chapter 29, pp 347-359 (ISBN 978-1-849-71228-6).

ANDRADE B.S. 2005. Gestión para la caza y aprovechamiento de fauna dañina en XII Región. Informe preparado para el Servicio Agrícola y Ganadero de Magallanes, 107 pp.

ANTINUCCI C.D., R.R. ZENUTO, F. LUNA, A.P. CUTRERA, P.P. PERISINOTTI, C. BUSCH. 2007. Energy budget in subterranean rodents: Insights from the tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). Pp. 111-140 In The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson (Kelt DA, Lessa E, Salazar-Bravo JA, Patton JL (eds.). University of California Publications in Zoology.

AVISE J.C. 1994. Molecular Markers. Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.

AZURRO E., D. GOLANI, G. BUCCIARELLI Y G. BERNARDI. 2006. Genetics of the early stages of invasión of the Lessepcian rabbitfish *Siganus luridus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 333:190-201.

BARNES D.M. Y A.U. MALIK. 1997. Habitat factors influencing beaver dam establishment in a northern Ontario watershed. Journal of Wildlife Management. 61:1371-1377.

BAUR B. Y B. SCHMID. 1996. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. En: Gaston, K. J. (ed). Biodiversity: a biology of numbers and difference. Blackwell Science, Reino Unido.

BERRY O., M.D. TOCHER Y S.D. SARRE. 2004. Can assignment test measure dispersal? Molecular Ecology. 13(3):551-561.

BIDAU C.J., GIMÉNEZ M.D. Y J.R. CONTRERAS. 1996. Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). Mendeliana. 12:25-37.

BIDAU C., E. LESSA Y R. OJEDA. 2008. *Ctenomys magellanicus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4.

BONDEL C.S. 1988. Geografía de Tierra del Fuego: guía docente para su enseñanza. Museo Territorial de Ushuaia. Ushuaia, Tierra del Fuego. 165 pp.

BRECK S.W., WILSON K.R. Y D.C. ANDERSON. 2001. The demographic response of bank-dwelling beavers to flow regulation: a comparision on the Green and Yampa rivers. Canadian Journal of Zoology. 79:1957-1964.

BRIONES M., R. SCHLATTER, A. WOLODARSKY Y C. VENEGAS. 2001. Clasificación ambiental para hábitat de *Castor canadensis* (Kuhl 1820, Rodentia), de acuerdo a características de cuencas en un sector de Tierra del Fuego. Anales del Instituto de la Patagonia, 29, 75–93.

BROOKS T.M., R.A. MITTERMEIER, G.A.B. DA FONSECA, J. GERLACH, M. HOFFMANN, J.F. LAMOREUX, C.G. MITTERMEIER, J.D. PILGRIM Y A.S.L RODRIGUES. 2006. Global biodiversity conservation priorities. Science. 313:58-61.

BROWN W.M., M. JR. GEORGE Y A.C. WILSON. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76:1967-1971.

BUJALESKY G.G. 2007. Coastal geomorphology and evolution of Tierra del Fuego (Southern Argentina). Geologia Acta. 5(4):337-362.

BUJALESKY G.G., S. ALIOTTA Y F. ISLA. 2004. Facies del subfondo del canal Beagle, Tierra del Fuego. Revista de la Asociación Geológica Argentina. 59(1): 29-37.

BUSCH, C., C. D. ANTINUCHI, J. C. DEL VALLE, M. J. KITTLEIN, A. I. MALIZIA, A. I. VASSALLO Y R. R. ZENUTO. 2000. Population ecology of subterranean rodents. In Lacey E. A., J. L. Patton & G. N. Cameron (Eds). Life underground: the biology of subterranean rodents. University of Chicago Press.

BUSHER P.E. 1996. Food caching behavior of beavers (*Castor canadensis*): selection and use of woody species. American Midland Naturalist. 135: 343-348.

CARVALHO D.C., D.A.A. OLIVEIRA, J.E. SANTOS, P. TESKE, L.B. BEHEREGARAY, H. SCHNEIDER E I. SAMPAIO. 2009. Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus cichla in Brazil. Genetic Molecular Biology. 32(3):601-607.

CASSENS I., R. TIEDEMANN, F. SUCHENTRUNK Y B. HARTL. 2000. Mitochondrial DNA variation in the European Otter (Lutra lutra) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. The Journal of Heredity. 91(1): 31-35.

CASTILLO N. 2006. Determinación de la composición botánica de la dieta de Castor (*Castor canadensis*) en la isla Tierra del Fuego. Tesis título de Ingeniero en Ejecución Agropecuario. Universidad de Magallanes, Punta Arenas.

CEGELSKI C., L.P. WAITS Y N.J. ANDERSON. 2003. Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. Molecular Ecology. 12:2907-2918.

CHESSER R.K. 1991. Influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations. Genetics 127: 372-388.

CLOUT M.N. Y J.C. RUSELL. 2006. The eradication of mammals from New Zealand islands. In: Koike F., Clout M.N., Kawamichi M., De Poorter M. & Iwatsuki K. (Eds.). *Assesment and Control of Biological Invasion Risks.* (Pp. 127-141). Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan and UICN, Gland, Switzerland.

COLLANTES M.B., J. ANCHORENA Y A.M. CINGOLANI. 1999. The steppes of Tierra del Fuego: Floristic and growthform patlerns controlled by soil fertility and moisture. Plant Ecology. 140: 61-75.

COLLANTES M.B., J. ANCHORENA Y G. KOREMBLIT. 1989. A soil nutrient gradient in magellanic Empetrum heathlands. Vegetation. 80: 183-193.

COLLEN P. Y R.J. GIBSON. 2001. The general ecology of beavers (*Castor spp*.) as related to their influence on stream ecosystems and riparian habitats, and the subsequent effects on fish – a review. Review in Fish Biology and Fisheries 10: 439-461.

COLTMAN D.W., D.W. BOWEN Y J.M. WEITH. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. Molecular Ecology 5:161-163.

CONTRERAS J.R. 1973. El tuco-tuco y sus relaciones con los problemas del suelo en la Argentina. Idia 29:14–36.

CORNUET J.M., S. PIRY, G. LUIKART, A. ESTOUP Y M. SOLIGNAC. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics. 153:1989–2000.

CORONATO A., J. ESCOBAR, C. MALLEA, C. ROIG Y M. LIZARRALDE. 2003. Características geomorfológicas de ríos y montaña colonizados por *Castor canadensis* en Tierra del Fuego, Argentina. Ecología Austral. 13:15-26.

COULON A., J.F. COSSON, J.M. ANGIBAULT, B. CARGNELUTTI, M. GALAN, N. MORELLET, E. PETIT, S. AULAGNIER Y J.M. HEWISON. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer individual-based approach. Molecular Ecology 13:2841-2850.

COURCHAMP F., J.L. CHAPIUS Y M. PASCAL. 2003. Mammalian invaders on islands: impact, control and control impact. Biological Reviews. 78:347–383.

CRANDALL K.A., BININDA-EMONDS O.R.P., G.M. MACE Y R.K. WAYNE. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in Ecology and Evolution. 15:290-295.

CRAWFORD J.C., Z. LIU, T.A. NELSON, C.K. NIELSEN Y C.K. BLOOMQUIST. 2008. Microsatellite analysis of mating and kinship in beavers (*Castor canadensis*). Journal of Mammalogy 89:575–581.

CRAWFORD J.C., Z. LIU, T.A. NELSON, C.K. NIELSEN Y S.K.BLOOMQUIST. 2009. Genetic population structure within and between Beaver (*Castor canadensis*) populations in Illinois. Journal of Mammalogy. 90(2): 373-379.

CRAWFORD, J. C., Z. LIU, T. A. NELSON, C. K. NIELSEN, AND C. K. BLOOMQUIST. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the beaver (*Castor canadensis*). Molecular Ecology Resources. 8(3): 616-618.

CURTIS P.D. Y P.G. JENSEN. 2004. Habitat factors affecting beaver occupancy along roadsides in New York State. Journal of Wildlife Management. 68(2):278-287.

CUTRERA A.P. Y C.D. ANTINUCHI. 2004. Cambios en el pelaje del roedor subterráneo *Ctenomys talarum*: posible mecanismo térmico compensatorio. Revista Chilena de Historia Natural. 77:235-242.

CUTRERA A.P., E.A. LACEY Y C. BUSCH.2006. Intraespecific variation in effective population size in talar tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. Journal of Mammalogy. 87(1):108-116.

CUTRERA A.P., E.A. LACEY, C. BUSCH. 2005. Genetic Structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. Molecular Ecology. 14:2511–2523.

DARLING J.A. Y M.J. BLUM. 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: A review and prospectus. Biological Invasions. 9(7):751-765.

DIONNE M.F., J.J. CARON, J.J. DODSON Y L. BERNATCHEZ. 2008. Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the interaction of gene flow and local adaptation. Molecular Ecology. 17:2382-2396.

DIRIENZO A. Y C. WILSON. 1991. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. Proceedings of Natural Academy of Sciences. USA 88:1597-1601.

DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ O. Y E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation. 32(1):59-70.

DUCROZ J.F., M.STUBBE, A.P. SAVELJEV, D. HEIDECKE, R. SAMJAA, A. ULEVICIUS, A. STUBBE Y W. DURKA. 2005. Genetic variation and population structure or the Eurasian Beaver *Castor fiber* in Eastern Europe and Asia. Journal of Mammalogy. 86(6): 1059-1067.

DURKA W, W BABIK, JF DUCROZ, D HEIDECKE, F ROSSEL, SAMJAA R, AP SAVELJEV, A STUBBE, A ULEVICIUS y M STUBBE. 2005. Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. Molecular Ecology. 14: 3843-3856.

EARL D.A. 2011. Structure Harvester v0.6.1. Disponible en http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/ (acceso 16/09/2011).

EGUIARTE L.E. Y D. PIÑERO. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. Ciencias. Número especial 4. Ecología y conservación en México: 34 –47 (reimpreso en Nuñez-Farfán J. y L. E. Eguiarte (editores)). La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. Pp. 371-398.

EGUIARTE L.E., V. SOUZA Y X. AGUIRRE (Compiladores). 2007. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

EL JUNDI T.A.R.J. Y T.R.O. FREITAS. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae). Hereditas 140: 18-23.

ELLSTRAND N.C. Y K.A. SCHIERENBECK. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 97:7043-7050.

ELTON C.S. 1958. The Ecology of Invasions by Animals and Plants. Methuen & Co., London, UK.

EPPERSON B.K. 1990. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. Genetics. 124:757-771.

EPPERSON B.K. Y T. LI. 1996. Measurement of genetic structure within populations using Moran´s spatial autocorrelation statistics. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 93:10528-10532.

EPPERSON B.K., Z. HUANG Y T.Q. LI. 1999. Measures of spatial structure in samples of genotypes for multiallelic loci. Genetica. 73:251-261.

EVANNO G., S. REGNAUT Y J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 14:2611-2620.

EXCOFFIER L. G. LAVAL Y S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bioinformatics Online. 1:47-50.

FERNÁNDEZ-STOLZ G. P, J. F. B. STOLZ Y T. R. O. DE FREITAS. 2007. Bottlenecks and dispersal in the Tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. Journal of Mammalogy 88: 935-945.

FERNÁNDEZ-STOLZ G.P. 2007. Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservacao em uma espécie endémica do ecosistema de dunas costeiras do Sul do Brasil, Ctenomys flamarioni (Rodentia-Ctenomyidae), a través de marcadores moleculares microsatélites e DNA mitocondrial. Tesis de Doctorado. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Brasil.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. 1999-2011. NETWORK ver 4.6.0.0. Available from http://www.fluxus-engineering.com.

FOERSTER K, M VALCU, A JOHNSEN y B KEMPENAERS. 2006. A spatial genetic structure and effects of relatedness on mate choice in a wild bird population. Molecular Ecology 15: 4555-4567.

FOLTZ D.W. Y J.L. HOOGLAND. 1983. Genetic evidence of outbreeding in the blacktailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). Evolution 37:273-281.

FORNEL R. Evolução na forma e tamanho do crânio no gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae).Tesis de Doctorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. 171 pp.

FRANKHAM R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. Genetical Research. 66:95-107.

FRANKHAM R. 1997. Do island populations have lower genetic variation than mainland populations? Heredity. 78:311-327.

FRANKHAM R. 2005. Resolving the genetic paradox in invasive species. Heredity. 94:385.

FRANKHAM R. K. LEES, M.E. MONTGOMERY, P.R. ENGLAND, E. LOWE Y D.A. BRISCOE. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? Animal Conservation. 2:255-260.

FRANKHAM R., J.D. BALLOU Y D.A. BRISCOE. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Reino Unido.

FRANKHAM R., H. MANNING, S.H. MARGAN Y D.A. BRISCOE. 2000. Does equalisation of family sizes reduce genetic adaptation to captivity? Animal Conservation. 3:357–363.

FRASER D.J. Y L. BERNATCHEZ. 2001. Adaptative evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. Molecular Ecology. 10:2741-2752.

FU Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147:915-925.

GAGGIOTTI O.E. E I. HANSKI. 2004. Mechanisms of population extinction. In: Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (Eds.), Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulation, pp. 337-366. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

GALLARDO M. 1979. Las especies chilenas de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). I. Estabilidad cariotípica. Archivos de Biología y Medicina Experimental. 12:71-82.

GARANT D. Y L.E. KRUUK. 2005. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. Molecular Ecology. 14:1843-1859.

GARRIZ C. Y LIZARRALDE M. 2007. Subproductos Cárnicos de Fauna Silvestre: Posibilidad de aprovechamiento de carne de castor. Publicación Científico Técnica Recursos Naturales (Formato Digital). SPD Provincia de Tierra del Fuego. 70 pp.

GAVA A. Y T.R.O. FREITAS. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of Ctenomys minutus from southern Brazil (Rodentia, Ctenomyidae). Journal of Mammalogy. 85:1201-1206.

GIMÉNEZ M.D., P.M. MIROL, C.J. BIDAU Y J.B. SEARLE. 2002. Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotipic variability. Cytogenetic and Genome Research. 96:130-136.

GODOY J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. Ecosistemas. 18(1):23-33.

GOFFINET B., W. BUCK, R. ROZZI Y F. MASSARDO. 2006. The Miniature Forests of Cape Horn – Los Bosques en Miniatura de Cabo de Hornos. Ediciones de la Universidad de Magallanes – Fundación Omora, Punta Arenas.

GOLSTEIN D.B., L.A. RUÍZ, L.L. CAVALLI-SFORZA Y M.W. FELMAN. 1995. Genetics absolute dating based on microsatellites and the origin of modern human. Proceedings of Natural Academy of Sciences USA. 92:6723-6727

GRANT W.S. Y B.W. BOWEN. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Genetics. 89:415-426.

GUSINDE M. 1982. Los Selk´nam. De la vida y del mundo spiritual de un pueblo de cazadores. Los indios de Tierra del Fuego. Resultado de mis cuatro expediciones en los años 1918 hasta 1924, organizadas bajo los auspicios del Ministerio de Instrucción Pública de Chile. Tomo II, vol. II. Centro Argentino de Etnología. CONICET, Buenos Aires.

HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignement editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.

HANSKI I. 1994. Spatial scale, patchiness and population dynamics on land. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 343:19-25.

HANSKI I. 1999. Metapopulation Ecology. Oxford University Press, Oxford, UK.

HANSKI I.A. Y M.E. GILPIN. 1997. Metapopulation dynamics: From concepts and observations to predictive models. En *Metapopulation Biology: ecology, genetics and evolution* (Hanski I.A y M.E. Gilpin, Ed.), pp. 69-91. Academic Press, San Diego, California. USA.

HARDY O.J. Y X. VEKEMANS. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. Heredity. 83:145-154.

HARTL, D.L. Y A.G. CLARK. 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Mass.

HARTMAN G. 1995. Patterns of spread of a reintroduced beaver *Castor fiber* population in Sweden. Wildlife Biology. 1:97-103.

HEDRICK P.W. 1995. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. Conservation Biology. 9:996-1007.

HEDRICK P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? Trends in Ecology & Evolution. 16:629-636.

HEDRICK P.W. 2004. Recent developments in conservation genetics. Forest Ecology and Management 197:3-19.

HEDRICK P.W. 2005. 'Genetic restoration': a more comprehensive perspective than 'genetic rescue' Trends in Ecology & Evolution. 20:109.

HOFFMANN M. 1985. Zur Ansiedlung der Bisamratte,Ondatra zibethica (L.). Pp. 93-97, en: Südamerika (On the settlement of the muskrat, Ondatra zibethica (L.) in South-America). Journal Pest of Science. 58: 93-97.

HURSTON H., J. BONANNO, L. VOITH, J. FOUFOPOULOS, P. PAFILIS, E. V ALAKOS Y N. ANTHONY. 2009. Effects of fragmentation on genetic diversity in island populations of the Aegean wall lizard *Podarcis erhardii* (Lacertidae, Reptilia). Molecular Phylogenetics and Evolution 52:395–405.

IMS R.A. Y N.G. YOCCOZ. 1997. Studying transfer processes in metapopulation: emigration, migration and immigration. Pages 247–265 in Hanski, I. A., and M. E. Gilpin, editors. Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution. Academic Press, San Diego, California, USA.

INGVARSSON P.K. 2001. Restoration of genetic variation lost –the genetic rescue hypothesis. Trends in Ecology and Evolution. 16:62-63.

IRIARTE A. 2000. Impacto de la fauna silvestre sobre la flora nativa de Chile. En Baldini A, L Pancel eds. Agentes de daño en el bosque nativo. Santiago, Chile. Editorial Universitaria. 319-350.

ITURRASPE R., R. SOTTINI, C. SCHROEDER Y J. ESCOBAR. 1989. Generación de información Hidroclimática en Tierra del Fuego. CADIC. Contribución científica n°7, Ushuaia. 196 pp.

IUCN. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2 (http://www.iucnredlist.org).

JAKSIC F.M. Y S.A. CASTRO. 2010. Ecología y biodiversidad de vertebrados de Chile: Análisis comentado de la zoología de Claude Gay. Revista Chilena de Historia Natural. 83:323-333.

JAKSIC F.M., J.L. YÁNEZ Y J.R. RAU. 1983. Trophic relations of the southernmost population of Dusicyon in Chile. Journal of Mammalogy 64: 693-697.

JI W., M.N. CLOUT Y S.D. SARRE. 2000. Response of male brushtail possums to sterile females: implications for biological control. Journal of Applied Ecology. 37:926–934.

JOBLING M.A., M.E. HURLES Y C. TYLER-SMITH. 2004. Human evolutionary genetics. Origins, peoples & disease. Garland Science: Garland Publishing.

KALINOWSKI S.T., M.L. TAPER Y T.C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology. 16: 1099-1106.

KELLER L.F. Y D.M. WALLER. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology & Evolution. 17:230-241.

KIBLISKY P. Y O. REIG. 1968. El cariotipo de *Ctenomys magellanicus fueguinus* Philippi (Rodentia Octodontidae) y datos sobre el número somático en distintas especies del género *Ctenomys*. Investigaciones Zoológicas Chilenas. 13:123-130.

KITTLEIN M.J. Y O.E. GAGGIOTTI. 2008. Interactions between environmental factors can hide isolation by distance patterns: a case study of *Ctenomys rionegrensis* in Uruguay. Proceedings of the Royal Society of London, B 275: 2633-2638.

KOLAR C.S. y D.M. LODGE. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. Trends in Ecology & Evolution. 16(4): 199-204.

KOLBE J.A., R.E. GLOR, L. RODRIGUEZ SCHETTINO, A. CHAMIZO LARA, A. LARSON Y J.B. LOSOS. 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. Nature. 431:177-181.

LACEY E. A. 2000. Spatial and social systems of subterranean rodents. En: Lacey, E. A., J. L. Patton & G. N. Cameron (eds.) Life underground: the biology of subterranean rodents. University of Chicago Press, Chicago, pp 257-296.

LACEY E.A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. Heredity. 86:628-637.

LACEY E.A. Y J.E. MALDONADO. 1999. Interespecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomydae). Molecular Ecology. 8:1754-1756.

LACEY E.A., S.H. BRAUDE Y J.R. WIECZOREK. 1997. Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). Journal of Mammalogy 78:556–562.

LACEY E.A., S.H. BRAUDE Y J.R. WIECZOREK. 1998. Solitary burrow use by adult Patagonian tuco-tucos (*Ctenomys haigi*). Journal of Mammalogy 79:986–991.

LADA H., J.R. THOMSON, R.MAC NALLY Y A.C. TAYLOR. 2008. Impact of massive landscape change on a carnivorous marsupial in south-eastern Australia: inferences from landscape genetics. Journal of Applied Ecology. 45:1732-1741.

LANDE R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. Science. 241:1455-1460.

LANDE R. Y S. SHANNON. 1996. The role of genetic-variation in adaptation and populations persistence in a changing environment. Evolution. 50:434-437.

LATCH E.K., D.G. SCOGNAMILLO, J.A. FIKE, M.B. CHAMBERLAIN y O.E. RHODES. 2008. Deciphering ecological barriers to North American River Otter (*Lontra canadensis*) gene flow in the Louisiana landscape. Journal of Heredity 99(3): 265-274.

LAURANCE W.F. Y R.O. BIERREGAARD (eds.) 1997. Tropical forest remnants. Ecology, management, and conservation of fragmented communities. Univ. Chicago Press.

LECIS R., A. FERRANDO, J. RUIZ-OLMO, S. MAÑAS Y X. DOMINGO-ROURA. 2007. Populations genetic structure and distribution of introduced American mink (*Mustela vison*) in Spain, based on microsatellite variation. Conservation Genetics. 9(5):1149-1161.

LEE C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive specis. Trends in Ecology & Evolution. 17:386-391.

LENCINAS M. V. 2005. Biodiversidad en el bosque productivo de *Nothofagus pumilio* y sus ambientes asociados en Tierra del Fuego. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Sur. Bahía Blanca - Argentina. 350 pp.

LENCINAS M.V., ESCOBAR J., MARTÍNEZ PASTUR G., QUIROGA P. Y L. MALMIERCA. 2001. Dinámica de vegetación de bosques Nothofagus en áreas impactadas por *Castor canadensis* en Tierra del Fuego. XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de la Sociedad Argentina 36: 94. Santa Rosa,21-25 Octubre 2001.

LESSA E.P. 2000. The evolution of subterranean rodents: a synthesis. In: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN, eds. Life underground: the biology of subterranean rodents. Chicago, IL: The University of Chicago Press, 389–420.

LESSA E.P. Y J.A. COOK. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. Molecular Phylogenetics and Evolution. 9:88-99.

LEVER C. 1994. Naturalized Animals: the ecology of successfully introduced species. T. & A.D. Poyser, London. 354 pp.

LEVINS R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity

LINDHOLM A.K., F. BREDEN, H.J. ALEXANDER, W.K. CHAN, S.G. THAKURT Y R. BROOKS. 2005. Invasions success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. Molecular Ecology. 14:3671-3682.

LIZARRALDE M Y JM ESCOBAR. 2000. Mamíferos exóticos en la Tierra del Fuego. Ciencia Hoy 10(56): 52-63.

LIZARRALDE M. 1989. El Castor (*Castor canadensis*) en Tierra del Fuego. Praxis 1: 34-35.

LIZARRALDE M. 1993. Current status of the introduced beaver (*Castor canadensis*) population in Tierra del Fuego, Argentina. Ambio. 22(6): 351-358.

LIZARRALDE M. 2000. Orden Roedores. En LIBRO ROJO DE MAMÍFEROS AMENAZADOS DE LA ARGENTINA. G. Diaz y R. Ojeda (Eds. Compiladores) Pág. 57-70, ISBN 987-98497-0-1, 106 pp.

LIZARRALDE M. Y ESCOBAR J. 1999. Plan de Manejo de la especie *Castor canadensis*. Sub. De Rec. Naturales, Prov. TDF.

LIZARRALDE M. Y M. ELISETCH. 2002. Economic significance and standard development of mammal trapping in Argentina. En: Wildlife, Land and People: Priorities for the 21st Century (R. Field, R.J. Warren, H. Okarma y P.R. Sievert, Eds.). Cap 6.16:340-342. The Wildlife Society, Bethesda, USA.

LIZARRALDE M., A. BOLZÁN Y M. BIANCHI. 2003. Karyotipic evolution in south american subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia Octodontidae): chromosome rearregments and TTAGGG telomeric sequence localization in 34 and 36 chromosomal forms. Hereditas. 139:13-17.

LIZARRALDE M., J. ESCOBAR Y G. DEFERRARI. 2004. Invader species in Argentina: A review about the beaver (*Castor canadensis*) population situation on Tierra del Fuego ecosystem. Interciencia 29(7): 352-356.

LIZARRALDE M., J. ESCOBAR, G. DEFERRARI Y M. FASANELLA. 2008b. El castor austral. Investigación y Ciencia 379: 58-64.

LIZARRALDE M.S., G. BAILLIET, S .POLJAK, M. FASANELLA Y C. GIULIVI. 2008a. Assessing genetic variation and population structure of invasive North American beaver (*Castor canadensis* Kuhl, 1820) in Tierra del Fuego (Argentina). Biological Invasions 10: 673-683.

LIZARRALDE M.S., G.A. DEFERRARI, S.E. ALVAREZ Y J.M. ESCOBAR. 1996. Effects of beaver (*Castor canadensis*) on the nutrient dynamics of the Southern Beech forest of Tierra del Fuego (Argentina). Ecología Austral 6: 101-105.

LIZARRALDE M.S., G.A. DEFERRARI, S.E. ALVAREZ Y J.M. ESCOBAR. 2001. Diferenciación evolutiva en *Ctenomys magellanicus*: variación morfológica, alozímica y consideraciones biogegráficas de 2 Formas cromosómicas. Interciencia 26: 13–17.

LOWE S., M. BROWNE, S. BOUDJELAS Y M. DE POORTER. 2004. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Publicado por el Grupo de Especialista de Especies Invasoras (GEEI), un grupo especialista de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). 12 pp.

LUIKART G. F.W. ALLENDORF, J-M. CORNUET Y W.B. SHERWIN. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. Genetics. 89:238-247.

MALDONADO J.E., C. VILÀ Y R.K. WAYNE. 2001. Tripartite genetic subdivision in ornate shrew (*Sorex ornatus*). Molecular Ecology. 10:127-147.

MANEL S., M.K. SCHWARTZ, G. LUIKART Y P. TABERLET. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution 18:189–197.

MANEL S., O.E. GAGGIOTTI, R.S. WAPLES. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. Trends in Ecology & Evolution 20: 136–142.

MAPELLI F.J. 2010. Ecología y genética de metapoblaciones del roedor subterráneo *Ctenomys porteousi*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

MARTÍNEZ PASTUR G., M.V. LENCINAS, J. ESCOBAR, P. QUIROGA, L. MALMIERCA Y M. LIZARRALDE. 2006. Understory succession in Nothofagus forests affected by *Castor canadensis* in Tierra del Fuego (Argentina). Applied Vegetation Science 9: 143-154.

MARTINS T.L.F., M.L. BROOKE, G.M. HILTON, S. FARNSWORTH, J. GOULD Y D.J. PAIN. 2006. Costing eradications of alien mammals from islands. Animal Conservation. 9:439-444.

MASSOIA E. Y J.C. CHEBEZ. 1993. Mamíferos silvestres del archipiélago fueguino. Editorial L.O.L.A., Buenos Aires.

MATOCQ M.D. 2004. Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*). Molecular Ecology. 13:1635-1642.

MCKINNEY M.L. Y J.L. LOCKWOOD. 1999. Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. Trends in Ecology & Evolution. 14:450 – 453.

McNAB B.K. 1966. The metabolism of fossorial rodents: A study of convergence. Ecology. 47:712-733.

McNEW L. Y A. WOOLF. 2005. Dispersal and survival of juvenile beavers (Castor canadensis) in Southern Illinois. The American Midland Naturalist Journal. 154:217-228.

McPEAKE R. Y M. PLEDGER. 2001. Beaver damage prevention and control methods. University of Arkansas (Systems). US Department of Agriculture and County Goverments Cooperating. 6 pp.

MEFFE G.K. Y R. CARROLL. 1994. Principles of conservation biology. Sinauer, Mass.

MELLA J., M. DÍAZ, B. SAAVEDRA, P. SABAT, C. SMITH, C. VELOSO Y A.M. HUMAÑA. 1995. Castores. Estudio de Línea de Base Informe del Sub-proyecto 94-14 Castores. Comité Científico Proyecto Río Cóndor, Santiago de Chile.

MILLS L.S. Y P.E. SMOUSE. 1994. Demographic consequences of inbreeding in small remnant populations. American Naturalist. 144:412-431.

MIROL P., M. D. GIMÉNEZ, J.B. SEARLE, C.J. BIDAU Y C.G. FAULKES. 2010. Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. Biological Journal of the Linnean Society. 100: 368-383.

MOORMAN M.C. 2007. The conservation implications of introduced trout and beaver on native fish in the Cape Horn Biosphere Reserve, Chile. Master's thesis. North Carolina State University, Raleigh.

MOORMAN M.C., C.B. ANDERSON, A.G. GUTIÉRREZ, R. CHARLIN Y R. ROZZI. 2006. Watershed conservation and aquatic benthic macroinvertebrate diversity in the Alberto D'Agostini National Park, Tierra del Fuego, Chile. Anales del Instituto de la Patagonia, 34, 41–58.

MORA M.S. 2008. Biología metapoblacional del tuco-tuco de las dunas (*Ctenomys australis*): Efectos de la estructura espacial del hábitat sobre la ecología y genética poblacional. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

MORA M.S., E.P. LESSA, A.P. CUTRERA, M.J. KITTLEIN Y A.I. VASALLO. 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.

MORA M.S., E.P. LESSA, M.J. KITTLEIN Y A.I. VASSALLO. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. Journal of Mammalogy 87: 1192-1203.

MORA M.S., F.J. MAPELLI, O.E. GAGGIOTTI, M.J. KITTLEIN Y E.P. LESSA. 2010. Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. BMC Genetics 11: 9.

MORITZ C. 1994. Defining "Evolutionary significant units" for conservation. Trends in Ecology & Evolution. 9:373-375.

MORITZ C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. Systems Biology. 51(2):238-254.

MOYLE P.B. 1986. Fish introductions into North America: patterns and ecological impact. En: Ecology of biological invasions of North America and Hawaii. H.A. Mooney y J.A. Drake (eds.). Springer, new York. Pp 27-43.

MÜLLER-SCHWARZE D. Y L. SUN. 2003. The Beaver. Natural History of a Wetlands Engineer. Cornell University Press, Ithaca, New York.

NAIMAN R.J., C.A. JOHNSTON & C.A. KELLEY. 1988. Alteration of North American streams by beaver: The structure and dynamics of streams are changing as beaver recolonize their historic habitat. BioScience 38:753-762.

NAIMAN R.J., J.M. MELILLO Y J.E. HOBIE. 1986. Ecosystem alteration of boreal forest streams by Beaver (*Castor canadensis*). Ecology. 67:1254-1269.

NEI M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

NEIGEL J.E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology and Systematics. 28:105–128.

NEVO E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. Annual Review of Ecology and Systematics 10:269–308.

NIEMINEN M., M.C. SINGER, W. FORTELIUS, K. SCHOPS E I. HANSKI. 2001. Experimental confirmation that inbreeding depression increases extinction risk in butterfly populations. American Naturalist. 157:237-244.

NOLTE D., D.H. ARNER, J. PAULSON, J.C. JONES Y A. TRENT. 2005. How to keep beavers from plugging culverts. Wildlife Damage Management, Internet Center for USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications. University of Nebraska, USA. 35 pp.

NOVAK R.M. 1999. Walker's mammals of the world. 6th edition. Maryland, USA, The Johns Hopkins University Press. 1629p.

O'BRIEN S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91:5748-5755.

OPAZO J.C., M.P. BURGUEÑO, M.J. CARTER, R.E. PALMA Y F. BOZINOVIC. 2008. Phylogeography of the subterranean rodent *Spalacopus cygnus* (Caviomorpha, Octodontidae). Journal of mammalogy. 89:837-844.

OPDAM P., R. VAN APELDOORN, A. SCHOTMAN Y J. KALKHOVEN. 1993. Population responses to landscape fragmentation. In Landscape ecology of a stressed environment. pp. 147-171. Edited by C.C. Vos and P. Opdam. Chapmann and Hall, London.

ORTELLS M. 1995. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. Biological Journal of the Linnean Society. 54:43-70.

OTHA T. Y M. KIMURA. 1973. The model of mutation appropriate to stimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. Genetic Research. 22: 201-204.

PAGE R.D.M. Y E.C. HOLMES. 1998. Molecular Evolution: A phylogenetic approach. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.

PALSBØLL P.J., M. BERUBÉ Y F.W. ALLENDORF. 2006. Identification of management units using population genetic data. Trends in Ecology & Evolution 13:146-158.

PARERA A. 2002. Los Mamíferos de la Argentina y la Región Austral de Sudamérica. 1˚ edición 454 pp. El Ateneo, Buenos Aires.

PARKES J.P., PAULSON J., DONLAN C.J. & CAMPBELL K. 2008. Control of North American Beavers in Tierra del Fuego: Feasibility of Eradication and Alternativa Management Options. Landcare Research Contract Report LC0708.

PATTON J.L. Y M. SMITH. 1990. The evolutionary dynamics of the pocket gopher *Thomomys bottae*, with emphasis on California populations. University of California Publications in Zoology 123: 1-161.

PEAKALL R. Y P.E. SMOUSE. 2006. GENAIEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

PEAKALL R., M. RUIBAL Y D.B. LINDENMAYER. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian Bush Rat, *Rattus fuscipes*. Evolution. 57(5):1182-1195.

PELZ-SERRANO K., A. MUNGUIA-VEGA, A. J. PIAGGIO, M. NEUBAUM, P. MUNCLINGER, A. PÁRTL, C. VAN RIPER III Y M. CULVER. 2009. Development of nine new microsatellite loci for the American Beaver, *Castor canadensis* (Rodentia: Castoridae), and cross-species amplification in the European Beaver, *Castor fiber*. Molecular Ecology Resources. 9:551-554.

PIMENTEL D., L. LACH, R. ZÚÑIGA Y D. MORRISON. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. BioScience, 50, 53–65.

PISANO E. 1977. Fitogeografía de Fuego-Patagonia Chilena. I. Comunidades vegetales entre las latitudes 52° y 56°S. Anales del Instituto de la Patagonia. 8:121-250.

POLJAK S., J. ESCOBAR, G. DEFERRARI Y M. LIZARRALDE. 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.

POSSE G., J. ANCHORENA Y M.B. COLLANTES. 2000. Spatial micro-patterns in the steppe of Tierra del Fuego induced by sheep grazing. Journal of Vegetation Science. 11:43–50.

PRIMACK R., R. ROZZI, P. FEISINGER, R. DIRZO Y F. MASARDO. 2001. Fundamentos de conservación biológica. Fondo de cultura económica, México.

PRITCHARD J.K., STEPHENS M. Y DONELLY P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics. 155:945-959. (http://www.pritch.bsd.uchicago.edu)

PROVAN J., N. SORANZO, N.J. WILSON, D.B. GOSTEIN Y W. POWELL. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. Genetics 153:943-947.

RABASSA J. A. CORONATO, G. BUJALESKY, C. ROIG, M. SALEMME, A. MEGLIOLI, C. HEUSSER, S. GORDILLO, F. ROIG JUÑENT, A. BORROMEI Y M. QUATROCCHIO. 2000. Quaternary of Tierra del Fuego, Southernmost South America: an updated review. Quaternary International. 68-71, 217-240.

RAMÍREZ SILVA M.D. 2006. Cuantificación de la biomasa leñosa removida por *Castor canadensis* (Kuhl 1820, Rodentia) en bosques nativos de Tierra del Fuego (XII región de Magallanes, Chile). Tesis de doctorado, Departamento de Ciencias Forestales, Pontificia Universidad Católica de Chile, 152 pp.

RAYMOND M. Y F. ROUSSET. 1995. An exact test for population differentiation. Evolution. 49:1280-1283.

REFOUFI A. Y M.A. ESNAULT. 2006. Genetic diversity and population structure of *Elytrigia pycnantha* (Godr.) (Triticeae) in Mont Saint-Michel bay using microsatellite markers. Plant Biology. 8:234-242.

REIG O.A. Y P. KIBLISKY. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae). Chromomsoma. 28:211-244.

REIG O.A., C. BUSCH, M.O. ORTELLS, J.R. CONTRERAS. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in Ctenomys. In: Nevo E, Reig OA, eds. Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels. New York: Wiley-Liss, 71–96.

ROBEL R.J .Y L.B. FOX. 1993. Comparison of aerial and ground survey techniques to determine beaver colony densities in Kansas. Southwestern Naturalist 38: 357-361.

ROBERTSON B.C. Y N.J. GEMMELL. 2004. Defining eradication units to control invasive pests. Journal of Applied Ecology. 41:1042-1048.

RODRÍGUEZ C. R. TORRES Y H. DRUMMOND. 2006. Eradicating introduced mammals from forested tropical island. Biological Conservation. 130:98-105.

ROIG F. 2000. Comunidades vegetales productoras de turba en Tierra del Fuego. En Conservación de ecosistemas a nivel mundial con énfasis en las turberas de Tierra del Fuego. Coronato y Roig eds. 33-44.

ROZAS J., J.C. SÁNCHEZ-DEL BARRIO, X. MESSEGUER Y R. ROZAS. 2003. DNAsp. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics. 19:2496-2497.

ROZZI R., J. ARMESTO, B. GOFFINET, W. BUCK, F. MASSARDO, J. SILANDER J.R., M.T.K. ARROYO, S. RUSSELL, C.B. ANDERSON, L. CAVIERES Y J.B. CALLICOTT. 2008. Changing biodiversity conservation lenses: Insights from the subantarctic non-vascular flora of southern South America. Frontiers in Ecology and the Environment. 6: 131-137.

RUSSELL J.C., A. ABDELKRIM Y R.M. FEWSTER. 2009. Early colonization population structure of a Norway rat island invasion. Biological Invasions. 11:1557-1567.

RYDER O.A. 1986. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. Trends in Ecology and Evolutions. 1:9-10.

SAKAI A.K., F.W. ALLENDORF, J.S. HOLT, D.M. LODGGE Y K.A.J MOLOFSKY. 2001. The population biology of invasive species. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. 32:305-332.

SALA O.E., F.S. CHAPIN, J.J. ARMESTO, E. BERLOW, J. BLOOMFIELD, R. DIRZO, E. HUBER-SANNWALD, L.F. HUENNEKE, R.B. JACKSON, A. KINZIG, R. LEEMANS, D.M. LODGE, H.A. MOONEY, M. OESTERHELD, N. LEROY POFF, M.T. SYKES, B.H. WALKER, M. WALKER Y D.H. WALL. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science. 287: 1770-1774.

SAMBROOCK J., E.F. FRITSCH Y T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning, a Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAUNDERS A. Y D.A. NORTON. 2001. Ecological restoration at mainland islands in New Zealand. Biological Conservation. 99:109-119.

SAUNDERS D.A., R.J. HOBBS Y C.R. MARGULES. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. Conservation Biology. 5: 18-32.

SAX D.F. Y S.D. GAINES. 2003. Species diversity: from global decreases to local increases. Trends in Ecology & Evolution. 18:561-566.

SAX F. Y J.H. BROWN. 2000. The paradox of invasion. Global Ecology & Biogeography. 9:363-371.

SBISÀ E., F. TANZARIELLO, A. REYES, G. PESOLE, C. SACCONE. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. Gene. 205:125-140.

SCHWARTZ M.K., G. LUIKART Y R.S. WAPLES. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution. 22(1):25-33.

SELKOE K.A. Y R.J. TOONEN. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters. 9:615-629.

SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO (SAG). 2004. Técnicas de caza, trampeo, elaboración y conservación de subproductos de fauna dañina. Universidad de Concepción. Región de Magallanes y Antártida Chilena. 60 pp.

SHAFFER G., G.M. FELLERS, A. MAGEE Y R. VOSS. 2000. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. Molecular Ecology. 9:245–257.

SHERWIN W.B. Y C. MORITZ. 2000. Managing and monitoring genetic erosion. In: Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations (Eds. Young A.G. and G.m. Clarke) 9-34. Cambridge University Press, Cambridge.

SILVA C.A. Y B. SAAVEDRA. 2008. Actas del Taller Internacional para el Control de Castores en la Patagonia. Edición digital. Wildlife Conservation Society - Chile.

SIMBERLOFF D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. Annual Review of Ecology and Systematics. 19:473-511.

SKEWES O., F. GONZÁLEZ, L. RUBILAR, M. QUEZADA, R. OLAVE, V. VARGAS Y A. ÁVILA. 1999. Investigación, aprovechamiento y control de castor (*Castor canadensis*) en las islas Tierra del Fuego y Navarino. Informe Final. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) XII Región, Magallanes y Antártica chilena. 200 pp.

SKEWES O., F. GONZÁLEZ, R. OLAVE, A. AVILA, V. VARGAS, P. PAULSEN Y H. KONING. 2006. Abundance and distribution of American Beaver, Castor canadensis (Kuhl 1820), in Tierra del Fuego and Navarino islands, Chile. European Journal of Wildlife Research. 52:292-296.

SLATKIN M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics. 16:393-430.

SLATKIN M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and no-equilibrium populations. Evolution. 47:264-279.

SMOUSE P.E. Y R. PEAKALL. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. Heredity. 82:561-573.

SU B., Y. FU, Y. WANG, L. JIN Y R. CHAKRABORTY. 2001. Genetic diversity and population history of the Red Panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations. Molecular Biology and Evolution. 18:1070-1076.

SUZUKI N. y W. MCCOMB. 1998. Habitat classification models for Beaver (*Castor canadensis*) in the streams of the central Oregon coast range. Northwest Science. 72:102-110.

SWAFFORD S.R., D.L. NOLTE, K. GODWIN, C.A. SLOAN Y J.J. JONES. 2003. Beaver population size estimation in Mississippi. En: FAGERSTONE K.A. Y G.W. WITMER (Eds.). Proceedings Tenth Wildlife Damage Management Conference: 398-407. National Wildlife Research Center, Fort Collins, Colorado.

TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetcis. 123:585-595.

TAYLOR P.D., L. FAHRIG, K. HENEIN Y G. MERRIAM. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. Oikos 68:571–573.

TAYLOR R.H., G.W. KAISER & M.C. DREVER. 2000. Eradication of Norway rats for recovery of seabird habitat on Langara Island, Britsh Columbia. Restoration Ecology. 8:151-160.

TEMPLETON A.R. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. Jhon Wiley & Sons. 716 pp.

THOMPSON J.D., T.J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN Y D.J. HIGGINS. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25(24):4876–4882.

TOMASCO I. Y E.P. LESSA. 2006. Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. In Kelt, D. A., J. A. Salazar-Bravo & J. L. Patton (eds). The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver Pearson. University of California Press.

TOMASCO I.H. Y E.P. LESSA. 2011. The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection. Molecular Phylogenetics and Evolution. 61(1):64-70.

TOWNS D.R. Y K.G. BROOME. 2003. From small Maria to massive Campbell: forty years of rat eradications from New Zealand islands. New Zealand Journal of Zoology. 30: 377-398.

TSUITSUI N.D., A.V. SUAREZ, D.A. HOLWAY Y T.J. CASE. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 97:5948-5953.

TUHKANEN S. 1992. The climate of Tierra del Fuego from a vegetation geographical point of view and its ecoclimatic counterparts elsewhere. Acta Botánica Fennica. 145: 1-64.

TUHKANEN S., I. KUOKKA, J.HYVONEN, S. STENROOS Y J. NIEMELA. 1989. Tierra del Fuego as a target for biogeographical research in the past and present. Anales del Instituto de la Patagonia. 19(2):5-107.

VALENZUELA A.E.J. 2011. Ecología y distribución del visón americano (Neovison vison) en Tierra del Fuego: efectos de este predador exótico en la fauna nativa. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

VÁZQUEZ D.P. 2002. Multiple effects of introduced mammalian herbivores in a temperate forest. Biological Invasions 4: 175-191.

VELLEND M., L.J. HARMON, J.L. LOCKWOOD, M.M. MAYFIELD, A.R. HUGHES, J.P. WARES Y D.F. SAX. 2007. Effects of exotic species on evolutionary diversification. Trends in Ecology & Evolution. 22:481–488.

VERZI D.H. 2002. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). Mastozoología Neotropical. 9: 309–328.

VILÀ C., I.R. AMORIM, J.A. LEONARD, D. POSADAS, J. CASTROVIEJO, F. PETRUCCI-FONSECA, K.A. CRANDALL, H. ELLEGREN Y R.K. WAYNE. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. Molecular Ecology 8: 2089-2103.

WAHLUND S. 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas. 11:65–106.

WALKER N.F., P.E. HULME Y A.R. HOELZEL. 2003. Population genetics of an invasive species, *Heracleum mantegazzianum*: implications for the role of life history, demographics and independent introductions. Molecular Ecology. 12:1747-1756.

WALLEM P.K., C.B. ANDERSON, G. MARTÍNEZ PASTUR Y M.V. LENCINAS. 2010. Community re-assembly by an exotic herbivore, *Castor canadensis*, in subantartic forests, Chile and Argentina. Biological Invasions. 12:325-335.

WALLEM P.K., C.G. JONES, P.A. MARQUET Y F.M. JAKSIC. 2007. Identificación de los mecanismos subyacentes a la invasión de *Castor canadensis* (Kuhl 1820, Rodentia) en el archipiélago de Tierra del Fuego, Chile. Revista Chilena de Historia Natural 80: 309-325.

WANG T., Y. SU Y G. CHEN. 2008. Population genetic variation and structure of the invasive weed *Mikania micrantha* in Southern China: consequences of rapid range expansion. Journal of Heredity 99(1):22-33.

WAPLES R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. Heredity 89:438-450.

WARES J.P., A.R. HUGHES Y R.K. GROSBERG. 2005. Mechanisms that drive evolutionary change: insights from species introductions and invasions. En: SAX D.F., J.J. STACHOWICZ Y S.D. GAINES. (eds.) Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 229-257.

WASER P.M. Y C. STROMBECK. 1998. Genetic signatures of interpopulation dispersal. Trends in Ecology & Evolution. 13(2):43-44.

WEBER L. Y C. WONG. 1993. Mutation of human short tandem repeats. Human Molecular Genetics. 2:1123-1128.

WLASIUK G., J.C. GARZA Y E.P. LESSA. 2003. Genetic and geographic differentiation in the río negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. Evolution. 57(4):913–926.

WRIGHT J.P., C.G. JONES Y A.S. FLECKER. 2002. An ecosystem engineer, the beaver, increases species richness at the landscape scale. Oecologia (Berlin). 132(1):96-101.

WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. Genetics. 28: 114-128.

WRIGHT S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics. 15:323-354.

WRIGHT S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol 4, en: Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.

ZALEWSKI A., S.B. PIERTNEY, H. ZALEWSKA Y X. LAMBIN. 2009. Landscape barriers reduce gene flow in an invasive carnivore: geographical and local genetic structure of American mink in Scotland. Molecular Ecology. 18:1601-1615.

ZENUTO R.R. Y C. BUSCH. 1998. Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. Zeitschrift fu¨r Sa¨ugetierkunde 63:357–367.

ANEXO

Extracción de ADN con Cloruro de Sodio

(Aljanabi y Martínez 1997)

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 1⁄ de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X pH 8,0 (autoclavado), etanol o isopropanol absolutos a -20 ºC y opcionalmente RNasa (10 mg/ml).

1- Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1,5 - 2 ml.

2- Enjuagar brevemente con d H_2O.

3- Agregar 500 µl de buffer de lisis + 100 µl de proteinasa K (1 mg/ml).

4- Incubar a 55ºC, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 hs o toda la noche (dependiendo del tipo de tejido).

5- Opcional: Una hora antes de finalizar, agregar 5 µl de RNasa (este paso se puede hacer luego de haber sembrado la muestra en un gel y ver si el ADN es de buena calidad o todavía tiene restos de ARN).

6- Centrifugar al máximo (por ejemplo 13.000 rpm) por 20 min.

7- Pipetear 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción solida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiera).

8- Agregar 300 µl de cloruro de sodio 5 M, agitar brevemente y centrifugar al máximo (13.000 rpm) por 20 minutos.

9- Pipetear 500-600 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar el doble de volumen de etanol absoluto a -20ºC. Agitar levemente primero, luego mezclar completamente.

10- Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20ºC por 2 hs o toda la noche.

11- Centrifugar al máximo (13.000 rpm) por 20 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.

12- Lavar breve y cuidadosamente con unos 250 µl de etanol 70º, evitando perder o disgregar el pellet.

13- Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37ºC (lleva unas 2 hs).

14- Resuspender en 100 µl de TE y guardar en la heladera hasta que se disuelva completamente.

15- Cuantificar por fluorescencia, evaluar la calidad de ADN y ver si es necesario hacer un paso con RNAsa. Diluir alícuotas de trabajo y guardar stock cuantificado en el Banco de ADN.

Nota: Si un pellet se disgrega involuntariamente en cualquier etapa, se repite la centrifugación.

Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo

(Sambrook *et al.* 1989)

1. Lavado de la muestra con EDTA (ácido etildiaminotetracético).
2. Agregado de SDS (sodio duodecil sulfato) y trituración de la muestra con tijeras.
3. Agregado de EDTA (a).
4. Agregado de proteinasa K (a).
5. Incubación en estufa durante 28 horas a 37 ºC (b).
6. Lavado por inversión con 1 volumen de fenol durante 10' y centrifugación a 3500 rpm durante 10'(c). Recuperación de la fase acuosa sobrenadante.
7. Lavado por inversión con 1/2 volumen de fenol y 1/2 volumen de cloroformo durante 10' y centrifugación a 3500 rpm durante 10'. Recuperación de la fase acuosa sobrenadante.
8. Lavado por inversión con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24) durante 10' y centrifugación a 3500 rpm durante 10'. Recuperación de la fase acuosa sobrenadante.
9. Agregado de 2 volúmenes de etanol a -20 ºC para precipitar al ADN (d).
10. Extracción del ovillo de ADN con pipeta Pasteur ciega. En caso de no obtener ovillo, ultracentrifugar a 12.000 rpm durante 15-20' y descartar sobrenadante para obtener el pellet. Enjuagar con alcohol 70⁄ para eliminar sales.
11. Secado a temperatura ambiente.
12. Resuspensión en buffer T.E.

(a) Los volúmenes de los reactivos varían de acuerdo al volumen de muestra usado/disponible y al recipiente usado en cada extracción (tubo de polipropileno de 15 ml o eppendorf de 1,5 ml).

(b) El tiempo de incubación varía de acuerdo con la evolución del estado de degradación del tejido, ya que el tiempo de actividad de la proteinasa K sobre muestras como por ejemplo de hígado o de bazo es menor que en el caso de muestras de cola.

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

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

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