

GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE TRES
ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE CHILENAS
AMENAZADAS, DISTRIBUIDAS EN LA
ECORREGIÓN DE BOSQUE VALDIVIANO:
Pudu puda, *Lycalopex fulvipes* Y *Rhinoderma
darwinii*



Javier Eduardo Cabello Stom

GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE TRES ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE
CHILENAS AMENAZADAS, DISTRIBUIDAS EN LA ECORREGIÓN DE BOSQUE

VALDIVIANO: *Pudu puda*, *Lycalopex fulvipes* Y *Rhinoderma darwinii*



JAVIER EDUARDO CABELLO STOM

TESIS DOCOTORAL

2019

GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE TRES ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE
CHILENAS AMENAZADAS, DISTRIBUIDAS EN LA ECORREGIÓN DE BOSQUE

VALDIVIANO: *Pudu puda*, *Lycalopex fulvipes* Y *Rhinoderma darwinii*

Memoria presentada por

Javier Eduardo Cabello Stom

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Castilla-La Mancha

VºBº Director

Dr. José Antonio Dávila García

Instituto de investigación en Recursos Cinegéticos

CSIC-UCLM-JCCLM

Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética

Universidad de Castilla-La Mancha

Ciudad Real, España

2019

A mi hija Alaia

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Genética de la conservación.....	3
Filogeografía	5
Marcadores moleculares	8
Ecorregión de bosque valdiviano de Chile.....	11
Glaciaciones en la Patagonia.....	16
Objetivos y estructura de la Tesis.....	18
Bibliografía	20
CAPÍTULO I. PUDÚ (<i>Pudu puda</i>).....	30
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.....	31
USO DE MICROSATÉLITES NO-ESPECIE ESPECÍFICOS EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PUDÚ (<i>Pudu puda</i>).....	39
Introducción.....	39
Materiales y métodos	39
Resultados y discusión.....	41
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES EN PUDÚ (<i>Pudu puda</i>)	44
Introducción.....	44
Materiales y métodos	44
Resultados y discusión.....	45
ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PUDÚ (<i>Pudu puda</i>).....	49
Introducción.....	49
Materiales y métodos	49
Resultados	58
Discusión.....	65
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN	69
BIBLIOGRAFÍA	71
CAPITULO II. ZORRO CHILOTE o DE DARWIN (<i>Lycalopex fulvipes</i>)	81
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.....	82

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES EN ZORRO CHILOTE (<i>Lycalopex fulvipes</i>) Y AMPLIFICACIÓN CRUZADA EN OTRAS ESPECIES DE CÁNIDOS	92
Introducción.....	93
Materiales y métodos	93
Resultados y discusión.....	95
DIVERSIDAD GENÉTICA Y EVIDENCIAS DE NUEVAS POBLACIONES CONTINENTALES PARA EL CARNÍVORO Más AMENAZADO DE AMÉRICA: EL ZORRO CHILOTE O DE DARWIN (<i>Lycalopex fulvipes</i>).....	99
Introducción.....	99
Materiales y métodos	100
Resultados	109
Discusión.....	119
ESTUDIO DE AGENTES INFECCIOSOS EN ZORRO DE DARWIN: ALTA PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE MYCOPLASMA HEMOTRÓFICO	128
Introducción.....	129
Materiales y métodos	130
Resultados	134
Discusión.....	134
Agradecimientos.....	137
Material suplementario	138
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO GAMMAHERPESVIRUS EN EL AMENAZADO ZORRO DE DARWIN (<i>Lycalopex fulvipes</i>).....	139
Introducción	140
Materiales y métodos.	142
Resultados y discusión.....	143
Agradecimientos.....	145
Material suplementario	146
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	147
BIBLIOGRAFÍA	151
CAPÍTULO III. RANITA DE DARWIN (<i>Rhinoderma darwinii</i>)	168
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.....	169
ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DE <i>Rhinoderma darwinii</i>	174
Materiales y métodos	174
Resultados	181

Discusión.....	188
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	193
BILIOGRAFÍA	194
DISCUSIÓN GENERAL	201
Síntesis de los hallazgos más relevantes e implicancias en conservación	201
Líneas de investigación y trabajos pendientes	206
Bibliografía.....	208
CONCLUSIONES	213
AGRADECIMIENTOS.....	215
ANEXOS.....	219
Anexo 1. Listado de muestras de <i>Pudu puda</i>	219
Anexo 2. Listado de muestras de <i>Lycalopex fulvipes</i>	225
Anexo 3. Listado de muestras de <i>Rhinoderma darwinii</i>	228

RESUMEN

La ecorregión valdiviana o de bosque templado lluvioso de Valdivia representa uno de los cinco mayores ecosistemas de este tipo en el mundo y el único de América del Sur, alberga una gran biodiversidad y un alto nivel de especies endémicas, formando parte de un paisaje característico que ha sido influenciado por los procesos glaciares del pleistoceno, sobre todo en la Patagonia.

La biodiversidad en esta Ecorregión está desapareciendo a un ritmo veloz, debido a diferentes causas de origen antrópico, poniendo en riesgo de extinción a varias especies de fauna nativa como el pudú (*Pudu puda*), el zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*) y la ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*).

La UICN reconoce la necesidad de conservar la biodiversidad en sus tres niveles: ecosistemas, especies y genes. Si se ignoran los factores genéticos en la gestión de especies amenazadas es probable que se produzcan acciones inadecuadas para su subsistencia. La genética de la conservación se ocupa de las aplicaciones genéticas y evolutivas a los problemas de conservación. La pérdida de variabilidad genética en una población lleva a una disminución del potencial adaptativo de ésta, aumentando la probabilidad de extinción. De esta manera, la genética de la conservación trata de entender las relaciones genéticas de las especies para gestionar las poblaciones, asegurando la mantención de la diversidad.

En Chile existe un gran desconocimiento acerca de las especies de fauna nativa y los problemas que las amenazan, lo que dificulta poder instaurar acciones para preservarlas.

El objetivo de esta tesis fue determinar la variabilidad genética y la estructura filogeográfica del pudú, el zorro chilote y la ranita de Darwin con el fin de aconsejar en la gestión para su conservación.

Para ello se realizó un muestreo en gran parte del área de distribución de las especies colectando muestras de heces, pelo, cuero, sangre, músculo e hisopos bucales para extraer, amplificar y estudiar el ADN mediante PCR, secuenciación automática,

genotipado y análisis informáticos, utilizando y diseñando marcadores moleculares mitocondriales y nucleares. En el zorro chilote además se realizó una búsqueda de patógenos, utilizando técnicas moleculares, que pudiesen ser una amenaza para su conservación.

Se logró diseñar marcadores moleculares microsatélites para el pudú y el zorro chilote; determinar y evaluar la diversidad genética de las especies de estudio, contribuir a resolver la filogeografía de estas especies y su historia evolutiva y pesquisar agentes patógenos en el zorro chilote.

Tanto para el pudú como la ranita de Darwin los aspectos genéticos actuales no parecen ser una amenaza para su preservación pues ambas especies muestran una variabilidad genética elevada. Muy diferente es lo ocurrido con el zorro chilote que presenta una diversidad genética extremadamente baja y poblaciones fragmentadas, lo que supone una amenaza adicional. A esto se suma el hallazgo de agentes infecciosos que pudiesen afectar su estado sanitario.

La alta estructuración poblacional y la gran diversidad genética encontrada en el pudú y la ranita de Darwin, se relaciona directamente con la compleja historia y estructura orogénica de esa zona y con los procesos glaciares del pleistoceno. De esta manera estas especies coinciden en un patrón filogeográfico pudiendo haber compartido algunos refugios glaciares patagónicos.

En todas las especies estudiadas se reconocen varias Unidades Evolutivamente Significativas (UESs), que deben ser consideradas y tratadas de manera independiente en cualquier plan de conservación, para proteger y mantener el potencial evolutivo sin homogeneizar el fondo genético. De la misma manera, es importante asegurar la mantención de hábitats adecuados para asegurar la subsistencia de cada una de estas UESs.

Finalmente, en los programas de reproducción ex situ tanto con fines científicos como recreativos o productivos, debiesen considerar el mantener las líneas evolutivas mencionadas que puedan servir como reservorio ante eventualidades que mermen las poblaciones silvestres.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Genética de la conservación

La biodiversidad del planeta ha disminuido rápidamente debido a las acciones directas o indirectas del ser humano. Un gran número de especies ya se han extinguido, mientras que otras han reducido sus tamaños poblaciones llevándolas al riesgo de extinción (Frankham, et al., 2002). Estas especies requieren, urgentemente la intervención humana para asegurar su supervivencia.

Si bien, tanto la extinción de especies como la especiación son procesos biológicos normales en la evolución del planeta, actualmente la tasa de extinción de las especies es de 10 a 100 veces mayor que antes de la presencia del ser humano (Pimm, et al., 1995), dando origen a lo que muchos autores llaman la “sexta extinción” (Leakey & Lewin, 1996) o la “extinción del Holoceno” (Pimm, et al., 1995).

La biología de la conservación es una disciplina científica de síntesis que se consolidó en la década de 1980 en respuesta a esta pérdida de biodiversidad (Simberloff, 1988). Se ocupa de estudiar las causas de la pérdida de diversidad biológica en todos sus niveles (ecosistemas, especies, genes) y de cómo minimizar esta pérdida (DeSalle & Amato, 2004). Esta disciplina ha incorporado varias aproximaciones para acelerar y aumentar la precisión en la toma de decisiones para la conservación. Los enfoques genéticos para caracterizar especies en peligro o las áreas que contienen especies en peligro son los principales ejemplos de esto. Los avances técnicos en áreas tales como la secuenciación, los análisis de marcadores moleculares y los muestreos no invasivos de ADN han llevado a la genética de la conservación a tener un rol más importante dentro de la biología de la conservación (DeSalle & Amato, 2004).

Si bien, el rol de los factores genéticos en la extinción de poblaciones silvestres ha sido controvertido desde un inicio, donde se ha sugerido que la estocasticidad demográfica y ambiental y las catástrofes causarían la extinción antes de que el deterioro genético se convirtiera en una seria amenaza para las poblaciones silvestres (Lande, 1988), evidencias actuales muestran que diversos factores genéticos contribuyen de

manera importante al riesgo de extinción. Proyecciones computacionales indican que la depresión endogámica tiene efectos importantes sobre el riesgo de extinción, se ha observado que la endogamia reduce la eficacia biológica de poblaciones silvestres, y la mayoría de las especies amenazadas muestran signos de deterioro genético. Así, si se ignoran los factores genéticos en el manejo de especies amenazadas es probable que se produzcan acciones inadecuadas (Frankham, 2003). Del mismo modo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) reconoce la necesidad de conservar la biodiversidad en sus tres niveles: ecosistemas, especies y genética (McNeely, et al., 1990; Frankham, et al., 2010).

La genética de la conservación es una mezcla de ecología, biología molecular, genética de poblaciones, modelamientos matemáticos y sistemática evolutiva. Es tanto una ciencia básica como aplicada, ya que primero se trata de entender las relaciones genéticas de la especie en estudio, para posteriormente manejar sus poblaciones asegurando la diversidad genética de esa especie.

Concretamente, la genética de la conservación utiliza teorías y técnicas genéticas para conservar el primer nivel de la diversidad biológica (Frankham, et al., 2002; DeSalle & Amato, 2004; Hedrick & Fredrickson, 2010), ocupándose de minimizar la endogamia, la pérdida de variabilidad genética y la acumulación de mutaciones deletéreas; caracterizar poblaciones; estimar tamaños poblacionales y detectar procesos demográficos históricos; detectar hibridación; resolver grupos taxonómicos inciertos; definir unidades de manejo para la conservación; monitorear poblaciones a partir de muestras no invasivas; identificar poblaciones o individuos de interés; seleccionar poblaciones adecuadas para una posible reintroducción; analizar muestras forenses para la identificación de especies protegidas, identificar parásitos y/o patógenos en poblaciones salvajes y cautivas y, en definitiva, ampliar el conocimiento de la biología de la especie.

El establecimiento de las unidades de conservación puede ayudar a tomar mejores decisiones para la conservación de la diversidad genética en una especie. La idea de proponer políticas de conservación en unidades por debajo del nivel de especie utilizando datos moleculares cobró importancia cuando se acuñó el concepto de

Unidades Evolutivamente Significativas (Premoli, et al., 2011) (UES o ESU's por sus siglas en inglés; (Ryder, 1986)). Esta idea de conservación a nivel infraespecífico pretende identificar de manera más precisa unidades de manejo que muestren la importancia evolutiva de los linajes dentro de las especies, para con ellos crear programas efectivos de conservación en especies con riesgo de extinción (Avice & Hamrick, 1996).

La pérdida de variabilidad genética en una población lleva a una disminución del potencial adaptativo de ésta, aumentando la probabilidad de extinción (Avice & Hamrick, 1996). El riesgo de extinción de una especie puede estar condicionado por procesos de hibridación, cuellos de botella y/o cambios del hábitat (fragmentación, destrucción, explotación humana y/o cambios ambientales). El resultado es la disminución del tamaño efectivo de la población, disminución de la variabilidad genética, disminución de la tasa de migración, aumento de la deriva genética, aumento de la endogamia, mayor acumulación de mutaciones deletéreas y/o aislamiento geográfico de la especie o población (Sastre, 2011).

De esta manera, el primer paso en el desarrollo de programas de conservación de fauna silvestre en cualquier país debe ser la determinación del estado de conservación de los animales involucrados en dichos programas (Miller, et al., 1983). En este sentido, adquirir información genética de una determinada población o especie y conocer cuáles son los factores determinantes de su variabilidad son pasos fundamentales para su conservación (Schwartz, et al., 2007; Frankham, 1995).

La diversidad genética en una población refleja su potencial evolutivo (Frankham, et al., 2002; Frankel & Soule, 1981). Mantener la diversidad genética es un objetivo primario en la gestión de poblaciones de especies amenazadas en la naturaleza y en cautividad ya que ésta es requerida por las poblaciones para evolucionar ante cambios medioambientales y la pérdida es asociada a una reducción en la salud reproductiva.

Filogeografía

La filogeografía es una disciplina acuñada por Avice et al. en 1987. En sentido estricto, la filogeografía se define como el análisis espacial de los linajes génicos (Avice,

et al., 1987). Así, la filogeografía es una disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente aquellos intraespecíficos y entre especies relacionadas cercanamente (Avice, et al., 1987; Avice, 2000). La filogeografía asume la idea de que muchas especies en la naturaleza presentan cierto grado de estructura genética asociada a la geografía. Esta estructura puede ser muy compleja, como es el caso de especies que habitan áreas de fuerte actividad tecto-volcánica o paleoclimática, o de menor complejidad, como el caso de poblaciones con altas tasas de migración o cuyo aislamiento es relativamente reciente (Domínguez & Vásquez, 2009). Podemos entonces detectar la estructura filogeográfica entre poblaciones cuando la genealogía es analizada a la par con los eventos geológicos y geográficos. De esta manera, el tiempo y el espacio son considerados conjuntamente los ejes de la filogeografía dentro de la cual, idealmente, son mapeadas las genealogías de genes de interés (Avice, 2000).

Dado que la filogeografía implica el estudio de los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes genealógicos, es considerada como una subdisciplina de la biogeografía cuyos análisis e interpretación de la distribución de los linajes requieren muchos datos de genética molecular, genética de poblaciones, etología, demografía, biología filogenética, paleontología, geología y geografía histórica. De esta forma, la filogeografía es una disciplina integradora que se encuentra con una importante confluencia de diversas disciplinas macro y micro evolutivas (Avice, 2000; Bermingham & Moritz, 1998) (figura 1).

Desde la aparición de concepto de filogeografía en 1987, se ha convertido en un método rápido y conveniente para referirse a investigaciones genealógicas explícitas en las dimensiones espaciales y temporales de la microevolución (Avice, 2009). De esta forma, el crecimiento del número de trabajos sobre filogeografía ha sido explosivo y abarca casi todos los grupos animales, con el fin de entender los distintos patrones de variación geográfica de sus poblaciones naturales, incluido el *Homo sapiens* (Avice, 1998; Avice, 2000).

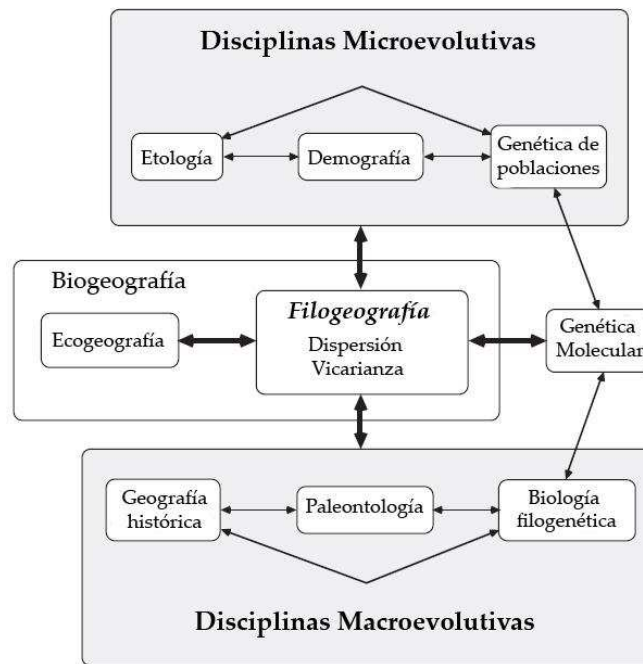


Figura 1. Lugar general de la filogeografía y algunas de sus funciones de puente empíricas y conceptuales, dentro de las ciencias de la biodiversidad (modificado de Avise, 2000).

Hace 20 años ya se proyectaba que el análisis filogeográfico comparativo permitiría realizar estudios detallados de la evolución del paisaje, incluida la dispersión de taxones a través de una región, especiación, radiación adaptativa y extinción; es decir, se proyectaban investigaciones que buscarían los vínculos fundamentales entre los procesos poblacionales y los patrones regionales de diversidad y biogeografía (Bermingham & Moritz, 1998).

En los animales se esperan diferentes estructuras filogeográficas para diferentes especie dada la alta diversidad de factores ecológicos y evolutivos que las han afectado a través de sus historias demográficas y genéticas (Avise, 2000). Si estas señales son coincidentes, es posible establecer una “concordancia genealógica” (Avise, 1996) entre especies de una región.

Las separaciones filogeográficas profundas son evidenciadas por diferencias genéticas que tienden a ser concordantes a través de múltiples marcadores dentro de un gen, entre múltiples genes dentro de una especie y entre las poblaciones geográficas de

múltiples especies codistribuidas. Esta estructura poblacional profunda reflejaría las influencias históricas biogeográficas de largo plazo (Avice, 1996).

De esta manera el análisis filogeográfico nos brinda una herramienta de gran utilidad para realizar estudios destinados a determinar la distribución original o ancestral y las principales vías de dispersión de las diferentes especies, el grado de estructuración poblacional que ellas presentan, y el tipo de especiación. La filogeografía aplica por primera vez el análisis de genealogías génicas al estudio de la evolución de las poblaciones y permite sacar conclusiones con respecto a las secuencias de colonización, diversificación y extinción de los linajes génicos en determinadas áreas. Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos. Además, la filogeografía comparada permite identificar áreas de concentración de la diversidad genética, candidatas a ser elegidas como prioritarias para su conservación (Lanterini & Confalonieri, 2003; Avice, 2000).

La filogeografía descansa fundamentalmente en el estudio de secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), que permite el seguimiento genealógico a través de los límites genéticos entre las poblaciones, las especies y los taxones superiores (Bermingham & Moritz, 1998).

La mayor parte de los estudios filogeográficos, aproximadamente un 70 %, han incluido análisis de ADNmt de animales, en forma primaria o exclusiva (Avice, 2000).

Marcadores moleculares

En las últimas décadas, las tecnologías genéticas y genómicas han sido usadas para determinar en preciso detalle el estado de muchas especies en peligro. Tales aproximaciones han proporcionado importantes datos que han afectado críticamente el manejo de decisiones y producido beneficios tangibles para las especies estudiadas (Wan, et al., 2004). Dentro de estos avances tecnológicos tenemos los referidos a marcadores moleculares que han permitido análisis genéticos poblacionales con un detalle no concebible previamente (Wan, et al., 2004). Los marcadores moleculares,

revelando polimorfismos en el ADN, juegan ahora un papel importante en genética animal. En la actualidad existen varias técnicas de biología molecular que pueden estudiar, de distintas formas, casi cualquier tipo de marcador genético, de modo que el problema no suele ser el disponer de una técnica y un sistema de marcador genético sino elegir una y otro entre los varios disponibles de acuerdo a los propósitos que se persiguen (Vignal, et al., 2002). Dentro de estos marcadores genéticos tenemos los de ADN nuclear de tipo microsatélite, uno de los más populares y poderosos de los actuales métodos para identificar marcadores polimórficos mendelianos (Li, et al., 2002; Scribner & Pearce, 2000) y, por otro lado, los de ADN mitocondrial, que son de herencia materna y son usados ampliamente para valorar relaciones taxonómicas y diferencias entre poblaciones intraespecíficas (Frankham, et al., 2002).

El ADN mitocondrial ha sido el marcador de diversidad molecular más popular en animales (Galtier, et al., 2009). Las razones por las cuales el ADNmt ha sido el marcador de elección son bien conocidas: ADNmt es altamente variable en poblaciones naturales debido a su elevada tasa de mutación (dependiendo de la región, entre 5 a 10 veces mayor que el DNA nuclear), pudiendo generar una cierta señal sobre la historia poblacional en cortos periodos de tiempo (Galtier, et al., 2009) debido a la fijación rápida de caracteres que producirán diferencias significativas (por la elevada tasa de mutación) entre poblaciones, especialmente si éstas están aisladas (Birky, et al., 1983; Ballard & Whitlock, 2004); se asume frecuentemente que la tasa evolutiva es constante (reloj molecular), en ausencia de cualquier mutación propagada a través de la selección positiva, solamente las mutaciones neutras se acumulan en el tiempo, de modo que los niveles divergencia de ADNmt pueden reflejar los tiempos de divergencia aproximados entre distintas líneas evolutivas; el contenido genético mitocondrial está fuertemente conservado a través de los animales, con muy pocas repeticiones, sin intrones y regiones intergénicas muy cortas (Gissi & Pesole, 2008); la herencia del ADNmt es casi siempre materna y normalmente no presenta recombinación genética intermolecular (Avise, 2000). Finalmente, el ADNmt existe en un gran número de copias en las células, siendo relativamente fácil su amplificación, lo que resulta muy útil cuando se trabaja con muestras que rinden poco ADN, como pelos o heces, muestras comunes en especies de fauna silvestre amenazadas.

El ADN mitocondrial animal, con pocas excepciones, es una molécula circular cerrada, haploide, típicamente de 15 a 20 kilobases (kb) y compuesta de 37 genes (figura 2). Casi todo el ADNmt está involucrado en funciones codificantes, haciéndolo para 22 ARN de transferencia, 2 ARN ribosomales y 13 proteínas involucradas en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la propia membrana de la mitocondria (Awise, 2000). Los genes de ARN ribosomal (12S y 16S) son los marcadores mitocondriales más usados para establecer relaciones filogenéticas a nivel de orden, familia y género (Sumida, et al., 2000). Los genes para el citocromo b y NADH deshidrogenasa 2 (ND2) y la región control o D-loop se utilizan para diferenciar especies o poblaciones próximas entre ellas porque tienen mayor tasa de mutación y por lo tanto alto grado de polimorfismo (Aquadro & Greenberg, 1983; Wan, et al., 2004).

La región control es un segmento del genoma mitocondrial hipervariable y no codificante (y por lo tanto se le supone neutro) que es frecuentemente usado en estudios de estructura genética poblacional (Awise, 1992).

Los segmentos mitocondriales que codifican el citocromo b y el ND2 son menos variables que la región control, por ser fragmentos codificantes, y por ello son más utilizados en trabajos filogenéticos con diferentes taxones que en los trabajos filogeográficos de una sola especie (Irwin, et al., 1991)

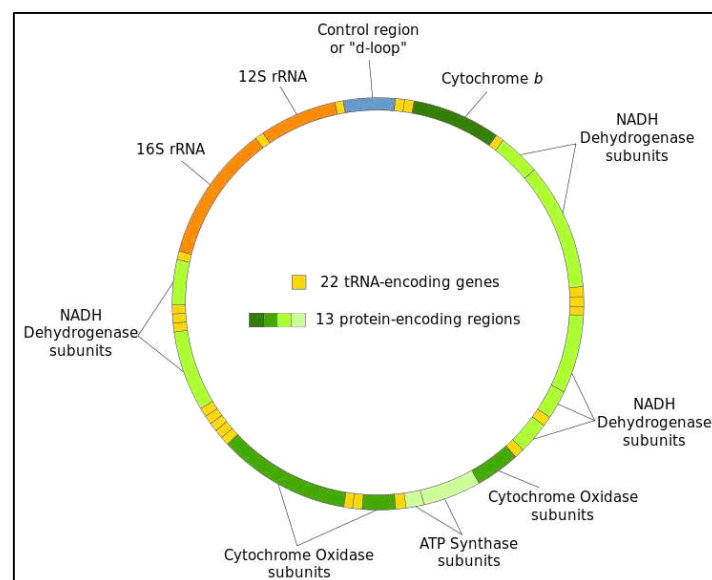


Figura 2. Características estructurales del ADN mitocondrial animal.

Chile por su gran extensión geográfica es poseedor de una amplia variedad de climas y condiciones geográficas que, sumado a la condición natural de aislamiento territorial, ubicado entre el océano pacífico y la cordillera de los Andes, como también, entre uno de los desiertos más áridos del planeta y los hielos antárticos, han condicionado la existencia de una variedad de flora y fauna propia del territorio chileno, las que son consideradas como un importante aporte a la diversidad biológica mundial (Celis, et al., 2011).

Los recursos bióticos que pueblan el territorio chileno son el resultado de la acción conjunta de una diversidad de fuerzas naturales modeladoras que produjeron fuertes oscilaciones y cambios profundos en la fisonomía de los paisajes en el pasado. El territorio, por su configuración, presenta una gran diversidad de ambientes físicos, con variadas combinaciones de clima y suelos. A pesar de esto, la diversidad biológica es moderada debido al carácter insular del territorio y al relativo aislamiento dado por las importantes barreras naturales, lo que también explica el gran endemismo que presenta la flora y la fauna (Santibañez, et al., 2008).

La biodiversidad no es uniforme en toda la tierra, sino que sigue patrones complejos determinados por el clima, la geología y la historia evolutiva del planeta, definiéndose de esta manera las ecorregiones (World Wildlife Found, 2007). Una ecorregión es un área que consiste en una agrupación característica de comunidades naturales que comparten muchas especies, dinámicas ecológicas y condiciones ambientales, tienen una mayor interrelación e interdependencia biológica y ecológica entre sí que con las comunidades que se encuentran fuera de ella y muestran patrones comunes para la producción de biomasa, incluyendo forestales y agropecuarias (Ibich & Mérida, 2003).

En Chile se distinguen doce ecorregiones, de las cuales la ecorregión del bosque templado valdiviano y la ecorregión del matorral de Chile central son consideradas endémicas, siendo relevantes a escala global por su importancia biológica (Dinerstein, et al., 2001).

En la propuesta de clasificación de las ecorregiones terrestres de América Latina y el Caribe (Dinerstein, et al., 1995) se entrega una evaluación del estado de conservación de las doce ecorregiones chilenas, donde se identifican tres ecorregiones en categoría de amenaza de extinción, con máxima prioridad de conservación: el bosque templado valdiviano, la estepa de la Patagonia y el matorral de Chile central.

La ecorregión de los bosque valdiviano, también llamada selva valdiviana, se desarrolla en Chile y áreas adyacentes de Argentina entre los paralelos 35° y 48° S (figura 4), correspondiendo administrativamente en Chile a las Regiones del Maule (parte sur), Biobío, Los Ríos, Los Lagos y Aysén (mitad norte), incluyendo varios tipos de bosques, matorrales, humedales, ríos y lagos (Dinerstein, et al., 1995; Olson, et al., 2000).

Esta ecorregión representa uno de los cinco mayores ecosistemas de este tipo en el mundo y el único de América del Sur. Sus bosques tienen características que los hacen singulares, como es el caso de los bosques sureños de *Nothofagus spp.*, que constituyen uno de los tres mayores bosques de este tipo a nivel mundial (Olson, et al., 2000). El bosque valdiviano en su forma natural contiene especies arbóreas nativas de gran altura, lo que también es común en otros tipos de bosques de la Patagonia (Luebert & Plischoff, 2006).

En la ecorregión valdiviana se concentra un extraordinario número de endemismos chilenos alcanzando el 34% de los géneros de plantas leñosas y la mitad de las especies vasculares, 76% de los anfibios, el 50% de los peces de agua dulce, el 36 % de los reptiles, el 33% de los mamíferos y el 30% de las aves (World Wildlife Fund, 2004). Dentro de estas especies vegetales encontramos el ulmo (*Eucryphia cordifolia*), el tineo (*Weinmannia trichosperma*), el laurel (*Laurelia sempervirens*) y el olivillo (*Aextoxicon punctatum*). Dentro de las especies animales todavía tenemos la ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*), el carpintero negro (*Campephilus magallanicus*), monito del monte (*Dromiciops gliroides*), el zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*) y el pudú (*Pudu puda*), entre otras.

Chile ha sufrido un dramático deterioro en la calidad del hábitat desde la colonización europea, generando una rápida tasa de destrucción y degradación en la

ecorregión valdiviana (Elizalde, 1970; Miller, 1980; Armesto, et al., 1995). Debido a lo anterior y a su importancia como hotspot, se clasifica en estado de “Vulnerable” (Dinerstein, et al., 1995) considerándose como una prioridad de conservación a nivel mundial (Echeverría, et al., 2007). Paralelamente existe, dentro de la ecorregión, un gran número de especies animales con graves problemas de conservación.

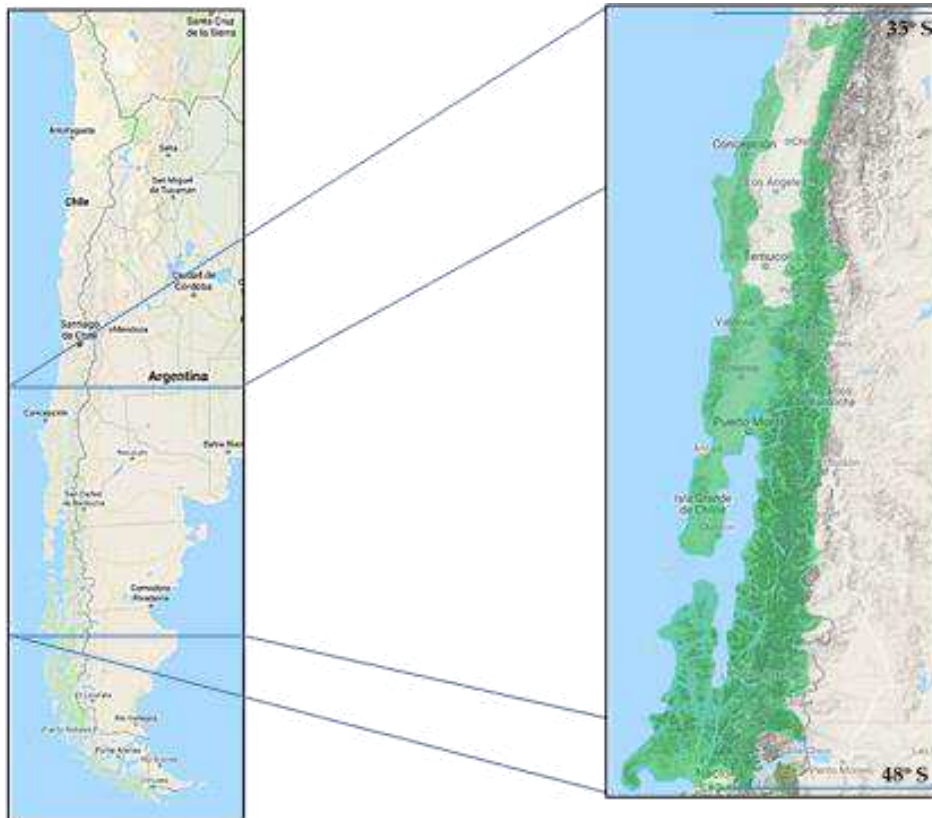


Figura 4. Ecorregión de los Bosque valdiviano (sombreado). Modificado de Dinerstein, et al., 1995.

Aunque Chile no tiene la riqueza de especies animales típicas de otras naciones sudamericanas, el gran aislamiento ha dado lugar a un alto grado de endemismo (Simonetti, et al., 1995). Esto, sumado a la destrucción del hábitat, la sobre caza, la captura ilegal, la contaminación de aguas y suelos y la introducción de especies exóticas, ha llevado a gran parte de las especies de fauna chilena a presentar algún tipo de amenaza para su preservación (Corporación Nacional Forestal, 1993). Las enfermedades infecciosas también pueden jugar un factor importante en la extinción de especies

silvestres (O'Brien & Everman, 1988; Flesness, 1989; Dobson & May, 1986), siendo los perros asilvestrados, presentes en las zonas rurales chilenas, quienes pueden tener un rol importante en la transmisión de enfermedades hacia los carnívoros silvestres.

La importancia de la ecorregión valdiviana reside principalmente en su singularidad, al mantener especies, comunidades y ecosistemas irremplazables. Por ello, muchos científicos e instituciones internacionales relacionados con la conservación, consideran que la biodiversidad de la ecorregión valdiviana posee un alto valor a nivel mundial, aunque actualmente se encuentra en riesgo de desaparecer (Tacón, 2004).

Según el Reglamento para la Clasificación de Especies silvestres de Chile (RCE) y/o la ley chilena 19.473, un gran número de especies de anfibios, reptiles, aves y mamíferos del bosque valdiviano se encuentran en alguna categoría de amenazada para su conservación. Dentro de ellas tenemos el zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*), el pudú (*Pudu puda*) y la ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*) (Ministerio de Medio Ambiente, 2012). De modo similar, para la UICN el huillín, el huemul, el zorro chilote y la ranita de Darwin están consideradas “en peligro de extinción”, mientras que la guiña y rana chilena lo están como “vulnerable” y el pudú y la comadreja trompuda en categoría de “casi amenazado” (UICN, 2018).

A pesar de ser especies amenazadas y algunas de ellas endémicas de Chile, son escasas las publicaciones científicas realizadas en ellas, siendo el área de ecología la más estudiada en desmedro de los estudios genéticos y evolutivos que son los menos realizados (Cisa, 2017). La investigación de fauna silvestre a escala nacional chilena además de ser escasa, es puntual y en muchos casos está almacenada en bases de datos de académicos, centros de investigación, universidades o privados (CEPAL & OCDE, 2016), lo que indica que en Chile la investigación de especies amenazadas es aún incipiente y las categorías de amenazas entregadas a estas especies está fundada básicamente en factores ambientales como la destrucción o alteración del hábitat.

La biodiversidad en esta región está disminuyendo a un ritmo veloz, debido a la extensión de tierras agrícolas y el uso ganadero y urbano (CONAF & CONAMA, 2009), la degradación de los bosques por extracción no sustentable de madera, leña y productos

forestales no madereros, la sustitución de coberturas naturales por plantaciones forestales de especies exóticas como el pino insigne y el eucaliptus, la ocurrencia de incendios provocados por acción humana y la construcción de infraestructura de alto impacto ambiental. Varias de estas amenazas se ven aún más intensificadas frente a un escenario de cambio climático, en el cual se prevé una disminución de precipitaciones y un aumento de temperaturas en la ecorregión (Tecklin, et al., 2011).

Glaciaciones en la Patagonia

La Patagonia es una región geográfica y cultural ubicada en el cono sur del continente americano comprendiendo los territorios de Chile y Argentina. Aunque en Argentina el límite es claro desde el Río Colorado al Sur, en Chile aún hay discrepancias, extendiéndose desde la falla de Huincul (39° S), en la Región de la Araucanía, hacia el sur (Schilling et al, 2017). Se reconoce que difiere del resto de Sudamérica en términos de topografía, medio ambiente, flora, fauna y registros paleontológicos.

Gran parte de la Patagonia chilena, entre las latitudes de 41° S y 56° S, ha sido modelada producto de los avances y retracciones de la capa de hielo durante los ciclos de glaciación en el pleistoceno formando un gran número de islas y fiordos, incluido la Isla Grande de Chiloé y su archipiélago (Denton et al. 1999). Chiloé es la segunda isla más grande de Sudamérica (8.400 km²) después de Tierra del Fuego albergando una gran cantidad de especies de flora y fauna.

Los procesos glaciares que han determinado esta morfología incluyen Las Glaciaciones Patagónicas Más Grandes (~1,1 millones de años atrás), La Glaciación Más Fría del Pleistoceno (~0,7 millones de años atrás), Las Últimas Glaciación del Sur de la Patagonia (~180.000 años atrás), y El Último Máximo Glacial (UMG, ~26.000–17.500 años atrás) (Rabassa & Clapperton 1990; McCulloch et al. 2000; Ruzzante et al. 2008). Hay evidencias de que el hielo influyó en la formación de “puentes” entre islas y continente que sirvieron de intercambio genético, los que se vieron favorecidos por el descenso del nivel del mar (Husch & Ormazábal, 1996) que osciló en más de 120 metros (Rohling et al. 1998). De esta manera, muchas de las islas que forman la Patagonia estuvieron conectadas al continente favoreciendo el intercambio de especies.

EL UMG o Glaciación Llanquihue, el último y más documentado de los procesos glaciares, no fue un fenómeno continuo y tuvo sus avances y retrocesos, los primeros conocidos como pleniglaciales y los segundos como interestadiales. Entre 45.000 y 30.000 años atrás se produjo un interestadial que abrió camino a enormes y profundos valles que hoy son mares interiores como el seno Reloncaví y el sector oriental de Chiloé, en donde reinó el bosque nativo, con especies como el alerce (*Fitzroya cupressoides*) y el ciprés de las Guaitecas (*Pilgerodendron uviferum*).

Las capas de hielo cubrían tanto las tierras bajas como las montañas, lo que implicó que gran parte de la biota predominante en la zona se refugiara en la cordillera de la Costa que hoy presenta la mayor diversidad y endemismo para la flora arbórea de Chile (Villagrán & Hinojosa, 1997). Chiloé ha sido diferencialmente afectada por los cambios climáticos del pleistoceno donde los sectores de baja altitud fueron glaciados (Heusser & Flint, 1977), mientras que el área noroeste se mantuvo libre de hielo y constituyó el principal refugio del bosque en el pleistoceno (Heusser, 1982). De esta manera el sur de Chile fue cubierto en gran parte por glaciares que, de la mitad de Chiloé (42°30' S) al sur, llegaron hasta el mar (Hulton, et al., 2002; Hubbard, et al., 2005; Santibañez, et al., 2008) (figura 5).

La desglaciación comenzó en torno a los 17.000 años con la llegada del bosque norpatagónico. Luego, la llegada de grupos taxonómicos resistentes a condiciones más húmedas y frías ocurrió en torno a los 15.000 y 13.500 años atrás.

El período más cálido y seco fue marcado por una abrupta expansión de taxones valdivianos en la zona, seguido por un clima más húmedo y frío ocurridos entre 7.500 y 5.500 años atrás y, el establecimiento del mosaico actual de bosque mixto norpatagónico/valdiviano a partir de los 5.000 años atrás (Latorre, 2008).

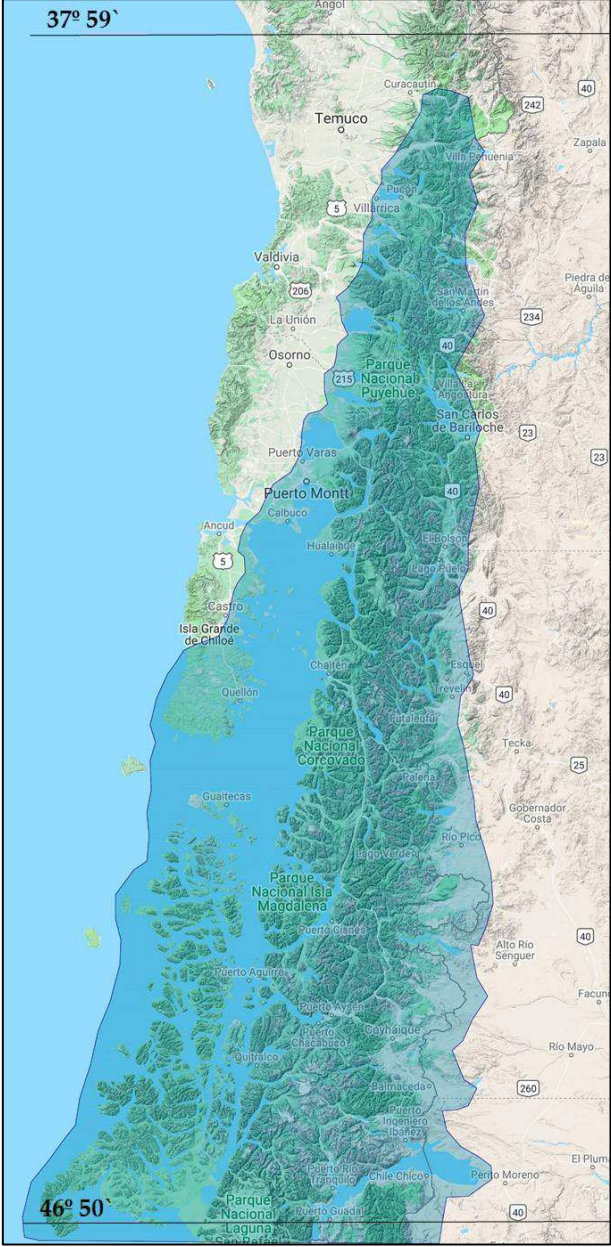


Figura 5. Límites de la glaciación Llanquihue y distribución de las capas de hielo (sombreado), modificado de Denton, et al. (1999).

Objetivos y estructura de la Tesis

La principal causa que ha llevado a las especies a estar en categoría de amenaza a su conservación es la alteración del hábitat, lo que provoca la fragmentación de sus poblacionales afectando sus tamaños poblacionales y perdiendo variación genética por efecto de la deriva genética, aumento de la endogamia o restringido flujo génico.

Los efectos genéticos de la reducción de los tamaños poblacionales y la subdivisión de poblaciones grandes y continuas en poblaciones pequeñas y

relativamente aisladas entre sí son temas de interés en conservación. Las bases teóricas de la genética de la conservación establecen que preservar la diversidad genética es esencial para el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies (Frankel & Soulé, 1981). Por lo tanto, es prioritario delimitar centros de diversidad genética fundamentalmente de especies amenazadas o en peligro de extinción. (Falk & Holsinger, 1991; Gitzendanner & Soltis, 2000).

Como se ha dicho, los patrones de distribución de la diversidad genética pueden utilizarse para el diseño de prácticas de conservación (Premoli, et al., 2011; Allendorf, et al., 2006). Asimismo, los estudios de los patrones geográficos de distribución de los polimorfismos moleculares permiten el análisis de numerosos individuos y poblaciones cuyos resultados también pueden guiar el diseño de prácticas de conservación. Del mismo modo, la comparación de los patrones filogeográficos de varias especies co-distribuidas permite plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes como de vicarianza o dispersión; e identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron haber influido en ellos (Arbogast & Kenagy, 2001; Zink, 2002).

La presente Tesis Doctoral se ha estructurado con una Introducción General, los Objetivos, tres Capítulos, una Discusión General y las Conclusiones. La introducción ha pretendido revisar los antecedentes y el contexto teórico de los temas que se tratarán en los siguientes capítulos. Cada capítulo desarrolla el trabajo realizado en una especie en particular: pudú (*Pudu puda*), zorro chilote o de Darwin (*Lycalopex fulvipes*) y ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*), pretendiendo ser independientes al resto de la tesis para permitir una mejor lectura, motivo por el cual se puede repetir alguna información a lo largo del documento. Cada capítulo a su vez posee una introducción, que presenta antecedentes de la especie y los diversos trabajos genéticos realizados previamente. Finalmente, en la Discusión General se integran los aspectos más relevantes de cada capítulo finalizando con las Conclusiones.

De esta manera el objetivo general y simple de la presente Tesis Doctoral ha sido determinar el estado genético de tres especies de fauna silvestres chilenas amenazadas distribuidas en la ecorregión de bosque valdiviano: *P. puda*, *L. fulvipes* y *R. darwinii* para

ampliar el conocimiento genético y contribuir a una mejor toma de decisiones a la hora de instaurar programas de conservación.

Para alcanzar el objetivo general, esta Tesis Doctoral se ha dividido en 3 capítulos cuyos objetivos específicos se describen a continuación.

1.- Capítulo I. Pudú (*Pudu puda*)

Los objetivos de este capítulo fueron: Desarrollar marcadores microsatélites específicos para el pudú, cuantificar la diversidad genética de la especie y resolver su filogeografía.

2. Capítulo II. Zorro chilote o de Darwin (*Lycalopex fulvipes*)

Los objetivos de este capítulo fueron: Desarrollar marcadores microsatélites específicos para el zorro chilote o de Darwin, calcular la variabilidad genética de las dos poblaciones conocidas Isla de Chiloé y Cordillera de Nahuelbuta, determinar la relación genética entre las dos poblaciones existentes, evaluar la posible existencia de nuevas poblaciones continentales y realizar un estudio piloto de los patógenos caninos más importantes que pudiesen infectar al zorro en la isla de Chiloé.

3.- Capítulo III. Ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*)

El objetivo de este capítulo fue determinar la filogeografía de la ranita de Darwin.

Bibliografía

- Allendorf, FW & G, L., 2006. Conservation and the genetics of populations. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Aquadro, C. & Greenberg, D., 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution; analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics*. 103, 211-220.
- Arbogast, B. & Kenagy, G., 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*. 28, 819-825.

- Armesto, J., Villagrán, C. & Kalin, M., 1995. *Ecología de los bosques nativos de Chile*.
Santaigo: Universitaria.
- Avise, J., Arnold, J., Ball, RM., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, JE. Reeb, CA &
Saunders, NC., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA
bridge between population genetic and systematics. *Annual Review of Ecology
and Systematics*. 18, 489-522.
- Avise, J., 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a
regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*. 63,
62-67.
- Avise, J., 1994. *Molecular Markers, natural history and evolution*. Primera ed. New York:
Chapman&Hall.
- Avise, J., 1996. Toward a regional conservation genetics perspective: phylogeography of
faunas in the southeastern United States. En: H. J. Avise JC, ed. *Conservation
Genetics: Case histories from nature*. New York: Chapman and Hall. 431-470.
- Avise, J. & Hamrick, J., 1996. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New
York: Chapman and Hall.
- Avise, J., 1998. The history and purview of phylogeography: A personal reflection.
Molecular Ecology. 7, 371-379.
- Avise, J., 2000. *Phylogeography: The history and formation of Species*. Cambridge:
Harvard University.
- Avise, J., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Second ed.
Sunderland: Sinauer.
- Avise, J., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36,
3-15.
- Ballard, J. & Whitlock, M., 2004. The incomplete natural history of mitochondria.
Molecular Ecology. 13, 729-744.

- Beja-Pereira, A., Zeyl, E., Ouragh, L., Nagash, H., Ferrand, N., Taberlet, P. & Luikart, G., 2004. Twenty polymorphic Microsatellites in two of North Africa's most threatened ungulates: *Gazella dorcas* and *Ammotragus lervia* (Bovidae; Artiodactyla). *Molecular Ecology Notes*. 4, 452-455.
- Bermingham, E. & Moritz, C., 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*. 7, 367-369.
- Birky, C., Maruyama, T. & Fuerst, P., 1983. An approach to population and evolutionary genetics theory for genes in mitochondria and chloroplast, and some results. *Genetics*. 103, 512-527.
- Cárdenas, R., 1998. El libro de la mitología de Chiloé. Historias, leyendas y creencias mágicas obtenidas de la tradición oral. Punta Arenas: Ateli.
- Celis, J., Ippi, S., Charrier, A. & Garín, C., 2011. Guía de campo de vertebrados terrestres. Primera ed. Concepción: Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile.
- CEPAL & OCDE, 2016. Evaluaciones del desempeño ambiental: Chile 2016. Santiago: Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL)/Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE).
- Cisa, S., 2017. Revisión bibliográfica sobre la investigación de mamíferos y aves amenazadas de la ecorregión de bosque valdiviano. Puerto Montt: Memoria para optar al título de médico veterinario. Universidad San Sebastián.
- CONAF & CONAMA, 2009. Catastro y Evaluación del Recurso Vegetacional Nativo de Chile. Santiago: Corporación Nacional Forestal, Comisión Nacional de Medio Ambiente.
- Corporación Nacional Forestal, 1993. Libro rojo de los vertebrados de Chile. Segunda ed. Santiago: Ministerio de Agricultura.
- Denton, GH., Lowell, TV., Moreno, PI., Andersen, BG. & Schlüchter, C., 1999. Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of Llanquihue drift

- in the area of the Southern Lake District, Seno de Reloncaví and Isla de Chiloé, Chile. *Geografiska Annaler*. 81:167–229.
- DeSalle, T. & Amato, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature review genetics*. 5, 702-712.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graham, D., Webster, A., Primm, S., Bookbinder, M. & Ledec, G., 1995. Una evaluación del estado de conservación de las ecorregiones terrestres de América Latina y el Caribe., Washington DC: The World Bank in cooperation with the World Wildlife Fundation.
- Dinerstein, E., Dinerstein, E., Wikramanayake, D., Burgess, N., Powell, G., Underwood, E., D'amico, J., Itoua, I., Strand, H., Morrison, J., Loucks, C., Allnutt, T., Ricketts, T., Kura, Y., Lamoreux, J., Wettengel, W., Hedao, P. & Kassem, K., 2001. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth. *Bioscience*. 51, 933-938.
- Dobson, A. & May, R., 1986. Disease and Conservation. En: M. e. Soulé, ed. *Conservation Biology: the science of scarcity and diversity*. Massachusetts: University of Chicago Press. 345-365.
- Dominguez, O. & Vásquez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 1(32), 59-70.
- Echeverría, C., Newton, AC. Lara, A., Rey-Benayas, JM & Coomes, D., 2007. Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape in southern Chile. *Global Ecology and Biogeography*. 16, 426-439.
- Elizalde, R., 1970. La sobrevivencia de Chile: la conservación de sus recursos naturales renovables. Segunda ed. Santiago: Ministerio de Agricultura.
- Falk, D. & Holsinger, K., 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press.

- Flesness, N., 1989. Mammalian extinction rates: background to black-footed ferret drama. En: U. Seal, E. Thome, M. Bogan & A. SH, edits. Conservation Biology of the black-footed ferret. Connecticut: Yale University Press. 3-9.
- Frankel, O. & Soulé, M., 1981. Conservation and Evolution. New York: Cambridge University Press.
- Frankel, O. & Soulé, M., 1981. Conservation and Evolution. New York: Cambridge University Press.
- Frankham, R., 1995. Conservation Genetics. Annual review of genetics. 29, 305-327.
- Frankham, R., 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations. Heredity. 28, 311-327.
- Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. Comptes Rendus Biologies. 326, s22-s29.
- Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D., 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press.
- Frankham, R., Ballu, J. & Briscoe, D., 2010. Introduction to Conservation Genetics. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Galtier, N., Nabholz, GS. & Hurst, G., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology. 18, 4541-4550.
- Gissi, CIF. & Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. Heredity. 101, 301-320.
- Gitzendanner, M. & Soltis, P., 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant. American Journal of Botany. 87, 783-792.
- Hamada, M., Cetrino, MG.; Kakunaga, T.; Seidman, M. & Stollar, BD, 1984. Characterization of genomic poly (dT-dG) poly (dC-dA) sequences: Structure, organization, and conformation. Molecular and Cellular Biology. 4, 2610-2621.

- Hedrick, P. & Fredrickson, R., 2010. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics*. 11, 615-626.
- Heusser, C., 1982. Palynology of cushion bogs on Cordillera Pelada, Province of Valdivia, Chile. *Quaternary Research*. 17, 71-92.
- Heusser, C. & Flint, R., 1977. Quaternary glaciations and environments of northern Isla Chiloé, Chile. *Geology*. 5, 305-308.
- Husch, B. & Ormazabal C., 1996. *Nuestro mundo cambiante*. Ediciones Los Andes, Santiago. Chile.
- Hubbard, A., Hein, A., Kaplan, M., Hulton, N. & Glasser, N., 2005. A modelling reconstruction of the late glacial maximum ice sheet and its deglaciation in the vicinity of the Northern Patagonian Ice-field, South America. *Geografiska annaler, series A-Physical Geography*. 87, 375-391.
- Hultona, N., Purvesa, RS., McCullocha, RD., Sugdena, DE. & Bentley, MJ., 2002. The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews*. 21, 233-241.
- Husch, B. & Ormazábal, C., 1996. *Nuestro mundo cambiante: El Hombre, Los recursos naturales y el medio ambiente*. Serie Medio.
- Ibich, P. & Mérida, G., 2003. *Biodiversidad, la riqueza de Bolivia. Estado de conocimiento y conservación*. Santa Cruz: FAN.
- Irwin, D., Kocher, T. & Wilson, A., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of molecular evolution*. 32, 128-144.
- Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241, 1455-1460.
- Lanterini, A. & Confalonieri, V., 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Ciudad de México: Facultad de Ciencia. 185-193.

- Latorre, C., 2008. Historia de la biota chilena. Fluctuaciones climáticas cuaternarias y sus impactos sobre la biodiversidad de Chile. En: Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Santiago: Ocho libros ediciones. 56.
- Leakey, R. & Lewin, R., 1996. The sixth extinction: biodiversity and its survival. London: Weidenfeld & Nicolson eds.
- Li, Y., Korol, A.; Fahima, T.; Beiles, A. & Nevo, E., 2002. Microsatellites Genomic distribution, putative function and mutational mechanism: A review. Molecular Evolution. 11, 2453-2465.
- Luebert, F. & Pliscoff, P., 2006. Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Santiago: Universitaria.
- McCulloch, RD., Bentley, MJ., Purves, RS., Hulton, NRJ., Sugden, DE. & Clapperton, CM., 2000. Climatic inferences from glacial and paleoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. Journal of Quaternary Science. 15:409-417.
- McNeely, J., Miller, KR.; Reid, WV., Mittermeier, RA. & Werner, TB., 1990. Conserving the World's Biological Diversity. Washington: IUCN, Gland, Switzerland; WRI, CI, WWF-US, and the World Bank.
- Miller, S., 1980. Human influences on the distribution and abundance of wild Chilean mammals: prehistoric-present. Seattle: PhD thesis, University of Washington.
- Miller, S., Rottmann, J., Raedeke, K. & Taber, R., 1983. Endangered Mammals of Chile: Status and Conservation. Biological Conservation. 25, 335-352.
- Ministerio de Medio Ambiente, 2012. Reglamento de Clasificación de Especies. Santiago: s.n.
- O'Brien, S. & Everman, J., 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. Trends in Ecology and Evolution. 3, 254-259.

- Olson, D., Dinerstein, E., Abell & Thieme, M., 2000. The Global 200: A Representation Approach to Conserving the Earth's Distinctive Ecoregions., Washington DC: Conservation Science Program Worl Wildlife Fund.
- Pimm, S., Russel, G., Gittleman, J. & Brooks, T., 1995. The future of Biodiversity. Science. 269, 347-350.
- Premoli, A., MP, Q., Souto, C. & P, M., 2011. Genética de la conservación: de poblaciones a filogeografía. En: J. A. -. D. R. -. P. B. Simonetti, ed. Conservación Biológica: Perspectivas desde América. Santiago: Editorial Universitaria. 31-48.
- Rabassa J. & Clapperton, C., 1990. Quaternary glaciations of the southern Andes. Quaternary Science Reviews. 9:153–174.
- Rohling, EJ., Fenton, M., Jorissen, FJ., Bertrand, P., Ganssen, G. & Caulet JP., 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. Nature. 394:162–165.
- Ruzzante, DE., Walde, SJ., Gosse, JC., Cussac, VE., Habit, E., Zemplak, TS. & Adams, ED., 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. Molecular Ecology. 17:2234–2244.
- Ryder, O., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of the subspecies. Trends Ecology and Evlution. 1, 9-10.
- Santibañez, F., Roa, P. & Santibañez, P., 2008. Influencia del medio físico en la Biodiversidad. En: Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Santiago: Ocho Libros Editores Ltda. 21.
- Sastre, N., 2011. Geenetica de la Conseravción del lobo gris (*Canis lupus*). Barcelona: Tesis doctoral para optar al título de Doctora, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Schwartz, M., Liker, G. & Wales, R., 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution. 22, 25-33.
- Scribner, K. & Pearce, J., 2000. Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical evaluations at individual, population and

- phylogenetic levels. En: A. Baker, ed. *Molecular Methods in Ecology*. London: Blackwell. 253-273.
- Simberloff, D., 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 19, 473-511.
- Simonetti, J., Arroyo, M., Spotorno, A. & Lozada, E., 1995. *Diversidad Biológica de Chile*. Santiago: Editores.
- Schilling, ME., Carlson, RW., Tassara, A., Conceição, RV., Bertotto, GW., Vásquez, M., Muñoz, D., Jalowitzki, T., Gervasoni, F. & Morata, D., 2017. The origin of Patagonia revealed by Re-Os systematics of mantle xenoliths. *Precambrian Research*. 294,15-32.
- Smith, F., May, RM.; Pellew, R.; Johnson, TH. & Walter, K., 1993. How much do we know about the current extinction rate? *Trends Ecology and Evolution*. 8, 375-378.
- Sumida, M., Ogata, M. & Nishioka, M., 2000. Molecular phylogenetic relationship of pond frog distributed in the Palearctic region inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S ribosomal RNA and cytochrome b genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2(12), 278-285.
- Tacón, 2004. *Conceptos generales para la conservación de la biodiversidad*. Valdivia: Cipma.
- Tecklin, D., DellaSala, D., Luebert, F. & Pliscoff, P., 2011. Valdivian Temperate Rainforests of Chile and Argentina. En: D. DellaSala, ed. *Temperate and Boreal Rainforests of the World: Ecology and Conservation*. Washington, DC: Island Press. 132-152.
- UICN, 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1 Disponible en: www.iucnredlist.org [Último acceso: 2 agosto 2018].
- Véliz, H., 1986. *El Origen de un Archipiélago*. Osorno: Menta Negra.

- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. & Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*. 3(34), 275-305.
- Villagrán, C. & Hinojosa, F., 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica II: análisis fitogeográfico. *Revista chilena de historia natural*. 70, 241-267.
- Vitousek, M., 1988. Diversity and biological invasions of oceanic islands. En: N. A. Press, ed. *Biodiversity*. Washington DC: Wilson, E.O. and Peters, F.M. Eds. 181-189.
- Wan, Q., Wu, H., Fujihara, T. & Fang, F., 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*. 25, 2165-2176.
- World Conservation Monitoring Centre, 1992. *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. London: Chapman and Hall.
- World Wildlife Fund, 2007. *Estándares para la gestión de proyectos y programas de conservación de WWF*.
- World Wildlife Fund, 2004. *A Biodiversity Vision for the Valdivian Temperate Rain Forest Ecoregion of Chile and Argentina, Valdivia*.
- Zink, R., 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 953-959.

CAPÍTULO I. PUDÚ (*Pudu puda*)



INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

La Familia *Cervidae* incluye 48 especies de ciervos distribuidos a través del hemisferio norte, Sudamérica y el sudeste asiático, los que están divididos en dos subfamilias y 5 tribus (Gilbert, et al., 2006) como se aprecia en la figura 6. Esta familia constituye la segunda familia de artiodáctilos con mayor número de especies después de *Bovidae* (Grubb, 1993).

Familia	Subfamilia	Tribu	Género
Cervidae	Cervinae	Cervini	Axis
			Dama
			Rucervus
		Muntiacini	Muntiacus
			Elaphodus
	Capreolina	Capreolini	Capreolus
			Hydroptes
		Alceini	Alces
		Odocoileini	Rangifer
			Odocoileus
			Mazama
			Blastocerus
			Hippocamelus
			Ozotoceros
			Pudu

Figura 6. Género *Pudu* dentro de la familia *Cervidae*.

La tribu Odocoileini está constituida por los llamados géneros de ciervos sudamericanos además de *Rangifer* de Norteamérica, siendo su historia evolutiva aún compleja y difícil de entender (Hassanin, et al., 2012) aunque su origen proviene de la expansión de los ciervos de América del Norte hacia el sur con la formación del istmo de Panamá, en el plioceno tardío (Woodburne, et al., 2006).

El género *Pudu* está representado por dos especies, el pudú del norte (*Pudu mephistophiles*) que vive en Perú, Ecuador y Colombia y el pudú del sur (*Pudu puda*), endémico del bosque valdiviano de Chile y Argentina, donde se le conoce con el nombre de venado, venadito o pudú. En Chile existen otras 2 especies de cérvidos, el huemul del norte o taruca (*Hippocamelus antisensis*) y el huemul del sur (*Hippocamelus bisulcus*) ambos catalogados como en peligro de extinción, mientras que el pudú presenta la categoría de vulnerable (MINGESPRES, 2007).

Pudu puda es uno de los cérvidos más pequeños del mundo (HersHKovitz, 1982), característica que sería presumiblemente una adaptación a la densidad de la vegetación boscosa y selvática que habita (Dellafiore & Maceira, 2001). El pudú adulto presenta un pelaje de color marrón, castaño o rojizo, variando la tonalidad según la región corporal y siendo más oscuro en los machos (Neumann, 1992). Esporádicamente se han visto pudúes albinos en Chiloé. Mide aproximadamente 90 cm de largo y 40 cm de altura a la cruz (Reyes, et al., 1988; Eldridge, et al., 1987; Neumann, 1992), alcanzando un peso que fluctúa entre 8 a 12 kg en estado adulto, las hembras son cerca de 1 kg más livianas que los machos (Neumann, 1992) y, en general, los animales de Chiloé parecen ser más grandes y pesados que los continentales (observación personal).

Los machos se diferencian de las hembras por presentar unas astas simples de entre 7 a 9 cm de longitud (Neumann, 1992) que cambian cada año. Sexualmente machos y hembras maduran entre los 15 a 18 meses de edad. El ciclo reproductivo se realiza entre marzo y abril, con una gestación promedio de 203 días, generando partos desde octubre a diciembre (CEAL, 1983). Cada hembra da a luz una sola cría con un peso que varía entre los 700 a 1.100 g (Reyes, et al., 1988) la cual presenta un pelaje más oscuro con tres filas de puntos blancos (Hick, 1969) o amarillentos por cada lado, que van desde los hombros a la base de la cola y que desaparecen entre los 3-5 meses (Frädrich, 1975; Reyes, et al., 1988; Vanoli, 1967).

Estos ciervos son por lo general solitarios y territoriales, permaneciendo la madre con su cría hasta los 8 meses de edad aproximadamente. En cautividad puede vivir en grupos de varios animales los cuales se pueden volver agresivos en época reproductiva (observación personal).

El pudú presenta una morfología bucal adaptada para seleccionar partes específicas de la vegetación que consumen con la presencia de molares braquiodontos, siendo coherente con el estilo de ramoneador selectivo (Pavez-Foxa, et al., 2015). Se alimenta de una gran diversidad de especies asociadas a los bosques comiendo las partes más nutritivas y menos lignificadas de las plantas nativas compuestas de hojas jóvenes y brotes de árboles, arbustos y hierbas (Jiménez, 2010). Es muy adaptable a consumir alimento dependiendo del hábitat donde se encuentre, incluyendo además helechos (Eldridge, et al., 1987), Plántago, Lotus y Dactylus en ambientes más abiertos (Jiménez, 2010) o especies exóticas como zarzamoras, rosas, manzanas, fresas, castañas, avellanas, bellotas, papas topinambur, zanahorias, apio, trébol rojo y blanco, en cautiverio (Junge, 1966; Neumann, 1992; Vanoli, 1967). Lugareños en Chiloé comentan que el pudú engorda a inicios de otoño debido al gran consumo de avellanas nativas (*Gevuina avellana*) (observación personal).

El hábitat chileno para el pudú son bosques húmedos y sombríos de la cordillera de los Andes y de la Costa (Reyes, et al., 2004) donde prefiere zonas de mayor densidad en la que abunda la especie de bambú, *Chusquea quila* (Miller, et al., 1983; Eldridge, et al., 1987), que le provee de refugio, alimento y túneles por los cuales pueden moverse casi a máxima velocidad cuando escapan de las amenazas (Eldridge, et al., 1987), evitando además zonas abiertas y soleadas por ser susceptibles al calor (Meyer, et al., 2007).

P. puda se distribuye geográficamente en Chile desde los 36° hasta al 49° de latitud Sur (Hershkovitz, 1982) correspondiente a la Región de Maule y la Región de Aysén respectivamente y, en Argentina, en zonas adyacentes a Chile, desde 39° S hasta los 43° S. (Meier & Merino, 2007) (figura 7). Algunas poblaciones de Chile y Argentina podrían estar conectadas por numerosos valles boscosos que se extienden a través de la frontera bajo los 1.200 m.s.n.m. (Meier & Merino, 2007).

Fuentes-Hurtado et al. (2011) sugieren que la población de Chiloé se aisló del continente en el período interglaciario hace menos de 500 mil años, proponiendo dos subespecies, *P. puda puda* y *P. p. chiloensis*. Sin embargo, D'elia (2012) emplaza a realizar investigaciones basadas en muestreos de mejor calidad para la caracterización de la biodiversidad a nivel de especie debido a la falta de rigurosidad en su propuesta.

Según Hershkovitz (1982), los pudúes se movieron, por dispersión natural, presumiblemente hacia mayores altitudes en el norte y a mayores latitudes en el sur en el inicio de la retirada glacial (figura 8). González et al. (2014), consideran que la vegetación densa no habría sido una barrera para que las poblaciones de pudú migren desde Argentina a Chile (o al revés) a través de pasos transandinos a baja altura (Huahum, 40°43' S, altitud 635 m.s.n.m.) durante los episodios interglaciares, lo cual ha sido reportado en otras especies de mamíferos (Himes, et al., 2008).

Hershkovitz estimó una población de 10.000 individuos en el año 1982, aunque hasta la fecha no hay estimaciones basadas en datos de campo (Jiménez, 2010). Sin embargo, considerando los remanentes de bosques entre la región del Maule y Los Lagos (gran parte de su área de distribución) y una estimación del hábitat necesario para sostener 500 individuos (Simonetti & Mella, 1997), es probable que la población actual del pudú exceda la cifra de 10.000 sólo en esta área (Silva-Rodríguez, et al., 2016).

La especie es abundante en Chiloé donde es frecuentemente avistado, atropellado y detectado en cámaras trampa, de la misma manera que animales en la cordillera de la Costa en la Región de los Lagos, Los Ríos (Silva-Rodríguez & Sieving, 2012) y en Nahuelbuta (observación personal). Jiménez (2010) sostiene que el hecho de no existir pumas en Chiloé pudiese ser la razón de la mayor abundancia de pudúes respecto al continente. Y, aunque esta afirmación carece de datos de base teniendo un valor hipotético (Silva-Rodríguez, et al., 2010), varios investigadores coinciden en la ausencia de predadores en general como una causa de ello, siendo el zorro chilote, que lo depreda eventualmente, el único que atacaría a esta especie en Chiloé (observación personal).



Figura 7. Distribución actual del pudú (UICN, 2018) ■ Presencia.

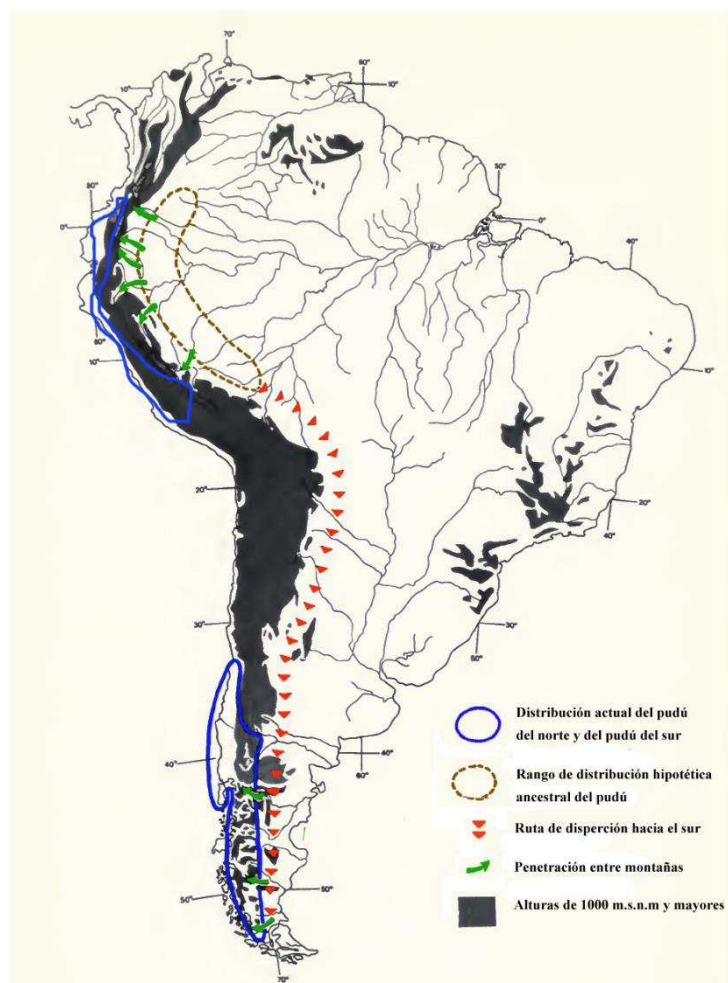


Figura 8: Dispersión y especiación de Pudú. La línea entrecortada al noreste de los Andes indica la zona temperada presumiblemente habitada por especies ancestrales durante el periodo glacial. Con el comienzo del periodo postglacial, los pudúes se movieron presumiblemente desde su temperado hábitat natural hacia mayores altitudes en el norte (flechas) y a mayores latitudes en el sur (triángulos) en el inicio de la retirada glacial. Extraído de Hershkovitz. 1982.

Se menciona que las poblaciones están formadas por pequeños grupos aislados que no se pueden reproducir entre ellos, lo que tendría como consecuencia un aumento de la consanguinidad, resultando en un incremento de la tasa de mortalidad debido a enfermedades genéticas (CODEFF, 1991; Mella, et al., 2002). Sin embargo, no hay estudios que concluyan estas aseveraciones, siendo la principal causa de disminución poblacional el deterioro del hábitat debido a la actividad humana (deforestación, monocultivos, agricultura) (Iriarte & Jaksic, 1986). Por otro lado, muchos pudúes se ven severamente afectados por los atropellos en carreteras y el ataque de perros, siendo las causas más comunes de ingresos de pudúes en los centros de rehabilitación de fauna

silvestre de Valdivia, Concepción (Silva-Rodriguez, et al., 2010), Puerto Montt (Aguilar, 2017) y Chiloé, mostrando un aumento progresivo en el ingreso de ellos cada año (observación personal).

Como causas secundarias de amenazas, tenemos la caza (prohibida para el pudú desde 1929 (Iriarte & Jaksic, 1986)), la explotación para piel o carne como parte suplementaria de la dieta de trabajadores rurales y la introducción de enfermedades transmitidas por animales de granja (Miller, et al., 1983). A pesar de ello, no hay estudios que evalúen el impacto de las enfermedades de animales domésticos en la conservación del pudú o viceversa, salvo algunos casos reportados de infecciones por virus (Pizarro-Lucero, et al., 2005 ; Gottschling, et al., 2008).

Si bien el pudú fue clasificado por el Reglamento de Clasificación de Especies (RCE) de Chile como “vulnerable”, la UICN actualmente lo clasifica como “casi amenazado”, debido a que la estimación poblacional no está respaldada por datos cuantitativos y, hasta la fecha, no existen estudios definitivos que hayan estimado su abundancia o densidad. No obstante, este cambio en la categoría de conservación, la tendencia poblacional es a la baja por las causas nombradas anteriormente.

Para frenar esta disminución poblacional se han implementado algunos programas de conservación, relacionados principalmente con la cría en cautividad de manera privada, donde su mantención y reproducción han sido relativamente fáciles (observación personal). La legislación chilena también permite la cría en cautividad con fines de lucro, existiendo criaderos en el sur de Chile. Debido a esto, el pudú está incluido en el Apéndice I de la Convención para el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Amenazadas (CITES). A pesar de la facilidad de reproducción en criaderos y centros de reproducción, se dan varios problemas como no tener los suficientes individuos para evitar cruzamientos emparentados y enfrentarse a enfermedades relacionadas con especies domesticas (Cortés, et al., 1988; Iriarte, et al., 2004). Por otro lado, tampoco se han hecho introducciones pues estos centros de cría carecen de un programa reproductivo para tales fines.

Si bien es una especie que se ha criado en cautividad por varios años tanto en Chile como en el extranjero, su estado natural es aún desconocido, siendo escasos los estudios destinados a evaluar su situación en vida libre.

Es necesario obtener información para tomar medidas de conservación tales como evaluar la endogamia y la pérdida de diversidad genética en los programas de cría en cautividad, determinar poblaciones en mayor riesgo de alteración de sus características genéticas, resolver la estructura de las poblaciones para aconsejar en las translocaciones de individuos en caso necesario, definir unidades de manejo para criar en cautividad y hacer reintroducciones futuras sin alterar el componente genético de las poblaciones silvestres, definir los sitios de reintroducción, además de actualizar los datos referentes al tamaño de las poblaciones y realizar estudios de seguimientos post-reintroducción con el objeto de evaluar el éxito o fracaso de tales.

De esta manera los objetivos de este capítulo son.

- Desarrollar marcadores microsatélites específicos para el pudú.
- Cuantificar la diversidad genética de la especie.
- Resolver la filogeografía de *Pudu puda*.

USO DE MICROSATÉLITES NO-ESPECIE ESPECÍFICOS EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PUDÚ (*Pudu puda*)

Introducción

Sólo un estudio genético se ha realizado en el pudú, usando ADN mitocondrial para intentar resolver la divergencia entre individuos continentales y de la Isla de Chiloé (Fuentes-Hurtado, et al., 2011), donde no valoraron los niveles de diversidad genética entre poblaciones de pudú.

Los loci microsatélites son ampliamente usados en genética de poblaciones, sin embargo, no hay disponibilidad de este tipo de marcadores moleculares en el pudú. Es posible utilizar secuencias polimórficas de ADN microsatélite de otras especies relacionadas debido a que existe amplificación cruzada (Kim, et al., 2004; Cosse, et al., 2007; Muneer, et al., 2011; Cabello & Dávila, 2014) por el hecho de que las secuencias flanqueantes de algunos loci de microsatélites y de los mismos microsatélites se conservan entre taxones relacionados. De esta manera, es posible que *primers* desarrollados para una especie puedan amplificar loci ortólogos en especies semejantes (Abdul-Muneer, 2014).

El objetivo de este trabajo fue probar la amplificación cruzada de *primers* de microsatélites de *Cervidae* en pudú para evaluar su variabilidad genética.

Materiales y métodos

La primera estrategia consistió en alinear secuencias de microsatélites de *Cervidae* con sus homólogas en *Bos taurus*, conseguidas mediante BLAST en GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir de los alineamientos, diseñamos por inspección visual 6 pares de *primers* (tabla 1) flanqueando los microsatélites en las regiones conservadas en ungulados. Las secuencias de *Cervidae* se tomaron de Kuehn et al. (2003), Meredith et al. (2005), Cosse et al. (2007) y de secuencias no publicadas depositadas en GeneBank.

Para probar estos *primers*, se utilizaron 55 muestras de ADN extraídas de pudúes de diferentes localidades, las cuales se dividieron arbitrariamente en 5 poblaciones de

acuerdo a su lugar de origen C: Concepción, V: Valdivia, Pv: Puerto Varas, Ch: Chiloé y Z: zoológicos de Santiago (tabla 2).

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando aproximadamente 50 ng de ADN, tampón 10 X con 2mM MgCl₂ (Biotools), 0,1 mM de cada dNTP (Biotools), 0,5 µM de cada *primer* y 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools). Un *primer* de cada pareja fue marcado de forma fluorescente con VIC, PET, 6-FAM o NED (Applied Biosystem). Las amplificaciones de PCR se realizaron en termocicladores Gene Amp® PCR System 2700 (Applied biosystems) e iCycler v.2.039 (Bio-Rad). Las condiciones de PCR consistieron en un periodo inicial de desnaturalización a 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de una desnaturalización a 94° C por 30 s, una temperatura de *annealing* de acuerdo a la tabla 1 por 30 s, una extensión a 72° C por 30 s, además de una extensión final a 72° C por 5 minutos.

Tabla 1: Secuencias de los *Primers* de marcadores microsatélite empleados en este estudio.

<i>Primer</i>	<u>Secuencia</u>	<u>T° annealing</u>
Ppu001F	AAGTTGTGAGGCACAGGCTG	60° C
Ppu001R	GAGAACTTAGTTGGCTGTGG	
Ppu003F	AGCAGGAAGTGCCATCCTAG	59° C
Ppu003R	GATGCAGTCTCCACTTGATTC	
Ppu006F	TTAATGCACTGAGGAGCTTGGGCTG	59° C
Ppu006R	CACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA5TG	
Ppu007F	GTCTCCAGGAGAGAAAACGT	52° C
Ppu007R	CACACACGGTTCTCAAATCCT	
Ppu010F	CAGAACAGTCTTAGGTGTACAG	59° C
Ppu010R	CAGAGCAGTGAAACTCTTCC	
Ppu011F	GAAGTACTGGTTGCCAATCG	54° C
Ppu011R	CACACGTCTCTGTCTTTGGA	

Los fragmentos se resolvieron junto con el marcador de peso molecular LIZ-500 (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi). Los tamaños de los alelos fueron anotados

usando Genemapper 3.7 (Applied Biosystems, Inc.) seguido por inspección visual de todos los tamaños de los alelos.

Las estimas de diversidad genética de los marcadores microsatélite (heterocigosidad y número de alelos) fueron calculadas para cada locus y población mediante el programa GenAlEx versión 6 (Peakall & Smouse, 2006). El desvío del equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó mediante el test exacto del programa GENEPOP v.4.0.10 (Raymond & Rousset 1995) de acuerdo con Weir & Cokerham (1984) aplicando el procedimiento de Cadenas de Markov (MC) (Guo & Thompson, 1992) con 1.000 demorizaciones, 100 lotes y 1.000 iteraciones por lote para determinar las probabilidades. El P-value total se calculó a partir de un test global para estimar la significancia de poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg usando el mismo software y los parámetros del algoritmo. Se evaluaron las desviaciones del desequilibrio de ligamiento para probar la hipótesis de independencia de genotipos entre los loci con el mismo programa GENEPOP v.4.0.10 y el procedimiento MC con 1.000 demorizaciones, 100 lotes y 1.000 iteraciones por lote para determinar las probabilidades. También se realizó un análisis factorial de correspondencias utilizando las frecuencias genotípicas individuales obtenidas con marcadores microsatélite mediante el programa Genetix versión 4.04 (Belkhir, et al., 2004).

Resultados y discusión

La tabla 2 muestra algunas medidas de diversidad genéticas obtenidas con los 6 marcadores microsatélites. No se han calculado estadísticos F_{st} porque no todas las poblaciones que hemos muestreado las podemos considerar poblaciones panmicticas reales, por dispersión excesiva de los animales muestreados o por muestreo pequeño.

Los microsatélites no resultaron ser tan variables en pudú como en las especies de los que se caracterizaron. Aunque se ha demostrado amplificación cruzada de microsatélites en diferentes especies, estos pudiesen ser menos variables debido a que se conservan pocas repeticiones durante la evolución donde la probabilidad de detectar un locus polimórfico disminuye al aumentar la distancia evolutiva (Primmer, et al., 1996). El locus Ppu 3 resultó monomórfico en la población de Chiloé y con un gran exceso de

homocigotos en el resto de las poblaciones, lo que podría indicar la presencia de alelos nulos.

El locus Ppu 11 sólo presentó un alelo en la población A. Por lo demás, los marcadores estaban en equilibrio Hardy-Weinberg y no hubo desequilibrio por ligamiento.

Tabla 2. Estimaciones de diversidad genética de 6 loci microsatélite utilizados en pudú.

Pop	(n / na)	Microsatélites		
		Ho	He	A
C	15 / 29	0,54	0,59	4,83
V	14 / 28	0,54	0,60	4,66
Pv	7 / 24	0,56	0,56	4,00
Z	3 / 18	0,61	0,50	3,00
Ch	16 / 33	0,46	0,57	5,50

Pop: población; **n**, número de individuos genotipados; **na**, número de alelos; **Ho**, heterocigosidad observada; **He**, heterocigosidad esperada; **A**, número medio de alelos por locus.

No obstante, el análisis factorial de correspondencias ilustrado en la siguiente figura muestra que los individuos no se agrupan aleatoriamente, sino que lo hacen de acuerdo a la zona de muestreo.

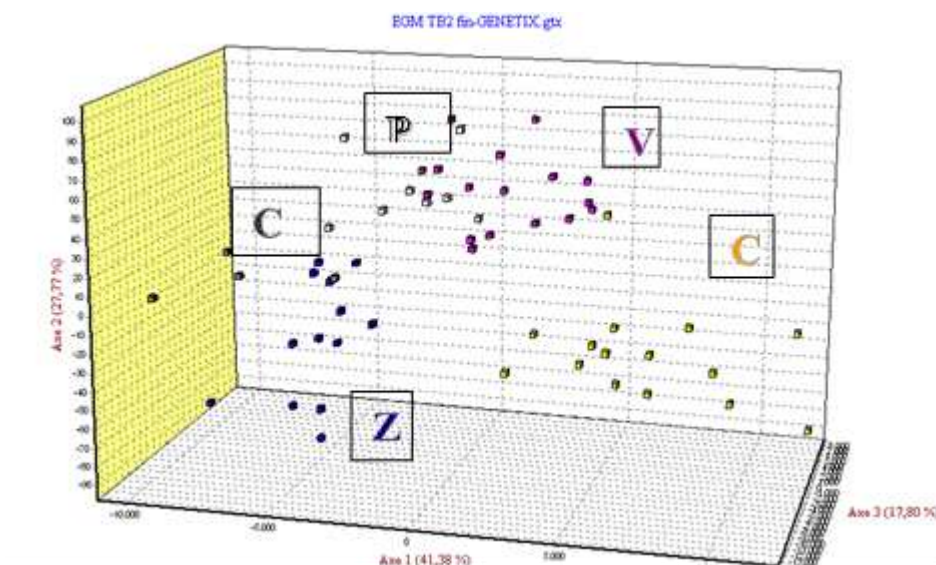


Figura 9. Gráfico resultante del análisis factorial de correspondencia para 6 loci microsatélite.

Los marcadores microsatélites empleados han sido tomados de otras especies y, aunque variables, han resultado poco informativos en pudú. Aunque son útiles y probablemente se puedan aplicar a la mayoría de especies de ciervos, su bajo polimorfismo y la posible existencia de alelos nulos aconsejan desarrollar marcadores microsatélite específicos, probablemente más variables, en estudios poblacionales.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES EN PUDÚ **(*Pudu puda*)**

Introducción

Los marcadores microsatélite no-especie específicos empleados previamente no tuvieron los resultados esperados y por lo tanto desistimos de utilizarlos para hacer estudios de poblaciones debido a su baja variabilidad y posible existencia de alelos nulos.

Es por esto que el objetivo de este trabajo fue caracterizar marcadores moleculares microsatélites específicos del pudú para obtener medidas de diversidad genética en las poblaciones existentes y poder hacer recomendaciones para su conservación.

Materiales y métodos

Para obtener secuencias de ADN conteniendo marcadores microsatélite, se construyó una librería enriquecida en microsatélites usando ADN genómico extraído de una muestra de músculo siguiendo el método de extracción con fenol/cloroformo y digestión con proteinasa K (Sambrook, et al., 1989).

50 µg de ADN fueron digeridos en 11 reacciones independientes con 150 U de cada una de las siguientes enzimas de restricción: AluI, BspLI, Hpy8I, RsaI, BseLI, Taal, BsuRI, MboI, Tru1I, Bme1390I (Fermentas) y DdeI (New England BioLabs), siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los extremos de los fragmentos resultantes de las digestiones fueron romeados con 50 U de polimerasa ADN T4 (Fermentas) y 0,1 mM dNTPs y resueltos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%. Los fragmentos con tamaños de entre 300 y 700 pb fueron cortados del gel de agarosa, desfosforilados con fosfatasa alcalina intestinal de ternera y ligados a adaptadores de extremos romos SNX (Hamilton, et al., 1999).

El ADN se hibridó entonces con oligonucleótidos biotinilados consistentes en los motivos de repetición (CA)₁₃, (CT)₁₃, (AGC)₈, (CTG)₈, (CCAT)₇, (GATA)₇, (GACA)₇, (GGAT)₇, y (AAAG)₇. A continuación, el ADN conteniendo esos motivos microsatélites

fue capturado con cuentas de estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen), para ser posteriormente, amplificado mediante PCR con *primers* SNX-F. Una vez amplificado, el ADN fue ligado al plásmido pUC19 dentro del sitio XbaI, que a su vez fue introducido mediante electroporación dentro de bacterias *Escherichia coli* competente. Los recombinantes fueron sembrados en placas Petri con medio agar-LB con X-Gal y ampicilina como sistema de selección. El ADN plasmídico de los recombinantes positivos fue transferido y fijado a membranas de nylon positivamente cargadas (Roche Diagnostics). Dichas membranas se introdujeron a continuación en una solución con sondas marcadas con DIG (CDP-Star, Roche Diagnostics), con los motivos de repetición usados en el enriquecimiento, lo que permitió, mediante métodos quimioluminiscentes, la detección de los recombinantes con motivos de repetición microsatélite en sus plásmidos. Al final, los clones positivos (300-700 pb) fueron secuenciados con el *primer* M13F y Big dye terminate versión 3.1 en un secuenciador ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

Resultados y discusión

Un total de 134 clones positivos fueron secuenciados. Las secuencias fueron editadas en BIOEDIT 7.0.4.1 (Hall, 1999). De los 134 recombinantes positivos secuenciados, 90 contenían secuencias microsatélite. Tras eliminar las secuencias repetidas y las que no presentaron secuencia flanqueante al microsatélite suficiente para diseñar *primers* de PCR, quedaron 54 marcadores microsatélite para los cuales se diseñaron parejas de *primers* de PCR por inspección visual (tabla 3).

Todas las parejas de *primers* fueron probadas para ajustar la T° de *annealing*. Cinco de ellas no amplificaron. Finalmente, 27 de estas 54 parejas de *primers* diseñadas fueron optimizadas y probadas con ADN genómico extraído de muestras sanguíneas y musculares colectadas de 9 individuos de *P. puda* y 2 *P. mephistopheles* (tabla 3).

Tabla 3: Secuencias de los *primers* de marcadores microsatélite diseñados para pudú y caracterización de 27 de ellos.

ID	Forward	Reverse	Repetición	Rango		T ^a	P ^{pu}	P ^{me}
Ppu3_A5	AGTGGTTCTCAATCCTGGCT	GGTGTGACCTCTGGATTAC	(CA)19	98	152	61	7	2
Ppu3_A7a	ACACTGCCCACCAGTAATC	GGCAGATACACTAAAGTGTG	(GACA)5-(CA)15	136	150	58	5	2
Ppu3_B9	TTCAGTTGCCATTTAGCTTG	ACACAACCAAGCAGGTAGAG	(GT)31	112	133	58	5	1
Ppu3_C1a	GAGAGATGCCTTCAACTGAC	TTCCCCTAAACTCCTCTCC	(GT)24	118	141	58	4	2
Ppu3_C4b	CCTGACACAAGACAGATTCC	ACATCACATCTCCAGATGC	(GT)25	147	190	61	7	2
Ppu3_D3a	GAACATTGAGGATCAATCACC	CTGGCAGTTTCTACTAGGATTG	(CA)4-(GA)38	124	189	61	7	2
Ppu4_B6a	GGTCACAGAAGAGTTAGACAC	GTTCATGGTTCCATCAGAAC	(CA)20	308	308	61	1	1
Ppu5_B6a	CCAGGAAGCCCTGCATTAAG	CATTGTGACGTGGGGATAC	(CT)9-(CA)19	114	178	61	9	2
Ppu5_D6b	TGATTACTCAGACCAGAACTG	TCTGGTTGTCCACCATACAC	(GT)17-(GA)14	116	130	61	6	1
Ppu5_D8a	CTGTGGACCATTTCACCACC	GCAACATTTGCCCTCAGTGG	(CT)24-(CA)14	182	124	61	4	2
Ppu5_E5b	TTTCCTTGCTACCTCCTAGG	TGATTGCCACCCATGTCTG	(GT)29	191	212	58	5	1
Ppu5_F7a	CCAGGCTTTAGAGGAGCCAAAAC	GCTGGCAAGGAGATTTGAAGTGG	(CA)23	247	286	62	6	2
Ppu5_I7a	CTTCCTTCCCCATCACAGA	AGAAACTGACCCAAGGGAG	(GA)34/22	162	186	58	8	1
PPu6_D8a	CAGTATTGTCGCTCATCTGTC	CCCCGAAGATTGTTGTAAAGG	(GA)10	141	163	61	5	1
Ppu7_C4a	GGGGCACAATTCACCAATAG	TTGTCCATGGAGCCAGTGAG	(GT)20	128	166	61	7	2
Ppu7_D3a	GGCAGTTTCTACTAGGATTG	CATTGAGGATCAATCACCT	(TC)33-(GT)6	110	130	60	6	1
Ppu7_D5a	TTCCAACAGGGATCTCAGTG	AAGGTCAGATTGTCCTCCTG	(TG)21	210	238	61	6	2
Ppu7_D9a	GCTGCTCAGCCTTCATAATC	AGGGTTCTCCAGAGGAATAG	(CA)26	96	121	62	6	2
Ppu7_E3a	GACAGTGTATCAGGTAATGTC	CAGATGACATCTGTGTACATC	(CA)20	104	126	58	7	1
Ppu7_E5a	CCTGGCTTTTAGGTGACTGC	TGATGGAATTTGTGCCCTTG	(GA)24	121	138	62	4	2
Ppu7_F3b	CCAAAAAAGGAGAGGTGAAG	CATGACCAGGAGGAAAACAC	(TC)19	162	190	58	7	2
Ppu9_B5a	CAGTCCATAGGATCACAAAG	GAGACAAGAGTAATGGGCTC	(CA)27	191	219	62	6	1
Ppu9_B7a	AGAGTGGGACATGACTGAGC	GCCTTCCTAATCACATAAGC	(GT)23	146	165	62	5	1
Ppu9_C6a	TCAGGCTCTTAGGGTGTAAG	TCTTTTGAGGTCCTGCTTCC	(GT)22	127	156	61	5	3
Ppu9_E3a	CTCATTCCTTTTTCCTATC	TTGAGAGATGCCTTCAACTGA	(CA)24	78	98	61	4	2
Ppu9_E4a	CCATTGCACGAAATAGTTGTC	GACCAAATACTTCCAAGTTCA	(CA)19	175	230	61	8	1
Ppu9_F3a	ACTCAGATCATGGCAGGAGC	CTGCACATGGAAGTTCTGAG	(GT)13-(GA)15	186	210	61	5	2

ID	Forward	Reverse	Repetición	Rango	T ^a	Ppu	Pme
Ppu_3B8a	ATACAAGGTATCCAAACTGG	AACAGTGTGGTGTGGAGTC	(TG)24		58		
Ppu_3F2a	TGGGATCCTGCTAATATCAG	GAAATGACTATGGGGAGGAAG	(CA)40		53		
Ppu_3E9a	TCTAGCTCATGGGTCTTGTGTC	CTCCCTGTAAGATGCCACAC	(GT)26		61		
Ppu_5E5a	GATTTCCTAGAACATTGAGGATC	CTGGCAGTTTCTACTAGGATTG	(CA)6-(GA)32		58		
Ppu_7F1a	CAGGTATATACAAAGCCATC	CTGCCAGGTTCAATATTTTC	(GA)33		50		
Ppu_7F3a	AGGGTGCATCAAGAAGTAG	ACCAAACCTCCCTCATTTG	(GT)28		50		
Ppu_9B4a	TGAAGCACTCTATGCCATAG	CTTTCTCTAAGGAACCTGAG	(CA)21		50		
Ppu_5I5a	TTCAGAGGGGACTTCTTAG	CCAGACTAGTTGATTTGAG	(GA)34		58		
Ppu_7C3a	GACAGTGTATCAGGTAATGTC	CAGATGACATCTGTGTACATC	(GT)25		58		
Ppu_7C7a	ACCCCTGTGAGTGTACAG	CACGGTGACGTCTTTTAG	(CT)21-(GA)17		58		
Ppu_9D9a	CCACCAAGAGTCATAGATAAC	TCTCTGACAAGCAAGTTGAG	(CA)24		58		
Ppu_6B2a	AACTCATGAGACTGGGATGG	TTCAGAGAGAGCCTGTTTG	(CA)39		53		
Ppu_5D6a	CAAGTCATCTAAGCATAG	TTTCTGTGAGTTGAGTAGG	(CA)25		48		
Ppu_9A8b	GAGAACCATCTCCCTTATC	GTTCTAATCACC AATTCAGG	(CA)25		53		
Ppu_6A5b	GTTCAAAAAGCTAGAGTTTGG	TTGTCTCTGCACAAGTGTTC	(TG)24		58		
Ppu_5E6b	AGGAGAATGGTCTTTTACC	ATACTACCATGTCAAATTAGC	(TG)28		50		
Ppu_7D3b	CCCAGTTAGACTCATTGAGG	GCTACAGTCTGTGAGGTCAC	(TG)25		61		
Ppu_7E7b	TGGAAATGCATCACAGAG	AAGGCAGCAGGTCAATAG	(GA)26		50		
Ppu_8B7b	CTTATGAATGGGACTAGTGC	TTCTCACC ACTGTGTCCTC	(GA)40		50		
Ppu_9A8a	CCAACCTCTGGCTTCCTTATC	GAATTAGAGAGGGCTTCACAC	(GT)48		53		
Ppu_5E6a	CAGATAGGACTAATTGAC	TCTTCTCTCGTTTCTATG	(CA)24		48		
Ppu_7A3a	GTGTAGTAGGTATTGTCTGGC	GGTAATGTACAGGTATTTGGG	(CA)32		no		
Ppu_3B2a	CTTTCCTCTCTAGGCATCC	TGTTCTGTGTGGAGACAGT	(CA)27		no		
Ppu_4B2a	GCTGGCTACAGTCCATGGTG	AGGCACTTCCTAGCTCCCTC	(GA)30		no		
Ppu_7A4a	TGAGCATCTTCAAAGAGAAG	CTTGCTCCATCTCTGATTC	(TG)25		no		
Ppu_3A2b	AGAAATTCTGAGCACCTCAG	TCTTAGTCTTTCCAAGGAAG	(GT)32		no		
Ppu_7E6a	GGCCATTCCCAAGTTATTCC	CATGGCCCAGGTCAGATTAGC	(GT)26		62		

Rango: rango de tamaños de alelos, T^a: temperatura de *annealing*, Ppu: n° de alelos en 9 *Pudu puda*, Pme: n° de alelos en 2 *P. mephistopheles*.

Las condiciones de PCR, que se realizaron en termocicladores Gene Amp® PCR System 2700 (Applied biosystems) e iCycler v.2.039 (Bio-Rad), consistieron en un periodo inicial de desnaturalización de 2 min a 94° C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a la temperatura de *annealing* (tabla 3) y 30 s a 72° C para terminar con un ciclo de 5 min a 72° C para completar las cadenas inacabadas. En cuanto a la mezcla de reacción (10 µl de volumen final) contenía: Tampón 10X con 2mM de MgCl₂ (Biotools), 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (Biotools), 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Biotools), y 50 ng de ADN.

Los productos de PCR se resolvieron en una unidad de electroforesis automática QIAxcel (Qiagen, Hilden, Alemania) utilizando el kit de alta resolución QIAexcel DNA, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Por motivos presupuestarios, no pudimos marcar los *primers* de forma fluorescente para resolver los fragmentos en el secuenciador automático. Sin embargo, los resultados acá presentados, para estos 27 marcadores, demuestran que pueden ser utilizados en pudú pues son variables e informativos.

ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DEL PUDÚ (*Pudu puda*)

Introducción

El ADN mitocondrial ha demostrado ser útil en estudios filogenéticos y filogeográficos porque es haploide, uniparentalmente heredado, el tamaño efectivo de la población es $\frac{1}{4}$ respecto a los loci nucleares; no recombina y evoluciona rápidamente (Borst, 1977). Además, al existir muchas copias de ADN mitocondrial por cada célula, facilita el trabajo cuando se estudian especies amenazadas cuyas muestras son escasas y difíciles de conseguir. La filogeografía se preocupa de testear hipótesis biogeográficas de una especie mediante el uso de marcadores genéticos (Avise, 1994). Determinar la filogeografía de los pudúes permitiría evaluar cómo estos se distribuyen en el territorio, averiguando si existen subespecies o unidades evolutivamente significativas.

Si bien otros autores describieron una marcada divergencia entre individuos de Chiloé y el continente, además de mencionar que no hay estructura genética en los animales continentales (Fuentes-Hurtado, et al., 2011), ese reporte muestra ciertas deficiencias debido a que su muestreo es bajo en número y no representa toda su área de distribución.

Los objetivos de este trabajo es resolver la filogeografía del pudú y cuantificar la diversidad genética de la especie. Los marcadores genéticos desarrollados y los resultados obtenidos arrojarán luces sobre la historia evolutiva del pudú y permitirán aconsejar en los programas de conservación.

Materiales y métodos

Se colectaron 248 muestras de pudú entre los años 2009 y 2012. Estas muestras fueron de heces, cuero, músculo y sangre. 80 muestras fueron de Chiloé y 168 continentales de 38 localidades. Algunas fueron de animales mantenidos en 2 zoológicos de Santiago, 2 criaderos, 1 centro de reproducción y 3 centros de rehabilitación (tabla 4, 5, 6 y figura 10).

Las muestras de zoológicos, criaderos y el centro reproducción, fueron de pelo tomadas de ambas zonas costales o bien del dorso de los animales. Estos pudúes fueron

anestesiados en sus mismas instalaciones aprovechando los manejos sanitarios de rutina de dichas instituciones. Para ello se utilizó jeringas de 1 ml, con una combinación de 8 mg/kg of ketamina (Imalgene, Merial, France) y 0,5 mg/kg de xilacina (Xilacina, Centrovét Ltda., Chile). Dependiendo de la duración del proceso, los animales fueron revertidos con 0,2 a 0,3 mg de yohimbina (recetario magistral farmacias Ahumada, Chile) o bien se incorporaron una vez transcurrido el efecto de ambos medicamentos. A todos los animales se les aplicó 0,7 ml de Vitamina E con Selenio (Dragpharma, Chile) como preventivo a la miopatía por captura, la que fue administrada una vez terminado el manejo y toma de muestras. Los animales fueron soltados en sus mismas instalaciones.

También se instalaron tramas de pelo en el sector de Huinay, que consistieron en ubicar, por un período de 7 días, 6 cepillos de bronce de 1,5 cm de diámetro y 20 cm de alto a una altura de 40 cm del suelo en forma de zigzag en pasos de pudú localizados entre la vegetación. A estas trampas se les asoció una cámara trampa para reconocer el paso de los animales. Fueron revisadas diariamente para extraer el pelo y flamear las trampas para su reinstalación. Además, se colectó pelo de pudú de un nido de chucao (*Scelorchilus rubecula*).

Las muestras de sangre fueron tomadas de las venas cefálica o safena de animales en centros de rehabilitación; los músculos fueron de los miembros posteriores de animales muertos encontrados en carretera o bien los que habían fallecido en centros de rehabilitación. Las heces fueron colectadas desde el suelo de los senderos donde se transitaba, tanto en los trabajos de campo de capturas de zorro chilote como en trabajos de campo con este solo objetivo. Finalmente, se cortaron trozos de 1 cm² de los cueros colectados de algunas casas particulares de diferentes localidades.

Todas las muestras fueron individualizadas, georreferenciadas y registradas en una base de datos (anexo 1); las de sangre y musculo fueron almacenadas con 4 volúmenes de etanol absoluto; las de heces fueron almacenadas de la misma manera o en tubos falcon de 50 ml con gel de sílice y, las de cuero y pelos fueron guardadas en bolsas de papel. Todas fueron conservadas a no más de -18° C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Tabla 4. Localización y tipo de muestra obtenida de pudú en la Isla de Chiloé.

	Localidad	Población	Georreferencia	Sa	ADN	Pe	Cu	He	Mu	To	M	H	ND
1	Ancud	Chiloé	41°52'47"S, 73°48'49"O			2			1	3		1	2
2	Ahuenco	Chiloé	42° 6'22"S, 74° 2'48" O					2		2			2
3	Aguas buenas	Chiloé	42° 5'51"S, 73°38'19"O						1	1			1
4	Butalcura	Chiloé	42°13'20"S, 73°42'52"O	1					1	2			2
5	Calén	Chiloé	42°19'8"S, 73°27'40"O			1				1		1	
6	Castro	Chiloé	42°27'4"S, 73°48'21"O			3			2	5	1	1	3
7	Chaiguata	Chiloé	43° 7.03'S, 73° 56.7'O			1		8		9			9
8	Chacao	Chiloé	41°50'34"S, 73°33'1"O						1	1			1
9	Degañ	Chiloé	42° 8'24"S; 73°43'35"O					2	1	3		1	2
10	Km 25	Chiloé	42° 1'41"S, 73°49'52"O						1	1		1	
11	El Quilar	Chiloé	41°53'11"S, 73°39'38"O	1			3		1	5	1	1	3
13	Inio	Chiloé	43°18'49"S, 74° 5'35"O					1		1			1
14	Huentetique	Chiloé	41°52'14"S, 73°56'9"O						1	1	1		
15	Lar	Chiloé	42° 9'13"S, 74° 3'29"O			1		8		9		1	7
16	Linao	Chiloé	41°56'4"S, 73°33'55"O				1			1	1		
17	Quellón	Chiloé	43° 6'36"S, 73°37'10"O	5						5			5
18	Quemchi	Chiloé	42° 8'6"S, 73°29'10"O			3	1			4		2	2
19	Quetalmahue	Chiloé	41°51'33"S, 73°57'38"O						1	1			1
20	Rancho grande	Chiloé	42°34'47"S, 74° 4'46"O					3		3			3
21	Río Pescado	Chiloé	42°10'4"S, 74° 4'56"O					2		2			2
22	Tongoy	Chiloé	42° 6'54"S, 74° 2'22"O					10		10			10
23	Yaldad	Chiloé	43° 1'6"S, 73°47'42"O				2			2			2
				7		11	7	36	11	<u>72</u>	4	9	58

Tabla 5. Localización y tipo de muestra obtenida de pudú en cautividad.

	Localidad	Población	Georreferencia	Sa	ADN	Pe	Cu	He	Mu	To	M	H	ND
1	Criadero Cañete	Biobío	37°48'23"S, 73°23'58"O			5				5	5		
2	C. reproducción Concepción	Biobío	36°49'23"S, 73° 1'55"O			14				14	8	6	
3	Zoológico Nacional	Santiago	33°27'33"S, 70°38'40"O			9				9	4	5	
4	Zoológico Buin zoo	Santiago	33°27'33"S, 70°38'40"O			4			3	7	4	3	
5	Criadero Cayumapu	Valdivia	39°43'19"S, 73° 7'7"O	1		19			2	22	6	15	1
6	CRFS RM	Santiago	33°27'33"S, 70°38'40"O			1				1			1
7	CRFS Valdivia	Valdivia	39°48'34"S, 73°15'21"O			2				2	2		
8	Centros de rehabilitación	Chiloé	41°52'47"S, 73°48'49"O					7	1	8			8
				1		54		7	6	<u>68</u>	29	29	10

Tabla 6. Localización y tipo de muestra obtenida de pudú en el continente.

	Localidad	Población	Georreferencia	Sa	ADN	Pe	Cu	He	Mu	To	M	H	ND
1	Aysén	Aysén	45°26'37"S, 72°43'2"O						2	2	2		
2	Caleta Gonzalo	Pumalín	42°33'46"S, 72°36'15"O				1	11		12			12
3	Cañete	Biobío	37°48'23"S, 73°23'58"O			1			1	2			2
4	Cayumapu	Valdivia	39°44'6"S, 73° 5'40"O			2				2	2		
5	Coihueco	Biobío	36°38'1"S, 71°47'43"O						2	2			2
6	Collico	Valdivia	39°48'9"S, 73°10'26"O	1						1			1
7	Concepción	Biobío	36°49'23"S, 73° 1'55"O			1				1	1		
8	Coñaripe	Araucanía	39°33'36"S, 72° 0'26"O	1					1	2			2
9	Coyhaique	Aysén	45°35'46"S, 72° 2'25"O			1	1			2			2
10	Ensenada	Llanquihue	41°15'7"S, 72°32'0"O			3				3	3		
11	Frontera	Llanquihue	40°42'50"S, 71°56'49"O				1			1			1
12	Hualaihué	Hualaihué	42° 0'13"S, 72°35'39"O			1				1		1	
13	Hualqui	Biobío	36°58'8"S, 72°55'22"O						1	1			1
14	Huinay	Huinay	42°22'47"S, 72°24'54"O			4	1			5	2		3
15	La Junta	Aysén	43°58'18"S, 72°24'42"O			1				1			1
16	Las Quemas	Llanquihue	41°23'49"S, 73°10'31"O			1				1		1	
17	Licanray	Araucanía	39°28'36"S, 72° 9'46"O						1	1			1
18	Llanquihue	Llanquihue	41°16'10"S, 73° 1'1"O	3						3			3
19	Loncoche	Araucanía	39°22'2"S, 72°38'45"O						1	1			1
20	Máfil	Valdivia	39°39'59"S, 72°57'4"O	1						1			1
21	Mehuín	Valdivia	39°25'42"S, 73°12'42"O						1	1			1
22	Molina	Curicó	35° 7'44"S, 71°16'9"O			1				1		1	
23	Niebla	Valdivia	39°51'30"S, 73°23'10"O			3			1	4		3	1
24	Nontuela	Valdivia	40° 5'55"S, 72°31'20"O			1				1			1
25	Paillaco	Valdivia	40° 3'12"S, 72°53'10"O			4				4	1		3
26	Panguipulli	Valdivia	39°41'3"S, 72°21'42"O						1	1			1
27	Pichicolo	Hualaihué	41°59'44"S, 72°41'51"O				1			1			1
28	PN Laguna San Rafael	Aysén	46°38'42"S, 73°51'36"O			1		4		5			5
29	Puerto Varas	Llanquihue	41°19'35"S, 72°57'54"O			5				5	2		3
30	Pucón	Araucanía	39°16'53"S, 71°58'15"O						1	1			1
31	Puerto Montt	Llanquihue	41°28'15"S, 72°54'29"O			2				2			2
32	Puyehue	Llanquihue	40°39'27"S, 72°36'55"O						1	1			1
33	Queulat	Aysén	44°28'16"S, 72°32'46"O			1				1			1
34	Reñihué	Pumalín	42°29'21"S, 72°21'4"O			4				4			4
35	S. José .de la Mariquina	Valdivia	39°32'2"S, 72°57'56"O	1						1			1
36	Valdivia	Valdivia	39°50'34"S, 73°15'3"O	3	11	7			3	24	1	3	20
37	Villarrica	Araucanía	39°18'46"S, 72° 3'10"O			1			2	3	1		2
38	Vududahue	Pumalín	42°28'49"S, 72°23'15"O				3			3			3
				10	11	45	8	15	19	108	15	9	84

Sa: sangre, ADN: extracciones de ADN, Pe: pelo, Cu: cuero, He: heces, Mu: músculo, To: total, M: machos, H: hembras, ND: no determinado, M.N.H.N.: Museo Nacional de Historia Natural. La georreferencia es referencial, los datos de cada muestra están presentados en el anexo 1.

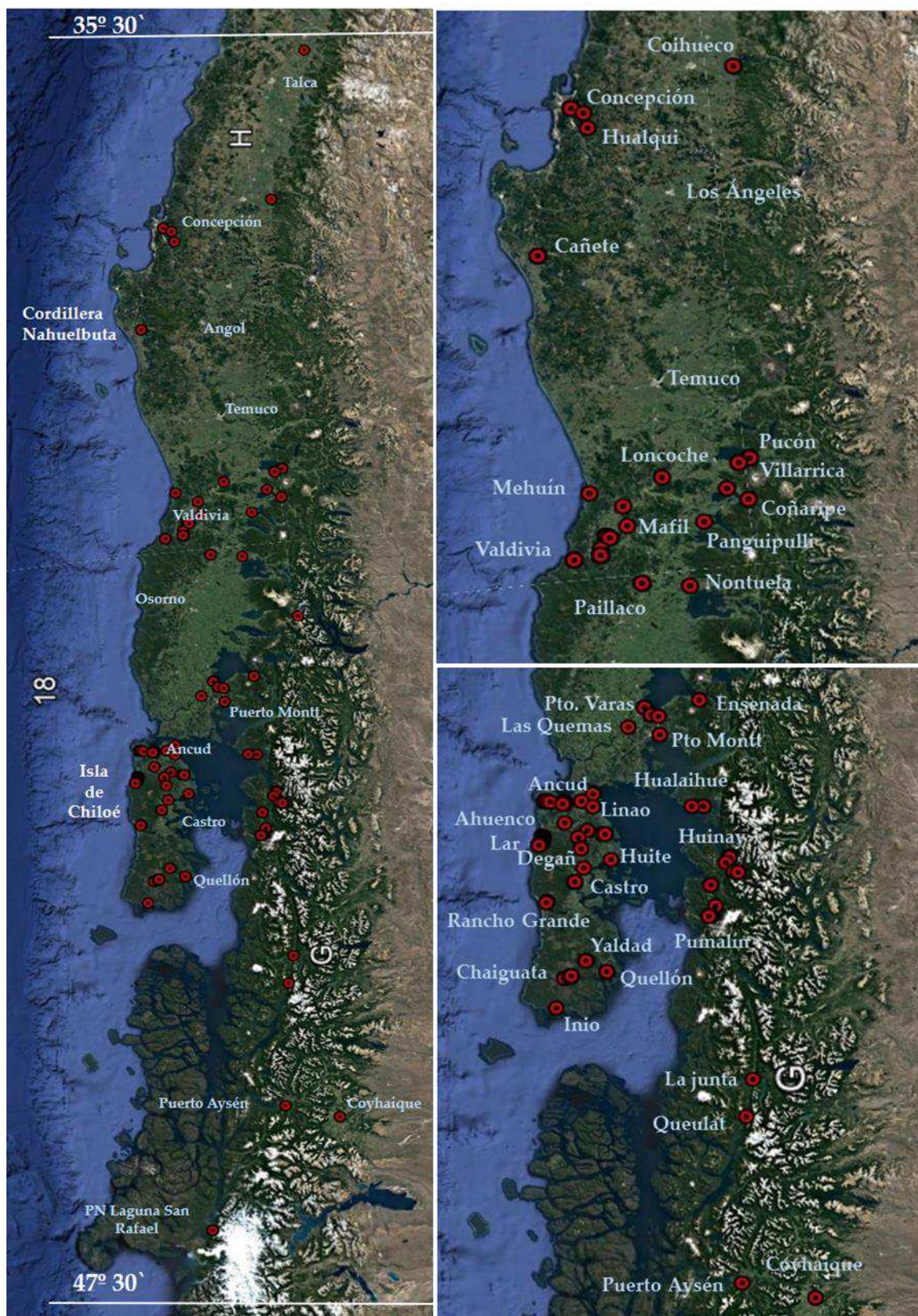


Figura 10. Distribución geográfica de las localidades de muestreo.

Extracción de ADN

El ADN genómico de las muestras de sangre y músculo fue aislado por digestión con proteinasa K, extraído con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, precipitado por etanol (Sambrook et al., 1989) y resuspendido en TE para obtener una concentración de trabajo de unos 50 ng/μl.

Los pelos fueron cortados a nivel de la raíz y traspasados a tubos eppendorf de 1,5 ml donde se extrajo el ADN utilizando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Las muestras de cuero fueron cortadas en diminutos trozos y una pequeña cantidad (25 mg) fue traspasada a un tubo eppendorf de 1,5 ml. El ADN fue extraído utilizando Investigator Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Para el caso de las heces, se cortó con un bisturí estéril la capa superficial de 1mm aproximadamente de entre 4 a 6 crotines (200 mg) de cada muestra y luego traspasó este material a un tubo eppendorf de 1,5 ml. El ADN fue extraído utilizando QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Una vez extraído el ADN, todas las muestras fueron cuantificadas en Nanodrop 2000 y, en caso necesario, las concentraciones fueron reajustadas para tener alrededor de 50 ng/μl. Finalmente todas las muestras fueron almacenadas a no más de -18° C hasta su utilización.

Amplificación y secuenciación de fragmentos mitocondriales.

Tres segmentos mitocondriales fueron estudiados. Para amplificar la región control se extrajeron de la literatura los *primers* Lpro y Hphe, previamente utilizados por Douzery y Randi (1997) para amplificar la región control de *Capreolus capreolus* y *Dama dama*. Para amplificar el citocromo b se usaron los *primers* Cerni_Cytob_A1 y Cerni_Cytob_B2, previamente diseñados por Ludt et al. (2004) para amplificar el citocromo b de *Cervus elaphus* (tabla 7). Posteriormente se diseñaron *primers* internos para las secuencias de pudú. En el caso del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa 2 (ND2),

se diseñaron parejas de *primers* en zonas conservadas de secuencias alineadas de *Bos taurus* y *Cervus elaphus* extraídas de GeneBank (MK028750, HQ191429). Las secuencias y temperaturas de *annealing* de los *primers* se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de los *primers* mitocondriales empleados en este estudio.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	T° C
Lpro	5'-CGTCAGTCTCACCATCAACCCCC-3'	54
Hphe	5'-GGGAGACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-3'	
Ppu_DLoop_F	5'-CAGTTTTGCACTCAACAGCCA-3'	61
Ppu_DLoop_R	5'-ATGGGGATGCTCAAGATGCAG-3'	
Cerni_Cytob_A1	5'-GAAAAACCATCGTTGTCATTCA-3'	50
Cerni_Cytob_B2	5'-GGAGGTTGGTAGCTCTCCTTTT-3'	
Ppu_Cytb_F	5'-GCATCCGACACAACAACAGCA-3'	65
Ppu_Cytb_R	5'-TTGTCTGGGTCTCCGAGTAGG-3'	
Ppu ND2 F	5'-GGTTTATATCCTTCCCGTAC-3'	55
Ppu ND2 R	5'-CGTAGTTGGGTTTGGTTTAG-3'	

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando 50 ng de ADN, tampón 10X con 2mM MgCl₂ (Biotools), 0,1 mM de cada dNTP (Biotools), 0,5 µM de cada *primer* y 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools). Las amplificaciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de una desnaturalización a 94° C por 30 s, un *annealing* de acuerdo a la tabla anterior por 30 s y una extensión a 72° C por 30 s, además de una extensión final a 72° C por 5 minutos. En cada reacción se utilizó un control negativo de agua.

Las muestras amplificadas fueron entonces purificadas por medio de MinElute PCR Purification KIT (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría utilizando Nanodrop 2000 y se almacenaron a no más de -18° C hasta su posterior secuenciación.

Se secuenciaron las dos cadenas utilizando BigDye® Terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) y limpiando las reacciones con BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secuencias se resolvieron en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi).

Las muestras de las cuales no se pudieron obtener secuencias claras y completas después de tres intentos de PCRs y/o reacciones de secuenciación independientes fueron excluidas de los análisis.

Análisis de secuencias

Todas las secuencias fueron editadas en BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999). Las secuencias mitocondriales se alinearon mediante el programa ClustalX versión 2.0 (Larkin, et al., 2007). No se encontró variación en longitud ni en las secuencias de la región control ni en las del citocromo b de pudú, excepto por una duplicación de 75 pb que estaba presente en 9 individuos mantenidos en cautiverio (7 en la Universidad de Concepción, uno en Buin Zoo y otro en el Zoológico Nacional). Esta duplicación fue considerada un único evento evolutivo recodificada como un solo carácter para los análisis filogenéticos, del mismo modo que lo realizado en *Cervus eldi* (Balakrishnan, et al., 2003).

Todas estas secuencias fueron colapsadas para obtener haplotipos únicos utilizando el programa Collapse versión 1.2 (Posada, 2004).

Se utilizó el programa JModeltest versión 0.1.1 (Posada, 2008) para estimar el modelo evolutivo que más se ajusta a nuestros datos utilizando *Akaike Information Criterion*. Para el caso de la región control se utilizó el modelo Hasegawa-Kishino-Yano con sitios invariantes y distribución gamma (HKY+I+G); para el citocromo b, Gamma Time Reversible con distribución gamma y, para el ND2, el modelo HKY+G. Para orientar los árboles construidos se utilizó como *outgroup* una secuencia de cada segmento mitocondrial de *Pudu mephistopheles*.

Se realizó un análisis filogenético de *Maximum Likelihood* con las tres secuencias concatenadas utilizando el modelo aleatorio de probabilidad máxima acelerada en el programa informático RaxML versión 8.1.21 (Stamatakis, A., 2014) implementado en Black Box *on line* (Kozlov et al., 2018) con un análisis de *bootstrap* rápido (1.000 réplicas). Un análisis filogenético bayesiano se realizó mediante el programa MrBayes (Ronquist, et al., 2012) utilizando también las secuencias concatenadas. Para el análisis bayesiano se llevaron a cabo 4 carreras independientes de 4 cadenas (MCMC) con 10 millones de generaciones cada una, comenzando con árboles al azar. Se realizaron muestreos a intervalos de 1.000 generaciones para incluir 10.000 puntos de datos. El 25% de los primeros árboles de la muestra fueron descartados para asegurar la estabilización de la muestra y, el restante, utilizado para calcular un árbol de consenso. La frecuencia de corte fue bajo 0,01, confirmando que el muestreo fue dentro de la distribución de la probabilidad posterior. Se utilizó el programa FigTree versión 1.4.2 (Rambaut, 2012) para dibujar un árbol consenso.

Se construyó una red de haplotipos (Templeton, et al., 1992) con las secuencias mitocondriales concatenadas de pudú. Este método une todos los pares de secuencias que tienen una probabilidad de parsimonia mayor del 0,95. El cladograma fue construido en el programa PopArt (Leigh, et al., 2015) utilizando el algoritmo del programa TCS (Clement, et al., 2000).

Para estudiar la diversidad genética encontrada, la muestra se dividió en 4 poblaciones: Chiloé (Ch), Continente (Co) desde 41,8° S al norte de la distribución del pudú, Patagonia Norte (PN) desde 41,8° S hasta 43,5° S y Patagonia Sur (PS) desde 43,5° S al sur de la distribución de la especie. Además, se incluyeron los individuos de criaderos de manera separada. Se utilizó el programa DnaSP v.6 (Rozas, et al., 2017) para el análisis de sitios polimórficos de las secuencias y medidas de diversidad.

Finalmente, se estimó el tiempo de divergencia entre los grupos Chiloé, Continente y Patagonia utilizando el análisis de coalescencia bayesiana implementado en el programa BEAST versión 1.8.2 (Drummond et al., 2012) con los tres fragmentos de genes concatenados: citocromo b, ND2 y región control. Se estableció un modelo de sustitución no enlazada para cada partición utilizando GTR+G, HKY+G y HKY+G+I

respectivamente, de acuerdo a lo obtenido por JModeltest y la disponibilidad del programa BEAST. Se usó un reloj estricto para estimar el Ancestro Común Más Reciente (MRCA) con las tasas evolutivas calculadas previamente para citocromo b (5,14%/Ma; Pitra, et al., 2004), región control (10,3%/Ma; Skog, et al., 2009) y estimada para el ND2 en el mismo programa. Se hicieron dos carreras independientes con 100.000.000 generaciones cada una, y con muestreos cada 10.000 pasos. Se utilizó el programa Tracer versión 1.6.0 (Rambaut et al., 2013) para analizar los archivos y Logcombiner versión 1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2013a) para combinar los resultados de ambas carreras. Los árboles muestreados se resumieron en Treeannotator versión 1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2013b) descartando el 10% de las muestras totales. Finalmente, el árbol resultante fue visualizado en FigTree versión 1.4.2 (Rambaut, 2012).

Resultados

Se obtuvo un 94% de éxito amplificando alguna de las tres secuencias de ADN mitocondrial en muestras de pelo y músculo, un 89% en muestras de sangre, un 79% en muestras de cuero y un 33% en las muestras de heces.

Logramos amplificar 580 pb de la región control en 194 muestras, 509 pb del citocromo b en 183 muestras y 492 pb del ND2 en 168 muestras completando un total de 1.581 pb de los 3 genes mitocondriales concatenados en 168 muestras de pudú, que corresponden a gran parte de su distribución geográfica.

La diversidad del citocromo b fue de 1 haplotipo diferente cada 7,03 individuos, 1 haplotipo por cada 7,34 individuos en el caso del ND2, 1 haplotipo por cada 2,73 individuos en el caso de la región control. Para los fragmentos del ADN mitocondrial concatenados la diversidad fue de 1 haplotipo por cada 2,02 pudúes.

Las estimas de diversidad mitocondrial para cada uno de los loci mitocondriales y de los fragmentos concatenados se pueden observar en las tablas 8 y 9.

Se puede apreciar que el pudú tiene una gran diversidad de haplotipos en todos los grupos estudiados cuyas divergencias se presentan en la tabla 10.

Tabla 8. Estimaciones de diversidad de ADN mitocondrial.

Población	CITOCROMO b (509)					ND2 (492 pb)				
	(ni/nh)	ps	Pi	Hd	k	(ni/nh)	ps	Pi	Hd	k
Chiloé	51/4	6	0,00109	0,315	0,565	39/10	10	0,00232	0,749	1,142
Criaderos	38/9	10	0,00306	0,596	1,659	37/7	7	0,00187	0,602	0,919
Continente	77/16	19	0,00246	0,738	1,253	75/12	12	0,00338	0,776	1,664
Patagonia Norte	12/3	4	0,00345	0,591	1,758	12/2	3	0,00323	0,530	1,591
Patagonia Sur	5/4	4	0,00393	0,900	2,000	5/2	1	0,00081	0,400	0,400
Pudú	183/26	30	0,00523	0,792	2,662	169/23	21	0,00317	0,795	1,56

ni: n° de individuos genotipados, **nh:** n° haplotipos, **ps:** sitios polimórficos, **Pi:** diversidad nucleotídica, **Hd:** diversidad haplotípica, **k:** número promedio de diferencias nucleotídicas.

Tabla 9. Estimaciones de diversidad de ADN mitocondrial.

Población	REGIÓN CONTROL (580 pb)					CONCATENADO (1581 pb)				
	(ni/nh)	ps	Pi	Hd	k	(ni/nh)	ps	Pi	Hd	k
Chiloé	48/18	24	0,00524	0,835	3,039	39/21	27	0,00238	0,901	3,760
Criaderos	38/19	34	0,01251	0,935	7,257	36/19	50	0,00596	0,930	9,427
Continente	90/37	42	0,00985	0,970	5,711	76/44	73	0,00558	0,981	8,830
Patagonia Norte	10/4	10	0,00812	0,742	4,712	12/4	17	0,00510	0,742	8,061
Patagonia Sur	6/6	5	0,00333	1,00	1,933	5/5	11	0,00316	1,00	5,000
Pudú	194/71	51	0,01468	0,972	8,517	168/83	101	0,00807	0,984	12,76

ni: n° de individuos genotipados, **nh:** n° haplotipos, **ps:** sitios polimórficos, **Pi:** diversidad nucleotídica, **Hd:** diversidad haplotípica, **k:** número promedio de diferencias nucleotídicas.

Tabla 10. Porcentaje de divergencia genética entre poblaciones.

REGIÓN CONTROL					CONCATENADO				
	Co	Ch	PN	PS		Co	Ch	PN	PS
Co					Co				
Ch	2,234				Ch	1,210			
PN	1,189	1,882			PN	0,715	1,129		
PS	1,459	1,591	1,226		PS	1,102	1,001	0,989	

Co: Continente, **Ch:** Chiloé, **PN:** Patagonia Norte, **PS:** Patagonia Sur.

Los árboles filogenéticos consensos obtenidos por *Maximum Likelihood* y por el método bayesiano presentaron una topología similar (figuras 11, 12 y 13). Las muestras se distribuyen primariamente en dos grandes agrupaciones divididas geográficamente norte-sur desde los 41,8° S. Así, en el grupo del Continente (Biobío, Los Ríos y Los Lagos) no se aprecia una estructura claramente definida y, aunque se evidencia una agrupación de haplotipos del Biobío, esta no presenta un buen soporte estadístico. Por el lado sur, existe un subgrupo de haplotipos ubicados al este de la Isla de Chiloé (PN), otro subgrupo ubicado en la zona más austral de la distribución del pudú (PS) y otro subgrupo correspondiente exclusivamente a la isla de Chiloé. Estos tres subgrupos se asocian en conjunto formando un clado bien diferenciado del resto del continente. En la zona de Pichicolo (41,8° S), encontramos dos haplotipos, uno único de este lugar y otro compartido con animales ubicados al sur (PN) y al norte (Co) de esta localidad.

La figura 14 muestra una red que representa las relaciones entre haplotipos donde se aprecia un gran número de ellos existentes en la especie y en cada subgrupo o poblaciones. Los resultados concuerdan con los obtenidos mediante los análisis filogenéticos, existiendo cierta estructura genética determinada por el accidente geográfico que separa Chiloé del continente, hacia el norte y el sur, mostrando además una estrecha relación entre las muestras que corresponden a la distribución patagónica.

El tiempo de divergencia estimado mediante el análisis de coalescencia bayesiana entre el grupo de Chiloé-Patagonia y Continente fue de aproximadamente 115 mil años atrás. Este análisis también mostró que el MRCA entre Chiloé y Patagonia Sur fue hace ± 68 mil años. Así mismo, se evidencia que Chiloé comenzó a diversificarse en torno a los 30 mil años atrás, un poco antes que Patagonia Sur (± 20 mil) y Patagonia Norte (± 10 mil).

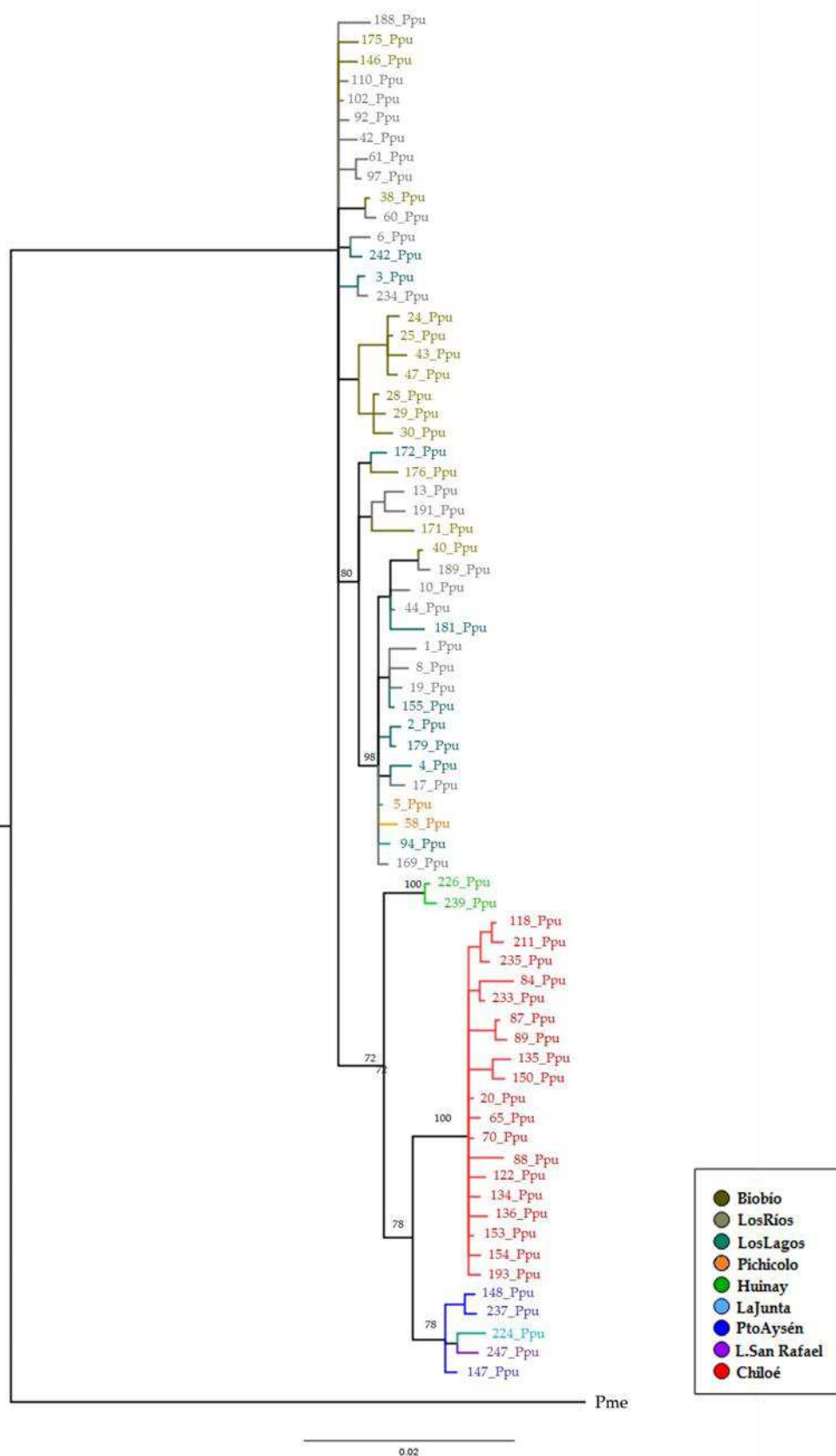


Figura 11. Árbol consenso construido por el método bayesiano con los genes concatenados citocromo b, ND2 y región control. Los valores de probabilidad posterior sobre 70% aparecen indicados. El árbol está orientado con la secuencia de *Pudu mephistopheles*.

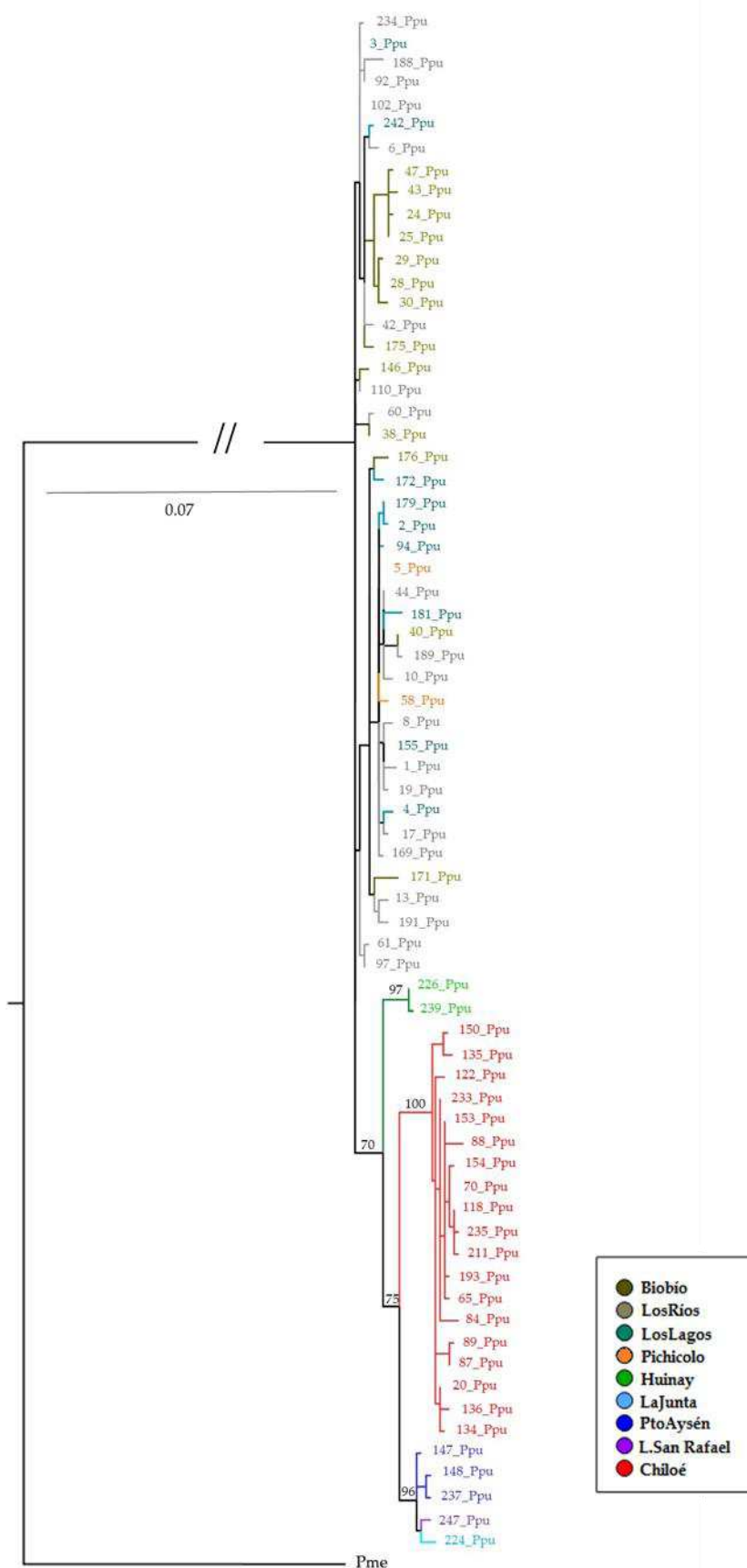


Figura 12. Mejor árbol encontrado por el análisis de *Maximum Likelihood* en RaxML con los genes concatenados citocromo b, ND2 y región control. Los valores de bootstrap sobre 70% aparecen indicados. El árbol está orientado con la secuencia de *Pudu mephistopheles*.

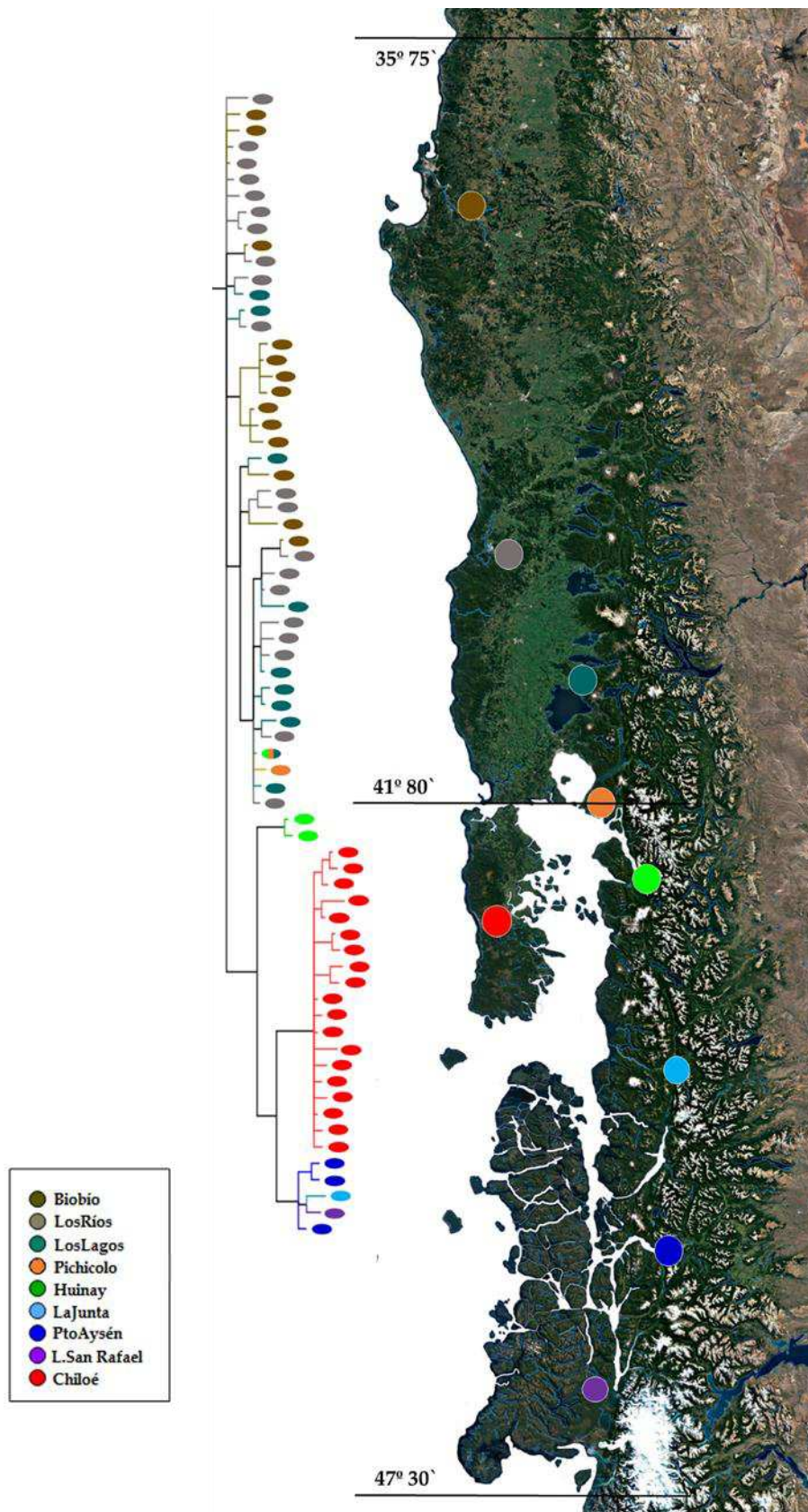


Figura 13 Árbol consenso construido por el método bayesiano de la figura 4 y su representación en el área de distribución del pudú.

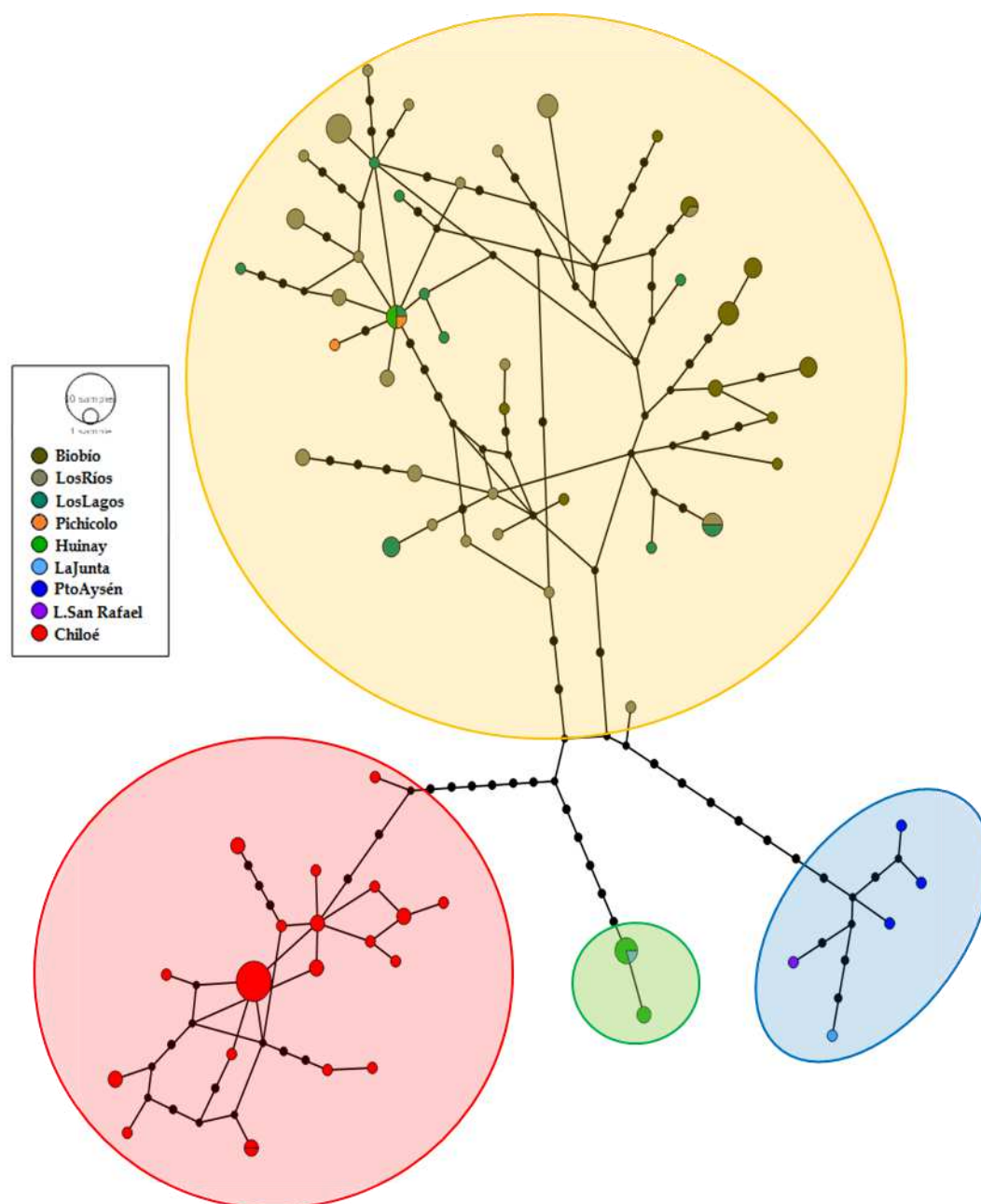


Figura 14. Red construida con el algoritmo del programa TCS en PopArt utilizando las secuencias concatenadas. Los sitios de mutación aparecen indicados **Continente**, **Chiloé**, **Patagonia Norte** y **Patagonia Sur**.

Discusión

Los análisis de los marcadores genéticos moleculares mostraron la presencia de una gran diversidad genética en el pudú, siendo elevada también en cada una de las poblaciones estudiadas. Como ejemplo comparativo en el corzo (*Capreolus capreolus*), un cérvido pequeño con poblaciones elevadas y una amplia distribución, Randi et al. (2004) reportaron valores de un haplotipo de la región control por cada 4,5 animales y una diversidad haplotípica (Hd) de 0,97, considerándolos muy elevados. Similar a lo ocurrido con el huemul donde se menciona una alta diversidad genética con 1 haplotipo cada 4,3 individuos y una Hd de 0,92 (Marín, et al., 2013).

Si bien Fuentes-Hurtado et al. (2011) también indican una alta diversidad genética, nuestros resultados muestran 3 a 5 veces más haplotipos en pudú que los reportados por ellos en la misma especie, utilizando los mismos segmentos mitocondriales. De esta manera reportamos 71 haplotipos para la región control, 26 para el citocromo b y 75 para las secuencias concatenadas de la región control y el citocromo b. Del mismo modo se encontró un mayor número de sitios polimórficos tanto para la región control como para el citocromo b (51/33, 30/11 respectivamente). Estos resultados se pueden explicar debido a que Fuentes-Hurtado et al. (2011) no realizaron un muestreo adecuado, tanto en cantidad como en las zonas geográficas muestreadas, excluyendo la Patagonia, desde Chiloé a la Laguna San Rafael, que representa más de 80.000 km² de superficie en casi 450 km de distancia de norte a sur. Sin embargo, los valores de Hd y Pi obtenidos en el Continente son los mismos que los reportados por ellos (Hd=0,97, Pi=0,009) en la misma zona geográfica. Por otro lado, en Chiloé, estos autores indican una Pi de 0,002, siendo menor a lo encontrado en este trabajo (0,005).

El número de haplotipos y la Hd en Ch y PN, aunque elevados, fueron un poco más bajos que en las muestras continentales, probablemente debido a la deriva genética en Chiloé y el escaso muestreo en PN. Sin embargo, PS con un muestreo aún menor presenta una Hd del 100% indicando que puede existir una gran diversidad en esa zona y que no hemos podido pesquisar debido a la dificultad en el muestreo.

La Pi del pudú está muy por debajo de los valores obtenidos en huemul (0,037, Marín et al., 2013), la cabra montesa americana (*Oreamnos americanus*) (0,037, Shafer et al.

2011), el reno (*Rangifer taradus*) (0,034 Gravlund et al., 1998) e incluso el Alce (*Alces alces*) ($P_i = 0,018$), donde Hundertmark et al. (2002) concluyen que su historia demográfica consiste en tamaños efectivos poblacionales bajos y una expansión reciente.

La divergencia entre las secuencias de la región control de Ch y Co fue de 2,2%, semejante al 2,3% reportado previamente en esta especie (Fuentes-Hurtado, et al., 2011) y mayor a lo estimado entre las demás poblaciones, que presentan divergencias de 1,22% entre PN y PS hasta 1,88% entre Ch y PN (tabla 10). Estos datos superan los valores obtenidos dentro de cada población.

Tal como describen Fuentes-Hurtado et al. (2011), nuestros resultados apoyan el aislamiento de las poblaciones de Chiloé y el Continente, aunque sólo presenta monofilia recíproca la población continental, siendo Ch, PN y PS clados parafiléticos. Los árboles filogenéticos muestran divergencia entre los cuatro grupos muestreados al igual que la red de haplotipos, donde se presentan entre 10 y 20 pasos mutacionales entre ellos (figura 14) y donde cada grupo tiene haplotipos únicos.

Si bien el Continente no muestra estructura genética (Fuentes-Hurtado, et al., 2011; y el presente trabajo), el pudú dentro de su distribución total si revela estructuración en el área geográfica que fue glaciada.

La ausencia de haplotipos de ADN mitocondrial compartido entre los grupos sugiere una interrupción de flujo genético histórica por un cierto número de generaciones suficientes en las poblaciones, para alcanzar el estado de monofilia recíproca (Avice et al 1987), sin embargo, la parafilia entre Ch, PN y PS podría indicar un aislamiento más reciente. Por otro lado, existe un haplotipo ubicado en los 41°80' S (Pichicolo) que es compartido por el grupo Co y PN pudiendo reflejar un flujo genético reciente.

Al igual que lo ocurrido con el huemul (Marín, et al., 2013), nuestros resultados sugieren que la distribución del pudú ha sido fuertemente influenciada por las glaciaciones del pleistoceno. Varias glaciaciones ocurrieron en este período provocando cambios climáticos y ambientales con gran influencia en el desarrollo del paisaje y los ecosistemas patagónicos, siendo el más extenso el Último Máximo Glaciar ocurrido entre

17.500 a 25.000 años atrás (Rabassa, et al., 2005). Diferentes procesos y cambios de distribución direccionales sugieren un mosaico de patrones filogeográficos, mucho más complejos que el tradicionalmente propuesto patrón norte-sur (Sérsic, et al., 2011), creándose refugios aislados mediante la contracción y fragmentación de los hábitat (Lessa, et al., 2003). A lo largo del océano Pacífico sur de Sudamérica, los avances y retiros de la capa de hielo llevaron a la formación de muchas islas y fiordos entre las latitudes de 41° S y 56° S (Denton, et al., 1999), restringiendo los rangos de distribución de muchas especies a esos refugios glaciares (Byrne, 2008) y produciendo además un asilamiento alopátrico (Lessa, et al., 2003). En los períodos interglaciares la biota se expandió desde estos refugios (Hewitt, 2000), formando a veces zonas de contacto secundarias con poblaciones conspecíficas (Haffer, 1985).

El MRCA calculado entre Chiloé-Patagonia y Continente fue datado en 115 mil años atrás aproximadamente, coincidente con el periodo transcurrido entre la última Glaciación del Sur de la Patagonia (± 180.000 años atrás) y el Último Máximo Glaciar (± 26.000 años atrás) no coincidiendo con el período sugerido para la separación de Chiloé y Continente (< 437.000 años) por Fuentes-Hurtado, et al. (2011), pues nuestros resultados indican una separación más reciente. Esta diferencia podría estar dada debido a que estos autores utilizaron un solo marcador molecular (región control) y a que la tasa de substitución utilizada por ellos fue más baja que la empleada en este trabajo (0,04-0,08 vs 0,1), la cual ha sido estimada ser el doble (10,3%, Skog, et al., 2009) que la del citocromo b (5,14%, Pitra, et al., 2004).

Dado que las divergencias de las secuencias son menores entre Chiloé y PS y que los haplotipos de PS aparecen como ancestrales a los de Chiloé, la colonización de la Isla pudo haber ocurrido desde PS en el último período interglaciar, permaneciendo en contacto a través de un puente formado por las islas presentes entre Chaitén y Dalcáhue (42,65° S) debido al descenso del nivel del mar durante la glaciación más fría del pleistoceno. De esta manera con la avanzada de los hielos glaciares, las poblaciones se aislaron entre sí manteniéndose, probablemente, en tres refugios glaciares correspondientes a Chiloé, PN y PS. Posteriormente con la retirada de los hielos las poblaciones comenzaron nuevamente a diversificarse ocurriendo primero en Chiloé,

luego en PN y, finalmente en PS, lo que coincide con la retirada glacial de noroeste a sureste (Porter, 1981; Villagrán et al. 1986; Heusser et al., 1999).

En Chiloé, gran parte del territorio fue cubierto por hielo (Heusser & Flint, 1977), excepto el noroeste de la Isla, que corresponde a zonas de mayor altura de la cordillera de la Costa siendo el principal refugio de bosque en el pleistoceno (Brüggen, 1950; Heusser, 1972; Heusser, 1982; Villagrán, et al., 1986). Del mismo modo, existen antecedentes de refugios glaciares en la Patagonia para especies terrestres y acuáticas (Lessa et al., 2010; Sérsic et al., 2011; Zemplak et al., 2011; Marín, et al., 2013). Este estudio muestra la segunda evidencia de refugios patagónicos para especies de mamíferos de mayor tamaño después del reportado en huemul (Marín, et al., 2013).

La alta diversidad genética encontrada en el continente sugiere que esta población no fue afectada por el UMG al igual que lo sugerido en estudios previos (Fuentes-Hurtado, et al., 2011).

Si bien este estudio muestra 4 grupos bien diferenciados que pudiesen tratarse como Unidades Evolutivamente Significativas independientes, es necesario aumentar el muestreo en la Patagonia para cubrir una mayor superficie y poder concluir de mejor manera estas afirmaciones. Del mismo modo los análisis de los marcadores nucleares ayudarían a caracterizar aún más la distribución de la variación genética en el pudú.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN

Este capítulo muestra, en primer lugar, nuestro fallido intento por utilizar marcadores microsatélites de otras especies para su uso en el pudú, los cuales, aunque fueron variables, resultaron ser poco informativos para nuestras pretensiones. Por este motivo posteriormente presentamos 27 marcadores microsatélites específicos para esta especie que pueden ser utilizados para complementar el estudio poblacional aquí presentado.

El pudú presenta una gran diversidad genética en todas las poblaciones estudiadas incluido las poblaciones cautivas, no siendo la baja variabilidad una amenaza para su conservación.

El pudú presenta estructura genética marcada hacia la mitad sur de su distribución (Patagonia) relacionada directamente con la compleja historia y estructura orogénica de la zona y con los procesos glaciares del pleistoceno. De esta manera, se reconocen 4 Unidades Evolutivamente Significativas, Continente, Patagonia Norte, Patagonia Sur y Chiloé, que debiesen tratarse de manera independiente en cualquier plan de conservación para proteger y mantener el potencial evolutivo de la especie, reconociendo la importancia de la conservación de la diversidad genética (Moritz, 1994).

Debido a que gran parte de la Patagonia fue cubierta por capas de hielo, pudieron haber existido al menos 2 refugios glaciares para el pudú que permitieron conservar una diversidad genética particular durante las glaciaciones, permitiendo una expansión posterior a la retirada de los hielos.

Por el hecho de no existir una marcada estructura filogeográfica en el Continente, las translocaciones de animales en esa zona no precisan de cautela especial. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tanto los pudúes de Chiloé como de la Patagonia son líneas evolutivas lo suficientemente diferenciadas y aisladas como para que sean tratadas por separado en su gestión y conservación no debiendo translocar individuos desde otras poblaciones.

Especial atención hay que tener con los criaderos y zoológicos ya que, por un lado, presentan una gran diversidad haplotípica y nucleotídica siendo un importante reservorio genético, pero por el otro, se evidencia que se mantienen y reproducen en cautividad animales de distinto origen como Concepción, Valdivia, Puerto Varas, Chiloé y Patagonia. Es por esto que se debiese exigir a estos “centros de exhibición” y “criaderos”, una trazabilidad genética de sus animales para determinar su población de origen y destino de ellos, prohibiendo totalmente la liberación de estos animales, como lo indica Ley chilena 19.473. Es recomendable que los criaderos y zoológicos mantengan grupos de cría específicos de las diferentes líneas evolutivas descritas, para que la crianza en cautiverio, además de tener un impacto comercial o educativo, tenga un valor para la conservación de esta especie.

El caso de los centros de reproducción también es de considerar pues, aunque la ley indica que son “planteles destinados a la crianza sin fines de lucro de especies protegidas para su preservación, conservación o repoblamiento”, desde que se han implementado hace más de 30 años, no se conocen estudios o manejo genéticos en estos planteles, pudiendo mezclar las diferentes líneas evolutivas poniendo en riesgo las diversidades de las poblaciones naturales ante una eventual liberación. Es por esto que también debe haber un mayor control en el origen de los animales y las formas de cómo se reproducen. Para ello el Servicio Agrícola y Ganadero debería exigir un plan de manejo genético y reproductivo antes de autorizar su instalación, así como realizar un seguimiento y análisis genético antes de alguna reintroducción de animales.

La destrucción del hábitat sigue siendo una de las mayores causas de amenaza para la conservación del pudú, donde el bosque nativo se sigue talando para ser reemplazado por monocultivos forestales, para agricultura o ganadería, además de ser fuente de calefacción y construcción de viviendas en el sur de Chile. Afortunadamente existe una serie de áreas silvestres que formarán La Red de Parques de la Patagonia con una extensión de unos 4,5 millones de hectáreas que abarcan gran parte de la distribución patagónica del pudú y los refugios glaciares que deben guardar una importante diversidad genética.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Muneer, P., 2014. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*, Article ID 691759, 11 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/6917>.
- Aguilar, C., 2017. Análisis de la casuística de Pudúes (*Pudu puda*) atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián sede de la Patagonia, entre los años 2008 y 2016. Puerto Montt: Memoria de título como requisito para optar al título de Médico Veterinario. Universidad San Sebastián.
- Avise, J., 1994. *Molecular Markers, natural history and evolution*. New York, USA: Chapman & Hall.
- Balakrishnan, C., Monfort, S.L., Gaur, A., Singh, L. & Sorenson MD., 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology*. 12, 1-10.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier, France: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, U.
- Borst, P., 1977. Structure and function of mitochondrial DNA. *Trends in Biochemical Sciences*. 2, 31-34.
- Brüggen, J., 1950. *Geologia*. Santiago: Editorial Nascimento.
- Byrne, M., 2008. Evidence for multiple refugia at different time scales during Pleistocene climatic oscillations in southern Australia inferred from phylogeography. *Quaternary Science Reviews*. 27, 2576–2585.
- Cabello, J. & Dávila, J., 2014. Isolation and characterization of microsatellite loci in Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*) and cross-amplification in other canid species. *Conservation Genetics Resource*. 6(3), 759–761.
- CEAL, 1983. *Fauna Argentina* N° 12, Buenos Aires: Centro Editor de América Latina.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9, 1657-1660.
- CODEFF, 1991. Informe sobre la captura, comercio y tenencia en cautividad de pudú (*Pudu puda*) en Chile, Santiago: Comité Nacional Pro Defensa de la Fauna y Flora.

- Cortés, I., Angulo, A., Guzmán, R. & Reyes, E., 1988. Comportamiento del pudú (*Pudu puda*) en cautiverio (Mammalia, *Cervidae*). Gayana Zoología. 52, 3-14.
- Cosse, M., Gonzalez, S. & Maldonado, J., 2007. Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Genetics and Molecular Research. 6, 1118-1122.
- D'elia, G., 2012. Nomenclatural unawareness, or on why a recently proposed name for Chiloean populations of *Pudu puda* (Mammalia, *Cervidae*) is unavailable. Revista Chilena de Historia Natural. 85, 37-239.
- Dellafiore, C. & Maceira, N., 2001. Los Ciervos autóctonos de la Argentina y la acción del hombre. Buenos Aires: (Eds).
- Denton, G., Lowell, TV., Moreno, PI., Andersen, BG. & Schlüchter, C., 1999. Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of Llanquihue drift in the area of the Southern Lake District Seno de Reloncaví and Isla de Chiloé, Chile. Geografiska Annaler. 81, 167-229.
- Douzery, R. & Randy, E., 1997. The mitochondrial control region of *Cervidae*: Evolutionary patterns and phylogenetic content. Molecular Biology and Evolution. 14, 1154-1166.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution. 29, 1969–1973.
- Eldridge, W., MacNamara, M. & Pacheco, N., 1987. Activity patterns and habitat utilization of pudus (*Pudu puda*) in south-central Chile. En: C. Wemmer, ed. Biology and management of the *Cervidae*. Washington DC: Smithsonian Institution Press. 352-370.
- Excoffier, L. & Lischer, H., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10, 564-567.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783-79.
- Frädrich, H., 1975. Notitzen über seltener gehaltene Cerviden. Zoologischen Garten. 45, 67-77.

- Fuentes-Hurtado, M., Marín, C., González-Acuña, D. Verdugo, C., Vidal, F. & Vianna, J., 2011. Molecular divergence between insular and continental Pudu deer (*Pudu puda*) populations in the Chilean Patagonia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 46(1), 23-33.
- Gilbert, C., Ropiquet, A. & Hassanin, A., 2006. Mitochondrial and Nuclear Phylogenies of *Cervidae* (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 40, 101-117.
- González, E., Labarca, R., Chávez-Hoffmeister, M. & Pino, M., 2014. First fossil record of the smallest deer cf. Pudu Molina, 1782 (Artiodactyla, *Cervidae*), in the late Pleistocene of South America. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 34(2), 483-488.
- Gottschling, M., Wibbelt, G., Wittstatt, U., Stockfleth, E. & Nindl, I., 2008. Novel papillomavirus isolates from *Erinaceus europaeus* (*Erinaceidae*, Insectivora) and the *Cervidae* (Artiodactyla), *Cervus timorensis* and *Pudu puda*, and phylogenetic analysis of partial sequence data. *Virus Genes*. 36, 281-287.
- Gravlund, P., Meldgaard, M., Pääbo, S. & Arctander, P., 1998. Polyphyletic origin of the small-bodied, high-arctic subspecies of tundra reindeer (*Rangifer tarandus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10, 151-159.
- Grubb, P., 1993. Artiodactyla. En: D. Wilson & D. Reeder, edits. *Mammal Species of the World: A taxonomic and geographic Reference*. Washington and London: Smithsonian Institution Press. 384-192.
- Guo, S. & Thompson, E., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48, 361-72.
- Haffer, J., 1985. Avian zoogeography of the Neotropical lowlands. *Ornithological Monographs*. 36, 113-146.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hamilton, M., Pincus, E., Di Fiore, A. & Fleischer, R., 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*. 500-507, 27.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammere, C., van Vuuren, BJ., Matthee, C., Ruiz-García, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, TT. & Couloux, A., 2012. Pattern

- and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*. 335, 32-50.
- Hedrick, P., 2000. *Genetics of Populations*. Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Hershkovitz, P., 1982. Neotropical Deer (*Cervidae*). Part 1. Pudus, Genus *Pudu* Gray. *Fieldiana Zoology*. New Series. 11, 1-86.
- Heusser, C., 1972. On the occurrence of *Lycopodium fuegianum* during late-Pleistocene interstades in the province of Osorno, Chile. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 99(4), 178-184.
- Heusser, C., 1982. Palynology of cushion bogs of the Cordillera Pelada. Province Valdivia, Chile. *Quaternary Research*. 17, 71-92.
- Heusser, C. & Flint, R., 1977. Quaternary glaciations and environments of northern Isla Chiloé, Chile. *Geology*. 5, 305-308.
- Heusser, C., Heusser, L. & Lowell, T., 1999. Paleoeology of the southern Chilean lake district- Isla Grande de Chiloé during middle-late Llanquihue glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler*. 81A (2), 231-284.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405, p. 907-913.
- Hick, U., 1969. Geglückte Aufzucht eines Pudus (*Pudu pudu* Molina, 1782) im Kölner Zoo. *Zoologischen Garten* 39: 111. *Zoologischen Garten*. 39: 111.
- Himes, C., Gallardo, M. & Kenagy, G., 2008. Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography*. 35, 1415-1424.
- Hundertmark, K., Shields, G., Udina, I., Bowyer, Y., Danilkin, A. & Schwartz, C., 2002. Mitochondrial phylogeography of moose (*Alces alces*): late Pleistocene divergence and population expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22, 375-387.
- Iriarte, A., Tala, Ch., González, B., Zapata, B., González, G. & Maino, M., 2004. Cría en cautividad de fauna chilena. Santiago: Servicio Agrícola y Ganadero, Zoológico Nacional y Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- Iriarte, J. & Jaksic, F., 1986. The fur trade in Chile: an overview of seventy-five years of export data (1910-1984). *Biological Conservation*. 38, 243-253.

- Jiménez, J., 1995. Responses of pudus (*Pudu puda* Molina, 1782) to human disturbances in Neotropical temperate rainforests. Final Report for the Lincoln Park Zoo Scott Neotropic Fund. 113 p.
- Jimenez, J., 2010. Southern Pudu *Pudu puda* (Molina 1782). En: Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer. s.l.: Funep and IUCN, Jaboticabal and Gland. 140-150.
- Junge, C., 1966. Pudu *Pudu pudu* at Chillán Viejo zoo. The International Zoo Yearbook. 6, 263-264.
- Kim, S., Min, M., An, J. & Lee, H., 2004. Cross-species amplification of *Bovidae* microsatellites and low diversity of the endangered Korean goral. Journal of Heredity. 95(6), 521-525.
- Krieg, H., 1925. Biologische Reisestudien in Südamerika. V.Die chilenischen Hirsche. Zeitschrift für Morphologie und Oecologie. 4, 685-701.
- Kozlov, AM., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B. & Stamatakis, A., 2018. RAxML-NG: A fast, scalable, and user-friendly tool for Maximum likelihood phylogenetic inference, bioRxiv. doi:10.1101/447110
- Kuehn, R., Schroeder, W., Pirchner, F. & Rottmann, O., 2003. Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*). Conservation Genetics. 4, 157-166.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 bigger dataset. Molecular Biology and Evolution. 33(7), 1870–1874.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., McGettigan, PA., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, IM., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD., Gibson, TJ. & Higgins, DG., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23, 2947-2948.
- Leigh, J., Bryant, D. & Nakagawa, S., 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, 6(doi:10.1111/2041-210X.12410). 1110-1116.
- Lessa, E., Cook, J. & Patton, J., 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 100, 10331-10334.

- Lessa, EP., D'Elia, G. & Pardinas, UF., 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian–Fuegian rodents. *Molecular Ecology*. 19, 3031–3037.
- Ludt, C., Schroeder, W., Rottmann, O. & Kuehn, R., 2004. Mitochondrial DNA Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 31, 1064–1083.
- Marín, J., Varas, V., Vila, AR., Lopez, R., Orozco-terWengel, P. & Corti, P., 2013. Refugia in Patagonian fjords and the eastern Andes during the Last Glacial Maximum revealed by huemul (*Hippocamelus bisulcus*) phylogeographical patterns and genetic diversity. *Journal of Biogeography*. 40, 2285–2298.
- Meier, D. & Merino, M., 2007. Distribution and habitat features of southern pudu (*Pudu puda* Molina, 1782) in Argentina. *Mammalian Biology*. 72(4), 204–212.
- Mella, J., Simonetti, J., Spotorno, A. & LC, C., 2002. Mamíferos de Chile. En: G. Ceballos & J. Simonetti, edits. *Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neotropicales*. México DF: CONABIO-UNAM. 151–183.
- Meredith, E., Rodzen, J., Levine, K. & Banks, J., 2005. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*. 6, 151–153.
- Meyer, W., Seegers, U. & Bock, M., 2007. Annual secretional activity of the skin glands in the Southern pudu (*Pudu puda* Molina 1782, *Cervidae*). *Mammalian Biology*. 73, 392–39.
- Miller, S., Rottmann, J., Raedeke, K. & Taber, R., 1983. Endangered Mammals of Chile: Status and Conservation. *Biological Conservation*. 25, 335–352.
- Miller, S., Rottmann, J. & Taber, R., 1973. Dwindling and endangered ungulates of Chile: Vicugna, Lama, Hippocamelus and Pudu. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference*. 38, 55–68.
- MINGESPRES, 2007. Reglamento de Clasificación de Especies. Santiago: Ministerio de Medio Ambiente.
- Moritz, C., 1994. Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Tree*. 9, 373–375.

- Muneer, P., Gopalakrishnan, A., Shivanandan, R., Basheer, VS. & Ponniah, AG., 2011. Genetic variation and phylogenetic relationship between two species of yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* and *H. nigricollaris* (Teleostei: *Horabagridae*) based on RAPD and microsatellite markers. *Molecular Biology Reports*. 38(4), 2225–2232.
- Neumann, A., 1992. El Pudu (*Pudu puda*, Molina). Contribución a su estudio etológico. Osorno: Impresor Ediciones.
- Pavez-Foxa, M., Pino, M. & Corti, P., 2015. Muzzle morphology and food consumption by pudu (*Pudu puda*, Molina 1782) in south-central Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Environmental*. <http://dx.doi.org/10.1080/01650521.2015.1050920>.
- Peakall, R. & Smouse, P., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288–295.
- Pitra, C., Fickel, J., Meijaard, E. & Groves, PC., 2004. Evolution and phylogeny of old world deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33, 880–895.
- Pizarro-Lucero, J., Celedón, MO., Navarro, C., Ortega, R. & González, D., 2005. Identification of a pestivirus isolated from a free-ranging (*Pudu puda*) in Chile. *Veterinary Record*. 157(10), 292–294.
- Porter, S., 1981. Pleistocene glaciation in the southern Lake District of Chile. *Quaternary Research*. 16 (3), 263–292.
- Posada, D., 2004. Collapse1.2. Program free available at <http://darwin.uvigo.es/>.
- Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25, 1253–1256.
- Primmer, C., Moller, A. & Ellegren, H., 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*. 5, 365–378.
- Rabassa, J., Coronato, A. & Salemme, M., 2005. Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Science*. 20, 81–103.
- Rambaut A., 2012. FigTree v1.4.2 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., Suchard, MA., Xie, W. & Drummond, AJ., 2013. Tracer v1.6.0 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.

- Rambaut, A. & Drummond, A.J., 2013a. LogCombiner v1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J., 2013b. TreeAnnotator v1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86, 248–249.
- Reyes, E., Guzmán, R., Angulo, A., Hermosilla, I. & Conejeros, S., 1988. Ciclo de vida y madurez sexual de *Pudu puda* (Molina) (Mammalia, Cervidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*. 59, 143-150.
- Reyes, E., Lobos, A., Carrasco, C., Cortés, R., Bubenik, G., Shams, D., Bartos, L. & Acuña, A., 2004. Programa de conservación de la especie nativa *Pudu puda*, Molina (Mammalia, Cervidae). En: Z. N. y. F. d. P. U. d. C. Servicio Agrícola y Ganadero, ed. Cría en cautividad de fauna chilena. Santiago. 365-370.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61, 539–542.
- Rozas, J., Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. & Sánchez-García, A., 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Dataset. *Molecular Biology and Evolution*. 34, 3299-3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sérsic, A., Cosacov, A., Cocucci, A.A., Johnson, L., Pozner, R., Avila, L.J., Sites, J.W. & Morando, M., 2011. Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 103, 475-794.
- Shafer, A., Cote, S. & Coltman, D., 2011. Hot spots of genetic diversity descended from multiple Pleistocene refugia in an alpine ungulate. *Evolution*. 65, 125–138.
- Silva-Rodríguez, E., Pastore, H. & Jiménez, J., 2016. *Pudu puda*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T18848A22164089. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T18848A22164089>.

- Silva-Rodríguez, E. & Sieving, K., 2012. Domestic dogs shape the landscape-scale distribution of a threatened forest ungulate. *Biological Conservation*. 150, 103-110.
- Silva-Rodriguez, E., Verdugo, C., Aleuy, A., Sanderson, JG., Ortega-Solis, G., Osorio-Zúñiga, F. & González-Acuña, D, 2010. Evaluating mortality sources for the Vulnerable pudu *Pudu puda* in Chile: implications for the conservation of a threatened deer. *Oryx*. 44(1), 97-103.
- Simonetti, J. & Mella, J., 1997. Park size and the conservation of Chilean mammals. *Revista Chilena de Historia Natural*. 70, 213-220.
- Skong, A., Zachos, FE., Rueness, EK., Feulner, PGD., Mysterud, A., Langvatn, R., Lorenzini, R., Hmwe, SS., Lehoczky, I., Hartl, GB., Stenseth, NC. & Jakobsen, KS., 2009. Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography*. 36, 66-77.
- Stamatakis, A., 2014 RAXML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>.
- IUCN, 2018. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T18848A22164089.
- Templeton, A., Crandall, K. & Sing, S., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132, 619-633.
- Vanoli, T., 1967. Beobachtungen an Pudus, *Mazama puda* (Molina, 1782). *äuetirkundliche Mitteilungen*. 15, 155-165.
- Weir, BS. & Cockerham, CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38, 1358–1370.
- Villagran, C., 1985. Analisis palinologico de los cambios vegetacionales durante el Tardiglacial y Post-gacial en Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 58, 57-69.
- Villagrán, C., 1988. Late Quaternary vegetation of southern Isla Grande de Chiloé. *Quaternary Research*. 29, 294–306.

- Villagran, C., Armesto, J. & Leiva, R., 1986. Recolonization postglacial de Chiloe Insular: Evidencias basadas en la distribución geográfica y los modos de dispersion de la flora. *Revista Chilena de historia Natural*. 59, 19-39.
- Wetterberg, G., 1972. Pudu in a Chilean National park. *Oryx*. 347-351.
- Woodburne, M., Cione, A. & Tonni, E., 2006. Central American provincialism and the Great American Biotic Interchange. En: O. y. L. E. Carranza-Castañeda, ed. *Advances in Late Tertiary Vertebrate Paleontology in Mexico and the Great American Biotic Interchange*. s.l.: Publicación Especial 4 del Instituto de Geología y Centro de Geociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. 73–101.
- Zemlak, TS., Walde, SJ., Habit, E. & Ruzzante, DE., 2011. Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: the influence of glacial cycling. *Molecular Ecology*. 20, 5280–5294.

CAPITULO II. ZORRO CHILOTE O DE DARWIN (*Lycalopex fulvipes*)



INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

Los cánidos contemporáneos son la familia más ampliamente distribuida dentro del orden Carnívora, con 36 especies existentes (Nowak, 1991). África y América del Sur aportan la mayor diversidad con más de 10 especies en cada continente. La riqueza de especies en América del Sur es interesante, ya que allí los cánidos llegaron tardíamente, desde América del Norte tras la aparición del istmo de Panamá.

Wayne et al. (1997) describió cuatro grupos monofiléticos dentro de *Canidae*: lobos y chacales, zorro rojo y similares, lobo de crin y zorro vinagre, y el grupo de los zorros sudamericanos. Este grupo está conformado por zorro el cangrejero (*Cerdocyon thous*), el de orejas cortas (*Atelocynus microtis*) y los zorros del género *Lycalopex* (*Pseudalopex*): de las pampas (*L. gymnocercus*), sechurano (*L. sechurae*), de dientes pequeños (*L. vetulus*), culpeo (*L. culpaeus*), chilla (*L. griseus*) y el chilote (*L. fulvipes*). El endemismo de estos zorros en América del Sur es debido no únicamente a la especiación en Sudamérica, sino también a la extinción de los linajes fundadores en Norte y América Central. Sólo los zorros del género *Lycalopex* y quizás *Atelocynus* parecen tener su origen en el continente sureño (Wayne, et al., 1997).

En Chile existen tres especies de zorros, de las cuales el zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*, Martin 1837) presenta un estado de conservación preocupante, asignado como la segunda prioridad de conservación dentro de los mamíferos chilenos terrestres, después del huemul (*Hippocamelus antisensis*) (Cofré & Marquet, 1999) y que junto al picaflor de Arica (*Eulidia yarrellii*) conforman el grupo de las 3 especies incluidas en el proyecto MMA/FAO/GEF de especies amenazadas del Ministerio de Medio Ambiente chileno. Las otras dos especies de zorros, culpeo y chilla, son catalogados como vulnerable y de preocupación menor respectivamente (Cofré & Marquet, 1999). Todos están incluidos en el apéndice II de CITES.

Durante algunos años no estuvo muy claro si el zorro chilote era una especie diferente al zorro chilla. En un inicio, algunos autores la consideraron una especie distinta (Martin, 1837; Darwin, 1939; Osgood, 1943; Cabrera, 1958), sin embargo, más

adelante dos autores (Langguth, 1969; Clutton-Brock, et al., 1976) la describieron como una subespecie insular del zorro chilla, siendo esta clasificación generalmente aceptada y citada por varios autores (Pine, et al., 1979; Corbet & Hill, 1980; Tamayo & Frassinetti, 1980). Finalmente, Yahnke et al. (1996) a través de un análisis filogenético de 344 pb de la región control mitocondrial, demostraron que el zorro chilote no es una subespecie insular del zorro chilla, sino una especie diferente, formando un clado monofilético hermano del clado formado por los zorros continentales (culpeo y chilla). El tiempo de divergencia estimado entre zorro chilote y el zorro chilla fue calculado en 275.000 a 667.000 años atrás, sugiriendo que el zorro chilote se originó en la invasión de zorros dentro de Sudamérica en el pleistoceno tardío (Yahnke, et al., 1996).

El zorro chilote es también conocido como *paynegurü* en lengua mapuche, que significa zorro azul y estaría presente en los ritos iniciáticos de los brujos mediante sueños, pues él tendría la sabiduría esencial, que traspasaría a los líderes de la tribu. Es uno de los más raros, menos conocidos y quizás el cánido más amenazado del mundo (Macdonald, et al., 2004). Fue descubierto para la ciencia por Charles Darwin el 6 de diciembre de 1834 al sureste de la Isla de Chiloé, en la pequeña isla San Pedro, de ahí que también se le conozca como zorro de Darwin.

El zorro chilote es el más pequeño de los tres zorros que habitan Chile y uno de los más pequeños del mundo, posee una de las más reducidas distribuciones conocidas de todos los cánidos existentes (Vilà, et al., 2004; Wayne, et al., 2004) siendo endémico de la ecorregión de bosque valdiviano de Chile, donde solo se conocen las poblaciones de la Cordillera de Nahuelbuta y la Isla de Chiloé, aunque hay registros de individuos en otras áreas continentales de Chile (D'Elía, et al., 2013; Farías, et al., 2014; Silva-Rodríguez, et al., 2018). Es el carnívoro terrestre más grande de la Isla de Chiloé; con una longitud total de 77,9 cm de largo en promedio, incluida la cola, y un peso adulto promedio de 3,4 kg variando de 2 a 4,7 kg (Cabello, 2015). Su hocico es corto y delgado, y se extiende en una frente más bien redondeada. Se caracteriza por su pelaje de color negro o azulado, a excepción de sus patas con manchas blancas y sus orejas de un vívido café rojizo (Iriarte, 2008). La cola es de color gris oscuro, relativamente corta y bastante espesa. Posee el cuerpo alargado y las patas cortas, otorgándole una apariencia robusta

(Jiménez & McMahon, 2004), la que se acentúa debido a su voluminoso pelaje, haciéndolo ver más pesado de lo que realmente es (observación personal).

Al igual que gran parte de los cánidos, es de conductas principalmente nocturnas siendo de hábitos alimenticios oportunistas, incluyendo en su dieta aves, insectos, semillas, frutos, mariscos, algas y carroña (Jaksic, et al., 1990; Jiménez, et al., 1991). Su alimentación varía según la disponibilidad de alimento a través de las estaciones del año. En Chiloé en la época estival se alimenta preferentemente de insectos, alcanzando hasta 74% en las heces. En menor medida aparecen los vertebrados además de frutos, mariscos, crustáceos, algas, carroña y eventualmente peces (Elgueta, et al., 2007). En invierno los invertebrados son sustituidos por mayor consumo de micromamíferos. En Nahuelbuta se alimenta principalmente de mamíferos como el ratón colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*) y el ratón oliváceo (*Abrothrix olivácea*), seguido de reptiles, insectos, aves y arácnidos (Jiménez, et al., 1991). Su dieta en esta zona contiene piñones de araucaria (*Araucaria araucana*) desde marzo a mayo, así como semillas de árboles pertenecientes a la familia Mirtácea ayudando a su dispersión y al regeneramiento del bosque nativo (Jiménez & McMahon, 2004). En Chiloé consume casi tres veces más frutos que en Nahuelbuta, principalmente de chupón o quiscal (*Greigia sphacelata*) (Elgueta, et al., 2007), cuyas semillas aparecen abundantemente en las heces. Sus presas de mayor tamaño, pero no muy frecuentes, son los pudúes (*Pudu puda*), a los cuales persiguen hasta un río o el mar donde estos se introduzcan a nadar, para luego salir nuevamente ya cansados, donde finalmente 2 o 3 zorros le dan caza (observación personal).

En Chiloé es poco temeroso al ser humano acercándose a las casas en el campo o a campamentos de trabajadores, quienes les proporcionan alimento. Su carácter poco precavido y osado ha facilitado su eliminación por parte de pobladores rurales, quienes los persiguen por su fama de frecuentar gallineros (Jiménez, 2005). En el continente, el zorro chilote vive en simpatria con el zorro chilla y el zorro culpeo, además de compartir hábitat con otros carnívoros como el güiña (*Leopardus guigna*), quique (*Galictis cuja*), chingue (*Conepatus chinga*), pumas (*Puma concolor*) y los abundantes perros domésticos (*Canis lupus familiaris*). Esto hace que tengan una gran competencia y depredación haciéndolo, quizás por esta razón, más esquivo que en Chiloé.

Si bien se describe que es solitario, salvo en época reproductiva (Jiménez & McMahon, 2004), se les suele ver en pareja todo el año (observación personal). En Nahuelbuta el período reproductivo comienza en agosto, con pariciones de 2 o 3 cachorros en octubre que se destetan en febrero (Jiménez & McMahon, 2004). Todo este periodo es al menos un mes más tardío en Chiloé (observación personal). Poseen crianza biparental donde las crías abandonan el grupo familiar alrededor de los 6 meses. Si hay suficiente disponibilidad de alimento, que suele ser cuando los pobladores les ofrecen alimento en las cercanías de las casas, puede haber grupos de 5 o 6 individuos (observación personal).

Se mencionaba como una especie obligada de bosque encontrándose únicamente en zonas de densa vegetación del bosque templado lluvioso (Jaksic, et al., 1990; Medel, et al., 1990) sin embargo, se ha encontrado que, aunque prefiere bosque maduro, como los bosques mixtos de araucaria en la Cordillera de Nahuelbuta y la selva valdiviana en Chiloé, también transita por bosques secundarios, pasturas aledañas, áreas pantanosas de baja altura (Jiménez & McMahon, 2004), playas (Elgueta, et al., 2007) y dunas (observación personal). En Nahuelbuta están asociados positivamente con la disponibilidad de bosques nativos y asociados negativamente con las carreteras, describiéndose además que las plantaciones comerciales también pudiesen proporcionar recursos de hábitat y alimentos complementarios (Moreira-Arce, et al., 2015).

El rango de hogar estimado varía entre 103 y 488 ha (Jiménez, 2007). Basado en estimas del ámbito de hogar en 6 zorros y considerando su extensivo solapamiento (42-99%, (Jiménez, 2000)) se calculó que la densidad ecológica del zorro chilote es de 0,95 individuos por km² en Piruquina, Chiloé (Jiménez & McMahon, 2004), similar a los 0,92 individuos por km² obtenido por Jiménez (2007) en Ahuenco, una zona costera de noroeste de Chiloé, pero donde viven varios animales gracias a la disponibilidad de alimento por parte de pobladores. Por otro lado, en el Parque Nacional Nahuelbuta, basado en capturas intensivas, se estimó una densidad de 1,14 individuos por km² (Jiménez & McMahon, 2004). De esta forma se estimaron poblaciones de 250 a 500 individuos en la Isla de Chiloé (Jiménez & McMahon, 2004; Yahnke, et al., 1996) y entre 50 a 78 zorros en Nahuelbuta (Cofré & Marquet, 1999; Jiménez & McMahon, 2004). Sin

embargo, recientemente se han realizado estimaciones basadas en la ocupación del hábitat, calculándose un mínimo de 412 individuos maduros en Chiloé y 227 individuos maduros en el continente donde el zorro está presente. Si se consideran las áreas donde potencialmente existe el zorro, el tamaño mínimo de población continental se acercaría a 489 individuos (Silva-Rodríguez, et al., 2016).

Las poblaciones que se conocen están limitadas a áreas forestales de la Isla Grande de Chiloé (8.090 km²) y la Cordillera de Nahuelbuta, reportada por Medel et al, recién en 1990. Esta población continental aparentemente está restringida al Parque Nacional Nahuelbuta y a escasos bosques nativos que rodean este parque (McMahon, et al., 1999) representado una “isla” virtual de 68 km², rodeada por remanentes de bosque nativo, terrenos degradados, deforestados y extensos monocultivos de pino insigne y eucaliptos (Jiménez, 2000).

Para explicar la presencia de estas dos poblaciones distanciadas por cerca de 600 km., Medel et al. (1990) y Yahnke et al. (1996) argumentaron que la población del Parque Nacional Nahuelbuta era un remanente relicto de una antigua distribución mucho mayor de la especie, llegando a la Isla de Chiloé en el pleistoceno cuando ésta estuvo conectada al continente. Posteriormente, hace alrededor de 17.000 años, la Isla de Chiloé se separó del continente cuando el nivel del mar subió después de la última glaciación (Villagrán, 1988) dejando la población insular completamente aislada.

A partir del año 2012 se han publicado nuevos registros de la presencia del zorro chilote, uno en la provincia de Cautín, Región de la Araucanía, de un animal atacado por perros (D'Elía, et al., 2013) y otros por fototrampeo en la provincia de Valdivia, en la Región de Los Ríos (Farías, et al., 2014) incluyendo al menos tres áreas protegidas: el Parque Nacional Alerce Costero, la Reserva Costera Valdiviana y el Parque Oncol. Además, se reporta un registro cerca de Maullín (Silva-Rodríguez, et al., 2016) lo que sugiere que la especie es potencialmente existente entre la Reserva Costera Valdiviana (Río Bueno) y Maullín (figura 15). Nahuelbuta y la cordillera costera de Valdivia están separadas por paisajes muy perturbados con zonas agrícolas y forestales, lo que podría indicar que estos nuevos registros pueden pertenecer a poblaciones aisladas entre sí.

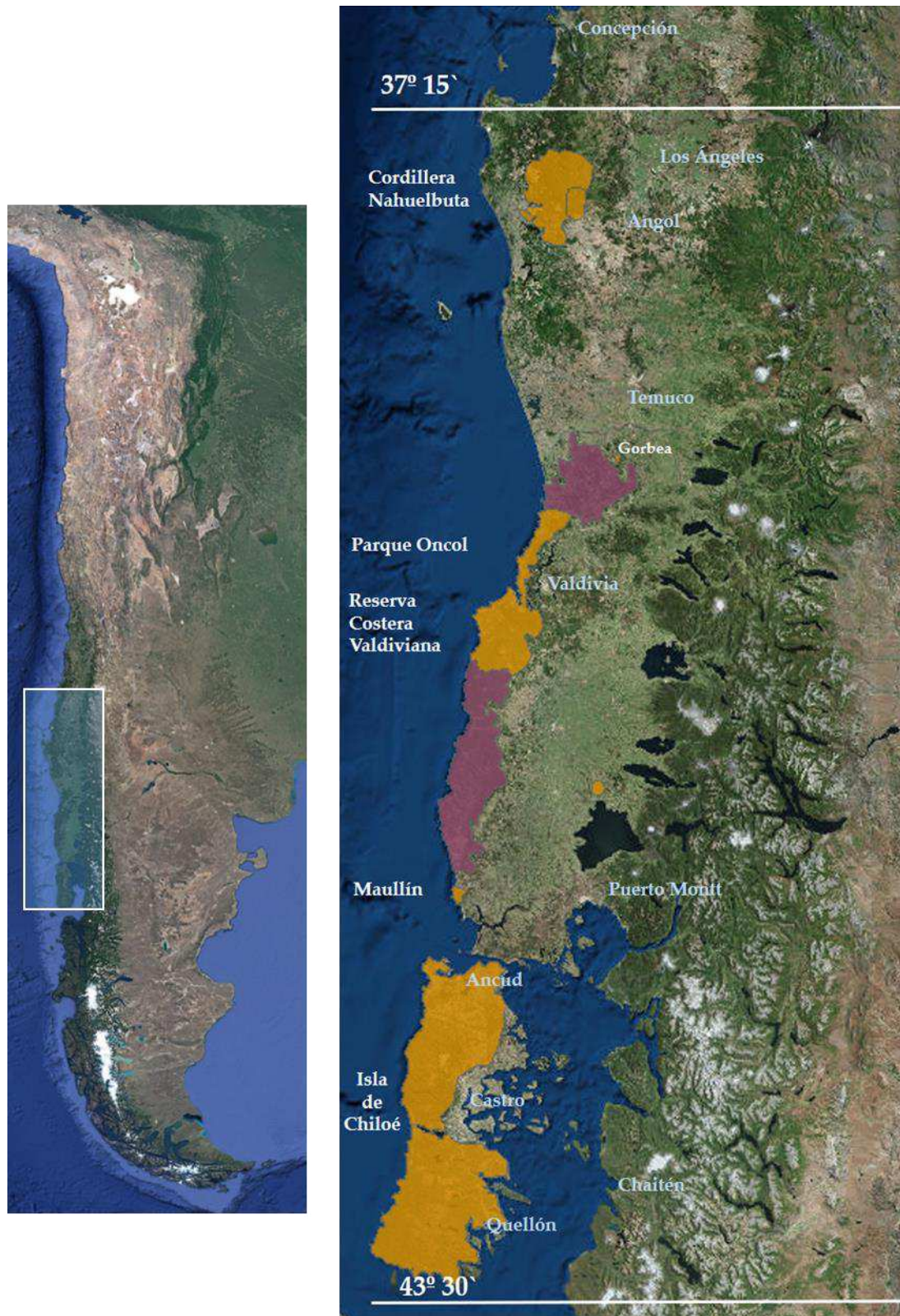


Figura 15. Distribución actual del zorro chilote (UICN, 2018) ■ Presencia ■ Presencia potencial.

En el año 2004 Vilà et al., utilizando trampeos, técnicas no invasivas y entrevistas a los pobladores, buscaron indicios de nuevas poblaciones de zorro chilote entre el Parque Nacional Nahuelbuta y la Isla de Chiloé. De esta forma, mediante análisis genéticos de un cuero colgado en la casa de un poblador del sector Punta Chanchán en la Región de los Ríos, pudieron establecer la existencia de un individuo de zorro chilote en esa zona, donde el haplotipo de la región control mitocondrial encontrando fue diferente a los descritos por Yahnke et al. (1996) quienes encontraron dos haplotipos en la Cordillera de Nahuelbuta en dos individuos y un único haplotipo en Chiloé también en dos individuos. De esta forma Vilà et al. (2004) argumentaron una posible nueva población. Sin embargo, no pudieron comprobar la existencia de tal población debido al nulo éxito de captura y también a la no identificación de heces de esta especie en toda el área de estudio.

La única población continental conocida hasta ahora tiene un alto riesgo de extinción tanto por factores demográficos o ecológicos, como enfermedades y depredación por pumas u otras especies de zorros (Jiménez, 2000) además de la presencia de perros salvajes que pueden atacar y transmitir enfermedades. Por otro lado, la Isla de Chiloé presenta una extensión lo suficientemente grande de bosques nativos capaz de mantener una población viable de esta especie (Jiménez & McMahon, 2004). Sin embargo, en Chiloé su distribución se limita a la zona occidental donde aún permanecen intactos los bosques nativos, pero que poco a poco van siendo explotados. Además, aunque la población isleña es más grande que la continental, puede tener menos variabilidad genética (Vilà, et al., 2004).

Debido principalmente a su escasa distribución, a su limitado tamaño poblacional y la pérdida progresiva del hábitat, el zorro chilote se encuentra clasificado en Chile como “En Peligro” de Extinción” por el Reglamento de Clasificación de Especies (MINSEGPRES, 2007). Por otra parte, hasta el año 2016 a nivel internacional era clasificado como “En Peligro Crítico” de extinción por la UICN debido a que solo existían dos poblaciones separadas por 600 km de distancia, con la población continental muy reducida, con un tamaño población de 250 individuos maduros y con al menos el 90% de ellos existiendo en una sola población, Chiloé (Jiménez, et al., 2008). Sin embargo,

el año 2016 fue reclasificado a la categoría de “En Peligro” bajando un escalafón en su estado prioritario de conservación debido principalmente a que el grado de ocurrencia de la especie es mucho más grande de lo que originalmente se pensaba, como también el número de individuos (Silva-Rodríguez, et al., 2016).

Este alto riesgo de extinción, si bien está mediado por factores demográficos y ecológicos, se ve fuertemente influenciado, además, por la presencia de perros que representan un alto riesgo por ataques y transmisión de enfermedades. En Chile la población de canidos domésticos asciende por sobre los 2.300.000, calculándose en todo Chile una relación de 1 perro por cada 6,8 personas, lo que nos ubica en el segundo lugar en Latinoamérica con la mayor cantidad de perros por persona, luego de Bolivia, que posee un promedio de un perro cada 5,3 personas (OPS, 2003).

El aumento del número de perros de vida libre tiene consecuencias relevantes para la salud pública, tanto por ataques a personas y transmisión de enfermedades, como por ataques a otros animales, ya sean de abasto o silvestres (Bonacic & Abarca, 2014). Los perros asilvestrados no sólo depredan sobre fauna silvestre y transmiten enfermedades infecciosas y parasitarias (Hughes & Macdonald, 2013), sino que la desplaza y obliga a modificar sus conductas naturales (Silva-Rodríguez, et al., 2010).

Durante los últimos años diferentes poblaciones de carnívoros silvestres han presentado eventos de mortalidad a causa de agentes infecciosos (Almberg, et al., 2009; Goller, et al., 2010 ; Matchett, et al., 2010; Miller, et al., 2010) que llevaron a la comunidad científica a considerar la evaluación sistemática de los patógenos que los pueden infectar como un factor importante para su conservación (Murray, et al., 1999; Funk & Fiorello, 2001; Deem & Emmons, 2005). Las poblaciones de perros son suficientes en número y susceptibilidad a los patógenos para funcionar como reservorio de los mismos. Varios patógenos de perros están relacionados directamente con el origen de las enfermedades en carnívoros silvestres, como la rabia y el distemper canino, causantes de importantes epidemias y hasta extinciones de poblaciones naturales (Cleaveland, et al., 2000; Acosta-Jamett, et al., 2010).

Además, una baja variabilidad genética puede estar relacionada con una baja inmunidad frente a patógenos, tomando esto mayor relevancia en especies amenazadas y de escaso tamaño poblacional, como nuestra especie de estudio. El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es uno de los sistemas genéticos más importantes en vertebrados para la resistencia a enfermedades infecciosas (Hill, et al., 1991; Hedrick & Kim, 2000). De esta manera, una baja variación del MHC puede estar relacionada con altas susceptibilidades a enfermedades infecciosas (O'Brien & Evermann, 1988). Poblaciones pequeñas y especies en peligro de extinción suelen tener niveles reducidos de variación genética que las hace más susceptibles a mortalidad por patógenos y parásitos y puede ser una amenaza significativa de extinción (Lyles & Dobson, 1993; Laurenson, et al., 1998; Murray, et al., 1999).

Los antecedentes recopilados por los autores ponen de manifiesto la necesidad de dedicar esfuerzos de investigación a la interacción epidemiológica entre el perro y el zorro chilote, considerando la gran presencia de perros en zonas rurales donde habita el zorro, sobre todo en Nahuelbuta donde los campesinos tienen hasta 10 o más perros por casa que deambulan por el bosque nativo, muchas veces en búsqueda de alimento (observación personal).

Actualmente las medidas de conservación para el zorro chilote se limitan fundamentalmente a realizar campañas de educación y a mantener el Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado (SNASPE) y algunas iniciativas privadas de conservación. Aunque existe una mesa de trabajo para construir el Plan Nacional de Recuperación, Conservación y Gestión (RECOGE) del Ministerio de Medio Ambiente chileno, donde se han realizado, a través de licitaciones públicas, campañas de vacunación a perros que viven en co-ocurrencia con el zorro chilote tanto en Chiloé como en Nahuelbuta, los esfuerzos aún son escasos.

A pesar de ser una especie endémica de Chile y estar en peligro de extinción, son pocos los estudios realizados en el zorro chilote o de Darwin, basándose especialmente en aspectos ecológicos, no existiendo suficiente información respecto a la variabilidad genética de las poblaciones incluso desconociendo su real distribución y su tamaño poblacional.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Desarrollar marcadores microsatélites específicos para el zorro chilote o de Darwin.
- Calcular la variabilidad genética de las dos poblaciones conocidas, en la Isla de Chiloé y en la Cordillera de Nahuelbuta.
- Determinar la relación genética entre las dos poblaciones existentes.
- Evaluar la posible existencia de nuevas poblaciones continentales.
- Realizar un estudio piloto de los patógenos caninos más importantes que pudiesen infectar al zorro en la isla de Chiloé.
- Poder tener antecedentes científicos para aconsejar en relación a algunas medidas de conservación de esta especie en peligro de extinción.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES EN ZORRO
CHILOTE (*Lycalopex fulvipes*) Y AMPLIFICACIÓN CRUZADA EN OTRAS
ESPECIES DE CÁNIDOS**

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-014-0208-6

MICROSATELLITE LETTERS

**Isolation and characterization of microsatellite loci in Darwin's
fox (*Lycalopex fulvipes*) and cross-amplification in other canid
species**

Javier E. Cabello · José A. Dávila

Received: 7 April 2014 / Accepted: 11 April 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s12686-014-0208-6](https://doi.org/10.1007/s12686-014-0208-6)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. E. Cabello (✉) · J. A. Dávila
Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC,
UCLM, JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain
e-mail: javiercabellostom@chiloessilvestre.cl

J. E. Cabello
Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad San Sebastián,
Campus Pichi Pelluco, Lago Panguipulli, 1390 Puerto Montt,
Chile

Published online: 22 April 2014

Introducción

Sólo dos estudios genéticos se han realizado en esta especie, usando ADN mitocondrial para resolver el status taxonómico de los zorros chilenos (Yahnke, et al., 1996; Vilà, et al., 2004). No se han realizado estudios previos para valorar los niveles de diversidad genética entre poblaciones conocidas de zorro chilote. Los Loci microsatélites han llegado a ser ampliamente usado en genética de poblaciones, pero no hay marcadores moleculares disponibles para el género *Lycalopex*.

El objetivo de este trabajo es caracterizar marcadores moleculares microsatélites para obtener medidas de diversidad genética en las poblaciones existentes y poder hacer recomendaciones para su conservación.

Materiales y métodos

Se utilizó sangre extraída, conservada en tubos eppendorf con etanol e individualizadas de 24 zorros chilotes silvestres capturados en la Isla de Chiloé.

Caracterización de marcadores de tipo microsatélite

Para obtener secuencias de ADN conteniendo marcadores microsatélites, se construyó una librería enriquecida en microsatélites usando ADN genómico extraído de las muestras sanguíneas siguiendo el método de extracción con fenol/cloroformo y digestión con proteinasa K (Sambrook, et al., 1989).

50 µg de ADN fueron digeridos en 11 reacciones independientes con 150 U de cada una de las siguientes enzimas de restricción: AluI, BspLI, Hpy8I, RsaI, BseLI, Taal, BsuRI, MboI, Tru1I, Bme1390I (Fermentas) y DdeI (New England BioLabs), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los extremos de los fragmentos resultantes de las digestiones fueron romeados con 50 U de polimerasa ADN T4 (Fermentas) y 0,1 mM dNTPs y resueltos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos con tamaños de entre 300 y 700 pb fueron cortados del gel de agarosa, desfosforilados con fosfatasa alcalina intestinal de ternera y ligados a adaptadores de extremos romos (SNX) (Hamilton, et al., 1999).

El ADN se hibridó entonces con oligonucleótidos biotinilados consistentes en los motivos de repetición (CA)₁₃, (CT)₁₃, (AGC)₈, (CTG)₈, (CCAT)₇, (GATA)₇, (GACA)₇, (GGAT)₇, y (AAAG)₇. A continuación, el ADN conteniendo esos motivos microsatélites fue capturado con cuentas de estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen), para ser posteriormente amplificado mediante PCR con *primers* SNX-F. Una vez amplificado, el ADN fue ligado al plásmido pUC19 dentro del sitio XbaI, que a su vez fue introducido mediante electroporación dentro de bacterias *Escherichia coli* competentes. Los recombinantes fueron sembrados en placas Petri con medio agar-LB con X-Gal y ampicilina como sistema de selección. El ADN plasmídico de los recombinantes positivos (selección blanco/azul) fue transferido a membranas de nylon positivamente cargadas (Roche Diagnostics). Dichas membranas se introdujeron a continuación en una solución con sondas marcadas con DIG (con los motivos de repetición usados en el enriquecimiento), lo que permitió mediante métodos quimioluminiscentes (CDP-Star, Roche Diagnostics) la detección de los recombinantes con motivos de repetición microsatélite en sus plásmidos. Al final, los clones positivos (300-700 pb) fueron secuenciados con el *primer* M13F y Big Dye terminator v. 3.1 en un secuenciador ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

Como resultado del proceso, un total de 96 clones positivos fueron secuenciados. Las secuencias fueron editadas en BIOEDIT v. 7.0.4.1 (Hall, 1999). De los 96 recombinantes positivos secuenciados, 60 contenían secuencias microsatélite. Tras eliminar las secuencias repetidas y las que no presentaron secuencia flanqueante al microsatélite suficiente para diseñar *primers* de PCR, quedaron 27 marcadores microsatélite para los cuales se diseñaron parejas de *primers* de PCR por inspección visual.

Finalmente, debido al presupuesto, sólo 11 de estos 27 pares de *primers* diseñados fueron optimizados y probados con ADN genómico extraído de muestras sanguíneas colectadas de 24 zorros chilotos silvestres de Chiloé (tabla 11). Estos *primers*, además fueron probados en ADN extraído de 13 muestras sanguíneas de zorro culpeo, 16 de zorro gris, 11 de *Vulpes vulpes* (zorro europeo) y 6 de *Canis lupus* (lobo europeo) (tabla 12).

Las condiciones de PCR consistieron en un periodo inicial de desnaturalización de 2 min a 94° C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a la temperatura de unión (tabla 11) y 30 s a 72° C para terminar con un ciclo de 5 min a 72° C para completar las cadenas inacabadas. Todas las PCR se realizaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystems). En cuanto a la mezcla de reacción (10 µl de volumen final) contenía: 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerasa (BIOTOOLS), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% Tween-20 (BIOTOOLS) y 50 ng de ADN. Los *primers* que produjeron productos de amplificación discretos y variables fueron marcados de forma fluorescente con VIC, PET, 6-FAM o NED (Applied Biosystem). Los fragmentos se resolvieron por electroforesis capilar junto con el marcador de peso molecular LIZ-500 (Applied Biosystems) en el secuenciador automático ABI prism 3130xl (Applied Biosystems) y con el programa GeneMapper versión 4.0 (Applied Biosystems).

Para comprobar si los marcadores estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg y no presentaban desequilibrio de ligamiento se usó el programa *online* Genepop 1.2 (Raymond & Rousset, 1995). El número de heterocigotos observados y esperados se estimó con Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Resultados y discusión

Los 11 loci fueron polimórficos con 2 a 4 alelos por locus. La heterocigosidad observada estuvo entre 0,041 y 0,608 (tabla 11). Después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989), todos los loci mostraron estar en equilibrio de Hardy-Weinberg y no se encontró desequilibrio por ligamiento entre ningún par de marcadores.

Los loci mostraron considerable amplificación cruzada en las otras especies probadas. Incluso mostraron tener mayor variabilidad en *L. culpaeus* y *L. griseus* que en *L. fulvipes* (tabla 12).

El mayor polimorfismo de estos microsatélites encontrados en pocos individuos de otras especies de canidos podría ser indicio de deriva genética en la población chilota del zorro chilote.

En la tabla 13 se entrega la lista de los 16 pares de *primers* restantes que no fueron optimizados, pero que mostraron amplificar en muestras de zorro chilote.

Tabla 11. Características de 11 loci microsatélites aislados de zorro chilote probados en 24 individuos.

Locus		Primer sequence (5'-3')	Motif	Ta	Range	Na	Ho	He	Pvalue	AN
Lfu 1B9	F ^F	TGGGAGGACAATCTTGTTG	(GT)14	62	169-177	2	0,083	0,081	1	KJ614232
	R	CCTGAAATGGTTTATCTCTCCTCC	(GA)17							
Lfu 4D11	F ^N	GGAGCCATTTTGTAGCTGAC	(CA)19	59	98-114	4	0,208	0,3	0,089	KJ614233
	R	CAGAAGGGGACTAGATGGA								
Lfu 4E5	F ^V	TCCTGGAAATCTCTAGGCT	(TC)8 (AC)13	59	159-167	2	0,041	0,119	0,063	KJ614234
	R	CATTAGATGTCTTCCAAGCAG								
Lfu 4F6	F ^F	AGCCTGAAGGGTCTGCTGC	(GGAT)33	62	288-269	2	0,391	0,449	0,642	KJ614235
	R	AAGCCAGTGTTCCTTCTGC								
Lfu 4K5	F ^N	CTGAGCCTGTAAGGTAAGCTC	(GCA)17	59	125-131	3	0,416	0,438	0,213	KJ614236
	R	GTTCTCCCAAAGATCACC								
Lfu 5D3a	F ^F	TCTTGAACCCCAACTACTC	(AC)26	58	110-122	2	0,458	0,403	0,634	KJ614237
	R	GGTTTCCTTAGATGAGAGCC								
Lfu 5F6	F ^V	TTCCATTGTCACGTGCATC	(GT)24	58	199-213	3	0,608	0,461	0,635	KJ614238
	R	CCTCTCTTCCCATCTCTTCC								
Lfu 5G3c	F ^F	GTGTGTGTGCAAGCACTTG	(TG)18	59	92-102	2	0,083	0,081	1	KJ614239
	R	CTCCATCTATCCCTCTGC								
Lfu 5H4	F ^P	GGCAGAGACTTTCTAAACCAG	(GT)20	62	171-173	2	0,434	0,347	0,537	KJ614240
	R	GAGATGCTAGTAAAGAGGTCC								
Lfu 8D5	F ^V	TCAGGATGAGGCCAGACTTC	(GT)14	62	109-115	2	0,458	0,467	1	KJ614241
	R	ACTGCTGCCTTACCCTCAC								
Lfu 8D6b	F ^P	GTTGCCTAGTTGCCGTGTAG	(AC)16	59	116-118	2	0,041	0,119	0,063	KJ614242
	R	GGGATCAGTGAAGTGACTGG								

F 6-FAM; N NED; P PET y V VIC indican el fluorescente utilizado. Ta, temperatura de annealing (°C); Na, número de alelos; Ho, heterocigocidad observada; He, heterocigocidad esperada, AN, Número de acceso en GeneBank.

Tabla 12. Amplificación cruzada de 11 loci microsatélites de zorro chilote en otras cuatro especies de

Locus	<i>L. culpaeus</i>			<i>L. griseus</i>			<i>Vulpes vulpes</i>			<i>Canis lupus</i>		
	n	Na	Range	n	Na	Range	n	Na	Range	n	Na	Range
Lfu 1B9	12	5	159–167	17	11	161–189	11	8	163–189	5	2	157–159
Lfu 4D11	11	5	92–106	19	10	76–110	11	3	78–86	6	2	86–92
Lfu 4E5	11	5	163–179	18	9	159–181	9	5	159–171	4	2	167–173
Lfu 4F6	10	3	292–300	17	11	238–308	9	3	194–202	4	4	272–288
Lfu 4K5	7	4	122–131	16	6	113–134	10	5	110–122	5	2	119–122
Lfu 5D3a	13	9	98–114	18	9	98–116	11	6	100–116	5	4	106–116
Lfu 5F6	1	1	185	12	7	183–207	10	7	189–209	4	1	175
Lfu 5G3C	13	7	96–108	18	8	92–112	10	7	92–104	4	3	92–96
Lfu 5H4	10	6	155–171	18	11	159–191	9	7	145–165	3	2	163–165
Lfu 8D5	11	4	101–109	18	4	107–113	10	5	111–119	2	2	99–101
Lfu 8D6b	13	7	116–130	19	10	110–128	10	2	100–102	4	5	112–128

n, número de individuos, Na, número de alelos observados; Range, rango de tamaño en pares de bases (bp).

Este es el primer panel de loci microsatélites aislados de zorro de chilote. Las secuencias de los *primers* se encuentran en la tabla 13 y las secuencias amplificadas en la tabla 14. Estos resultados también indican el uso potencial de estos marcadores microsatélites en otras especies de cánidos. Es de esperar que estos loci recientemente caracterizados puedan ser útiles en estudios de otras especies de cánidos sudamericanos.

Tabla 13. Secuencias de primers de marcadores microsatélite no caracterizados de zorro chilote.

Locus		Primer sequence (5'-3')	Motif	Ta
Lfu 1A8	F	GACTTTGGGTGACTATGATG	(TG)15 (AG)12	58
	R	GAGTAGTTTTGAGTCTACCTC		
Lfu 1C8a	F	ACTTCTTCTCCACCTGCTC	(CCAT)56	52
	R	TGGCCTGGAACATAGATAGG		
Lfu 1C8b	F	GTATGTACACATGCACAGACC	(TC)14 (AC)7	60
	R	TGATGTGAGACCACAGCAC		
Lfu 4C9	F	GCACTCCTGCATTCTGTGCA	(AC)21	58
	R	TGACTGGGAAATGGAAAGG		
Lfu 4D13	F	GATTTTACTCCCTTCTGGAGC	(CA)19	56
	R	TATGAACAAGCAGACCTGTGG		
Lfu 4D6	F	GTAAACCAGTAGTCTCGATTCC	(GA)23	62
	R	CCTGCTTCTGCCTATGTCTC		
Lfu 4H11	F	CCTGAGAATGGTCTACAGTC	(GT)13 (GC)3 (GT)8	58
	R	ACTCAAGCATTGGAATTCC		
Lfu 4I13	F	ATTAATCCCTGGCCAAAGC	(GT)24	55
	R	TAATTCTGTTGGCCAGCAGG		
Lfu 5B6a	F	CAAAAGCCTGACAGTCTGA	(GGAT)17	58
	R	CCACCTACTGATTATCAGC		
Lfu 5B6b	F	GGAGTGTCAAGAAGAGCAC	(GAAA)61	62
	R	GAGAATTCAGCCTGCTTCC		
Lfu 5C8	F	AGCGGGGATTTTGAAGTC	(GT)20	58
	R	TCCTCAGCTGCTCTCCCTTG		
Lfu 5G3a	F	GAGACACAACACACATCATCG	(AC)24	60
	R	GCTATGAGTGCCTGGTTTG		
Lfu 5G5	F	ATGGCCTTCATTACAGACCTCC	(TC)21	58
	R	GGAGTTTGGCCATTGAAGG		
Lfu 5G9	F	GGCTGAACAGAATGTCTGAT	(GGAT)11	50
	R	GTGCTATCCTTAGCATTGAGA		
Lfu 8D4	F	ACCATCTCAACTCCACCCTG	(CA)21	58
	R	CATCTGGTCATCAGTCATGTG		
Lfu 8E5a	F	TGAAGCCTGGTGAAGACTGC	(CCAT)17	62
	R	TTTCCTTTCCCTCTGCCTC		

Tabla 14. Secuencias amplificadas con los primers descritos.

[illegible]

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y EVIDENCIAS DE NUEVAS POBLACIONES
CONTINENTALES PARA EL CARNÍVORO MÁS AMENAZADO DE AMÉRICA:
EL ZORRO CHILOTE O DE DARWIN (*Lycalopex fulvipes*)**

Introducción

Desde el año 2012 se han reportado y publicado nuevos registros del zorro chilote en áreas diferentes a las de las dos poblaciones conocidas: Chiloé y Nahuelbuta. En mayo de 2012 un funcionario del Servicio Agrícola y Ganadero de la Región de La Araucanía encontró un zorro chilote muerto por perros cerca de Gorbea, un pueblo a unos 150 km al sur de Nahuelbuta y a solo 50 km de Punta Chanchán. En 2013, D'elía et al. secuenciaron 331 pb de la región control mitocondrial de ese espécimen encontrado en Gorbea obteniendo un nuevo haplotipo diferente de los tres previamente descritos por Yahnke et al. (1996). Farías et al. (2014) reportaron una nueva población de zorro chilote mediante registros de cámaras trampa en la provincia de Valdivia desconociéndose el número de animales y si realmente corresponde a otra población continental distinta a la ya conocida. Finalmente, Silva et al. (2018) reportaron un registro fotográfico en la comuna de Maullín, también por foto trampeo.

Adquirir información genética de una especie amenazada y comprender los determinantes de su variabilidad genética son pasos fundamentales para su conservación (Frankham, 1995; Schwartz, et al., 2007). La deriva genética reduce la variación en una población a través de la pérdida de alelos y, la endogamia puede disminuir aún más la variabilidad individual. La deriva genética no solo reduce la variación, sino que también puede reemplazar a la selección natural como la fuerza principal del cambio evolutivo. La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones respondan evolutivamente a los cambios ambientales y, en el corto plazo, para hacer frente a la reducción en la salud reproductiva, a la disminución de su capacidad de generar respuesta a nuevas enfermedades infecciosas y al riesgo de fijar en homocigosis alelos recesivos deletéreos.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la diversidad genética, el grado de consanguinidad y determinar la relación genética de las dos poblaciones conocidas

de zorros de Darwin en la Isla de Chiloé y la Cordillera de Nahuelbuta, contribuir a determinar el número de poblaciones existentes y, de esta forma, poder establecer recomendaciones en relación a diferentes acciones de conservación como los programas de cría en cautividad, las translocaciones o las reintroducciones.

Materiales y métodos

Muestreo

Entre los años 2009 y 2017 se colectaron 121 muestras de zorro chilote correspondientes a material fecal, pelos, cuero, músculo y sangre de animales de Chiloé, Cordillera de Nahuelbuta, Parque Oncol, Reserva Costera Valdiviana y Gorbea (tabla 15, figura 16). A esto se sumaron 19 muestras de ADN extraído entre los años 1998 y 2002 de zorros chilotos del Parque Nacional Nahuelbuta de investigaciones anteriores realizadas por E. MacMahon y W. Johanson.

Con el objetivo de capturar los animales para la toma de muestras sanguíneas, se realizaron 35 expediciones de entre cuatro y quince días cada una en 22 localidades diferentes de Chiloé y 9 localidades continentales. Los sitios de captura se seleccionaron por registros previos de presencia de zorro chilote a través de cámaras trampa, por información de avistamiento directo de pobladores y por denuncias de ataques a gallineros. Además, se seleccionaron algunos lugares de acuerdo a la presencia de su hábitat ideal (bosque nativo maduro) y las posibilidades de acceso. En cada terreno se utilizaron entre tres y treinta trampas del tipo tomahawk y de cierre automático tipo guillotina, dispuestas en transectos y separadas entre 300 y 500 m cada una. Las trampas fueron revisadas al amanecer todos los días que duraron los trabajos de campo.

Una vez realizadas las capturas, los animales fueron sedados o anestesiados en la misma trampa utilizando jeringas de 1 ml con una combinación de 10 mg/kg de ketamina (Imalgene, Merial, France) y 1 mg/kg de xilacina (Xilacina, Centrovét Ltda., Chile) o 0,05 mg/kg de medetomidina (sedator, Divasa Farmic) o 0,04 mg/kg de dexmedetomidina (dexdomtor, Pfizer) sola o combinada con 2,5 a 5 mg/kg de ketamina. Cuando se utilizó medetomidina o dexmedetomidina sola, su efecto fue revertido con atipamezol en dosis de 0,25 mg/kg o 0,4 mg/kg respectivamente (Revazol, Divasa Farmic o Antisedan, Pfizer).

Todos los zorros intervenidos fueron cubiertos con una manta para asegurar el bloqueo de la visión y para mantener la temperatura corporal estable. A todos ellos se les realizó un examen clínico general por un veterinario antes de colectar las muestras, además de monitorear temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria cada 5 minutos. Se extrajeron entre 3 a 6 ml de sangre desde las venas cefálicas izquierda o derecha indistintamente. La sangre fue dispuesta en tubos para extracción de sangre (vacutainer) con EDTA, en tubos para extracción de sangre sin aditivos y en tubos eppendorf de 2 ml. Posteriormente se tomaron muestras de pelo de la cola, heces desde el recto, isopados orales y rectales además de realizar mediciones morfométricas para estudios paralelos.

A todos los animales se les administró un microchip (EI1001, Felixcan Animal ID) de manera subcutánea entre las escápulas. Cada vez que hubo una captura, los animales fueron revisados para la presencia del microchip con un lector universal FX-Pet (Felixcan Animal ID). Una vez terminado el manejo los zorros fueron liberados en el mismo sitio de captura.

Las muestras de heces ambientales fueron identificadas visualmente y colectadas desde los mismos transectos de trampeo y también desde otros senderos. Las muestras de cuero fueron colectadas de animales embalsamados en el Parque Nacional Nahuelbuta, Museo Nacional de Historia Natural y un cuero que poseía un campesino en Chiloé. Finalmente, la muestra de músculo fue colectada de un individuo muerto por perros en el sector de Gorbea y custodiada por el Servicio Agrícola y Ganadero de la Región de la Araucanía.

Todas las muestras fueron individualizadas, georreferenciadas y registradas en una base de datos (anexo 2); las de sangre, heces y músculo fueron almacenadas con 4 volúmenes de etanol absoluto y las de cuero fueron guardadas en bolsas plásticas. Todas fueron conservadas a no más de -18°C hasta su procesamiento en laboratorio.

Adicionalmente a las muestras de zorro Darwin, se obtuvieron 14 muestras sanguíneas de zorro culpeo y 23 muestras sanguíneas de zorro gris de diferentes lugares de Chile (tabla 16).

Todas las muestras fueron colectadas con autorización del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de acuerdo a la Ley 19.473 de 1996 y algunas exportadas a España con permisos CITES.

Tabla 15. Localización y tipo de muestra obtenida.

	Localidad	Población	Georreferencia	Sa	ADN	Pe	Cu	He	Mu	To	M	H	ND
1	Parque Nac. Nahuelbuta	Nahuelbuta	37°45' S, 73° O	19			2			21			21
2	Butamalal, Forestal Arauco	Nahuelbuta	37°48' S, 72°57' O	5						5	2	3	
3	Sección 9, F. Arauco	Nahuelbuta	37° 39.9'S, 73° 13.03'O							0			
4	Trongol Alto	Nahuelbuta	37° 34.9'S, 73° 11.5'O							0			
5	Pino Guacho, F. Arauco	Nahuelbuta	37° 33.51'S, 73° 14.05'O							0			
6	Fundo Santa María	Nahuelbuta	37° 38.7'S, 73° 7.8'O							0			
7	Gorbea	Gorbea	39° 6' S, 72°42' O						1	1	1		
8	Oncol	Oncol	39°42' S, 73°20' O	2						2		2	
9	Reserva Costera valdiviana	Valdivia	40° 1.35 S, 73°34' O	3						3	1	2	
10	Parque Ahuenco	Chiloé	42° 6'22" S, 74° 2'48" O	17		1		8		26	9	8	9
11	Lar, P.N. Chiloé	Chiloé	42° 9'13" S, 74° 3'29" O	6		1		2		9	4	3	2
12	Rancho Grande, P.N. Chiloé	Chiloé	42°34'47" S, 74° 4'46" O	1				4		5		1	4
13	Cole-Cole P.N. Chiloé	Chiloé	42°29' S, 74° 10' O	2						2	1	1	
14	Pirámide, P. Tantauco	Chiloé	43°8.7' S, 74°7.8' O					5		5			5
15	Emerenciana, P. Tantauco	Chiloé	43° 8'38" S, 74°15'54" O	2				5		7	2		5
16	Caleta zorra, P. Tantauco	Chiloé	43° 8.86'S, 74° 16.98'O	2						2	1	1	
17	Yaldad, P. Tantauco	Chiloé	43° 1'6" S, 73°47'42" O	9						9	4	4	1
18	Chaiguaco, P. Tantauco	Chiloé	43° 7.9'S, 74° 0.5'O	3				5		8	2	1	5
19	Chaiguata, P. Tantauco	Chiloé	43° 7.03'S, 73° 56.7'O	7				3		10	3	4	3
20	Inío, Parque Tantauco	Chiloé	43°18'49" S, 74° 5'35" O					1		1			1
21	Tablaruca	Chiloé	42° 54.71'S, 74° 6.30'O	4						4	3	1	
22	San Antonio	Chiloé	41°57'30" S, 73°49'4" O	4				2		6	1	3	2
23	Rahue	Chiloé	42°41'22" S, 74° 6'2" O	3			1			4	2	1	1
24	Chepu	Chiloé	42° 2'7" S, 73°59'8" O	1						1		1	
25	Tara	Chiloé	42° 43.03'S, 73° 48.84'O	1						1	1		
26	Puntra	Chiloé	42° 7.74'S, 73° 48.5'O	1						1		1	
27	Queilen	Chiloé	42° 59.63'S, 73° 33.09'O	1						1	1		
28	Huite	Chiloé	42° 43.03'S, 73° 48.84'O	1						1	1		
29	Guabún	Chiloé	41° 47.87'S, 74° 0.38'O	1						1	1		
30	Palomar	Chiloé	42° 3'44" S, 73°46'14" O	3						3	2	1	
31	Isla San Pedro	Chiloé	43° 19.88'S, 73° 43.09'O							0			
	M.N.H.N.	Chiloé	Sin información				1			1			1
				79	19	2	4	35	1	140	42	38	60

Sa: sangre, ADN: extracciones de ADN, Pe: pelo, Cu: cuero, He: heces, Mu: músculo, To: total, M: machos, H: hembras, ND: no determinado, M.N.H.N.: Museo Nacional de Historia Natural. La georreferencia es referencial, los datos de cada muestra están presentados en el anexo 2.

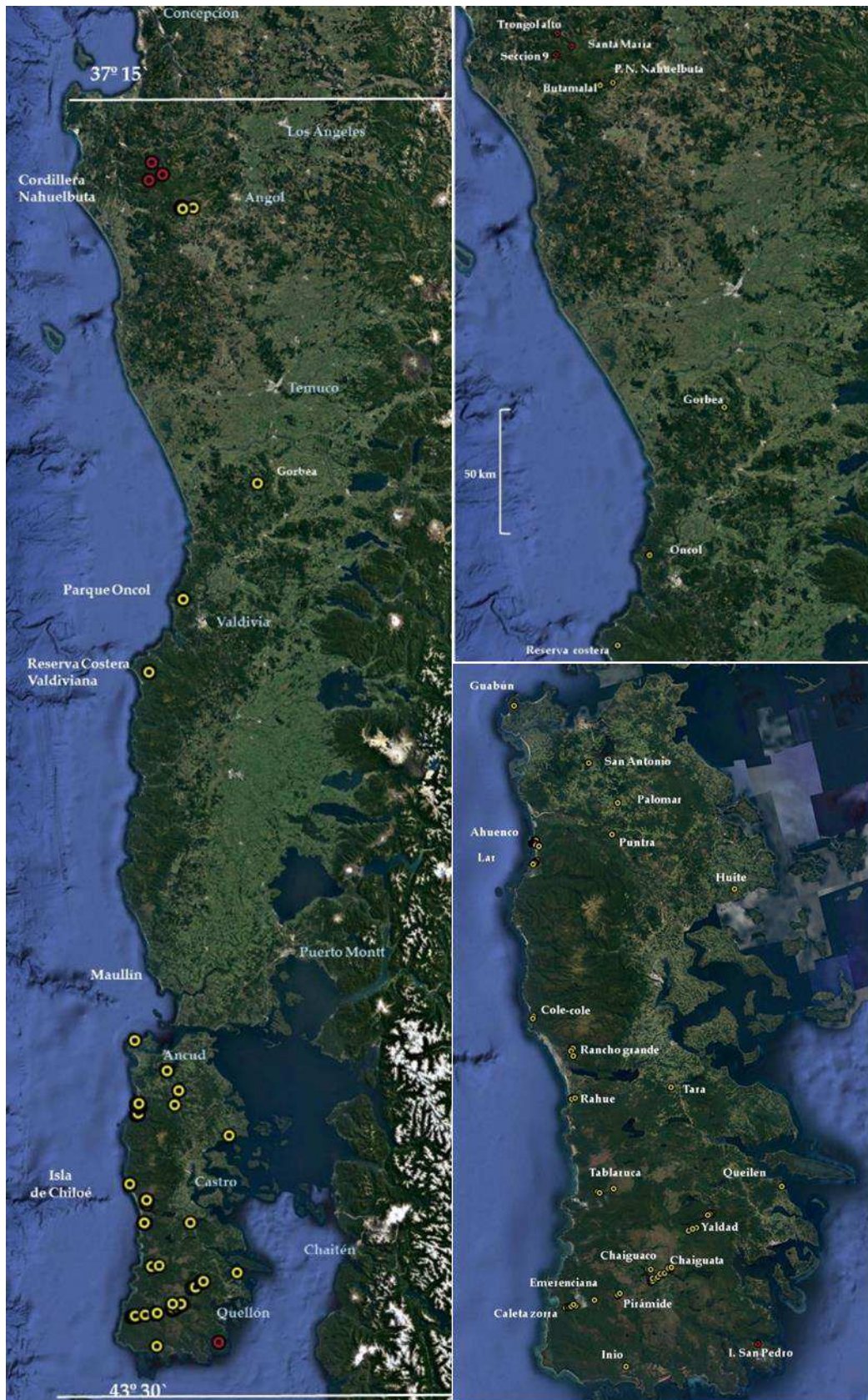


Figura 16. Distribución geográfica de las localidades de muestreo. Puntos rojos, no hubo capturas.

Tabla 16. Localización de muestras obtenidas de zorro gris y culpeo.

Localidad	Gris	Culpeo
Lo Aguirre, Región Metropolitana		2
San Carlos de Apoquindo, Región Metropolitana		1
Zoo Metropolitano, Región Metropolitana		1
El Morado, San José de Maipo, Región Metropolitana		1
El Manzano, San José de Maipo, Región Metropolitana		2
Reserva Nacional, Río Clarillo, Región Metropolitana		3
Rancagua, Región del L. Bernardo O'Higgins		1
San Fernando, Región del L. Bernardo O'Higgins		1
Los cipreses, Región del L. Bernardo O'Higgins		1
Pichilemu, Región de L. Bernardo O'Higgins	1	
Parque Nacional Nahuelbuta, Región de la Araucanía	5	
Puerto Montt, Región de los Lagos	1	
Tierra del fuego Región de Magallanes	16	
TOTAL	23	14

Extracción de ADN

El ADN genómico de las muestras de sangre y músculo fue aislado por digestión con proteinasa K, extraído con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, precipitado por etanol (Sambrook et al., 1989) y resuspendido en TE para obtener una concentración de trabajo de unos 50 ng/μl. Para las muestras de heces, el ADN fue extraído utilizando QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen) y para los cueros se utilizó DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Para extraer ADN de aquellas muestras con poco tejido (pelos) o con malos resultados en las extracciones anteriores (algunos cueros y heces), utilizamos QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen). Todos los protocolos utilizados fueron los recomendados por el fabricante.

Amplificación y secuenciación de la región control mitocondrial y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Para amplificar la región control de zorros se usaron los *primers* MTLPRO2 y CCR-DR1 utilizados previamente en el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*) (Tchaicka, et al., 2006).

Para aquellas muestras en que no fue posible amplificar con los *primers* mencionados anteriormente se diseñaron por inspección visual *primers* internos (figura

17) para obtener la secuencia de la región control de manera parcializada. Las secuencias de los primers, los tamaños de productos de PCR y las temperaturas de *annealing* se muestran en la tabla 17.

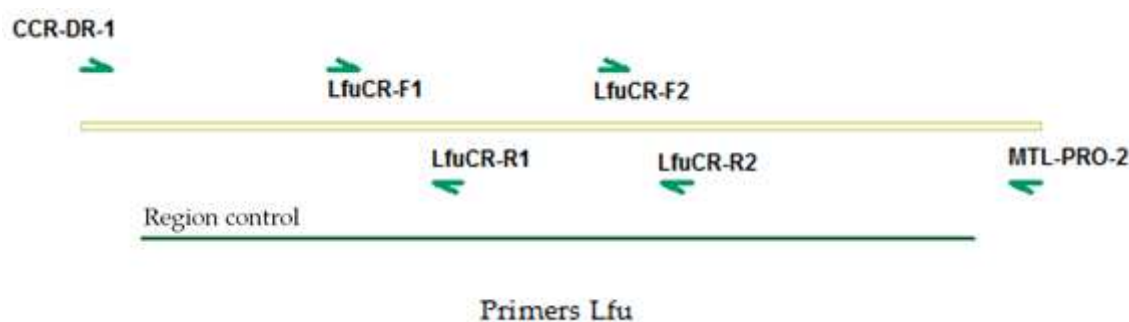


Figura 17. Posición de los primers internos diseñados en este estudio para amplificar la región control.

Tabla 17. Secuencias de primers mitocondriales empleados en este estudio.

<i>Primer</i>	Secuencia	T° C	Pb
CCR-DR-1	CTGTGACCATTGACTGAATA	62	688
MTL-PRO-2	CAGCTTTGGGTGCTGATAGTG		
CCR-DR-1	CTGTGACCATTGACTGAATA	56	273
LfuCR-R1	TCTCAAATGGGACATCTGA		
LfuCR-F1	CCCCCGAAAATTAAGATACC	58	261
LfuCR-R2	AGGGATTAATCACCATGCCTC		
LfuCR-F2	CGGAGCGAGAAGAGARGCAT	56	317
MTL-PRO-2	CAGCTTTGGGTGCTGATAGTG		

Para amplificar el segundo exón de DRB y DQB del complejo MHC clase II usamos los *primers* DM-1 and DM-2 (Hedrick, et al., 2000) y DQB-F y DQB-R (Fernandez-Vina & JD, 1997) respectivamente.

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando aproximadamente 50 ng de ADN, tampón 10X con 2mM MgCl₂ (Biotools), 0,1 mM de cada dNTP (Biotools), 0,5 µM de cada *primer* y 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools). Las amplificaciones de PCR se realizaron en termocicladores Gene Amp® PCR System 2700 (Applied biosystems) e iCycler v.2.039 (Bio-Rad) y consistieron en una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de una desnaturalización a 94° C por 30 s, un *annealing* a las temperaturas de la

tabla 17 para la región control y para los loci del MHC a 61° C (DM-1/DM-2) y 58° C (DQB-F/DQB) por 30 s y una extensión a 72° C por 30 s, además de una extensión final a 72° C por 5 minutos. En cada reacción se utilizó un control negativo de agua.

Las muestras amplificadas fueron entonces purificadas por medio de MinElute PCR Purification KIT (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante, o bien tratadas con 0,5 U de fosfatasa alcalina y 4 U de exonucleasa.

Se secuenciaron las dos cadenas utilizando BigDye® Terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) y limpiando las reacciones con BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secuencias se resolvieron en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi).

Las muestras de las cuales no se pudieron obtener secuencias claras y completas después de tres intentos de PCRs y/o reacciones de secuenciación independientes fueron excluidas de los análisis.

Los productos de PCR de los loci DRB y DQB obtenidos de animales heterocigotos fueron clonados usando QIAGEN PCR Cloning Kit para luego secuenciar los clones con los *primers* universales M13 hasta obtener ambas secuencias.

Análisis de secuencias

Todas las secuencias fueron editadas en BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Las secuencias mitocondriales de zorro chilote fueron comparadas con las obtenidas por Yahnke et al. (1996) y D'elia (2012) alineándolas mediante el programa ClustalX versión 2.0 (Larkin, et al., 2007) para verificar la correspondencia entre ellas. Las secuencias de estos autores fueron excluidas de los análisis filogenéticos por ser menos informativas que las obtenidas en este trabajo (344 y 401 pb respectivamente en contraste con los 599 pb). Se quiso hacer lo mismo con la secuencia descrita por Vilà et al. (2004) pero no pudimos tener acceso a ella una vez solicitada.

Finalmente, todas estas secuencias mitocondriales fueron colapsadas para obtener haplotipos únicos utilizando el programa Collapse versión 1.2 (Posada, 2004).

Las secuencias de zorro culpeo y gris también fueron colapsadas para obtener haplotipos únicos utilizando el mismo programa. Con los haplotipos únicos obtenidos de zorro chilote, culpeo y gris se construyeron árboles filogenéticos.

El programa JModeltest versión 0.1.1 (Posada, 2008) fue utilizado para estimar el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajusta a nuestros datos utilizando *Akaike Information Criterion* (AIC). El modelo seleccionado fue Hasegawa-Kishino-Yano asumiendo una proporción de sitios invariables (HKY+I). Los árboles fueron enraizados con una secuencia ortóloga del zorro de las pampas (*L. gymnocercus*) obtenida en GeneBank (EF107034.1).

Se construyeron árboles filogenéticos utilizando Inferencia Bayesiana y *Maximum Likelihood*. El árbol de análisis bayesiano fue implementado en el programa MrBayes 3.2.1x64 (Ronquist, et al., 2012). Se llevaron a cabo 4 carreras independientes de 4 cadenas (MCMC) con 10 millones de generaciones cada una, comenzando con árboles al azar. Se realizaron muestreos a intervalos de 1.000 generaciones para incluir 10.000 puntos de datos. El 25% de los primeros árboles de la muestra fueron descartados para asegurar la estabilización de la muestra y, el restante, utilizado para calcular un árbol de consenso. La frecuencia de corte fue bajo 0,01, confirmando que el muestreo fue dentro de la distribución de la probabilidad posterior. Se utilizó el programa FigTree versión 1.4.2 (Raumbaut, 2012) para dibujar un árbol consenso.

Maximum Likelihood fue implementada en el programa Mega 7.0 (Kumar, et al., 2015) utilizando el mismo modelo evolutivo dado por JModeltest. El soporte estadístico para los distintos nodos en el árbol filogenético se evaluó con un remuestreo de 1.000 bootstrap (Felsenstein, 1985). Este análisis intenta identificar el árbol que tiene la mayor probabilidad de producirse dadas nuestras secuencias.

Se construyó una red de parsimonia estadística (Templeton, et al., 1992) con las secuencias mitocondriales de todos los individuos. Este método une todos los pares de secuencias que tienen una probabilidad de parsimonia mayor del 0,95. El cladograma fue construido mediante TCS Network (Clement, et al., 2000) en el programa PopArt (Leigh, et al., 2015).

Se utilizó el programa DnaSP v.6 (Rozas, et al., 2017) para el análisis de sitios polimórficos.

Las secuencias de MHC fueron alineadas con ClustalX versión 2.0 (Larkin, et al., 2007). El número de alelos, el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) fueron estimadas con el programa Genepop v1.2 (Raymond & Rousset, 1995).

Genotipado y análisis de microsatélites

Se amplificaron 11 loci microsatélites específicos de zorro chilote denominados Lfu 1B9, Lfu 4D11, Lfu 4E5, Lfu 4F6, Lfu 4K5, Lfu 5D3a, Lfu 5F6, Lfu 5G3C, Lfu 5H4, Lfu 8D5 y Lfu 8D6b, según las condiciones de PCR descritas por Cabello & Dávila (2014).

Los fragmentos se resolvieron por electroforesis capilar junto con el marcador de peso molecular LIZ-500 (Applied Biosystems) en el secuenciador automático ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi).

Los tamaños de los alelos fueron anotados usando Genemapper 3.7 (Applied Biosystems, Inc.) seguido por inspección visual de todos los tamaños de los alelos.

Para el análisis de microsatélites se utilizaron dos poblaciones, Nahuelbuta y Chiloé debido a que las muestras de Gorbea, Oncol y Reserva Costera fueron excluidas de estos análisis por no representar poblaciones. Para comprobar si los marcadores estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el algoritmo de las cadenas de Markov (Guo & Thompson, 1992). Para comprobar la existencia de desequilibrio por ligamiento entre los loci se usó el test exacto. Ambos análisis fueron realizados en el programa Genepop versión 1.2 (Raymond & Rousset, 1995). Los valores de P obtenidos fueron ajustados usando el método de Bonferroni para tomar en cuenta múltiples test sobre los mismos grupos de datos y corregir el posible error tipo I (Rice, 1989). Las frecuencias alélicas por locus en cada población se estimaron con GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006), la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada y el coeficiente de consanguinidad (F_{is}) se calcularon con el programa Arlequín (Schneider & Lischer, 2009). Para tener en cuenta la variación del tamaño de muestra respecto a los

alelos encontrados, se calculó la riqueza alélica (Petit, et al., 1998) para las poblaciones de Chiloé y Nahuelbuta utilizando el programa FSTAT versión 2.9. (Goudet, 2001).

La diferenciación genética entre poblaciones, medidas como valores de F_{st} se calculó en Arlequín (Excoffier & Lischer, 2010) y se comprobó la significancia usando 10.000 permutaciones.

También se realizó un análisis factorial de correspondencias utilizando las frecuencias genotípicas individuales obtenidas con marcadores microsatélites mediante el programa Genetix versión 4.04 (Belkhir, et al., 2004).

Resultados

Variación mitocondrial

Se amplificaron 599 pb de la región control mitocondrial en 99 muestras de zorros, teniendo éxito en el 71% de ellas, siendo las de heces las muestras más complejas de amplificar con solo 9% de éxito.

Identificamos 6 haplotipos de la región control mitocondrial en 99 zorros chilotos. Lfu-Ch fue el único haplotipo en 69 secuencias de zorros muestreados en Chiloé; Lfu-Na, un haplotipo encontrado en 23 secuencias de Nahuelbuta, Lfu-Na2 un haplotipo encontrado en un animal de Nahuelbuta, Lfu-Go fue un haplotipo encontrado en un animal atacado por perros en Gorbea, Lfu-On un único haplotipo encontrado en 2 animales de Oncol y Lfu-Rc un único haplotipo encontrado en 3 animales capturados en la Reserva Costera Valdiviana. Lfu-Ch y Lfu-Na correspondieron con 2 de los 3 haplotipos descritos por Yanhke et al. en 1996 (Dfu-3 y Dfu-2 respectivamente). Como se esperaba, porque la secuencia provino del mismo espécimen, Lfu-Go se correspondió con el haplotipo descrito por D'Elía et al (2013). Las estimas de diversidad mitocondrial se pueden observar en la tabla 18.

13 sitios polimórficos (tabla 19) estaban presentes en los 6 haplotipos, con una diferencia principal entre pares que se aprecian en la tabla 20.

Tabla 18. Estimaciones de diversidad de la región control de ADN mitocondrial.

Población	(ni / nh)	ps	Pi	Hd	k
Chiloé	69/1	0	0	0	0
Continente	30/5	12	0,005	0,409	3,156
Nahuelbuta	24/2	1	0,0001	0,083	0,083
Gorbea	1/1	x	x	X	x
Oncol	2/1	0	0	0	0
Reserva Costera	3/1	0	0	0	0
Total	99/6	13	0,005	0,463	3,370

ni: n° de individuos genotipados, **nh:** n° haplotipos, **ps:** sitios polimórficos, **Hd:** diversidad haplotípica, **Pi:** diversidad nucleotídica, **k:** número promedio de diferencias nucleotídicas.

Tabla 19. Diferenciación nucleotídica entre los haplotipos de región control mitocondrial.

	nt-39	nt-89	nt-108	nt-321	nt-418	nt-421	nt-430	nt-431	nt-438	nt-448	nt-457	nt-517	nt-575
LfuOn	G	T	G	C	G	C	A	T	C	T	C	A	A
LfuCh	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	G
LFuRc	.	.	.	T	.	.	G	.	T	C	.	.	.
LfuNah	A	C	A	.	A	T	.	C	T	.	T	G	.
LfuNah2	A	C	A	.	A	T	.	C	T	.	.	G	.
LfuGo	A	C	A	.	.	T	.	C	T	.	.	.	.

Tabla 20. Matriz de *Pairwise distance* entre haplotipos de zorro chilote.

	LfuOn	LfuNah	LfuNah2	LfuGo	LfuCh	LfuRc
LfuOnc						
LfuNah	0,01527					
LfuNah2	0,01355	0,00167				
LfuGor	0,01013	0,00503	0,00335			
LfuChi	0,00504	0,01354	0,01182	0,00842		
LFuRc	0,00673	0,01873	0,01699	0,01355	0,00842	

La mayor diferencia entre pares de bases se observa entre LfuRc y LfuNah con 1,87% y la menor diferencia entre LfuNah y LfuNah2 (0,16%). Se observa además que el haplotipo de Chiloé se diferencia más de los haplotipos de Nahuelbuta (1,35% y 1,11%) mientras que se asemeja más al haplotipo de Oncol (0,50%). Del mismo modo destaca que el haplotipo de Oncol tenga menor diferencia de pares de bases con Chiloé que con los demás haplotipos continentales.

La diversidad de la región control fue muy baja mostrando 1 haplotipo diferente por cada 16,5 individuos, sin embargo, si observamos esta medida sólo en los individuos continentales obtenemos 1 haplotipo por cada 6 individuos.

Además, identificamos 7 haplotipos con 9 sitios polimórficos en 14 secuencias de zorros culpeo y 11 haplotipos con 33 sitios polimórficos de 23 secuencias de zorros de chilla (accesiones GeneBank KJ866885 a KJ866903).

El número medio de diferencia de nucleótidos en los haplotipos de zorro chilote fue de 3,37, en los haplotipos de zorro culpeo fue de 3,7 y en los haplotipos de zorro de chilla fue de 11,49. Por otro lado, las diversidades de nucleótidos (P_i) fueron 0,005, 0,006 y 0,019 respectivamente.

Los árboles consensos obtenidos tanto por *Maximum Likelihood* como por el método bayesiano presentaron una topología similar (figura 18). Los haplotipos del zorro chilote formaron un grupo monofilético separado del otro grupo formado por los haplotipos de culpeo y chilla que difieren claramente entre ellos. Por su parte los haplotipos de Nahuelbuta se agrupan estrechamente, junto a la secuencia de Gorbea, sin embargo, no se aprecia un buen soporte en la agrupación de los demás haplotipos, mostrando el haplotipo de Chiloé, una posición intermedia entre Nahuelbuta-Gorbea y Reserva Costera-Oncol al igual que lo muestra la red de haplotipos de la figura 19. En la figura 20, se puede observar el árbol de las secuencias de zorros con la distribución geográfica de las mismas.

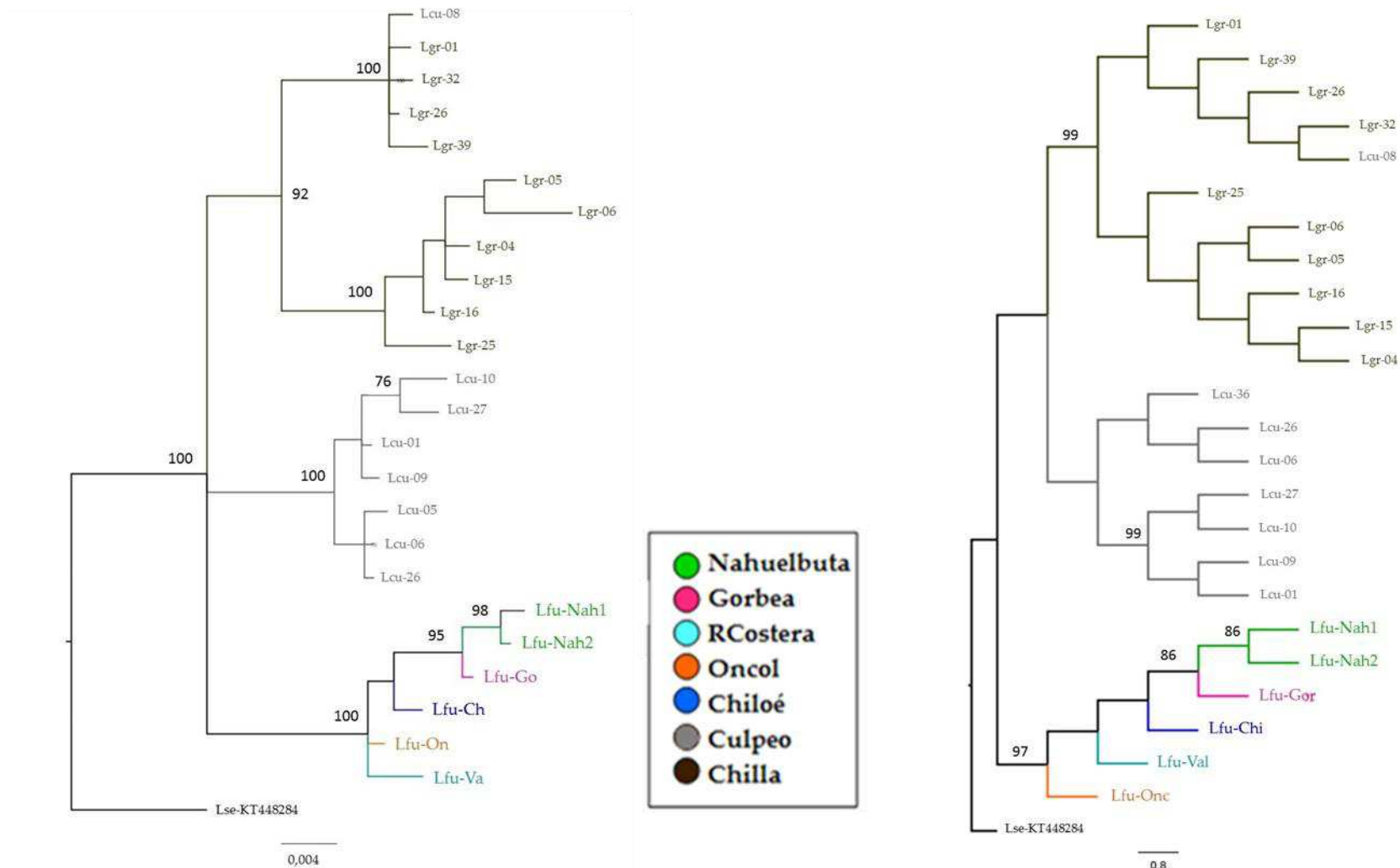


Figura 18. Árbol consenso construido por los métodos bayesiano (A) y *Maximum Likelihood* (B) para la región control mitocondrial (599 pb). Los valores de probabilidad posterior y bootstrap aparecen indicados. El árbol está orientado con una secuencia de *Lycalopex sechurae* (GB KT448284).

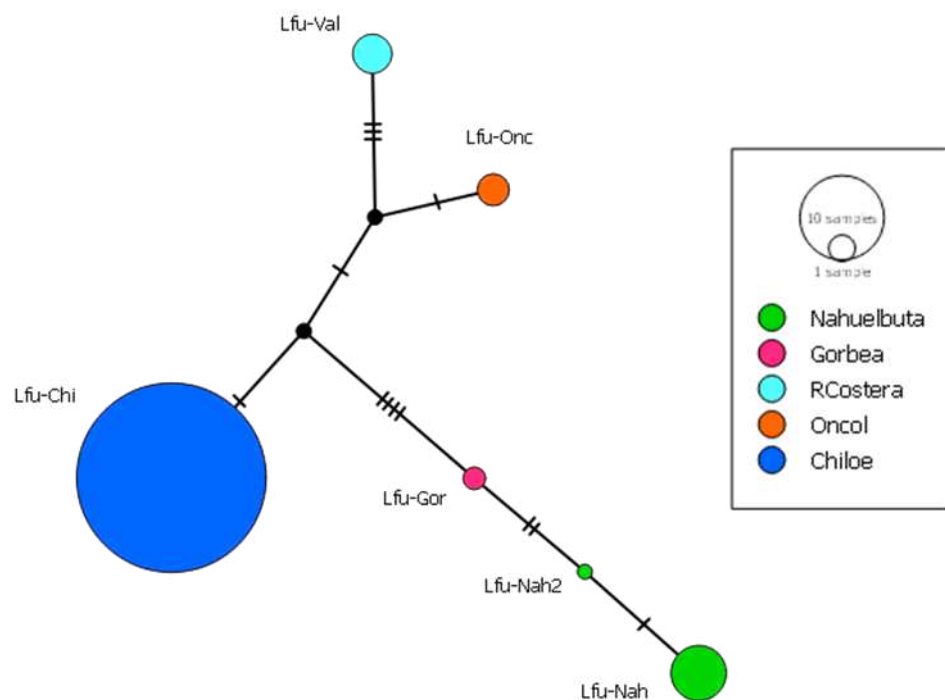


Figura 19. Red construida con TCS en PopArt utilizando 99 secuencias de región control mitocondrial, de zorro chilote. Los sitios de mutación aparecen indicados.

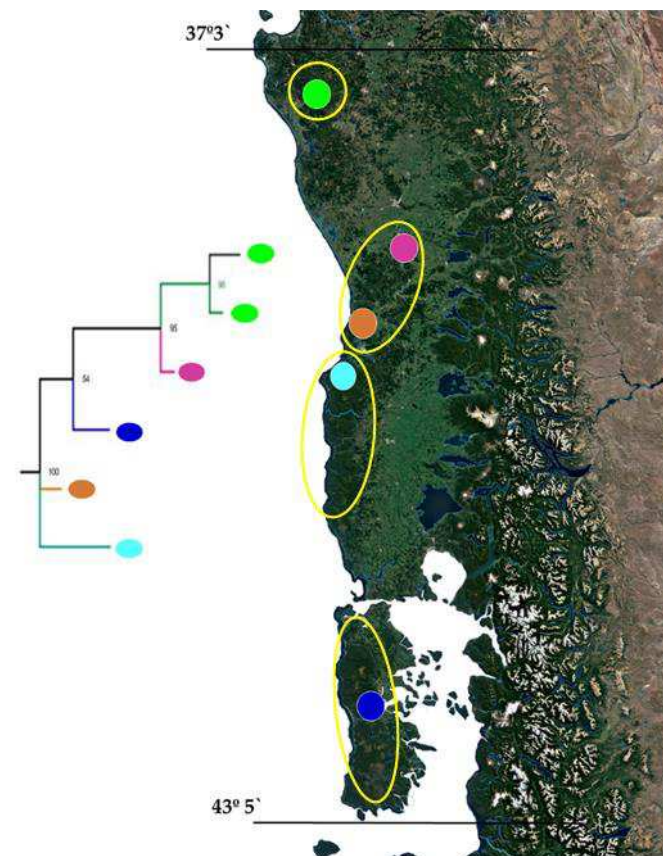


Figura 20. Árbol construido por el método bayesiano de la figura 18 y su representación en el área de distribución. En amarillo las poblaciones sugeridas.

Variación de MHC

Se secuenciaron 243 pb del locus DRB y 200 pb del DQB. Encontramos una variación extremadamente baja de loci MHC en 99 zorros de Darwin. El locus DRB mostró solo 2 alelos (Lfu-DRB01 y Lfu-DRB02) en ambas poblaciones estudiadas, Chiloé y Nahuelbuta. Estos dos alelos fueron los mismos encontrados en las demás muestras continentales. El 93,4% de todos los zorros presentó el alelo Lfu-DRB01, siendo homocigotos con el alelo Lfu-DRB02 solo 4 individuos de Nahuelbuta. Las frecuencias de los alelos del gen DRB del MHC se aprecian tabla 21.

Los dos alelos DRB variaron en 10 sitios polimórficos (P_i : 0,04132) a través de 80 codones, con 4 sustituciones en la primera posición del codón, 4 en la segunda posición del codón y 2 en la tercera posición del codón. Hubo un alto nivel de sustituciones no sinónimas (8) que llevaron 6 diferencias de aminoácidos entre ambos alelos. El locus DQB fue monomórfico, con una diferencia de nucleótidos de 26 y 30 con respecto a Lfu-DRB01 y Lfu-DRB02, respectivamente. No hubo mutaciones de cambio en el marco de lectura ni codones de paradas, lo que indica que no amplificamos pseudogenes sino los genes funcionales. Las secuencias de los alelos DRB y DQB se compararon con sus homólogos de otros cánidos depositados en GeneBank para confirmar su correspondencia con los loci estudiados. Los tres alelos son nuevos entre los cánidos.

Los zorros de Chiloé fueron más homocigotos que los Nahuelbuta, con un 68% y un 45%, respectivamente (tabla 21). Las secuencias de zorros chilote se almacenan en GeneBank con los números de acceso KM880155 (Lfu-DR01), KM880156 (Lfu-DR02) y KM880157 (Lfu-DQB). Debemos mencionar que los *primers* DQB-F / DQB-R para amplificar el locus DQB también amplificaron Lfu-DRB en 8 de las 51 muestras analizadas. Esta falta de especificidad ocasional de este par de *primers* también se encontró en zorros árticos de las Islas Commander (Ploshnitsa, et al., 2012)

Tabla 21. Frecuencia de los alelos DRB del MHC clase II en zorro chilote.

	Chiloé n=37	Nahuelbuta n=18	Gorbea n=1	Oncol n=2	R. Costera n=3
Lfu-DRB01	37 (1)	14 (0,77)	1 (1)	2 (1)	3 (1)
Lfu-DRB02	12 (0,32)	14 (0,77)	0	2 (1)	2 (0,66)
Hom	25 (0,68)	8(0,45)	1	0	1 (0,33)
Ho	0,32432	0,5882			
He	0,27545	0,5133			

Hom: número de animales homocigotos, Ho: y He: heterocigosidad observada y esperada.

Variación microsatélite

Hemos genotipado 63 individuos con 11 loci microsatélites y el locus DRB del MHC. Considerando un locus como polimórfico cuando la frecuencia de su alelo más común no excede 0,95, 3 loci fueron monomórficos en Chiloé (Lfu 1B9, Lfu 5G3c y Lfu 8D6b) y otros 2 en Nahuelbuta (Lfu 5H4 y Lfu 8D6b). Se observó que todos los loci estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones (Chiloé y Nahuelbuta) y no hubo desequilibrio por ligamiento. Encontramos 50 alelos en el zorro chilote con 1 a 7 alelos por locus. La población de Chiloé tuvo 7 alelos exclusivos (26,9%), 8 en Nahuelbuta (22,8%), 1 en 3 muestras de la Reserva Costera Valdiviana, 3 en 2 muestras de Oncol y 1 en una sola muestra de Gorbea. Además, un alelo fue compartido sólo entre Oncol y Gorbea (tabla 22). La riqueza de alelos fue mayor en Nahuelbuta (3,090) que en Chiloé (2,129). El Ho por locus varió de 0,051 a 0,526 en Chiloé y de 0,0 a 0,823 en Nahuelbuta con un valor promedio de 0,284 y 0,530 respectivamente. Los coeficientes de consanguinidad fueron positivos en 7 de 11 loci en Chiloé y en 5 de 9 loci en Nahuelbuta, además de los valores medios también fueron positivos, lo que podría sugerir efectos de endogamia en ambas poblaciones. La diferenciación genética (F_{st}) entre las poblaciones de Chiloé y Nahuelbuta fue alta (0,448).

La frecuencia de los alelos microsatélites por poblaciones se aprecian en la tabla 23.

Tabla 22. Variación de microsatélites en zorros de Darwin.

Locus	Population	n	Na	Alleles range	r	Ho	He	Fis
Lfu 1B9	Chiloé	39	2	(1) 173-175	1,558	0,051	0,05	-0,013
	Nahuelbuta	18	4	(1) 169-177	4	0,500	0,58	0,148
	R. Costera	3	2	169-171				
	Oncol	2	x					
	Gorbea	1	2	169-175				
Lfu 4D11	Chiloé	39	4	(2) 102-112	2,853	0,128	0,192	0,338
	Nahuelbuta	18	3	(2) 100-114	3	0,388	0,407	0,048
	R. Costera	3	2	102-106				
	Oncol	2	1	102				
	Gorbea	1	2	(1) 98-102				
Lfu 4E5	Chiloé	39	2	159-161	1,81	0,051	0,098	0,483
	Nahuelbuta	18	3	(1) 159-167	3	0,777	0,607	-0,290
	R. Costera	3	1	161				
	Oncol	2	3	(1*) 159-163				
	Gorbea	1	2	(1*) 159-163				
Lfu 4F6	Chiloé	38	2	288-296	2	0,474	0,437	-0,083
	Nahuelbuta	18	3	288-296	2	0,388	0,493	0,217
	R. Costera	3	3	288-296				
	Oncol	2	2	(1) 296-300				
	Gorbea	1	1	296				
Lfu 4K5	Chiloé	39	3	125-131	2,942	0,384	0,385	0,002
	Nahuelbuta	18	3	125-131	3	0,388	0,560	0,312
	R. Costera	3	1	125				
	Oncol	2	1	128				
	Gorbea	1	1	125				
Lfu 5D3a	Chiloé	39	2	112-114	2	0,462	0,386	-0,198
	Nahuelbuta	18	3	(1) 112-122	3	0,111	0,109	-0,015
	R. Costera	3	3	110-114				
	Oncol	2	2	(1) 112-116				
	Gorbea	1	2	(1) 110-112				
Lfu 5F6	Chiloé	38	3	(1) 199-207	2,998	0,526	0,635	0,174
	Nahuelbuta	18	6	(2) 201-213	6	0,722	0,760	0,052
	R. Costera	3	3	201-205				
	Oncol	2	2	203-205				
	Gorbea	1	2	203-205				
Lfu 5G3c	Chiloé	39	2	(1) 92-98	1,558	0,051	0,05	-0,013
	Nahuelbuta	18	4	96-102	4	0,823	0,718	-0,0152
	R. Costera	3	2	96-98				
	Oncol	2	2	100-102				
	Gorbea	1	1	100				
Lfu 5H4	Chiloé	37	2	(1) 171-173	2	0,514	0,563	-0,250

	Nahuelbuta	18	1		171	1	0	0	NA
	R. Costera	3	2	(1)	165-171				
	Oncol	2	2	(1)	171-177				
	Gorbea	1	1		171				
Lfu 8D5	Chiloé	39	2		109-113	2	0,436	0,441	0,012
	Nahuelbuta	18	4	(1)	109-115	4	0,611	0,598	-0,022
	R. Costera	3	2		109-111				
	Oncol	2	3		109-113				
	Gorbea	1	1		111				
Lfu 8D6B	Chiloé	39	2	(1)	116-118	1,71	0,026	0,075	0,661
	Nahuelbuta	18	1		118	1	0	0	NA
	R. Costera	3	1		118				
	Oncol	2	1		118				
	Gorbea	1	1		118				

Na: número de alelos por locus (entre paréntesis los alelos exclusivos); r: riqueza alélica, Ho y He, heterocigosidad observada y esperada; Fis: coeficiente de consanguinidad. * alelo compartido sólo entre gorbea y Oncol.

Tabla 23. Frecuencia de alelos microsatélites.

Locus/ alelos	Chiloé	Nahuelbuta	R. Costera	Oncol	Gorbea
1B9	n=39	n=18	n=3	n=0	n=1
169	0	0,61	0,027	0	0,5
171	0	0,17	0,83	0	0
173	0,97	0	0	0	0
175	0,03	0,06	0	0	0,5
177	0	0,16	0	0	0
4D11	n=39	n=18	n=3	n=2	n=1
98	0	0	0	0	0,5
100	0	0,19	0	0	0
102	0,9	0,75	0,5	1	0,5
106	0,01	0	0,5	0	0
110	0,04	0	0	0	0
112	0,05	0	0	0	0
114	0	0,06	0	0	0
4E5	n=39	n=18	n=3	n=2	n=1
159	0,05	0,56	0	0,25	0,5
161	0,95	0,25	1	0,5	0
163	0	0	0	0,25	0,5
167	0	0,19	0	0	0
4F6	n=38	n=18	n=3	n=2	n=1
288	0,68	0,64	0,5	0	0
292	0,32	0,03	0,33	0	0

	296	0	0,33	0,17	0,75	1
	300	0	0	0	0,25	0
4K5		n=39	n=18	n=3	n=2	n=1
	125	0,09	0,46	1	0	1
	128	0,14	0,35	0	1	0
	131	0,77	0,19	0	0	0
5D3a		n=39	n=18	n=3	n=2	n=1
	110	0	0	0,17	0	0,5
	112	0,26	0,94	0,66	0,25	0,5
	114	0,74	0,03	0,17	0	0
	116	0	0	0	0,75	0
	122	0	0,03	0	0	0
5F6		n=39	n=18	n=3	n=2	n=1
	199	0,41	0	0	0	0
	201	0	0,11	0,17	0	0
	203	0,42	0,42	0,5	0,75	0,5
	205	0	0,11	0,33	0,25	0,5
	207	0,17	0,03	0	0	0
	209	0	0,22	0	0	0
	213	0	0,11	0	0	0
5G3c		n=39	n=17	n=3	n=2	n=1
	92	0,03	0	0	0	0
	96	0	0,26	0,83	0	0
	98	0,97	0,06	0,17	0	0
	100	0	0,35	0	0,5	1
	102	0	0,33	0	0,5	0
5H4		n=37	n=18	n=3	n=2	n=1
	165	0	0	0,17	0	0
	171	0,72	1	0,83	1	1
	173	0,28	0	0	0	0
8D5		n=37	n=18	n=3	n=2	n=1
	109	0,68	0,03	0,33	0,25	0
	111	0	0,58	0,66	0,5	1
	113	0,32	0,22	0	0,25	0
	115	0	0,17	0	0	0
8D6b		n=37	n=18	n=3	n=2	n=1
	116	0,04	0	0	0	0
	118	0,96	1	1	1	1

El análisis factorial de correspondencia separó a los individuos estudiados en cuatro grupos correspondientes a los individuos de Chiloé, Nahuelbuta, R. Costera y Oncol, notando la gran distancia de los grupos continentales con los de Chiloé (figura 21). La muestra de Gorbea aparece en una posición intermedia entre Nahuelbuta y Oncol.

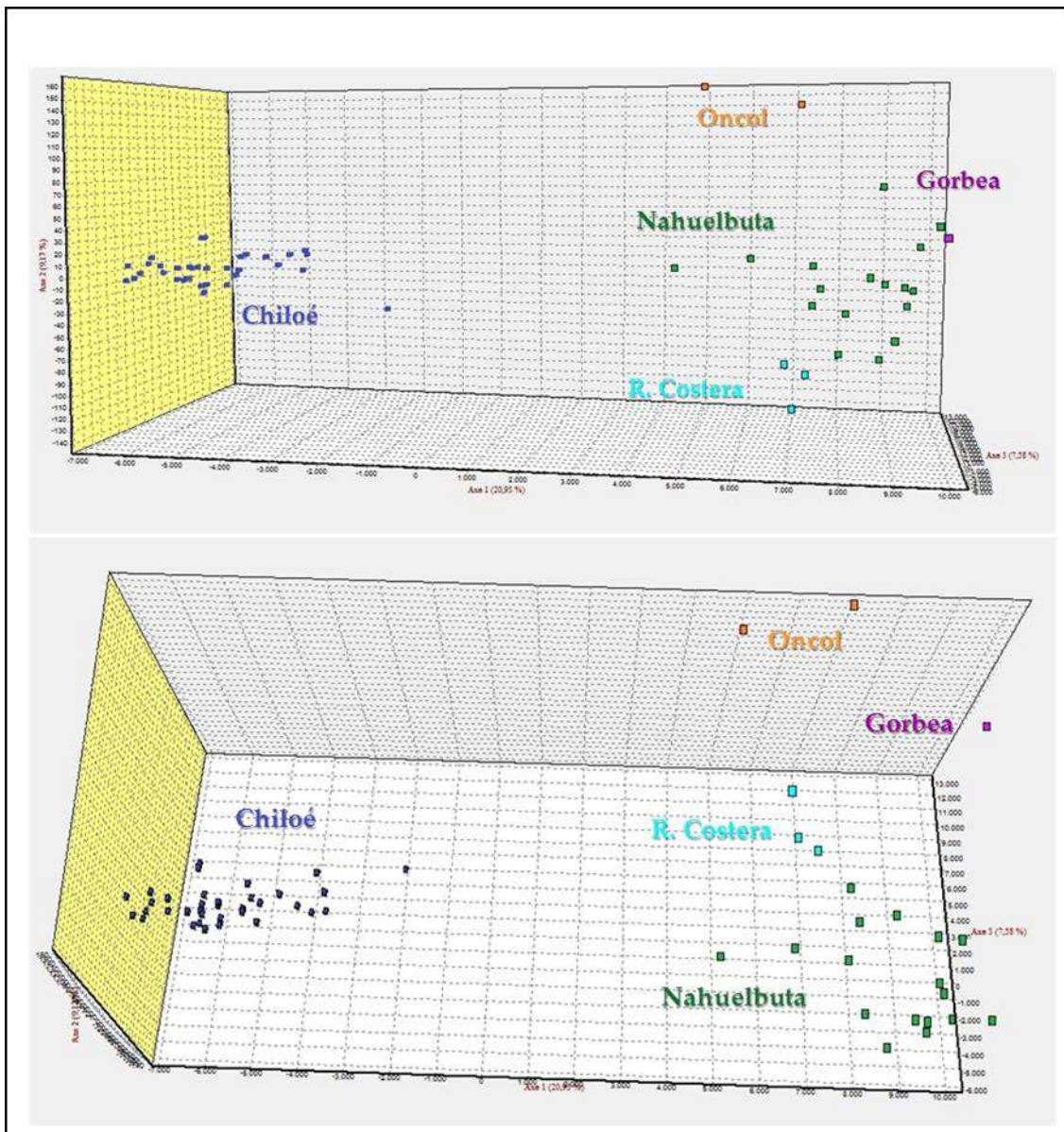


Figura 21. Gráficos resultantes del análisis factorial de correspondencia para 11 loci microsatélite.

Discusión

Región Control Mitocondrial

Se encontraron 6 haplotipos de la región control mitocondrial en el zorro chilote (Lfu-Ch, Lfu-Na, Lfu-Na2, Lfu-Go, Lfu-On y Lfu-Rc) agrupados en un clado monofilético. Estos haplotipos corresponden a 5 regiones geográficas muestreadas: Chiloé, Nahuelbuta, Gorbea, Oncol y Reserva Costera Valdiviana.

Yanhke et al. (1996) identificaron un haplotipo (Dfu3) de este segmento mitocondrial en dos muestras de Chiloé y dos haplotipos (Dfu1 y Dfu2) en dos muestras de Nahuelbuta. Lfu-Ch corresponde con Dfu3 y Lfu-Na con Dfu2. Lfu-Na2 es un nuevo haplotipo para esta población. Por otro lado, a pesar del mayor esfuerzo de muestreo (18-28% de la población total estimada) no se encontró el otro haplotipo (Dfu1) descrito en Nahuelbuta por Yanhke et al. Realizamos un estudio más profundo de este haplotipo que difiere en una única base de nucleótidos (A / C) respecto a LfuNa (Dfu2). Pudimos comparar Dfu1 y Dfu2 con nuestras secuencias y varias secuencias de otros zorros del género *Lycalopex* además de otros cánidos (*L. griseus* y *L. culpaeus* (de este estudio), *L. vetulus* (EF107032.1), *L. gymnocercus* (EF107036.1), *Canis lupus* (JN182113.1) y *Canis latrans* (DQ480511.1)) observando que la única posición de polimorfismo entre Dfu1 y Dfu2 (A / C) es conservada en todos los cánidos analizados (C), excepto el haplotipo de Nahuelbuta informado por Yanhke et al. en 1996 y que no pudimos encontrar. O este haplotipo es producto de un error de secuenciación o puede haber desaparecido de la población por deriva genética.

Si bien hemos encontrado más haplotipos en los zorros continentales (Lfu-Nha2, Lfu-On, Lfu-Rc) de los descritos hasta ahora y, aunque hay varios datos de una distribución más continua del zorro chilote a lo largo de los fragmentos de bosque nativo desde la Araucanía hasta la Isla de Chiloé (Farías, et al., 2014; Silva-Rodríguez, et al., 2018; Escobar, et al., 2018), aún no podemos determinar cuántas poblaciones podrían existir. Si bien Lfu-Go se agrupa con los haplotipos de Nahuelbuta, es cierto que este haplotipo fue encontrado en un zorro muerto en una zona distanciada de cerca de 170 km de los animales de la cordillera de Nahuelbuta donde, además, existe un área desprovista de bosque nativo de unos 70 km en la que existe agricultura y ganadería, con lo cual en la actualidad parece poco probable que este zorro haya provenido de Nahuelbuta. Sumado a esto, Lfu-Go tampoco fue encontrado en las muestras de Nahuelbuta.

Por otro lado, Gorbea está a solo 50 km de Chanchán, donde Vilà et al. (2004) encontraron un haplotipo diferente a los descritos por Yanhke et al. (1994) y, a su vez, Oncol está a solo 22 km de Chanchán, donde existe relativa continuidad de bosque

nativo entre estos tres sectores. Se considera más probable que el zorro de Gorbea provenga desde esta área pudiendo existir una población que abarcaría desde Gorbea a Oncol en el área cubierta por bosque nativo, existiendo al menos dos haplotipos: Lfu-Go y Lfu-On. El haplotipo descrito por Vilà et al. (2004) no está disponible en GeneBank y, aunque fue solicitado al autor, no se tuvo acceso a él, con lo cual podría ser otro haplotipo o bien uno de los descritos en este trabajo.

El haplotipo de la Reserva Costera Valdiviana Lfu-Rc fue único en tres animales capturados y podría representar a otra población. Si bien solo hay 40 km de distancia con el Parque Oncol, este sector está separado por una serie de ríos, zonas urbanas y terrenos agropecuarios representando una barrera importante para la conectividad poblacional. Sin embargo, hacia el sur existe un continuo de bosque nativo que alcanza prácticamente hasta Maullín y el canal de Chacao, donde nace la Isla de Chiloé. De esta manera, podría existir otra población desde la Reserva Costera Valdiviana, en la zona de bosque nativo que corresponde a la cordillera de la costa, hasta Maullín donde hubo un registro de zorro chilote por fototrampeo (Silva-Rodríguez, et al., 2018). Así, podrían existir 4 poblaciones genéticamente diferenciadas, Chiloé, Nahuelbuta, Oncol-Gorbea y Reserva Costera-Maullín.

Es aún incierto el número de individuos que podrían vivir en estas poblaciones, aunque existen estimaciones que van entre los 227 y 489 individuos maduros en el continente (Silva-Rodríguez, et al., 2016). Estos estarían divididos en al menos tres poblaciones, posiblemente aisladas entre sí. Se ha realizado un gran esfuerzo de captura en la Reserva Costera Valdiviana y en el Parque Oncol y solo se han capturado 3 y 2 individuos respectivamente. En 1996 Vila et al (2004) realizaron un estudio en el área comprendida entre Nahuelbuta y Chiloé, no encontrando ningún tipo de registros, salvo una piel en Punta Chanchan. Del mismo modo, Silva-Rodríguez et al. (2018) realizaron un estudio con 8.309 días de cámaras trampa ubicadas también entre Nahuelbuta y Chiloé, reportando los mismos sitios registrados previamente por Farías et al. (2014) en la Reserva Costera Valdiviana además de un registro en Maullín. De esta manera no existen registros de la presencia de zorro chilote entre Río Bueno y Maullín, lo cual indica que, de existir, sus densidades deben ser muy bajas. Aun así, estos individuos podrían

albergar nuevos haplotipos mitocondriales los que, presumiblemente, reagruparían los haplotipos en el filograma, que hoy ubican a Lfu-Ch entre Lfu-Nah/Lfu-Go y Lfu-Rc/Lfu-On.

En Chiloé se estiman un mínimo de 412 individuos maduros (Silva-Rodríguez, et al., 2016). Aquí, hemos podido registrar la presencia del zorro por foto trampeo y capturas de animales prácticamente en todos los sitios muestreados donde hay bosque nativo, exceptuando la Isla San Pedro al sur de la Isla Grande, donde Charles Darwin registró el primer zorro chilote para la ciencia en 1834. Es necesario considerar que solo muestreamos una pequeña parte de la isla.

Los únicos 6 haplotipos encontrados denotan una muy baja variabilidad haplotípica en comparación con los encontrados en los pocos culpeos (7/14) y chillas (11/23) analizados en este estudio y, con los 10 haplotipos encontrados en 66 animales de 11 poblaciones de uno de los cánidos más amenazado del mundo, *Canis simensis* (Gotelli, et al., 2004).

Si bien la población parece ser abundante en Chiloé, el hecho de existir un solo haplotipo en 69 animales muestreados muestra una nula variabilidad pudiendo haber experimentado una pérdida genética, en relación a las poblaciones continentales, por el asilamiento (Vilà, et al., 2004) o bien corresponder a un cuello de botella o efecto fundador.

Suponiendo el mismo 10% de tasa de divergencia por millones de años para región control mitocondrial utilizado por Vilà et al. (1999) en otros cánidos y una divergencia del 0,94% entre los haplotipos de zorro chilote continentales y el de Chiloé, el tiempo de coalescencia entre ellos fue de aproximadamente 94.000 años. Esto sugiere que el zorro chilote entró y se extendió a través de la isla de Chiloé en el último período interglaciar, entre la Última Glaciación Patagónica Austral (180.000 años atrás) y el UMG (26.000 – 17.500 años atrás). Luego, con el avance de las capas de hielo en el UMG, los zorros deberían haberse refugiado en el noroeste de la isla de Chiloé como muchas otras especies (Heusser, 1972; Villagrán, 1995; Sérsic, et al., 2011). De este modo, después de la retirada de la capa de hielo, el zorro chilote pudo recolonizar la isla de Chiloé.

Con respecto a las otras especies de zorros chilenos, el análisis filogenético mostró que los zorros culpeo y chilla son dos clados monofiléticos claramente separados, al contrario de lo que reportaron Yahnke et al. (1996) y Vilà et al. (2004). Si bien, en nuestro análisis, un haplotipo de culpeo Pcu-8 (dos individuos) se agrupó con el clado de chilla, asumimos que esta secuencia pertenecía al zorro de chilla debido a que la divergencia entre las secuencias de Pcu-8 y culpeo era de 3,4%, un porcentaje similar al que encontramos cuando analizamos la divergencia entre chilla y culpeo (3,1%) y, la divergencia entre Pcu -8 y las secuencias de chilla (1,85%) fue el mismo valor encontrado al analizar la divergencia dentro de las secuencias de chilla (1,9%). Además, nuestro análisis de microsatélites agrupó a los dos individuos de Pcu-8 con los de chilla. Este error de asignación probablemente se debió a una identificación errónea de la especie. Aunque el zorro culpeo suele ser el zorro más grande de Chile, la variación de tamaño dentro de los zorros de chilla y culpeo es tan extrema en algunas áreas que estas dos especies son difíciles de distinguir (Fuentes & Jaksic, 1979). Este hecho también es reportado por muchos especialistas en especies silvestre en Chile, comentando que algunos cachorros o juveniles a veces son indistinguibles. Así, la ausencia de monofilia de zorros culpeo y chilla encontrada por Yahnke et al. (1996) y Vilà et al. (2004) podría deberse a un error en la identificación de los individuos y no a una reciente separación evolutiva de ambas especies con un tiempo no suficiente para alcanzar la monofilia recíproca o la introgresión por hibridación, como lo discutió Yahnke et al. (1996).

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

El MHC es uno de los sistemas genéticos más importantes para la resistencia a enfermedades infecciosas en vertebrados. Los genes de MHC tienden a mostrar una gran diversidad alélica, una gran persistencia de los alelos en el tiempo y una alta heterocigosidad (Klein, et al., 1993). Nuestros datos muestran que el zorro chilote es genéticamente muy pobre en los dos loci MHC estudiados. Encontramos una ligera variación del locus DRB en las dos poblaciones siendo el locus DQB monomórfico. Resultados opuestos a los reportados en otros cánidos que han presentado cuellos de botella en sus poblaciones: Niskanen et al. (2014) encontraron 11 alelos DRB y 9 DQB en la población de lobos finlandeses, que fueron conducidos cerca de la extinción y tienen un flujo genético limitado de las poblaciones vecinas, como también es el caso de los

lobos italianos, donde Galaverni et al. (2013) encontraron 9 alelos DRB y 8 DQB; Marsden et al. (2009) describieron 17 alelos del locus DRB y 2 de DQB en perros salvajes africanos (*Lycaon pictus*); y Kennedy et al. (2011) encontraron 4 alelos DRB y 5 DQB en la mayor población de lobos etíopes (*Canis simensi*).

Por otro lado, el monomorfismo del locus DQB ha sido descrito anteriormente por Aguilar et al. (2004) en el zorro de la isla de California San Nicolás (*Urocyon littoralis dickeyi*) y en una población de la isla de Medyi de zorro ártico (*Vulpes lagopus*), que también fue monomórfico para los loci DRB y DQB (Ploshnitsa, et al., 2012).

Los genes del MHC son los más polimórficos en vertebrados. Se cree que alguna forma de equilibrio por selección impuesta por agentes patógenos mantiene el polimorfismo en los loci MHC (Hedrick y Kim 2000), sin embargo, la deriva genética en poblaciones que han sufrido severos cuellos de botella puede superar los efectos del equilibrio por selección (Allendorf y Luikart 2007; Miller y Lambert 2004).

Los mismos alelos de MHC se comparten entre las poblaciones de zorro chilote de la Isla y el continente, lo que podría indicar que la especie sufrió un cuello de botella antes de que zorros de Chiloé y el continente se desconectarán. Esto sugiere que el zorro chilote ha estado lidiando con los escasos alelos desde hace varios miles de años hasta el presente. Similar a lo ocurrido en el tritón crestado (*Triturus cristatus*) que tiene tres poblaciones distanciadas geográficamente y que comparten los mismos dos alelos MHC, proponiendo que los alelos pudieron haberse mantenido por equilibrio de selección por miles de años desde su expansión (Babik, et al., 2009).

Si bien una reducción en la variación de MHC está asociada a una alta susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Paterson, et al., 1998; Hedrick & Kim, 2000; Lachish, et al., 2007), casi la totalidad de nuestros zorros muestreados se encontraron clínicamente sanos, salvo una hembra vieja que presentó un estado caquéctico presumiblemente por la no de ingesta de alimento debido a la falta de dientes. Hay una serie de especies que han experimentado cuellos de botella extremos y que también muestran disminución en alelos MHC como el panda (*Ailuropoda melanoleuca* (Zhu, et al., 2007)), la cabra montesa canadiense (*Oreamnos americanus* (Mainguy, et al., 2007)), el

castor escandinavo (*Castor fiber* (Ellegren, et al., 1993)) y el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris* (Weber, et al., 2004)) entre otros, pero que sus poblaciones sobreviven e incluso aumentan en número, representando ejemplos raros de supervivencia (Ellegren, et al., 1993; Mainguy, et al., 2007; Babik, et al., 2009). Otras, por el contrario, son particularmente susceptibles a agentes infecciosos (Radwan, et al., 2010) u otras patologías, como el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*) donde la diseminación de un tumor mortal transmisible, es aparentemente facilitada por una variación muy baja en el MHC I (Siddle, et al., 2007).

El guepardo (*Acinonyx jubatus jubatus*) ha sido considerado un paradigma de vulnerabilidad a enfermedades asociada con baja diversidad genética, particularmente de genes MHC (Castro-Prieto, et al., 2011) debido a la alta mortalidad ocurrida por peritonitis infecciosa felina (O'Brien, et al., 1985). Si bien en comparación con otras especies de mamíferos, los guepardos muestran bajos niveles de diversidad de MHC, esto no parece influir en su inmunocompetencia (Castro-Prieto, et al., 2011), donde la susceptibilidad a infecciones se ha presentado solo en cautividad (Evermann, et al., 1988; Heeney, et al., 1990), atribuyéndose a las desfavorables condiciones de manejo (Caro & Laurenson, 1994; Merola, 1994). El zorro chilote presentó menos alelos y menor diversidad nucleotídica en el MHC II-DRB que todos los mamíferos analizados en el estudio de Castro-Prieto et al (2011), incluido el guepardo, no pudiendo descartar que los niveles de variación de MHC observados puedan limitar la inmunocompetencia ante el caso de nuevas enfermedades o aquellas a las cuales los zorros no han sido expuestos.

Variación microsatélite

La diversidad genética encontrada en el zorro chilote a través del análisis de microsatélites también mostró ser muy baja en ambas poblaciones, siendo más baja en la Isla de Chiloé que en Nahuelbuta, a pesar de su aparente mayor tamaño poblacional. La diversidad genética del zorro chilote se agota de manera similar a la de otros carnívoros en peligro de extinción. Un buen ejemplo de comparación es el caso del lince ibérico (*Lynx pardinus*), que con solo dos poblaciones restantes y una heterocigosidad observada promedio de 0,387 y un número promedio de alelos de 3,75 por locus (Casas-Marce et al. 2013) muestra mayor diversidad que la población de zorro chilote de Chiloé y similar

a la de Nahuelbuta. Si comparamos con el lobo etíope, uno de los cánidos más amenazados del mundo, el número de alelos encontrados en el zorro chilote es similar al encontrado en las poblaciones de lobos tomadas separadamente, siendo el H_o promedio menor en el zorro.

El alto porcentaje de alelos únicos encontrados en ambas poblaciones de zorro chilote indica que han estado aisladas, como ha ocurrido en otras poblaciones (Gottelli, et al., 2012). Esto no es sorpresa para ninguna de las dos poblaciones, considerando que la población insular se aisló con la separación de la isla de Chiloé y el continente en el UMG y la población de Nahuelbuta ha estado aislada debido a las grandes extensiones de monocultivos de pino, eucaliptus y zonas agropecuarias.

Bajo una restricción en el flujo genético, las poblaciones pueden tener alelos únicos alcanzados a través de la deriva genética (Gottelli, et al., 2012). Los cambios en la diversidad alélica ocurren rápidamente en poblaciones pequeñas y el aislamiento causa gran diferenciación entre poblaciones (Storz, et al., 2002). La diferenciación genética entre las poblaciones de Chiloé y Nahuelbuta, medida por el estadístico F_{st} es alta, estando dentro de lo esperable debido a que no existe flujo genético entre ellas desde hace miles de años.

Por otro lado, tanto los individuos de la R. Costera, como los de Gorbea y Oncol presentaron alelos exclusivos (1, 1 y 3 respectivamente), lo que refuerza la idea de nuevas poblaciones continentales, las cuales estarían aisladas, no existiendo flujo genético entre ellas. Esta idea también se ve reforzada por el análisis factorial de correspondencia que los agrupa de manera separada. Aunque Gorbea no se agrupa estrechamente con Oncol, comparten un alelo exclusivo, lo que también podría reforzar la idea que pertenecen a la misma población.

La escasa variabilidad genética encontrada en el zorro chilote nos hace pensar en una menor capacidad de reacción ante la estocasticidad, como la introducción del virus del distemper que puede causar reducciones catastróficas como las sospechadas en *Urocyon littoralis catalinae* (Timm, et al., 2009) o la sarna, que también ha causado una severa reducción poblacional en zorros árticos (Ploshnitsa, et al., 2011), ambas

enfermedades transmitidas por perros. Esto podría llevar a una mayor reducción de la diversidad genética, con una mayor susceptibilidad a infecciones y con una esperada pérdida de la eficacia biológica (O'Brien & Evermann, 1988; Hughes, 1991; Hedrick, 2001) pudiendo entrar la especie en un vórtex de extinción.

ESTUDIO DE AGENTES INFECCIOSOS EN ZORRO DE DARWIN: ALTA PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE MYCOPLASMA HEMOTRÓFICO

Veterinary Microbiology 167 (2013) 448–454



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas



Javier Cabello^{a,b}, Laura Altet^c, Constanza Napolitano^d, Natalia Sastre^e, Ezequiel Hidalgo^f, José Antonio Dávila^a, Javier Millán^{g,*}

^a Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (UCLM, CSIC, JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain

^b Centro de Conservación de la Biodiversidad, Chiloe-Silvestre, Las Américas 1060, Ancud, Chiloe, Chile

^c Vetgenomics, Edifici Eureka, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Spain

^d Laboratorio de Ecología Molecular & Instituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^e SVGM, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^f Conservation and Research Department (CIBZ), Parque Zoológico Buin Zoo, Panamericana Sur Km 32, Buin, Chile

^g Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS) (Wildlife Diseases Research Group), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2013

Received in revised form 25 September 2013

Accepted 29 September 2013

Keywords:

Canidae

Hemoplasma

Hemobartonella

Pseudalopex fulvipes

South America

* Corresponding author at: Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra (Spain) Tel.: +34 935861090; fax: +34 935812006.
E-mail address: syngamustrachea@hotmail.com (J. Millán).

0378-1135/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.034>

Introducción

El zorro de Darwin (*Lycalopex fulvipes*) es un raro miembro de la familia de los cánidos, endémicos de Chile. Está clasificado como “En Peligro Crítico” por la UICN, con un tamaño poblacional que se calculó en menos de 250 adultos totales (Jiménez et al., 2008). Tiene una distribución con dos subpoblaciones, donde al menos el 90% de toda la población se encuentra en la isla de Chiloé. En el continente chileno, se ha observado una pequeña subpoblación desde 1975 en el Parque Nacional Nahuelbuta, ubicado a unos 600 km al norte de la Isla. Hasta la fecha, no se han encontrado otras subpoblaciones en el remanente de bosque que existe entre los dos sectores.

Las epidemias representan serias amenazas de conservación para las poblaciones de especies en peligro debido a que pueden causar mortalidad, reducir la aptitud del huésped y/o alterar los patrones de dispersión y movimiento de los animales infectados (Scott, 1988). Dado que la mayoría de los individuos en una población en peligro rara vez están expuestos a un patógeno por la baja tasa de interacciones intraespecíficas, existe poca inmunidad adquirida, de modo que cuando ocurre una epidemia tiende a infectar a una gran proporción de la población y los niveles de mortalidad pueden ser altos (McCallum y Dobson, 1995). Por lo tanto, monitorear la prevalencia de la enfermedad debe ser una prioridad en la conservación (Scott, 1988).

A pesar de su crítico estado de conservación, se sabe muy poco sobre las enfermedades que afectan al zorro de Darwin. Según la UICN, la mayor amenaza para la conservación del zorro de Darwin puede ser la presencia de perros en áreas habitadas por zorros, que servirían como posibles vectores de enfermedades (Jiménez et al., 2008). Sin embargo, existe una profunda falta de conocimiento no solo sobre la importancia de las enfermedades en la mortalidad del zorro, sino también sobre los patógenos que infectan a esta especie. Hasta la fecha, solo están disponibles tres estudios parasitológicos: uno que informa la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en dos zorros cautivos (Patitucci et al., 2001), un reporte sobre la presencia de piojos en un zorro (González-Acuña et al., 2007) y un estudio coproparasitológico de las heces recolectadas del medio ambiente (Jiménez et al., 2012).

Recientemente se ha identificado un nuevo gammaherpesvirus que infecta a los zorros de Darwin (Cabello et al., 2014). El objetivo del presente estudio fue llevar a cabo un estudio piloto de los patógenos de importancia en caninos que pueden infectar al zorro de Darwin en la isla de Chiloé, utilizando muestras de sangre almacenadas.

Materiales y métodos

Métodos de muestreo

Se incluyeron en este estudio treinta muestras de sangre que fueron recolectadas entre 2009 y 2012 para el análisis genético de la población de zorros en la isla de Chiloé (41°46' S 74°00' O). La muestra consistió en 24 zorros de más de un año (10 machos y 14 hembras) y cinco zorros menores de un año (2 machos, 3 hembras; tres de estos zorros pertenecían a la misma camada). No tuvimos disponible la información de sexo y edad en una de las muestras. Los zorros fueron capturados en diez sitios diferentes a lo largo de Chiloé (tabla 24, figura 22) con trampas de tipo caja o tomahawk. Las trampas se activaron por la noche y se revisaron a la mañana siguiente al amanecer. Los individuos fueron anestesiados con una combinación de 10 mg/kg de ketamina (Imalgene, Merial, Francia) y 1 mg/kg de xilacina (Xilacina, Centrovét Ltda., Chile). Los zorros fueron sometidos a una evaluación clínica básica por un veterinario. Se colectó sangre de vena cefálica donde alrededor de 200 µl de sangre se le agregó 1.000 µl de etanol absoluto en un tubo eppendorf. El etanol preserva el tejido y el ADN al extraer agua del tejido siendo bastante estable incluso a temperatura ambiente una vez que está seco. Cuando el ADN está seco forma una estructura alfa, que es mucho más estable que la estructura beta que se forma cuando se disuelve en una solución a base de agua (Wong et al., 2012). Los zorros fueron liberados después de su recuperación total en el mismo sitio de captura.

Tabla 24. Número de positivos y *Mycoplasma* spp. detectados en zorros de Darwin en cada área de la Isla de Chiloé. Ver figura 21 para la localización de cada sitio y área.

Area	Sites included	Positive foxes/surveyed	<i>Mycoplasma</i> spp. ^a
North	1–5	9/18	3 Mhc, 1 ≈Mhc, 1 Mhf, 3 Mhf/Mhc, 1 ≈CMt
Center	6 and 7	1/4	1 Mhf/Mhc
South	8–10	7/8	5 Mhc, 1 Mhf/Mhc, 1 ≈CMt

^a Mhc: *Mycoplasma haemocanis*; Mhf: *M. haemofelis*; Mhc/Mhf: *M. haemofelis/haemocanis*; ≈Mhc: *Mycoplasma* sp. showing 94% identity with *M. haemocanis*; ≈CMt: *Mycoplasma* sp. showing between 92% and 94% identity with *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Aislación de ADN, amplificación de qPCR y secuenciación

25 mg de sangre periférica entera se lavaron con 1 ml de PBS para eliminar el etanol. El ADN se aisló usando DNeasy1 Blood & Tissue Kit (Qiagen) en un QIAcube (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lisis se realizó con 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (20 mg / ml) a 56° C durante 2 h. El ADN se eluyó en 200 µl de tampón TE.

Se llevaron a cabo amplificaciones en tiempo real de *Ehrlichia/Anaplasma* sp., *Rickettsia* sp., *Bartonella* sp., *Coxiella burnetti*, *Borrelia* sp., *Mycoplasma* sp., *Hepatozoon felis*, *H. canis*, *Babesia* sp. y *Filariae*. Para ello se utilizó un volumen final de 20 µl utilizando SYBR SELECT Master Mix (AB, lifeTechnologies), 4 µl de ADN y una concentración de *primer* final en función del patógeno amplificado (tabla 25). El ciclo térmico fue de 50° C por 2 min y 95° C por 10 min seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 s y 60° C por 1 min. La evaluación de la especificidad de la PCR en tiempo real se realizó mediante la adición de un análisis de curva de disociación al final de la ejecución. El fragmento amplificado para cada patógeno y los *primers* usados se muestran en la tabla 25. Se usó agua como control negativo de PCR y se obtuvieron controles positivos de: (i) portaobjetos comerciales recubiertos con células infectadas con los patógenos (MegaScreen® LUOEHRlichia c. MegaScreen® FLUOBABESIA canis MegaScreen® FLUORICKETTSIAri., MegaScreen® BARTONELLAh. (Megacor)); (ii) a partir de ADN

Tabla 25. *Primers* usados para la detección molecular en zorro de Darwin.

Pathogen	Region amplified	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Reference	Final [primer] (μM)
<i>Ehrlichia/Anaplasma</i> sp.	16S rRNA	GCAAGCTTAACACATGCAAGTCG	CTACTAGCTAGATTCTTAYGCACTACTACCC	This study	0.5
<i>Rickettsia</i> sp.	ITS2	GCTCGATTGTTTACTTTGCTGTGAG	CATGCTATAMCCCAAGCTAGCAATAC	This study	0.5/0.3
<i>Bartonella</i> sp.	ITS1	AGATGATGATCCCAAGCCTTCTG	CCTCCGACCTCACGCTTATCA	Modified from Maggi et al. (2005)	0.3
<i>Coxiella burnetii</i>	16S rRNA	AAACCTTACTACCTTGACATCTC	TCCCGAGGCACCAATCA	This study	0.3
<i>Borrelia</i> sp.	ITS2	GGCAGTTCCGGGAGAGTA	C CATTACCATAGACTTATTACTTTGACCA	This study	0.3
<i>Mycoplasma</i> sp.	16S rRNA	ATGTTGCTTAATTCGATAATACACGAA	ACRGGATTACTAGTAGATTCCAACTTCAA	This study	0.3/0.5
<i>M. haemocanis/haemofelis</i>	RNaseP	CCTCCGATGGTCTGTAATGTTG	GAGRGTTTACCGCGTTTTCAC	Modified from Tasker et al. (2003)	0.3
<i>Babesia</i> sp.	18S rRNA	GTGGCTTTTCGATTCTCG	TTCCCTTAAGTGATAAGGTTTCACAAAACCTT	This study	0.3
<i>Hepatozoon felis</i>	18S rRNA	CTTACCGTGGCAGTCACGGT	TGTTATTCTGTCTACTCTCTCTATGCG	This study	0.3
<i>Hepatozoon canis</i>	18S rRNA	CTTACCGTGGCAGTCACGGT	ATGTTATTCTTGTGTACTACCTCTCTCAAAAC	This study	0.3
<i>Filariae</i>	12S rRNA	TGACTGACTTTAGATTCTTCTTTGGAATAT	ATAATYATAAGCCAAATATATATCTGTTTAA	This study	0.3/0.5

comercial para *Borrelia burgdorferi* y *C. burnetii* (Genekam Biotechnology AG) y (iii) a partir de muestras clínicas previamente amplificadas y secuenciadas para *Mycoplasma* spp., *Hepatozoon felis*, *Hepatozoon canis* y *Filariae* (un gato infectado con *Mycoplasma hemocanis/felis*, un gato infectado con *H. felis*, un perro infectado con *H. canis* y un perro infectado con *D. immitis*). Se utilizó Eukaryotic 18S RNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (AB, tecnologías Live) como referencia interna para la amplificación de ADN genómico con el fin de garantizar (i) la adecuada amplificación por PCR de cada muestra y (ii) que los resultados negativos correspondían a muestras negativas verdaderas en lugar de un problema con la carga de ADN, degradación de la muestra o la inhibición de la PCR. Los productos positivos de PCR en tiempo real de *Mycoplasma* sp. y *Rickettsia* sp. fueron secuenciados con BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (AB, Life Technologies) usando los mismos *primers*. La PCR cuantitativa de *Leishmania* se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Francino et al. (2006).

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y la base de datos RDP para 16S rRNA (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Las nuevas secuencias nucleotídicas de los genes de *Mycoplasma* 16S rRNA y RNase P, se enviaron a la

base de datos EMBL con los números de acceso HF678195 y HF679526, respectivamente.

La nueva secuencia *Rickettsia* ITS2 quedó registrada en la base de datos EMBL con el número de acceso HG328363.

Análisis genético de *Mycoplasma* spp.

Se calculó la distancia genética P entre los 15 *Mycoplasma* spp. con MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) utilizando 334 pb del gen de ARN ribosómico 16S.

Análisis estadístico

Las diferencias en la prevalencia según el sexo del zorro y el área de captura se compararon mediante la prueba exacta de Fisher.

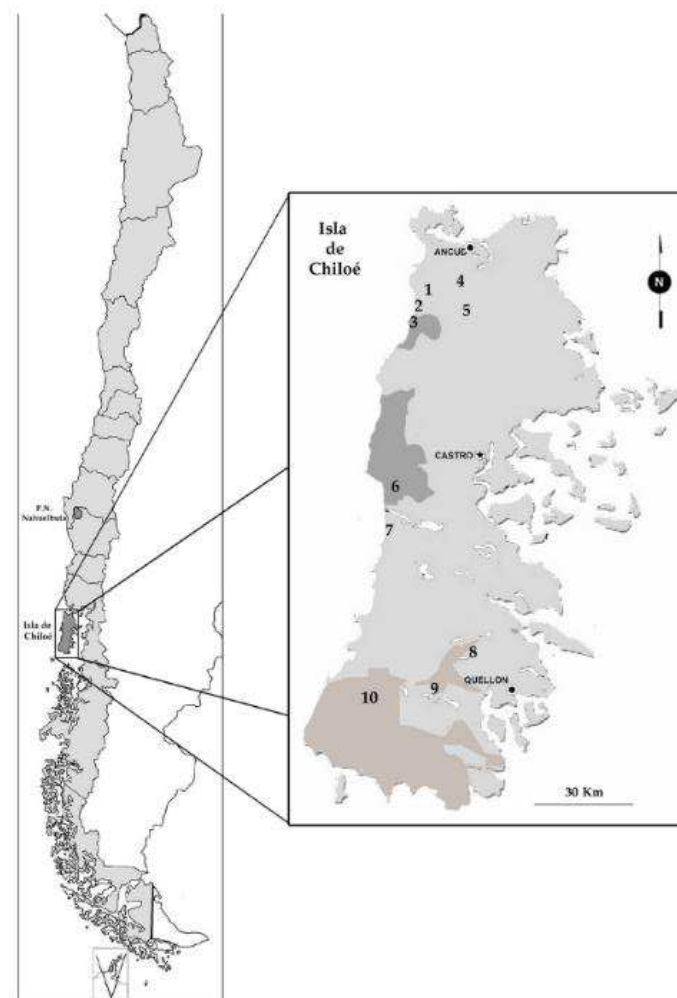


Figura 22. A) Áreas conocidas de distribución de zorro de Darwin (sombreado). B) Sitios de muestreo en Chiloé. 1) Chepu; 2) Ahuenco; 3) Lar; 4) Mechaico-San Antonio; 5) Palomar; 6) Rancho grande; 7) Rehue; 8) Yaldad; 9) Chaiguata-Chaiguaco; 10) Emerenciana. Se muestran las áreas protegidas.

Resultados

Todas las muestras sanguíneas fueron negativas a las PCRs dirigidas a *Ehrlichia/Anaplasma sp.*, *Bartonella sp.*, *C. burnetti*, *Borrelia sp.*, *Babesia sp.*, *Hepatozoon sp.*, *Leishmania sp.*, y *Filariae*. La secuenciación del gen 16S rRNA reveló ADN de *Mycoplasma spp.* en diecisiete zorros (56,7%, intervalos de confianza del 95% = 38,2-73,7). De estos, quince fueron identificados como *M. haemofelis/haemocanis* (Mhf/Mhc). Los otros dos zorros estaban infectados con las mismas especies de hemoplasma que solo mostraron un 92,1% y del 93,9% de identidad con los aislados de CMt de los gatos y entre el 89,1% y el 93,0% con los hemoplasmas de los roedores.

Con el fin de caracterizar adicionalmente las muestras positivas a Mhf/Mhc, se analizaron 10 de ellas para la secuencia de la subunidad de ARN del gen RNasa P. Ocho mostraron 100% de identidad con *M. haemocanis* (Mhc), una mostró 100% de identidad con *M. haemofelis* (Mhf), y otra mostró 93,9% de identidad con Mhc str. Illinois de un perro en los Estados Unidos (CP003199).

Se encontraron zorros infectados con hemoplasma en ocho de las diez áreas estudiadas en las áreas norte, centro y sur de Chiloé, sin diferencias en la prevalencia ($p > 0,05$), y sin ninguna agrupación geográfica clara de *Mycoplasma spp.* (tabla 24, figura 22). Todos los zorros infectados tenían más de un año (prevalencia en adultos, 66,6%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia según el sexo del zorro ($p > 0,05$). Todos los zorros estaban aparentemente sanos, excepto una hembra vieja con signos de emaciación, pero esta zorra era negativa para la infección por hemoplasma. No se registraron signos clínicos relacionados con la hemoplasmosis en ningún zorro.

Un zorro positivo para Mhc también estaba infectado con un *Rickettsia* que mostró un 97% de identidad con diferentes secuencias publicadas de *R. felis*.

Discusión

Los zorros en este estudio mostraron poco contacto con los agentes infecciosos investigados. Esta es una característica común de los carnívoros en peligro (por ejemplo, Millán et al., 2009; Almeida et al., 2013) y se explica por su sistema social solitario (Jiménez et al., 2008) que disminuye la tasa de encuentros intraespecíficos. Esta tasa

natural de bajo de contacto se acentúa probablemente por el tamaño poblacional del zorro de Darwin que es actualmente pequeño. El hecho de que Chiloé sea una isla también podría afectar a la transmisión de enfermedades infecciosas del continente.

Sin embargo, nuestro estudio reveló que la infección por micoplasmas hemotróficos es una característica aparentemente común del zorro de Darwin. Los hemoplasmas son células sin pared celular parásitos epicelulares de los eritrocitos. Hasta el momento, se han descrito cinco especies de hemoplasma en carnívoros: se considera que Mhc es el agente causal de la micoplasmosis hemotrófica en perros; *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (CMhp) se aisló por primera vez de un perro esplenectomizado con neoplasia hemática; Mhf, anteriormente conocida como gran variante de *Haemobartonella felis*, es el agente causante de la anemia infecciosa felina; *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm), anteriormente considerada la variante pequeña de *H. felis*, generalmente causa infecciones subclínicas en gatos; y *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt) se describió en un gato con anemia hemolítica (Sykes et al., 2005; Willi et al., 2005; Harvey, 2006).

Infecciones por hemoplasma han sido detectadas en varios felinos de vida libre (Willi et al., 2007; Munson et al., 2008; Hirata et al., 2012; Krengel et al., 2013) y recientemente en el oso negro (*Ursus thibetanus japonicus*, Iso et al., 2013). Por el contrario, la infección de hemoplasma en cánidos de vida libre solo se ha descrito en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en Japón, que resultó ser positivo para un *Mycoplasma sp.* perteneciente al grupo Mhf/Mhc a través del análisis del gen 16S rRNA (Sasaki et al., 2008). Entre los animales cautivos, dos zorros vinagres (*Speothos venaticus*) dieron positivo para *Mycoplasma sp.* estrechamente relacionado con CMhp, y dos lobos (*Canis lupus*) fueron positivos para *Mycoplasma sp.* estrechamente relacionado con CMhm, todos ellos de zoológicos brasileños (Andre' et al., 2011).

La mayoría de las infecciones detectadas en el presente estudio fueron causadas por Mhc. Este hemoplasma infecta a perros en todo el mundo (Kenny et al., 2004). Los perros son infectados de forma latente por Mhc hasta que otros factores, como la esplenectomía o la inmunosupresión, desencadenan la enfermedad (Kenny et al., 2004). Todos los zorros infectados mostraron buena condición externa sin signos de

enfermedad. La ausencia de signos clínicos también es una característica típica de la hemoplasmosis en felinos salvajes, y según Willi et al. (2007) se puede explicar por la posibilidad de que los animales fueron muestreados durante un estado de portador crónico y no durante la infección aguda. Sin embargo, la inmunosupresión causada por factores de estrés (translocación o cautividad), enfermedades concurrentes o el tratamiento con corticoides puede inducir la parasitemia por hemoplasma y generar anemia en estos carnívoros salvajes (Guimaraes et al., 2007).

Se corroboró que un individuo estaba infectado por Mhf. Recientemente, la secuenciación del genoma completo de Mhc permitió a do Nascimento et al. (2012) confirmar que Mhf y Mhc son especies diferentes que infectan a gatos y perros respectivamente. No conocemos ningún reporte de perros infectados con Mhf, después de la introducción de los análisis de la subunidad de ARN del gen RNasa P, que permite la diferenciación de las dos especies de *Mycoplasma* (Tasker et al., 2003). Aquí, presentamos la primera evidencia de que un cánido puede ser infectado por Mhf. El presente caso es probablemente el resultado de una diseminación por parte de gatos domésticos o de algún felino salvaje simpátrico como la güiña (*Leopardus guigna*).

Dos individuos dieron positivo para *Mycoplasma sp.* mostrando entre un 92,0% y un 93,9% de identidad con secuencias de CMt previamente informadas. Otras secuencias de CMt previamente reportadas presentaron una gran identidad entre ellas: entre el 95,1% y el 99,7%. Esto respalda la hipótesis de que esta secuencia puede corresponder a una nueva especie de hemoplasma, aunque, esto debe validarse aún más (Drancourt y Raoult, 2005). La fuente de infección para el zorro de Darwin es desconocida. Esto puede representar un *Mycoplasma* típico de esta especie o de cánidos de América del Sur, adquirido después del consumo repetido de roedores como parte de su dieta normal, lo que puede explicar por qué se encontró en zorros muestreados distantes geográficamente. Alternativamente, esto puede ser el resultado de una diseminación desde un carnívoro doméstico, que posteriormente evolucionó independientemente en la isla de Chiloé. El último escenario también podría explicar la secuencia similar a Mhc detectada en otro zorro.

Se detectó una *Rickettsia* estrechamente relacionada con *R. felis* en un zorro. *Rickettsia felis* tiene una distribución mundial y es transmitida por la pulga del gato *Ctenocephalides felis*, mientras que los gatos y las zarigüeyas (*Didephis virginianus*) han sido mencionados como reservorios en América del Norte (Greene y Breitschwerdt, 2006). Además de las especies mencionadas, y los seres humanos, solo los perros y las ratas han sido infectado por este patógeno (Reif y Macaluso, 2009). El hecho de que *Rickettsia sp.* detectada en este zorro está más estrechamente relacionada con *R. felis* no descarta la posibilidad de que ésta sea una especie de *Rickettsia* diferente y tal vez desconocida, como se hipotetizó en el caso de un zorro gris de las pampas (*P. gymnocercus*) infectado por un *Hepatozoon sp.* estrechamente relacionado con *H. felis* (Giannitti et al., 2012). Las infecciones experimentales de gatos con *R. felis* produjeron infección subclínica (Wedincamp y Foil, 2000), pero no se sabe nada sobre la posible patogenicidad para el zorro de Darwin.

Agradecimientos

Los zorros fueron capturados con permiso del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG) con las resoluciones números 1262/2009, 2262/2010 y 206/2012. Las muestras se exportaron e importaron con permisos CITES. Queremos agradecer a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y al Parque Tantauco por permitirnos capturar zorros dentro de las áreas protegidas y por su ayuda en el transporte, alojamiento y apoyo en tierra. Al Parque Tantauco por una subvención otorgada a J. Cabello para apoyar parcialmente el trabajo de campo en 2009; Cooperativa de Pescadores Mar Adentro, para transporte marítimo y alojamiento en Ahuenco; y J. Hetz, M. Mora, V. Sánchez, T. Vuskovic, V. Solé, R. Palou, V. Nogal y E. Neves por su asistencia en el campo o en el laboratorio. C. Napolitano recibió el apoyo de la beca de doctorado ICM P05-002 del Instituto de Ecología y Biodiversidad (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), del Programa de Premios Panthera Kaplan (Fundación Panthera, Nueva York, EE. UU.), Del Premio Scott Neotropical Fund (Cleveland Metroparks Zoo & the Cleveland Zoological Society, Cleveland, EE. UU.) y la beca Eric York (Felidae Conservation Fund, California, EE. UU.). J. Millán posee un contrato Ramón y Cajal otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Fondo Social Europeo.

Material suplementario**HF678195.1** Uncultured *Mycoplasma* sp. partial 16S rRNA gene, isolate ZD19

AACCTTACCAAGGTTTGACATCCCTCGCGAACTATGGAAACATAGCGGAGGTTATCGAGGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGAGATGTTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTACTCTCTAGTTGT
TTGTCTAGAGAGACTGAACAGTAATGTATAGGAAGGTTGGGATCACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGCCTTG
GGCCGCAAACGTGTTACAATGGCGAGTACAATGTGTTGCAAAGTACGATAGTGAGCCAATCACTAAAACTCG
TCTCAGTCCGGATAAAAGGCTGCAATTCGCCTTT

HF679526.1 Uncultured *Mycoplasma* sp. ribonuclease P RNA, isolate ZD26

GTGCAAGCATATAAAAAATAAAGCTTGACACTCTTTAGGGTGATGACGGGGGATAAGATAAGGCGAAAGCTA
CTACTTATTCTCTATAAAGTGCCACAGAGACGAGTTATGCAGAAATGCATAG

HG328363.1 Uncultured *Rickettsia* sp. genomic DNA containing ITS2, isolate ZD1

ATTACATATGCATATAGTGTTAATTCTATAAAAAATGTAGTATCAACTCACAAAGTTATCAGGTTAAATTAGCTTT
ATCAATGAATAAAAAATGTTGTTGCACAGCTAATAATATCATACCGTGGTCCCGCGCCACGGTATCTAGAAAAA
TTTTTAATATTTAGATTCTTGCTTCCGCAGGAATGACAAATTTAGTCATGTAACAACATTAACAGC

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO GAMMAHERPESVIRUS EN EL AMENAZADO ZORRO DE DARWIN (*Lycalopex fulvipes*)

«paper no. vir057851 charlesworth ref: vir057851»

Animal - DNA viruses

Journal of General Virology (2013), 94, 000–000

DOI 10.1099/vir.0.057851-0

Short Communication

Correspondence
Javier Millán
syngamustrachea@hotmail.com

Received 31 July 2013
Accepted 12 September 2013

Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*)

Javier Cabello,^{1,2} Fernando Esperón,³ Constanza Napolitano,⁴ Ezequiel Hidalgo,⁵ José Antonio Dávila¹ and Javier Millán⁶

¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (UCLM, CSIC, JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain

²Centro de Conservación de la Biodiversidad, Chiloe-Silvestre, Las Américas 1060, Ancud, Chiloé, Chile

³Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), 28130 Valdeolmos, Spain

⁴Laboratorio de Ecología Molecular & Instituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁵Conservation and Research Department (CIBZ), Parque Zoológico Buin Zoo, Panamericana Sur Km 32 Buin, Chile

⁶Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS) (Wildlife Diseases Research Group), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Introducción.

El orden Herpesvirales es un vasto orden de aproximadamente 130 especies de virus con ADN envuelto, dividido en tres familias. La familia *Herpesviridae* contiene aproximadamente 79 especies de virus de mamíferos, éste a su vez se divide en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Widén et al., 2012). *Gammaherpesvirus* generalmente tienen un rango de hospedador restringido a una familia o un orden. Hasta el momento, la infección por *gammaherpesvirus* ha sido reportada en solo cinco especies de carnívoros terrestres: el tejón europeo (*Meles meles*) y la nutria marina septentrional (*Enhydra lutris kenyoni*), el león (*Panthera leo*), en una marta pescadora cautiva (*Martes pennant*) y una nutria de uñas pequeñas (*Aonyx cinerea*) (tabla 26). Los virus de esta subfamilia tienen especificidad por linfocitos B o T y pueden causar enfermedad linfoproliferativa.

La latencia de *gammaherpesvirus* puede determinarse en el tejido linfoide. Las infecciones con virus de esta subfamilia generalmente causan pocos signos clínicos en el hospedador principal, pero pueden causar enfermedad en otras especies relacionadas (Widén et al., 2012). La infección por *gammaherpesvirus* se ha asociado a lesiones ulcerosas de piel y mucosas en una marta pescadora (Gagnon et al., 2011), en nutrias marinas (Tseng et al., 2012) y también en miembros marinos del orden Carnívora (p. Ej. Goldstein et al., 2006). El objetivo de la presente comunicación fue informar la identificación de un nuevo miembro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* que infecta al zorro de Darwin (*Lycalopex fulvipes*). Esta especie se considera críticamente amenazada por UICN y es uno de los carnívoros más amenazados en todo el mundo, con solo 250 individuos restantes calculados (Jiménez et al., 2012). La información sobre su susceptibilidad a agentes infecciosos es casi inexistente.

Tabla 26. Resumen de herpesvirus reportados hasta ahora en carnívoros terrestres silvestres.

Host	Herpesvirus	GenBank accession no.	Lesions attributable to herpesvirus	Prevalence by PCR	Location	Reference(s)
Fisher (<i>Martes pennanti</i>)*	FiHV	HM579931	Multiple skin ulcers on the muzzle and plantar pads†	Single case	Canada	Gagnon <i>et al.</i> (2011)
Oriental small-clawed otter1 (<i>Aonyx cinerea</i>)	Oriental small-clawed otter herpesvirus	FJ797657	NR	Single case	Hungary	Janoska and Harrach, unpublished data
European badger (<i>Meles meles</i>)	Badger herpesvirus (BadHV)‡	AF376034	Pulmonary fibroblast in one individual	96 % of 29	UK and Ireland	Banks <i>et al.</i> (2002); King <i>et al.</i> (2004)
	Mustelid herpesvirus 1 (MusHV-1)‡	GU799569	NR	Single case	Hungary	Dandár <i>et al.</i> (2010)
Northern sea otters (<i>Enhydra lutris kenyoni</i>)	MusHV-2	GU979535	Ulcerative lesions and plaques on the lingual, gingival, oral, oesophageal, and labial mucosa	46 % of 28 tissues and 34 % of 62 nasal swabs	Alaska, USA	Tseng <i>et al.</i> (2012)
Lion (<i>Panthera leo</i>)	<i>Panthera leo</i> gammaherpesvirus 1	DQ789370	NR	Single case	NR	Ehlers <i>et al.</i> (2008)
Darwin's fox (<i>Pseudalopex fulvipes</i>)	Darwin's fox gammaherpesvirus	HF586888, KF471019	External lesions not observed	14 % of 28§	Chiloé Island, Chile	Present study

NR, Not reported.

*Captive born.

†It was not further confirmed whether the herpesvirus isolated was responsible for the observed lesions.

‡BadHV and MusHV-1 probably correspond to the same species.

§The storage of samples in alcohol probably resulted in an underestimation of the true prevalence. See text for details.

Materiales y métodos.

Se utilizaron veintiocho muestras de sangre recolectadas entre 2009 y 2012 durante un estudio genético de población de zorros en la isla de Chiloé. Las muestras consistieron en 23 zorros adultos de al menos un año (nueve machos y catorce hembras) y cinco zorros menores de un año (dos machos, tres hembras). Una hembra adulta y tres cachorros pertenecían a la misma camada. Los zorros fueron capturados en 10 sitios diferentes en Chiloé con jaulas trampas. Las trampas se activaron por la tarde y se revisaron a la mañana siguiente. Los individuos fueron anestesiados con una combinación de 10 mg/kg de ketamina (Imalgene) y 1 mg/kg de xilacina (Xilacina). La sangre se extrajo de la vena cefálica y se le agregó etanol absoluto para su preservación en tubo eppendorf. Los zorros fueron evaluados clínicamente por un veterinario y liberados después de su recuperación total en el mismo sitio de captura. Una porción de la muestra de sangre (0,5 ml) fue centrifugada, lavando tres veces el pellet. Después de una etapa de lisis (Cell Signaling Technology), se extrajo el ácido nucleico total mediante filtración a presión (QuickGene DNA tissue kit S; FujiFilm Life Science).

La detección del ADN del herpesvirus se realizó utilizando una prueba de PCR descrita previamente (VanDevanter et al., 1996). La secuenciación directa se llevó a cabo con los *primers* TGVseq e IYGseq resultando un fragmento de aproximadamente 167 pb, excluidos los *primers*. Las muestras positivas se caracterizaron posteriormente por medio de la amplificación parcial del gen de la glicoproteína B. Se utilizó una PCR universal anidada que amplifica un fragmento de 500 pb del gen de la glicoproteína B del gammaherpesvirus (GH1) (Ehlers et al., 2008).

Los fragmentos de ADN se purificaron, se clonaron en el plásmido pGEM-T y se cultivaron en *Escherichia coli* JM109 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las distancias p de aminoácidos se calcularon antes del análisis filogenético. Para construir árboles filogenéticos de la polimerasa y de glicoproteína B se utilizó el programa MEGA5.2 (figura 23) usando el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 1.000 repeticiones.

Resultados y discusión.

Cuatro zorros estaban infectados con herpesvirus (14,3%, intervalos de confianza del 95%: 5,0-31,9). Todos los zorros positivos eran adultos no emparentados: dos fueron capturados en el Parque Nacional Chiloé, ubicado en la parte noroeste de la isla, y los otros dos zorros fueron capturados en el Parque Tantauco, un área privada protegida en el sur. Esto sugirió que este agente está presente en toda la isla de Chiloé.

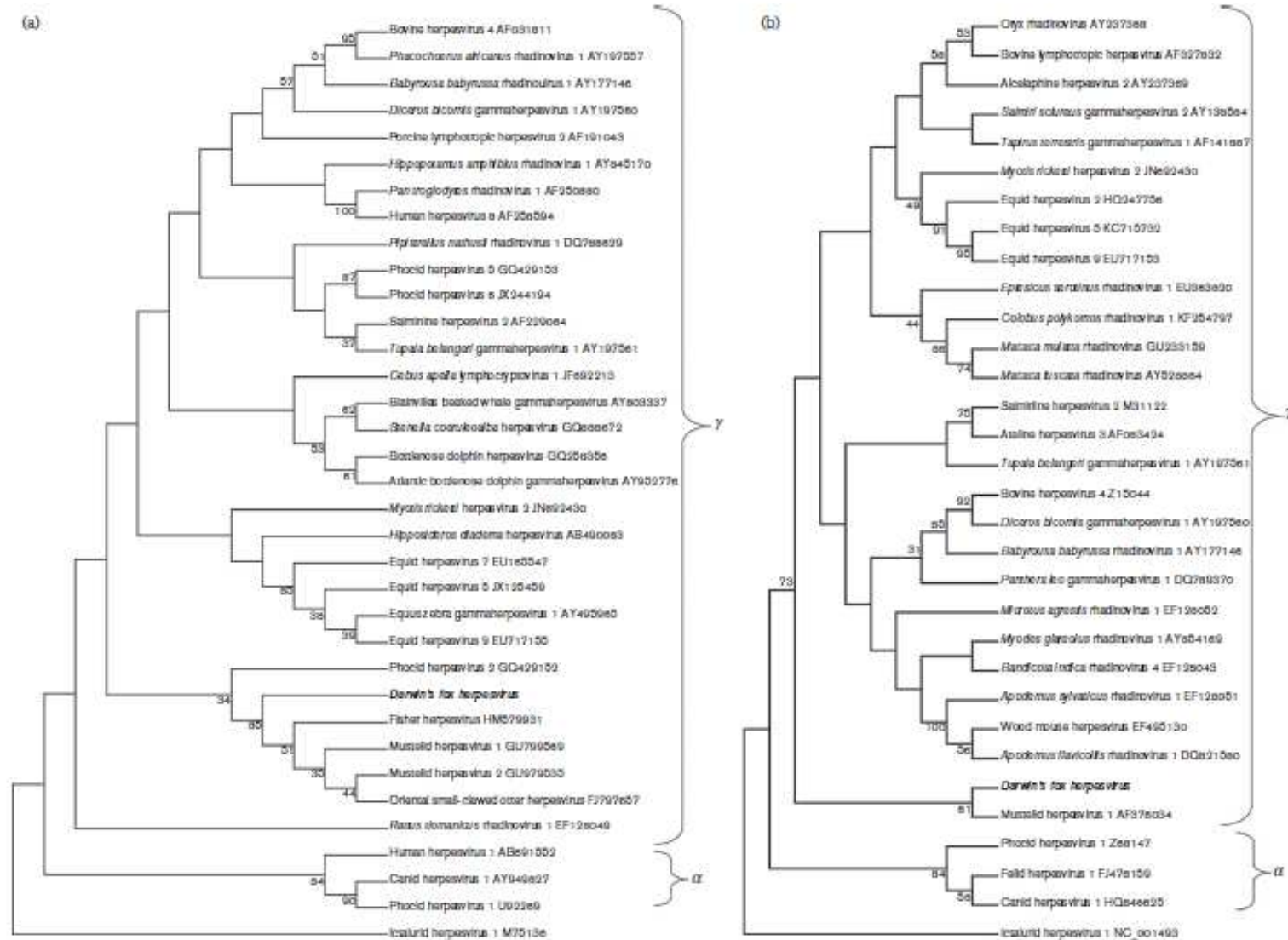
Las secuencias del fragmento analizado de los cuatro individuos positivos dan cuenta de un nuevo herpesvirus perteneciente a la subfamilia *Gammaherpesvirinae* (figura 23), aparentemente más relacionado con el grupo de herpesvirus de mustélidos, aislado en tejón, especies de nutrias y una marta pescadora de Canadá (distancia-p aminoacídica 0,217) y también estrechamente relacionado con otros gammaherpesvirus de carnívoros terrestres (figura 23, tablas 26 y 27).

Tabla 27. Estimación de divergencia evolutiva entre secuencias parciales del gene polimerasa de herpesvirus.

Lower left (bold): Number of amino acid differences per site from between sequences. Upper right: Number of nucleotide differences per site from between sequences. The analysis involved 12 sequences.

Virus (GenBank no.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Darwin's fox herpesvirus (HF586888)		0.23	0.23	0.23	0.18	0.29	0.36	0.42	0.49	0.51	0.63	0.56
2. Fisher herpesvirus (HM579931)	0.22		0.10	0.08	0.15	0.32	0.41	0.41	0.49	0.51	0.64	0.58
3. Mustelid herpesvirus 1 (GU799569)	0.24	0.11		0.08	0.16	0.30	0.43	0.41	0.51	0.51	0.63	0.59
4. Mustelid herpesvirus 2 (GU979535)	0.28	0.11	0.09		0.13	0.33	0.45	0.41	0.53	0.54	0.64	0.59
5. Otter herpesvirus (FJ797657)	0.28	0.17	0.15	0.11		0.32	0.39	0.42	0.52	0.54	0.64	0.56
6. Phocid herpesvirus 2 (GQ429152)	0.37	0.39	0.39	0.41	0.41		0.42	0.44	0.55	0.53	0.59	0.59
7. Phocid herpesvirus 6 (JX244194)	0.41	0.43	0.43	0.46	0.43	0.52		0.22	0.53	0.53	0.65	0.60
8. Phocid herpesvirus 5 (GQ429153)	0.43	0.46	0.41	0.43	0.39	0.52	0.24		0.53	0.54	0.65	0.59
9. Phocid herpesvirus 1 (U92269)	0.63	0.61	0.63	0.63	0.63	0.63	0.67	0.63		0.23	0.53	0.74
10. Canid herpesvirus 1 (AY949827)	0.67	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.67	0.63	0.24		0.51	0.75
11. Human herpesvirus 1 (AB691552)	0.70	0.67	0.67	0.67	0.65	0.70	0.70	0.70	0.41	0.46		0.70
12. Ictalurid herpesvirus 1 (M75136)	0.80	0.80	0.83	0.85	0.83	0.83	0.85	0.87	0.96	0.96	0.89	

Figure 23 Maximum-likelihood phylograms based on amino acid sequences of the herpesvirus DNA polymerase (a) and herpesvirus glycoprotein B (b). The bootstrap consensus tree was inferred from 1000 replicates generated with a random seed (MEGA5.2). The ictalurid herpesvirus 1 is included as an outgroup member. The name of each sequence indicates the host species followed by the GenBank accession number. The GenBank accession numbers of Darwin's fox herpesvirus (canid herpesvirus 2) are HF586888 and KF471019 for the polymerase and glycoprotein B genes, respectively.



La amplificación parcial del gen de la glicoproteína B fue exitosa, y las secuencias obtenidas estuvieron muy relacionadas con el herpesvirus de mustélidos1 (MusHV-1) (distancia p aminoacídica 0,230). Esto concuerda con observaciones previas que sugieren que muchos elementos en los patrones de ramificación de los miembros de la familia *Herpesviridae* son congruentes con los patrones de ramificación para las especies hospedadoras correspondientes, siendo consistentes con la coevolución del huésped-virus (Wellehan et al., 2008). Dado que las especies de herpesvirus se nombran de acuerdo con la familia de la especie hospedadora de la que se aislaron (Davison et al., 2009), proponemos el nombre tentativo de Darwin's fox gammaherpesvirus (herpesvirus canino 2). Hasta ahora, la infección por gammaherpesvirus ha sido reportada en solo cinco especies de carnívoros, cuatro de ellos pertenecientes a la familia *Mustelidae* (tabla 26). Este es el primer informe de un virus gammaherpes que infecta un cánido en todo el mundo, y el primero en infectar a un carnívoro de América del Sur. La patogenicidad de este nuevo virus sigue siendo desconocida. No se observaron lesiones externas en ninguno de los animales. Las infecciones por herpes virus a menudo son latentes y no muestran lesiones en el momento del aislamiento (Banks et al., 2002). Por ejemplo, MusHV-1 no se ha asociado hasta ahora con lesiones o enfermedad clínica en tejones (King et al., 2004).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, si se han encontrado lesiones en otras especies. Además, muchas infecciones por herpesvirus predisponen al huésped a infecciones bacterianas secundarias y, teniendo en cuenta el pequeño tamaño de la población y el área de distribución del zorro de Darwin, creemos que este virus debe tenerse en cuenta al implementar estrategias de conservación, como la translocación de individuos, por ejemplo.

Agradecimientos

Los zorros fueron capturados con los permisos del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG) números 1262/2009, 2262/2010 y 206/2012. Las muestras se exportaron e importaron con permisos CITES. Queremos agradecer a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y al Parque Tantauco por permitirnos capturar zorros dentro de las áreas protegidas y por su ayuda en el transporte, alojamiento y apoyo en tierra; además

al Parque Tantauco por una subvención otorgada a J. C. para apoyar parcialmente el trabajo de campo en 2009; Cooperativa de Pescadores Mar Adentro, para transporte marítimo y alojamiento en Ahuenco; y J. Hetz, M. Mora, V. Sánchez, T. Vuskovic, V. Solé y R. Palou, V. Nogal y E. Neves por su asistencia en el campo o en el laboratorio. CN recibió el apoyo de una beca de doctorado del Instituto de Ecología y Biodiversidad (ICM P05-002), el Programa de Premios Panthera Kaplan (Fundación Panthera, NY, EE. UU.), El Premio Scott Neotropical Fund (Cleveland Metroparks Zoo y la Sociedad Zoológica de Cleveland, Cleveland, EE. UU.) Y el Fondo de Conservación Felidae Scholarship de Eric York, California, EE. UU.). J. M. posee un contrato Ramón y Cajal otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Fondo Social Europeo.

Material suplementario

HF586888.1 Canid herpesvirus 2 partial pol gene for DNA polymerase

TCTTCAGGTATTCTCCCTTGTCTAAAAATTGCAGAACTATAACCTATGAAGGAAGACACATGCTA
GAAAAGTCAAAAAAGTTTATAGAGGATATCACCCCTATTGACATGGAGAGAATTATGAATAGAC
CAGTAAATTGTGCATATAATGCTAGTTTTAGAGTAAT

KF471019.1 Canid herpesvirus 2 isolate C70 glycoprotein B gene, partial cds

AGTGCAATCTATGGAAAGCCAGTTTCAGCCAGGTTTTGGGGGATGTAATCTCTGTTACTGAATGT
GTAATTGTGGACCAAACTAAGGTTGATTACATCAAAGTATGAGAGTATTAGGCTCAGACAATGT
GTGCTATTCCAGACCTATTGTTACATTTAGATTTAAAAACGGTACTGAGGTTTTCACTGGACAAC
GGGTCCCAGAAATGAAATCTTTTATCAACCAGGTTAGTTGAGACTTGTAAGAATCTGCTGTTCA
TTACTTTTCAGTCTGGCCATCAAATGCACAAATTTGTAACTACCAACACAAAAACACTGCTGACA
TTCAAAATTTTTCAACTCTCAACACTTTTATACTTTAACTTAACATTTATTGAAAACATAGATTT
TGAAGTAGTTGAATTGTATTCTAGAGAGGAAAAAGATTAGCGAACGTTTTGGATATAGAGACC

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Este capítulo muestra que el zorro chilote está genéticamente empobrecido tanto en ADN mitocondrial como microsatélites neutrales y el MHC funcional, presentando la diversidad genética más reducida entre los cánidos más amenazados del planeta. Aunque, el genotipado de microsatélites presentó evidencia de nuevas poblaciones, no podemos adelantar conclusiones positivas ya que la presencia de alelos exclusivos nos lleva a pensar en poblaciones aisladas.

Con bajos tamaños poblacionales aparentes y en disminución, además de la ausencia de flujo genético, se espera una mayor pérdida de la diversidad por la deriva genética, así como un aumento en la endogamia. Existe una amplia literatura, tanto teórica como empírica, sobre los efectos nocivos de la baja diversidad genética y la endogamia.

No tenemos datos de eficacia biológica para evaluar que la baja variabilidad genética presentada en el zorro chilote es, en sí misma o no, una amenaza para la viabilidad de la especie a largo plazo y es posible que la purga genética elimine alelos deletéreos, disminuyendo así la depresión por endogamia. Del mismo modo permanece poco claro si la baja variabilidad en alelos MHC es una amenaza para la supervivencia de las poblaciones o no. No obstante, el deterioro de la diversidad genética tanto del ADN Mitocondrial, MHC y microsatélites presentados en el zorro chilote dentro de las poblaciones sí podría reducir la aptitud biológica de los individuos, quedando muy susceptibles ante brotes de enfermedades infecciosas que pudiesen acabar con gran parte de la población, sobre todo aquellas transmitidas por los perros, como el virus del distemper canino. De esta manera, la mantención de la variación genética es, a lo menos, un elemento esencial para que los programas de conservación sean eficaces.

Actualmente se confecciona un borrador para el Plan Nacional de Recuperación, Conservación y Gestión (RECOGE) de del zorro chilote o de Darwin en Chile, sin embargo, aún se desconocen aspectos importantes de esta especie.

Como primer paso para la protección del zorro chilote, es recomendable que se continúen los intentos de exploración en los remanentes de los bosques valdivianos en el área entre Gorbea y Chiloé para buscar individuos, caracterizar las nuevas poblaciones y así poder tomar medidas de conservación incluyendo todas las poblaciones existentes y sus variabilidades genéticas. Igualmente, se deberían realizar esfuerzo en determinar la presencia de este zorro al sur y al este de la Isla de Chiloé siguiendo la distribución de la ecorregión de bosque valdiviano, donde los bosques nativos que ahí existen permanecen aún inalterados y protegidos, en parte, por una red de Parques Nacionales, siendo un hábitat potencial para el zorro chilote.

Existe una clara necesidad de recopilar datos que revelen las posibles consecuencias de la baja diversidad del MHC para la viabilidad de las poblaciones, particularmente el impacto de la riqueza alélica de MHC sobre la abundancia de parásitos o prevalencia de enfermedades (Radwan, et al., 2010). Estas consecuencias incluirían una gran dificultad en la cría en cautividad, un alto grado de mortalidad juvenil en cautiverio y en la naturaleza y, una alta frecuencia de anomalías de espermatozoides (O'Brien & Evermann, 1988). Si bien aún se discute si la baja variabilidad en el MHC por si solo debería ser motivo de gran preocupación, nuestros resultados no solo muestran una baja variabilidad en estos loci, sino también en marcadores microsatélites y ADN mitocondrial, dejando en evidencia la deplorable variabilidad genética del zorro chilote.

Mientras esto ocurre, es aconsejable incentivar un programa de conservación ex situ para mantener una población en cautiverio que incluya individuos de todas las poblaciones capaz de proporcionar animales para reintroducciones o refuerzos de poblaciones silvestres en caso de ser necesario. El archipiélago de Chiloé consta de más de 30 islas pequeñas además de la Isla grande, muchas de ellas están intervenidas por actividades antrópicas, pero otras aún conservan bosques nativos que pueden servir de hábitat para liberar animales de manera experimental, criados en cautividad. De esta manera, a través de un centro de reproducción ex-situ se pueden evaluar los aspectos reproductivos y de comportamiento en cautividad, además de realizar cruzamientos

dirigidos para poder liberar animales en un ambiente natural controlado evaluando el éxito reintroducciones y los cambios en la variabilidad genética.

Se debe tener especial cuidado con las poblaciones de perros que circulan libremente por las áreas naturales en toda la distribución del zorro, ya que, no solo pueden atacarlos o desplazarlos, sino que, podrían transmitir enfermedades infecciosas con consecuencias catastróficas a nivel poblacional. A pesar de que las enfermedades infecciosas están consideradas como una amenaza para este cánido, no existe mayor información epidemiológica o informes de casos obtenidos en esta especie, salvo un reporte de la presencia de piojos (*Trichodectes canis*) (González-Acuña, et al., 2007) y un estudio para identificar parásitos en heces ambientales (Jiménez, et al., 2012), ambos en Chiloé.

En este trabajo se encontró una prevalencia mayor al 50% de *Mycoplasma* en zorros y 14% de gamaherpesvirus, sin evidencias de signos clínicos de enfermedad, desconociendo si estos agentes pudiesen significar algún perjuicio para la conservación del zorro chilote o no. Paralelamente, hemos realizado un estudio parasitario en perros que viven en simpatria con el zorro chilote en la Cordillera de Nahuelbuta encontrándose un 50,2% de perros parasitados (Oyarzún, 2007), los cuales, si bien tienen propietarios, circulan libremente por zonas de bosque nativos compartiendo los mismos lugares frecuentados por zorros chilote, de acuerdo a nuestros registros de cámaras trampa.

Teniendo en cuenta que las enfermedades pueden suponer un riesgo para especies amenazadas como el zorro chilote, creemos que se necesitan más estudios para determinar la importancia de los hemoplasmas, herpesvirus y otros agentes infecciosos o parasitarios, no incluidos en este estudio.

Los perros poseen poblaciones con número y susceptibilidad a los patógenos suficiente para funcionar como reservorio de los mismos, siendo necesario realizar un seguimiento del estado sanitario de sus poblaciones, especialmente aquellas que viven en contacto con el zorro chilote, lo que ayudaría a dilucidar si los perros son la fuente de la infección o si las infecciones se mantienen enzoóticamente en las poblaciones de

zorros. Además, son necesarios análisis moleculares de artrópodos que infestan perros, gatos, zorros y otros carnívoros salvajes en Chiloé para determinar los patrones de transmisión del hemoplasma entre los carnívoros en la Isla.

Si bien, recién en 2017 se publica en Chile la ley 21.020 de tenencia responsable de mascotas y animales de compañía que tiene entre otros objetivos regular la población de perros en el país y proteger la salud pública y el medio ambiente, no se mencionan medidas para control de los perros asilvestrados, quienes provocan los daños a la fauna silvestre y ganadería. Se debiese volver a incluir al perro en la lista de especies dañinas de la de caza 19.473, considerando medidas de control conforme a las leyes vigentes, además de realizar una fuerte fiscalización en los pobladores.

La necesidad de translocaciones entre poblaciones debe ser evaluada con cuidado. Hemos observado diferencias de comportamiento entre las poblaciones de zorros, siendo los de Chiloé menos temerosos al ser humano que los zorros continentales, quizás debido a la falta de competidores y depredadores o los años de aislamiento. También hay diferencias morfológicas sutiles que permiten distinguir los zorros chilotes en Chiloé y en el continente. Estas diferencias pueden ser normas de reacción fenotípicas o pueden tener una base genética. Dada la falta de conocimiento de las divergencias adaptativas entre las poblaciones insulares y continentales, no recomendamos la translocación de individuos entre Chiloé y las poblaciones continentales. Desde nuestro punto de vista, serían recomendables estrategias de manejo dirigidas a cruzar individuos en cautividad de diferentes poblaciones para establecer un grupo de individuos adicionales que sirvan de refuerzo en caso de catástrofes. El caso de *Urocyon littoralis* muestra un aumento de su población de estar casi extinta hasta alcanzar cerca de 4.000 individuos, gracias a un plan de manejo en cautividad, lo que le ha permitido bajar de la categoría de “en peligro crítico” que poseía en 2008 a la categoría de “casi amenazado” (Coonan, et al., 2013). Una población en cautividad o semicautividad serviría, a su vez, como laboratorio viviente para verificar el impacto genético y demográfico de tales acciones y para evaluar los posibles efectos sobre la aptitud biológica.

Finalmente, es necesario considerar la diversidad genética de las poblaciones para evaluar la categoría de amenaza, pues si bien hoy se conoce la presencia de nuevas poblaciones, éstas deben ser de tamaño reducido, aisladas y genéticamente pobres, pudiendo presentar cada una de ellas un alto riesgo de extinguirse.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jamett, G., Cleaveland, S. & Cunningham, A., 2010. Demography of domestic dogs in rural and urban areas of the Coquimbo region of Chile and implications for disease transmission. *Preventive Veterinary Medicine*. 94(3), 272-281.
- Aguilar, A., Roemer, G., Debenham, S., Binns, M., Garcelon, D. & Wayne, RK., 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 3490-3494.
- Almberg, E., David, LM., Smith, DW., Sheldon, JW. & Crabtree, RL., 2009. A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community. *Plos One*. 4(9), e7042.
- Almeida, AP., Souza, TD., Marcili, A. & Labruna, MB., 2013. Novel Ehrlichia and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 50, 640-646.
- Andre', MR., Adania, CH., Allegretti, SM. & Machado, RZ., 2011. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 42, 342-347.
- Babik, W., Pabijan, M., Arntzen, JW., Cogalniceanu, D., Durka, W. & Radwan, J 2009. Long-term survival of a urodele amphibian despite depleted major histocompatibility complex variation. *Molecular Ecology*. 18, 769-781.
- Banks, M., King, DP., Daniells, C., Stagg, DA. & Gavier-Widen, D., 2002. Partial characterization of a novel gammaherpesvirus isolated from a European badger (*Meles meles*). *Journal of General Virology*. 83, 1325-1330.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000 ed. Montpellier: Université de Montpellier II.

- Bonacic, C. & Abarca, K., 2014. Hacia una política y legislación para el control de poblaciones de cánidos y calidad de vida de las personas: un enfoque multidisciplinario. Santiago: Centro de Políticas Públicas Universidad Católica.
- Cabello, J. & Dávila, J., 2014. Isolation and characterization of microsatellite loci in Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*) and cross-amplification in other canid species. Conservation Genetics Resources. 6(3), 759-761.
- Cabello, J., Esperón, F., Napolitano, C., Hidalgo, E., Dávila, JA., Millan, J., 2013 Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*). Journal of General Virology. 94, 2745–2749.
- Cabello, V., 2015. Medidas corporales del zorro chilote (*Lycalopex fulvipes*). Valdivia: Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de médico veterinario.
- Cabrera, A., 1958. Catálogo de mamíferos de América de Sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". 4, 1-307.
- Caro, T. & Laurenson, M., 1994. Ecological and genetic-factors in conservation-a cautionary tale. Science. 263, 485–486.
- Castro-Prieto, A., Wachter, B. & Sommer, S., 2011. Population, Cheetah Paradigm Revisited: MHC Diversity in the World's Largest Free-Ranging. Molecular Biology and Evolution. 8(4), 1455-1468.
- Cleaveland, S., Appel, M., Chalmers, W., Chillingworth, C., Kaare, M. & Dye, C., 2000. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. Veterinary microbiology. 72(3), 217-227.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P. & Posada, D. C. K., 2002. TCS: Estimating gene genealogies. 2, 184., Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings.
- Clutton-Brock, J., Corbet, G. & Hills, M., 1976. A review of the family *Canidae*, with a classification by numerical methods. Bulletin of the British Museum (Natural History). 29, 117-99.

- Cofré, H. & Marquet, P., 1999. Conservation status, rarity, and geographic priorities for conservation of Chilean mammals: an assessment. *Biological Conservation*. 88, 53–68.
- Coonan, T., Ralls, K., Hudgens, B., Cypher, B. & Boser, C., 2013. *Urocyon littoralis*, e.T22781A13985603. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T22781A13985603>: The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
- Corbet, G. & Hill, J., 1980. *A World list of Mammalian Species*. New York: British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London.
- Dandár, E., Szabé, L., Heltai, M. & Doszpoly, A., 2010. Adenovírusok és herpesvírusok előfordulásának felmérése emlős ragadozók (*Carnivora*) mintáinak PCR-vizsgálatával: borz-herpesvírus első kimutatása Magyarországon. *Magy Állatorv Lapja*. 132, 302–308.
- Darwin, C., 1939. *El viaje del Beagle*. London: s.n.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J. & Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. 154, 171–177.
- Deem, S. & Emmons, L., 2005. Exposure of free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) to infection and parasitic disease agents in the Noél Kempff Mercado National Park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36 (2), 192–197.
- D'Elía, G., Ortlhoff, A., Sánchez, P., Guíñez, B. & Varas, V., 2013. A new geographic record of the endangered Darwin's Fox *Lycalopex fulvipes* (Carnivora: *Canidae*): filling the distributional gap. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86, 485–488.
- Do Nascimento, N.C., Santos, A.P., Guimaraes, A.M., Sanmiguel, P.J. & Messick, J.B., 2012. *Mycoplasma haemocanis* – the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary Research*. 43, 66.
- Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 4311–4315.
- Earl, D. & vonHoldt, B., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resource*. 4, 359–361.

- Ehlers, B., Dural, G., Yasmum, N., Lembo, T., de Thoisy, B., Ryser-Degiorgis, MP., Ulrich, RG. & McGeoch, DJ., 2008. Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer. *Journal of Virology*. 82, 3509–3516.
- Elgueta, E., Valenzuela, J. & Rau, J., 2007. New insights into the prey spectrum of Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes* Martin, 1837) on Chiloe' Island, Chile. *Mammalian Biology*. 3, 179–185.
- Ellegren, H., Hartman, G., Johansson, M. & Andersson, L., 1993. Major histocompatibility complex monomorphism and low-levels of DNA-fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(8), 8150-8153.
- Escobar, L., Qiao, H., Cabello, J. & Peterson, T., 2018. Ecological niche modeling re-examined: Darwin's fox. *Ecology and Evolution*. 1-14.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14, 2611–2620.
- Evermann, J., Heeney, JL., Roelke, ME., Mckeirman, AJ. & O'Brien, SJ., 1988. Biological and pathological consequences of feline infectious peritonitis virus-infection in the cheetah. *Archives Virology*. 102, 155–171.
- Excoffier, L. & Lischer, H., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-567.
- Fariás, A., Sepúlveda, MA., Silva-Rodríguez, EA., Eguren, A., González, D., Jordán, NI., Ovando, E., Stowhas, P. & Svensson, GL., 2014. A new population of Darwin's Fox (*Lycalopex fulvipes*) in the Valdivian Coastal Range. *Revista Chilena de Historia Natural*. 87, 1-3.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-79.
- Fernandez-Vina, M. & JD, B., 1997. *Primers* and oligonucleotide probes (SSOP) used for DNA typing of HLA class II alleles. In: e. D. Charron, ed. *HLA, genetic diversity of HLA*. Paris: EDK Press. 216–225.

- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A. & Roura, X., 2006. Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 137, 214–221.
- Frankham, R., 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics*. 29, 305–327.
- Fuentes, E. & Jaksic, F., 1979. Latitudinal Size Variation of Chilean Foxes: Tests of Alternative Hypotheses. *Ecology*. 60(1), 43–47.
- Funk, S. & Fiorello, C., 2001. The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: S. M. F. D. W. M. a. R. K. W. John L. Gittleman, ed. *Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. 443 p.
- Gagnon, CA., Tremblay, J., Larochelle, D., Music, N. & Tremblay, D., 2011. Identification of a novel herpesvirus associated with cutaneous ulcers in a fisher (*Martes pennanti*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23, 986–990.
- Galaverni, M., Caniglia, R., Fabbri, E., Lapalombella, S. & Randi, E., 2013. MHC Variability in an Isolated Wolf Population in Italy. *Journal of Heredity*. 104, 601–612.
- Giannitti, F., Diab, S.S., Uzal, F.A., Fresneda, K., Rossi, D., Talmi-Frank, D. & Baneth, G., 2012. Infection with a Hepatozoon sp. closely related to Hepatozoon felis in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex -Pseudalopex gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Veterinary Parasitology*. 186, 497–502.
- Gil, H., García-Esteban, C., Barandika, JF., Peig, J., Toledo, A., Escudero, R., Jado, I., Rodríguez-Vargas, M., García-Amil, C., Lobo, B. & Roales, P., 2010. Variability of Bartonella Genotypes among Small Mammals in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (24), 8062–8070.
- Goldstein, T., Lowenstine, LJ., Lipscomb, TP., Mazet, JA., Novak, J., Stott, JL. & Gulland, FM., 2006. Infection with a novel gammaherpesvirus in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Journal of Wildlife Diseases*. 42, 830–835.
- Goller, K., Fyumagwa, RD., Nikoli, V., East, ML., Kilewo, M., Speck, S., Müller, T., Maztke, M. & Wibbelt, G., 2010. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Veterinary Microbiology*. 146, 245–252.

- González-Acuña, D., Briceño, C., Cicchino, A., Funk, S., Jiménez, J., 2007. First records of *Trichodectes canis* (Insecta: Phthiraptera: *Trichodectidae*) from Darwin's fox, *Pseudalopex fulvipes* (Mammalia: Carnivora: *Canidae*). *European Journal of Wildlife Disease*. 53, 76-79.
- Gotelli, D., Marino, J., Sillero-Zubiri, C. & Funk, S., 2004. The effect of the last glacial age on speciation and population genetic structure of the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Molecular Ecology*. 13, 2275-2286.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2): Available from www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm.
- Greene, C.E., Breitschwerdt, E.B., 2006. Rocky Mountain spotted fever, murine typhuslike disease, rickettsialpox, typhus, and Q fever. In: Greene, C. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 232-245.
- Guimaraes, A.M.S., Javarousky, M.L., Bonat, M., Lacerda, O., Balbinotti, B., Queiroz, L.G.P.B., Timenetsky, J., Biondo, A.W., Messick, J.B., 2007. Molecular detection of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in a lion (*Panthera lion*) from a Brazilian zoological garden. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 49, 195-196.
- Guo, S. & Thompson, E., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48, 361-72.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hamilton, M., Pincus, E., Di Fiore, A. & Fleischer, R., 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*. 27, 500-507.
- Harvey, J.W., 2006. Hemotropic mycoplasmosis (hemobartonellosis). In: Green, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, Philadelphia. 252-260.
- Hedrick, P. & Kim, T., 2000. Genetics of complex polymorphisms: Parasites and maintenance of the major histocompatibility complex variation. In: R. Singh & C.

- (Krimbas, eds. *Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology*. Cambridge: University Press, Cambridge. 204-234.
- Hedrick, P., 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*. 16, 629-636.
- Hedrick, P., Lee, R. & Parker, K., 2000. Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity*. 85, 617-624.
- Heeney, J. Evermann, JF., McKeirnan, AJ., Marker-Kraus, L., Roelke, ME., Bush, M., Wildt, DE., Meltzer, DG., Colly, L. & Lukas, J., 1990. Prevalence and implications of feline coronavirus infections of captive and free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Virology*. 64, 1964-1972.
- Heusser, C., 1972. On the occurrence of *Lycopodium fuegianum* during late-Pleistocene interstades in the province of Osorno. Chile. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 99, 178-184.
- Hill, A., Allsop, C., Kwiatkowski, D., Antsey, N., Twumasi, P., Rowe, P., Bennet, D., McMichale, A. & Greenwood, B., 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 352, 595-600.
- Hirata, M., Tateno, M., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Shimokawa Miyama, T., Setoguchi, A., Endo, Y., 2012. An epidemiological survey of hemoplasma infection in Iriomote cats (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 74, 1531-1537.
- Hughes, A., 1991. MHC polymorphism and the design of captive breeding programs. *Conservation Biology*. 5, 249-251.
- Hughes, J. & Macdonald, D., 2013. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation*. 157, 341-351.
- Iriarte, A., 2008. *Mamíferos de Chile*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Iso, T., Suzuki, J., Sasaoka, F., Sashida, H., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Harasawa, R., 2013. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Veterinary Microbiology*. 163, 184-189.

- Jaksic, F., Jiménez, J., Medel, R. & Marquet, P., 1990. Habitat and diet of the Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes*) on the Chilean mainland. *Journal of Mammalogy*. 71, 246–248.
- Jiménez, J. & McMahon, E., 2004. Darwin's fox *Pseudalopex fulvipes* (Martin, 1837). In: C. Sillero-Zubiri, M. Hoffmann & D. E. Macdonald, eds. *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan*. Oxford: Glands and Oxford: IUCN/SSC Canid Specialist group. 50–55.
- Jiménez, J. E., Lucherini, M. & Novaro, A. J., 2012. *Pseudalopex fulvipes*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 24 January 2013.
- Jiménez, J., 2000. Viability of the endangered Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes*): assessing ecological factors in the last mainland population and its ecology on the island population., Chicago: Informe de avance (mayo 1999-agosto 2000) Lincoln Park Zoo Neotropical fund.
- Jiménez, J., 2005. El enigmático zorro de Darwin. en: Smith-Ramírez, C., Armesto, JJ., & Valdovinos, C., eds. *Historia, Biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*. Santiago: Editorial Universitaria.
- Jiménez, J., 2007. Ecology of a coastal population of the critically endangered Darwin's Fox (*Pseudalopex fulvipes*) on Chiloé Island, southern Chile. *Journal of Zoology*. 271, 63-77.
- Jiménez, J., Marquet, P., Medel, R. & Marquet, P., 1991. Comparative ecology of Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes*) in mainland and island settings of southern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 63, 177–186.
- Jiménez, J.E., Briceño, C., Alcaíno, H., Vásquez, P., Funk, S., González-Acuña, D., 2012. Coprologic survey of endoparasites from Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes*) in Chiloé, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44, 93–97.
- Jiménez, J.E., Lucherini, M., Novaro, A.J., 2008. *Pseudalopex fulvipes*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2., www.iucnredlist.org (downloaded on 20.02.13).
- Kennedy, L., Randall, D.A., Knobel, D., Brown, J.J., Fooks, A.R., Argaw, K., Shiferaw, F., Ollier, W.E.R., Sillero-Zubiri, C., Macdonald, D.W. & Laurenson, M.K., 2011. Major

- histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Tissue Antigens*. 77, 118-125.
- Kenny, MJ., Shaw, SE., Beugnet, F. & Tasker, S., 2004. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French Dogs *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 5397–5399.
- King, DR., Mutukwa, N., Lesellier, S., Cheeseman, C., Chambers, MA. & Banks, M., 2004. Detection of mustelid herpesvirus-1 infected European badgers (*Meles meles*) in the British Isles. *Journal of Wildlife Diseases*. 40, 99–102.
- Klein, J., Takahata, N. & Ayala, F., 1993. MHC polymorphism and human origins. *Scientific American*. 269, 78–83.
- Krengel, A., Meli, ML., Cattori, V., Wachter, B., Willi, B., Thalwitzer, S., Melzheimer, J., Hofer, H., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R., 2013. First evidence of hemoplasma infection in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Microbiology*. 162, 972–976.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 bigger dataset. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7), 1870–1874.
- Lachish, S., Jones, M. & Mccallum, H., 2007. The impact of disease on the survival and population growth rate of the Tasmanian devil. *Journal of Animal Ecology*. 76, 926–936.
- Langguth, A., 1969. Die südamerikanischen *Canidae* unter besonderer Berücksichtigung des Mahnenwolfes *Crysocyon brachyurus* Illiger. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. 179, 1-88.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., McGettigan, PA., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, IM., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD., Gibson, TJ. & Higgins, DG., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948.
- Laurenson, K., Sillero-Zubiri, C., Thompson, H., Shiferaw, F., Thirgood, S. & Malcom, LJ., 1998. Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conservation*. 1, 273-280.

- Leigh, J., Bryant, D. & Nakagawa, S., 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6 (doi:10.1111/2041-210X.12410). 1110-1116.
- Lyles, A. & Dobson, A., 1993. Infectious disease and intensive management: population dynamics, threatened host, and their parasites. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 24, 315-326.
- Macdonald, D., Sillero-Zubiri, C. &., 2004. *Biology and conservation of wild canids*. Eds ed. Oxford: Oxford University Press.
- Maggi, RG., Harms, CA., Hohn, AA., Pabst, DA., McLellan, WA., Walton, WJ., Rotstein, DS. & Breitschwerdt, EB., 2005. *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerging Infectious Disease journal*. 11, 1894–1898.
- Mainguy, J., Worley, K., Côte, D. & Coltman, D., 2007. Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites. *Conservation Genetics*. 8, 885-891.
- Marsden, C., Mable, B., Rasmussen, G., Cleaveland, S., McNutt, JW., Emmanuel, M., Thomas, R. & Kennedy, L., 2009. Highly endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*) lack variation at the Major Histocompatibility Complex. *Journal of Heredity*. 100(1), S54-S6.
- Martin, W., 1837. Observations upon a new fox from Darwin's collection (*Vulpes fulvipes*). *Proceedings of the Zoological Society of London*. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1831, 11-12.
- Matchett, M. Biggins, DE., Carlson, V., Powell, B. & Rocke, T., 2010. Enzootic plague reduces black-footed (*Mustela nigripes*) Survival in Montana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(1), p. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0053>.
- McCallum, H., Dobson, A., 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*. 10, 190–194.
- McMahon, E., Fuller, T. & Johnson, W., 1999. *Ecología y conservación en los zorros simpátricos de Chile*. Progress report for SAG and CONAF, Temuco: s.n.
- Medel, R., Jiménez, JE., Jaksic, FM., Yáñez, JL. & Armesto, JJ., 1990. Discovery of a continental population of the rare Darwin's fox, *Dusicyon fulvipes* (Martin 1837) in Chile. *Biological Conservation*. 51, 71–77.

- Merola, M., 1994. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. *Conservation Biology*. 8, 961–971.
- Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S. & León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Journal*. 182, 114–124.
- Miller, Conrad, P.A., Harris, M., Hatfield, B., Langlois, G., Jessup, D., Magargal, S.P., Packham, A.E., Toy-Choutka, S., Melli, A., Murrayf., Gulland, F.M. & Grigg, M.E., 2010. A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: Mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. *Veterinary Parasitology*. 172, 183–194.
- MINSEGPRES, 2007. Reglamento de Clasificación de especies. Santiago: Ministerio General de la Presidencia. Chile. Decreto Supremo N°151 del 6 de diciembre de 2006, Diario Oficial el 24 de marzo de 2007.
- Moreira-Arce, D., Vergara, P., Boutin, S., Simonetti, J., Briceño, C. & Acosta-Jamette, G., 2015. Native forest replacement by exotic plantations triggers changes in prey selection of mesocarnivores. *Biological Conservation*. 192, 258–267.
- Moreira-Arce, D., Vergara, P. & Boutin, S., 2015. Diurnal human activity and introduced species affect occurrence of carnivores in a human-dominated landscape. *Plos One*. 10(9), e0137854.
- Munson, L., Terio, K.A., Kock, R., Mlengeya, T., Roelke, M.E., Dubovi, E., Summers, B., Sinclair, A.R.E., Packer, C., 2008. Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. *PLoS ONE*. 3, e2545.
- Murray, D., Kapke, C., Evermann, J. & Fuller, T., 1999. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*. 2, 241–254.
- Niskanen, A. Kennedy, L.J., Ruokonen, M., Kojola, I., Lohi, H., Isomursu, M., Jansson, E., Pyhäjärvi, T. & Aspi, J., 2014. Balancing selection and heterozygote advantage in major histocompatibility complex loci of the bottlenecked Finnish wolf population. *Molecular Ecology*. 23(8), 875–889.
- Nowak, R., 1991. *Walker's mammals of the World*. 4th Edition ed. Baltimore, Maryland: Johns Hopking Univ. Press.

- O'Brien, S., Roelke, ME., Marker, L., Newman, A., Winkler, CA., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, JF., Bush, M. & Wildt, DE., 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*. 227, 1428-1434.
- O'Brien, S. & Evermann, J., 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural population. *Trends in Ecology and Evolution*. 3, 254-259.
- O'brien, S., Wildt, D., Goldman, D., Merrill, C. & Bush, M., 1983. The Cheetah Is Depauperate in Genetic Variation. *Science*. 221, 459-461.
- OPS, 2003. Resumen de la situación de los programas de rabia en la América Latina. Informe final. RIMS 13/INF/2, 36-70., s.l.: Organización Panamericana de Salud.
- Osgood, W., 1943. The mammals of Chile. *Field Mus. Field Museum of Natural History, Zoological Series*. 30, 1-268.
- Oyarzún, S., 2007. Estudio coproparasitario de perros (*Canis lupus familiaris*) que viven en co-ocurrencia con el zorro de darwin (*Lycalopex fulvipes*) en la cordillera de nahuelbuta. Puerto Montt: Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia.
- Paterson, S., Wilson, K. & Pemberton, J., 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 3714–3719.
- Patitucci, AN., Perez, MJ., Rozas, MA., Israel, KF., 2001. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 33, 227–232.
- Peakall, R. & Smouse, P., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288–295.
- Petit, R., El Mousadik, A. & Pons, O., 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*. 12, 844–855.
- Pine, R., Miller, S. & Schramberger, M. L., 1979. Contributions to the mammology of Chile. *Mammalia*. 43, 339-376.

- Ploshnitsa, A., Goltsman, ME., Macdonald, DW., Kennedy, LJ. & Sommer, S., 2011. Impact of historical founder effects and a recent bottleneck on MHC variability in Commander Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *Ecology and Evolution*. 165-180.
- Ploshnitsa, A., Goltsman, ME., Macdonald, DW., Kennedy, LJ. & Sommer, S., 2012. Impact of historical founder effects and a recent bottleneck on MHC variability in Commander Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *Ecology and Evolution*. 2, 165–180.
- Posada, D., 2004. Collapse1.2. Program free available at <http://darwin.uvigo.es/>.
- Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25, 1253–1256.
- Pritchard, J., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155, 945–959.
- Radwan, J., Biedrzycka, A. & Babik, W., 2010. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation*. 143, 537-544.
- Rambaut A., 2012. FigTree v1.4.2 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86, 248-249.
- Reif, KE., Macaluso, KR., 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *Journal of Medical Entomology*. 46, 723–736.
- Rice, W., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43, 223–225.
- Rodríguez-Moreno, I., Olmeda, AS., García-Pérez, AL. & Anda, P., 2010. Variability of Bartonella genotypes among small mammals in Spain. *Applied Environmental Microbiology*. 76, 8062–8070.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, DL., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, MA. & Huelsenbeck, JP., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61, 539–542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, JC., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, SE. & Sánchez-García, A., 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis og Large Dataset. *Molecular Biology and Evolution*. 34, 3299-3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

- Sasaki, M., Ohta, K., Matsuu, A., Hirata, H., Ikadai, H., Oyamada, T., 2008. A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. *Journal of Protozoology Research*. 18, 57–60.
- Schneider, S. & Lischer, H., 2009. ARLEQUIN, version 3.5. An integrated software package for population genetics data analysis. Berne: University of Berne.
- Schwartz, M., Liker, G. & Wales, R., 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*. 22, 25–33.
- Scott, ME., 1988. The impact of infectious disease on animal populations, implications for conservation biology. *Conservation Biology*. 2, 40–65.
- Sérsic, A., Cosacov, A., Cocucci, AA., Johnson, L., Pozner, R., Avila, LJ., Sites, JW. & Morando, M., 2011. Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 103, 475–494.
- Siddle, H. et al., 2007. Transmission of a fatal clonal tumor by biting occurs due to depleted MHC diversity in a threatened carnivorous marsupial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 16221–16226.
- Silva-Rodríguez, E., Farias, A., Moreira-Arce, D., Cabello, J., Hidalgo-Hermoso, E., Lucherini, M. & Jiménez, J., 2016. *Lycalopex fulvipes* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species. [Online]
- Silva-Rodríguez, E., Ovandoc, E., González, D., Zambranod, B., Sepúlveda, M., Svensson, G., Cárdenas, R., Contreras, P. & Farías, A., 2018. Large-scale assessment of the presence of Darwin's fox across its newly discovered range. *Mammalian Biology*. 92, 45–53.
- Silva-Rodríguez, E., Ortega-Solis, G. & Jimenez, J., 2010. Conservation and ecological implications of the use of space by chilla foxes and free-ranging dogs in a humandominated landscape in southern Chile. *Austral Ecology*. 35, 765–777.
- Sykes, JE., Ball, LM., Bailiff, NL. & Fry, MM., 2005. 'Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 27–30.

- Tamayo, M. & Frassinetti, D., 1980. Catálogo de los mamíferos fósiles y vivientes de Chile. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. 37, 323-99.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24, 1596–1599.
- Tasker, S., Helps, CR., Day, MJ., Harbour, DA., Shaw, SE., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, RG., Malik, R., Beaufils, JP., Belford, CR. & Gruffydd-Jones, TJ., 2003. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. Journal of Clinical Microbiology. 41, 3877–3880.
- Tchaicka, L., Eizirik, E., de Oliveira, TG., Cándido, JF. & Freitas, TR., 2006. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). Molecular Ecology. 16, 819-838.
- Templeton, A., Crandall, K. & Sing, S., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. Genetics. 132, 619-633.
- Timm, S., Munson, L., Summers, BA., Terio, KA., Dubovi, EJ., Rupprecht, ChE., Kapil, S. & Garcelon, DK., 2009. A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline un Satna Catalina Island Foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). Journal of Wildlife Disease. 45(2), 333-343.
- Tseng, M., Fleetwood, M., Reed, A., Gill, VA., Harris, RK., Moeller, RB., Lipscomb, TP., Mazet, JA. & Goldstein, T., 2012. Mustelid herpesvirus-2, a novel herpes infection in northern sea otters (*Enhydra lutris kenyoni*). Journal of Wildlife Disease. 48, 181–185.
- UICN, 2018. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41586A107263066
- VanDevanter, DR., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, ER., Coulter, S., Garber, RL. & Rose, TM. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus *primer* PCR. Journal of Clinical Microbiology. 34, 1666–1671.
- Vilà, C., Leonard, J., Iriarte, A., O'Brien, S., Johnson, W. & Wayne, R., 2004. Detecting the vanishing populations of the highly endangered Darwin's fox, *Pseudalopex fulvipes*. Animal Conservation. 7, 147–153.

- Villagrán, C., 1988. Late Quaternary vegetation of Southern Isla Grande de Chiloé, Chile. *Quaternary Research*. 29, 294–306.
- Villagrán, C., 1995. Quaternary History of the Mediterranean Vegetation of Chile. In: P. Z. a. M. F. M. Kalin, ed. *Ecology and Biogeography of Mediterranean ecosystem in Chile, California and Australia*. New York: Springer Verlag. 3-20.
- Wayne, R., GeVen, E., Girman, DJ., KoeppXi, KP., Lau, LM. & Marshall, CR., 1997. Molecular systematics of the *Canidae*. *Systematic Biology*. 46, 622-653.
- Wayne, R., Geffen, E. & Vilà, C., 2004. Population genetics: population and conservation genetics of canids. In: D. & S. C. (. Macdonald, ed. *The biology and conservation of wild canids*. Oxford: Oxford University Press. 55–84.
- Weber, D., Stewart, B., Schienman, J. & Lehman, N., 2004. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology*. 13, 711-718.
- Wedincamp, J., Foil, LD., 2000. Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (*Ctenocephalides felis* Bouche, 1835) infected with *Rickettsia felis*. *Journal of Vector Ecology*. 25, 123–126.
- Wellehan, JF., Johnson, AJ., Childress, AL., Harr, KE. & Isaza, R., 2008. Six novel gammaherpesviruses of Afrotheria provide insight into the early divergence of the *Gammaherpesvirinae*. *Veterinary Microbiology*. 127, 249–257.
- Wideén, F., Das Neves, CG., Ruiz-Fons, F., Reid, HW., Kuiken, T., Gavier-Widén, D. & Kaleta, EF., 2012. Herpesvirus infections. In *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*, pp. 19–53. Edited by D. Gavier-Widen, A. Meredith & J. P. Duff. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Willi, B., Boretti, FS., Cattori, V., Tasker, S., Meli, ML., Reusch, C., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R., 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2581–2585.
- Willi, B., Filoni, C., Catao-Dias, JL., Cattori, V., Meli, ML., Vargas, A., Martinez, F., Roelke, ME., Ryser-Degiorgis, MP., Leutenegger, CM., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R., 2007. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 1159–1166.

- Wong, PB., Wiley, EO., Johnson, WE., Ryder, OA., O'Brien, SJ., Haussler, D., Koepfli, KP., Houck, ML., Perelman, P., Mastromonaco, G., Bentley, AC., Venkatesh, B., Zhang, YP., Murphy, RW. & G10KCOS, 2012. T sampling methods and standards for vertebrate genomics. *Gigascience*. 1, 8.
- Yahnke, C., Johnson, WE., Geffen, E., Smith, D., Hertel, F., Roy, MS., Bonacic, CF., Fuller, TK., Van Valkenburgh, B. & Wayne, K., 1996. Darwin's fox: a distinct endangered species in a vanishing habitat. *Conservation Biology*. 10, 366–375.
- Zhu, L., Ruan, XD., Ge, YF., Wan, QH. & Fang, SG., 2007. Low major histocompatibility complex class II DQA diversity in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *BMC Genetics*. 8, 29.

CAPÍTULO III. RANITA DE DARWIN (*Rhinoderma darwinii*)



INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO

Actualmente los anfibios, el grupo de vertebrados menos representado en Chile (Méndez & Correa, 2008), se clasifican en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Gymnophiona (cecilias) y Caudata (salamandras). Estos organismos presentan una característica singular dentro de los vertebrados, ya que realizan una diferenciación total durante su desarrollo, a través del proceso de metamorfosis. En Chile sólo encontramos representantes del orden Anura, con 63 especies nativas descritas a la fecha, reunidas en siete familias (*Alsodidae*, *Bufo*nidae, *Batrachylidae*, *Calyptocephalellidae*, *Leptodactylidae*, *Rhinodermatidae* y *Telmatobiidae*) sumándose una especie exótica invasora, la rana africana (*Xenopus laevis*) perteneciente a la familia *Pipidae* (Lobos, et al., 2013), siendo el 66,1% de estas, especies endémicas de Chile. Comparado con otros países, Chile ocupa el undécimo lugar en número de especies endémicas y el decimotercer en porcentaje de especies anfibias en peligro de extinción o extintas, siendo este grupo de animales los vertebrados con mayor endemismo de Chile y el grupo con la tasa más alta de especies amenazadas (36,2%) (Stuart, et al., 2008).

La mayor riqueza de especies nativas de anfibios se concentra en los bosques templados del centro y sur de Chile, en la ecorregión de bosque valdiviano, donde se conjugan los ambientes más húmedos con temperaturas adecuadas para este grupo (Lobos, et al., 2013). La familia *Rhinodermatidae*, propia de estos bosques, posee dos especies, siendo *Rhinoderma darwinii* la más común y la que tiene el rango de distribución más amplio, no habiendo registros de *R. rufum* desde 1980 (Penna & Veloso, 1990).

R. darwinii, conocida en Chile como ranita de Darwin, sapito vaquero, sapito partero o rana narigona, es un ejemplo de anfibio chileno único y en peligro de extinción. Se caracterizan por una prolongación nasal, colores y patrones dorsales similares a las hojas, con tonos que pueden variar de verde, pardusca o café; vientre negro brillante con manchas blancas, extendiéndose la pigmentación hasta las membranas interdigitales (Cei, 1962). Se han descrito cambios en la coloración como una adaptación para coincidir con los colores de fondo en un entorno que consiste en micro hábitats espectralmente heterogéneos (Bourke, et al., 2011) permitiéndole utilizar más de un micro hábitat al tiempo que reduce el riesgo de depredación (Stevens & Cuthill, 2006).

Su longitud corporal oscila generalmente entre 25-30 mm. Tiene cabeza de forma triangular, caracterizada por un apéndice nasal cilíndrico que le confiere un aspecto puntiagudo. Sus extremidades son largas y delgadas; las posteriores, con membrana de desarrollo moderado entre los dedos, estando ausente entre el 4^{to} y 5^{to} dedo.

R. darwinii es carnívoro generalista (Díaz-Páez & Ortiz, 2003) con un característico comportamiento de búsqueda de "sentarse y esperar" (Crump, 2002). Tiene un desarrollo directo, sin existencia de vida larvaria libre en medio acuático pues ha desarrollado una forma altamente especializada de transporte y crianza de sus renacuajos, conocida como neomelia (Bürger, 1905). Las hembras depositan los huevos en áreas húmedas y aisladas, como musgos y hojarasca, no describiéndose cuidado de los huevos por parte de los padres (Valenzuela-Sánchez, et al., 2014). Después del comienzo del movimiento larval dentro de los huevos (19 a 25 días post fertilización) los machos incorporan los renacuajos en sus sacos vocales por un período de 6-8 semanas, tiempo durante el cual les suministra un fluido de alimentación, produciéndose la metamorfosis. Finalmente, los juveniles son regurgitados en el ambiente terrestre ya desarrollados (Goicoechea, et al., 1986). Este sistema sofisticado de cría se ha comparado con la incubación de huevos en el estómago de las ya extintas ranas australianas *Rheobatrachus silus* (Bourke, 2012).

La ranita de Darwin es una rana terrestre que habita el bosque templado de sur de Chile y Argentina, utilizando generalmente la hojarasca de bosques templados de *Nothofagus*, aunque también está presente en las turberas del bosque. No es muy tolerante a la perturbación del hábitat, ya que se ha encontrado consistentemente dentro de bosques nativos bien mantenidos y, como máximo, dentro del bosque nativo donde tiene lugar la recolección de leña (Soto-Azat, et al., 2013).

En general tienen un rango de hogar pequeño si se le compara con otros anuros ($1,82 \pm 0,54 \text{ m}^2$; rango 0,1– 6 m^2), con una correlación positiva al tamaño corporal, no existiendo diferencias entre sexos o estado de desarrollo. Tampoco hay evidencias de territorialidad en machos, habiendo gran solapamiento y asociación entre diferentes grupos, en contraste con las hembras que no exhiben solapamiento y muestran poca asociación entre grupos (Valenzuela-Sánchez, et al., 2014).

Históricamente, se distribuyó en Chile desde Concepción a la provincia de Aysén (figura 24) siendo relativamente abundante hasta 1980. Actualmente se sabe de la existencia de ranita de Darwin en 56 localidades de las cuales sólo 16 corresponden a los 103 sitios históricos conocidos desde 1834 (UICN SSC Amphibian Specialist Group, 2018) presentando una fuerte declinación de las poblaciones meridionales, hasta la aparente desaparición de algunas de sus poblaciones (Crump & Veloso, 2005).

A pesar de que la especie tiene un amplio rango de distribución, se ha encontrado que las poblaciones ocupan áreas circunscritas dentro de un hábitat adecuado (UICN SSC Amphibian Specialist Group, 2018) estimando que cada área no sería mayor a 4 km², o incluso menos de 300 m² para algunas subpoblaciones (Soto-Azat, et al., 2013b), las cuales estarían formadas por entre 10-105 individuos incluidos adultos y juveniles (Soto-Azat, et al., 2013b).

R. darwinii está clasificada en Chile como “En Peligro” de extinción (MINGESPRES, 2008), idéntica categoría que presenta a nivel internacional (UICN SSC Amphibian Specialist Group, 2018), siendo su principal amenaza la modificación y destrucción de su hábitat para plantaciones forestales, sobre todo en la zona norte de su distribución (Soto-Azat, et al., 2013), donde *Pinus radiata* y *Eucalyptus* producirían cambios drásticos en la humedad atmosférica y de sustrato, temperatura del aire, luminosidad y velocidad de los vientos (Vallan, 2002). A esto se suma el cambio de uso de suelo de bosque nativo a zonas de agricultura, especialmente en el centro de Chile (Smith-Ramírez, 2004); los procesos naturales como erupciones volcánicas; la introducción de especies exóticas como *Xenopus laevis* (Soto-Azat, et al., 2013b) y la chytridiomycosis, enfermedad causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bourke, et al., 2010; Soto-Azat, et al., 2013).

Las medidas de conservación en la actualidad se remiten a las áreas protegidas públicas y privadas, dos iniciativas de reproducción ex situ (Bourke, 2010; Busse, 2004), y algunas asociaciones entre Universidades Chilenas, extranjeras, ONGs y el sector privado, para investigar y brindar mayor protección a la especie.



Figura 24. Distribución de ranita de Darwin (UICN, 2018) ■ Presencia ■ Posiblemente extinto.

No hay estudios conducentes a evaluar la estructura poblacional o la diversidad genética de sus poblaciones, siendo un aspecto importante a considerar para tomar medidas de conservación. Con el propósito de contribuir a aumentar los conocimientos de esta especie, el objetivo de este capítulo es determinar la filogeografía de *R. darwinii*.

ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO DE *Rhinoderma darwini*

Materiales y métodos

Se recopilaron 243 muestras de ranita de Darwin entre el año 2008 y 2012. 98 muestras fueron solicitadas a museos de Europa y Chile, las cuales fueron recolectadas en el centro y Sur de su distribución entre 1835 y 1989. 140 muestras fueron de hisopados bucales (MW100, Medical & Wire Equipment Co.) y 5 de individuos colectados en trabajo de campo. Para los hisopados bucales los animales fueron capturados de acuerdo a metodologías descritas previamente (Soto-Azat, et al., 2013a) y relacionadas a otras investigaciones. Los algodones de cada hisopado fueron almacenados dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml. Las muestras corresponden a 26 localidades continentales y 9 de la Isla de Chiloé en gran parte de su distribución geográfica (tabla 28, 29 y figura 25).

Tabla 28. Localización y tipo de muestra obtenida de ranita de Darwin en la Isla de Chiloé.

	Localidad	Población	Georreferencia	Swabs	tejido museo	larva	Juvenil	To
1	Senda Darwin	Chiloé	41°53'0.4"S, 73°39'56"O	6				6
2	El Quilar	Chiloé	41°56'21"S, 73°37'3"O		5			5
3	Caulín	Chiloé	41°49'38"S, 73°42'11"O	1				1
4	Alerzales, Cucao	Chiloé	42°36'53"S, 74° 6'24"O	5				5
5	Isla Tranqui	Chiloé	42°55'25"S, 73°32'30"O	9				9
6	Pirámide, Tantauco	Chiloé	43° 8'46"S, 74°12'10"O			1		1
7	Huillín, Tantauco	Chiloé	43°12'34"S, 74° 9'00"O	6				6
8	Yaldad, Tantauco	Chiloé	43° 7'3.5"S, 73°56'33"O	8				8
9	Inio, Tantauco	Chiloé	43°20'39"S, 74° 6'44"O	7			1	8
10	S/I	Chiloé	S/I		2			2
				42	7	1	1	51

Tabla 29. Localización y tipo de muestra obtenida de ranita de Darwin en el continente.

	Localidad	Población	Georreferencia	Swabs	tejido museo	Adulto/Juvenil	To
1	Paredones	Maule	34°39'41"S, 71°52'20"O		1		1
2	Isla Mocha	Biobío	38°22'23"S, 73°54'38"O		5		5
3	Contulmo	Biobío	37°56'39"S, 73°13'46"O	5	12	1	18
4	Butamalal	Biobío	37°48'17"S, 73° 2'54"O	4			4
5	Ramadilla	Biobío	37°18'10"S, 73°15'11."O		3		3
6	Nahuelbuta	Biobío	37°42'42"S, 73° 7'2"O		2		2
7	Concepción	Biobío	36°51'19"S, 72°58'38"O		4		4
8	Nahuelbuta	Araucanía	37°48'53"S, 72°58'54"O		11		11
9	Villarrica	Araucanía	39°26'57"S, 71°42'11"O	16			16
10	Valdivia	Los Ríos	39°49'10"S, 73°14'42"O		9		9
11	Coñaripe	Los Ríos	39°33'38"S, 72° 0'32"O	3			3
12	La Unión	Los Ríos	40° 9'53"S, 73°39'30"O		1		1
13	Huilo-Huilo	Los Ríos	39°51'32"S, 71°54'22"O	55			55
14	Mehuín	Los Ríos	39°25'56"S, 73°12'44"O		10		10
15	Alerce Costero	Los Ríos	40°12'14"S, 73°29'9"O	2			2
16	Bahía mansa	Los Lagos	40°35'10"S, 73°43'44"O		4		4
17	Pucatrihue	Los Lagos	40°32'14"S, 73°42'36"O		3		3
18	Puyehue	Los Lagos	40°42'22"S, 72°18'14"O	12			12
19	PN Vicente Pérez Rosales	Los Lagos	41° 3'6"S, 72° 2'49"O		11		11
20	Llanquihue	Los Lagos	41° 3'45"S, 72°38'38"O		1		1
21	Caleta el Manzano	Los Lagos	42° 1'39"S, 72°38'21"O		9		9
22	Cerro derrumbes	Los Lagos	41° 8'15"S, 72°11'19.97"O		2		2
23	Lago Yelcho	Los Lagos	43°14'2"S, 72°24'11"O		1		1
23	Puerto Montt	Los Lagos	41°28'49"S, 72°51'53"O		1		1
24	HMIM	Los Lagos	Sin información	1			1
25	Puyuhuapi	Aysén	44°14'20"S, 72°31'6"O		1		1
26	Angostura	Aysén	44°19'10"S, 72°33'39"O			2	2
				98	91	3	192

Todas las muestras fueron individualizadas, georreferenciadas y registradas en una base de datos (anexo 3); almacenadas con 4 volúmenes de etanol absoluto y conservadas a no más de -18° C hasta su procesamiento en laboratorio.

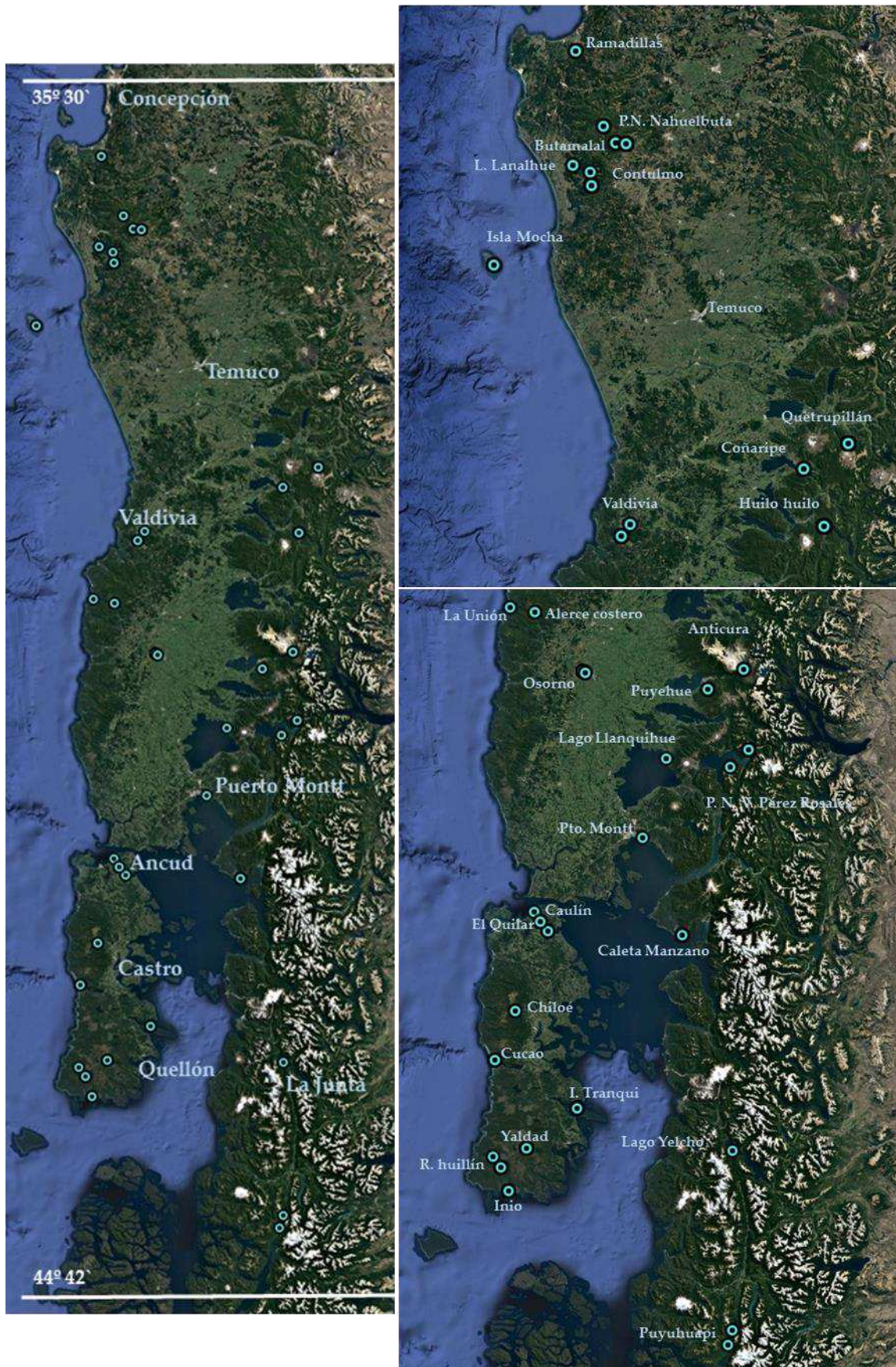


Figura 25. Distribución geográfica de las localidades de muestreo.

Extracción de ADN

Las muestras de museo (trozos de dedo) fueron cortadas en diminutos trozos y una pequeña cantidad (10 mg) fue traspasada a un tubo eppendorf de 1,5 ml para extraer el ADN genómico utilizando QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) con las indicaciones establecidas por el fabricante.

Las muestras de hisopados bucales primero fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 90 minutos eliminando el etanol con una micropipeta, para extraer el ADN utilizando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez extraído el ADN, fue cuantificado mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000 y, en caso necesario, las concentraciones fueron reajustadas para tener unos 50 ng/μl y almacenadas a no más de -18° C hasta su utilización.

Amplificación y secuenciación de fragmentos mitocondriales.

Para amplificar el gen mitocondrial ND2 se extrajeron de la literatura los *primers* L4437 y H5697, previamente utilizados por Macey et al (1997) para amplificar ND2 de otros anfibios dando un fragmento de 1.125 pb. Debido a la calidad de las muestras y la dificultad de amplificar este segmento en ADN degradado, se diseñaron *primers* internos (figura 26) para obtener la secuencia de 1.125 pb de manera parcializada. Las secuencias de los *primers*, los tamaños de productos de PCR y las temperaturas de *annealing* se muestran en la tabla 30.



Figura 26. Posición de los *primers* internos diseñados en este estudio para amplificar ND2.

Tabla 30. Secuencias de *primers* mitocondriales empleados en este estudio.

<i>Primer</i>	Secuencia	T° C	Pb
L4437	5'-AAGCTTTTGGGCCCCATACC-3'	58°	1284
H5697	5'-CGCTGGATAGAGYGTTCAGC-3'		
L4437	5'-AAGCTTTTGGGCCCCATACC-3'	55°	380
Rda-R1	5'-GGGGCGARTCCYAGTTTAA-3'		
Rda-F1	5'-CAAGCAACAGCATCAGCAC-3'	62°	330
Rda-R2	5'-TTGGTTAATRCCYCTCAGC-3'		
Rda-F2	5'-AGCCCCTATARYACTTCTAA-3'	56°	356
Rda-R3	5'-GGAGACCYCTTAGTGAGAGT-3'		
Rda-F3	5'-CYRAAYTATCAACCTCYTG-3'	53°	335
Rda-R4	5'-TATTGGGGAAATTGGGAG-3'		
Rda-F4	5'-CTCTTACACTAGCCCCAAA-3'	57°	332
H5697	5'-AAGCTTTTGGGCCCCATACC-3'		

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando 50 ng de ADN, tampón 10X con 2mM MgCl₂ (Biotools), 0,1 mM de cada dNTP (Biotools), 0,5 µM de cada *primer* y 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools). Las amplificaciones de PCR se realizaron en termocicladores Gene Amp® PCR System 2700 (Applied biosystems) e iCycler v.2.039 (Bio-Rad) y consistieron en una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de una desnaturalización a 94° C por 30 s, un *annealing* de acuerdo a la tabla anterior por 30 s y una extensión a 72° C por 30 s, además de una extensión final a 72° C por 5 minutos.

Las muestras amplificadas fueron entonces purificadas por medio de MinElute PCR Purification KIT (Qiagen, Chatsworth, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría utilizando Nanodrop 2000.

Se secuenciaron las dos cadenas utilizando BigDye® Terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) y limpiando las reacciones con BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secuencias se resolvieron en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi).

Las muestras de las cuales no se pudieron obtener secuencias claras y completas después de tres intentos de PCRs y/o reacciones de secuenciación independientes fueron excluidas de los análisis.

Análisis de secuencias

Se trabajó con dos grupos de secuencias de acuerdo a su factibilidad de amplificación. Un grupo de 1.125 pb y otro con 297 pb obtenido con la pareja de *primers* L4437 y Rda-R1. El resto de los fragmentos secuenciados no fueron incluidos en los análisis.

Todas las secuencias fueron editadas en BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999). Las secuencias mitocondriales se alinearon mediante el programa ClustalX versión 2.0 (Larkin et al., 2007). Todas las secuencias fueron colapsadas para obtener haplotipos únicos utilizando el programa Collapse versión 1.2 (Posada, 2004).

El programa JModeltest versión 0.1.1 (Posada, 2008) fue utilizado para estimar el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajusta a nuestros datos utilizando *Akaike Information Criterion* (AIC). El modelo seleccionado para el grupo de 1.125 pb fue General Time Reversible (GTR) asumiendo una proporción de sitios invariables y distribución gamma. Para el grupo de 297 pb, el modelo fue Hasegawa-Kishino-Yano con una distribución gamma (HKY+G). Los árboles fueron enraizados con secuencias de *Pseudacris crucifer*.

Se construyeron árboles filogenéticos utilizando Inferencia Bayesiana y *Maximum Likelihood*. El árbol de análisis bayesiano fue implementado en el programa MrBayes 3.2.1x64 (Ronquist, et al., 2012). Se llevaron a cabo 4 carreras independientes de 4 cadenas (MCMC) con 10 millones de generaciones cada una, comenzando con árboles al azar. Se realizaron muestreos a intervalos de 1.000 generaciones para incluir 10.000 puntos de datos. El 25% de los primeros árboles de la muestra fueron descartados para asegurar la estabilización de la muestra y, el restante, utilizado para calcular un árbol de consenso. La frecuencia de corte fue bajo 0,01, confirmando que el muestreo fue dentro de la distribución de la probabilidad posterior. Se utilizó el programa FigTree versión 1.4.2 (Raumbaut, 2012) para dibujar un árbol consenso.

Maximum Likelihood fue implementado en el programa Mega 7.0 (Kumar, et al., 2015) utilizando el mismo modelo evolutivo dado por JModeltest. El soporte estadístico para los distintos nodos en el árbol filogenético se evaluó con un re-muestreo de 1.000 bootstrap (Felsenstein, 1985). Este análisis intenta identificar el árbol que tiene la mayor probabilidad de producirse dadas nuestras secuencias.

Se construyó una red de haplotipos (Templeton et al., 1992) para cada una de las secuencias mitocondriales amplificadas. Este método une todos los pares de secuencias que tienen una probabilidad de parsimonia mayor del 0,95. El cladograma fue construido mediante el algoritmo TCS Network (Clement, et al., 2000) en el programa PopArt (Leigh, et al., 2015).

Para estudiar la diversidad genética encontrada, la muestra se dividió en 2 poblaciones arbitrarias: Chiloé y Continente (que incluye Biobío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos), además de un haplotipo de Patagonia. Se utilizó el programa DnaSP v.6 (Rozas, et al., 2017) para el análisis sitios polimórficos y medidas de diversidad de las secuencias.

Finalmente, se estimó el tiempo de divergencia entre los grupos utilizando el análisis de coalescencia bayesiana implementada en el programa BEAST v1.8.2 (Drummond et al., 2012) con el fragmento de mayor tamaño por ser más informativo. Se utilizó el modelo GTR+G+I de acuerdo a lo obtenido por JModeltest y la disponibilidad del programa BEAST. Se usó un reloj estricto para estimar el Ancestro Común Más Reciente (MRCA) con una tasa evolutiva de 0,957% utilizada previamente en estudios de anfibios (Crawford, 2003). Se hicieron dos carreras independientes con 20.000.000 de generaciones cada una, y con muestreos cada 2.000 pasos. Se utilizó el programa Tracer v1.6.0 (Rambaut et al., 2013) para analizar los archivos y Logcombiner v1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2013a) para combinar los resultados de ambas carreras. Los árboles muestreados se resumieron en Treeannotator v1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2013b) descartando el 10% de las muestras totales. Finalmente, el árbol resultante fue visualizado en FigTree versión 1.4.2 (Raumbaut, 2012).

Resultados

Logramos amplificar un fragmento de 1.125 pb del gen ND2 mitocondrial en 49 muestras de ranita de Darwin y un fragmento de 297 pb en 103 muestras. Tuvimos éxito en 70% de muestras de Swabs, 60% en tejido y 1% en muestras de museo. En el resto de las muestras no tuvimos éxito en amplificar los fragmentos seleccionados o bien las secuencias no estaban completas para los análisis.

El fragmento de 297 pb presentó 22 haplotipos (nh) en 103 secuencias, mostrando 35 sitios polimórficos (ps), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,760, una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,030 y un número promedio de diferencias nucleotídicas (k) de 9,190. La diversidad mitocondrial para este fragmento muestra 1 haplotipo diferente cada 4,72 individuos.

Para el caso del fragmento de 1.125 pb, se encontraron 26 haplotipos (nh) en 49 secuencias con 120 sitios polimórficos (ps), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,942, una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,030 y un número promedio de diferencias nucleotídicas de (k) 34,806. La diversidad mitocondrial es bastante elevada mostrando 1 haplotipo por cada 1,88 individuos. Las medidas de diversidad genética por poblaciones se presentan en las tablas 31 y 32.

Existe una divergencia de 4,35% entre las secuencias de Chiloé y el Continente, un 2,85% entre Chiloé y la única secuencia de Patagonia y un 3,32% entre esta misma secuencia y el Continente.

El tiempo de divergencia estimado mediante el análisis de coalescencia bayesiana entre el grupo de Chiloé-Patagonia-Puyehue y Continente fue hace alrededor de 365 mil años, anterior a la divergencia estimada entre Chiloé y Patagonia-Puyehue datado en aproximadamente 200 mil años atrás.

Tabla 31. Estimaciones de diversidad de ADN mitocondrial del gen ND2 en 297 pb.

Población	(ni / nh)	ps	Pi	Hd	k
Chiloé	31/13	23	0,0142	0,916	4,241
Continente	71/10	27	0,0168	0,511	4,991
Biobío	4/3	3	0,0061	0,833	1,833
Araucanía	13/3	18	0,0093	0,295	2,769
Los Ríos	45/3	45	0,0030	0,279	0,895
Los lagos	9/2	1	0,0007	0,222	0,222
Patagonia	1/1				

ni: n° de individuos genotipados, nh: n° haplotipos, ps: sitios polimórficos, Pi: diversidad nucleotídica, Hd: diversidad haplotípica, k: número promedio de diferencias nucleotídicas.

Tabla 32 Estimaciones de diversidad de ADN mitocondrial del gen ND2 en fragmento de 1.125 pb

Población	(ni / nh)	ps	Pi	Hd	k
Chiloé	26 / 16	74	0,0136	0,948	15,32
Continente	22/10	90	0,0241	0,801	27,16
Biobío	4/4	11	0,0062	1	7,000
Araucanía	11/3	2	0,0003	0,345	0,364
Los Ríos	1/1				
Los lagos	6/2	36	0,0106	0,333	12,00
Patagonia	1/1				

ni: n° de individuos genotipados, nh: n° haplotipos, ps: sitios polimórficos, Pi: diversidad nucleotídica, Hd: diversidad haplotípica, k: número promedio de diferencias nucleotídicas.

Este análisis también mostró que Chiloé tiene un ancestro común datado en ± 100 mil años atrás, sin embargo, sus poblaciones comenzaron a diversificarse recientemente hace aproximadamente 45 mil años (Centro), 30 mil años (Norte) y 25 mil años (Sur). Aún más reciente aparece la diversificación de las poblaciones cordilleranas de

Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, estimada en ± 10.000 años atrás, mostrando un MCRA con Biobío datado en torno a 120 mil años atrás.

Los filogramas obtenidos tanto por *Maximum Likelihood* como por el método bayesiano presentaron la misma topología para ambos fragmentos y se muestran en las figuras 27, 28 y 29. Las muestras se reparten en tres grandes agrupaciones de norte a sur con valores estadísticos consistentes: Biobío, Araucanía/Los-Ríos y un grupo formado por Los Lagos, Chiloé y Patagonia. Este último, se divide en un subgrupo que presenta haplotipos de Los Lagos, Chiloé y Patagonia, apareciendo como ancestral al otro subgrupo, Chiloé, que se divide en 3 agrupaciones diferenciados de norte a sur.

La figura 30 muestra una red que representa las relaciones entre haplotipos obtenida mediante el método TCS sobre las secuencias estudiadas. Los resultados concuerdan con los obtenidos mediante los análisis filogenéticos existiendo estructura genética determinada por la geografía norte-sur y una clara separación de las muestras de la Isla de Chiloé respecto a las continentales más lejanas. Del mismo modo se muestra una relación más estrecha entre los haplotipos de Chiloé, Patagonia y Los Lagos.

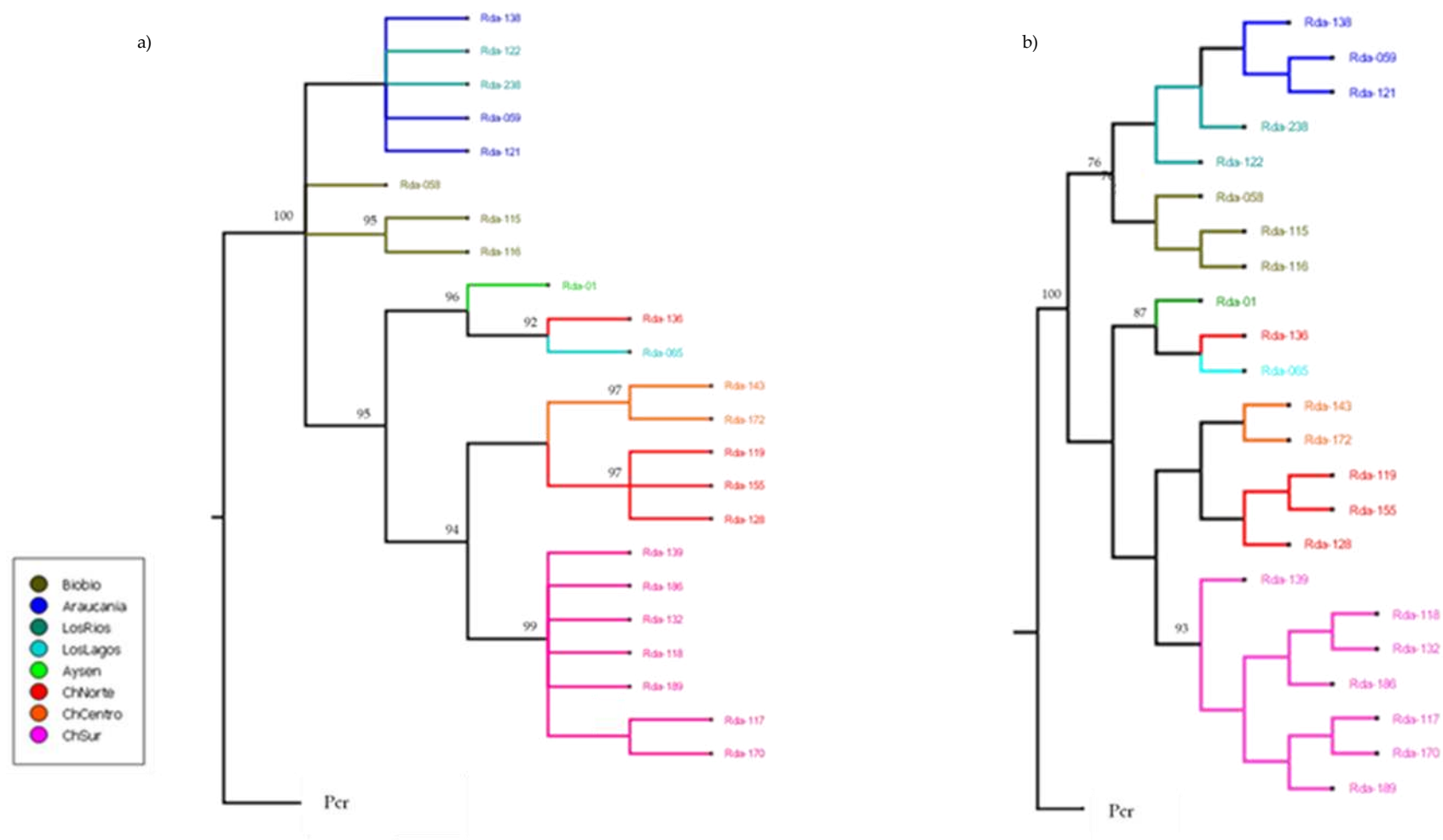


Figura 27. Árbol consenso construido por los métodos bayesiano (a) y *Maximum Likelihood* (b) para el ND2 de ADN mitocondrial (297 pb). Los valores de probabilidad posterior y bootstrap sobre 75% aparecen indicados. El árbol está orientado con la secuencia de *Pseudacris crucifer*.

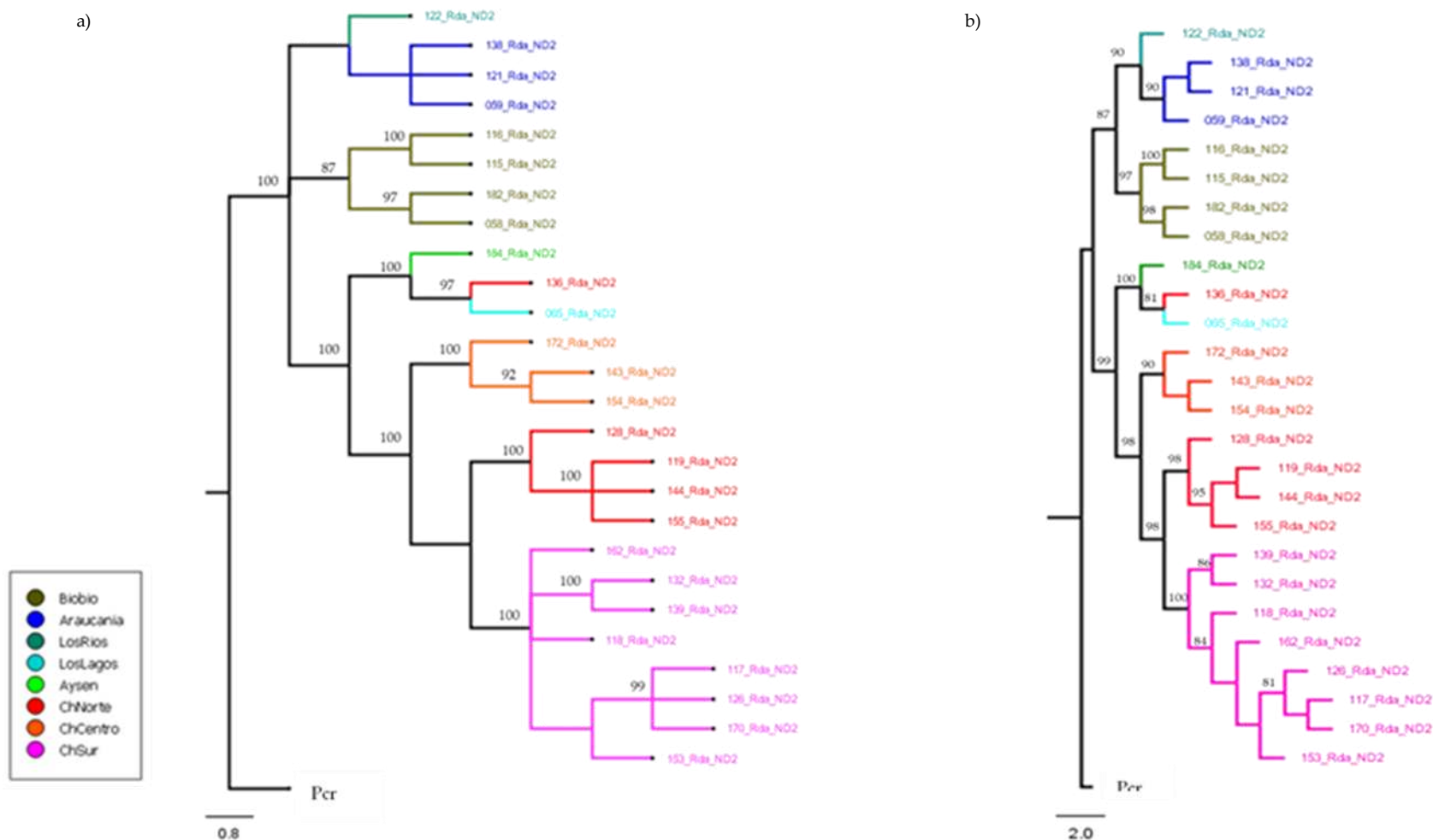


Figura 28. Árbol consenso construido por los métodos bayesiano (a) y *Maximum Likelihood* (b) para el ND2 de ADN mitocondrial (1.125 pb). Los valores de probabilidad posterior y bootstrap sobre 75% aparecen indicados. El árbol está orientado con la secuencia de *Pseudacris crucifer*.

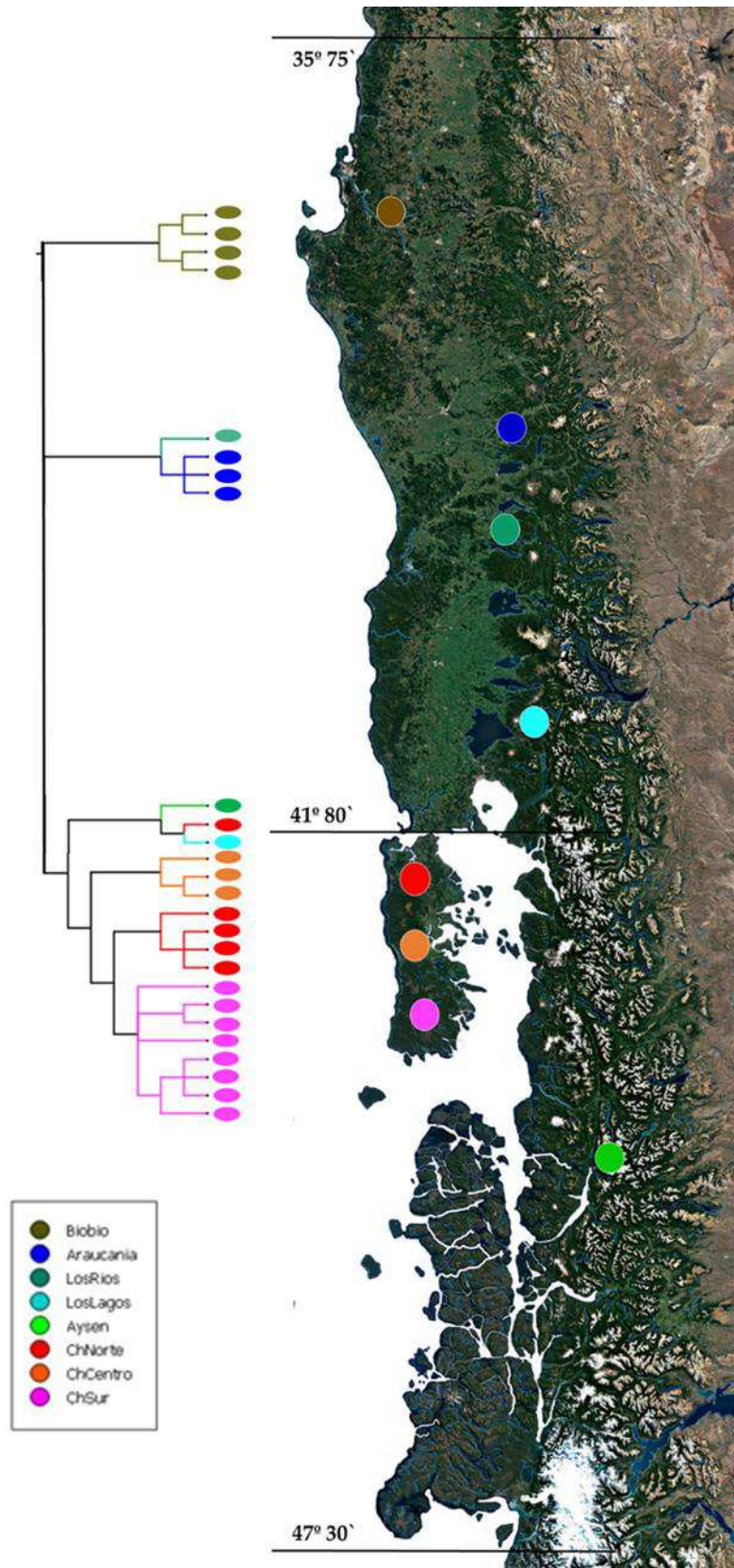


Figura 29. Árbol construido por el método bayesiano de la figura 27b y su representación en el área de distribución. En amarillo las poblaciones sugeridas.

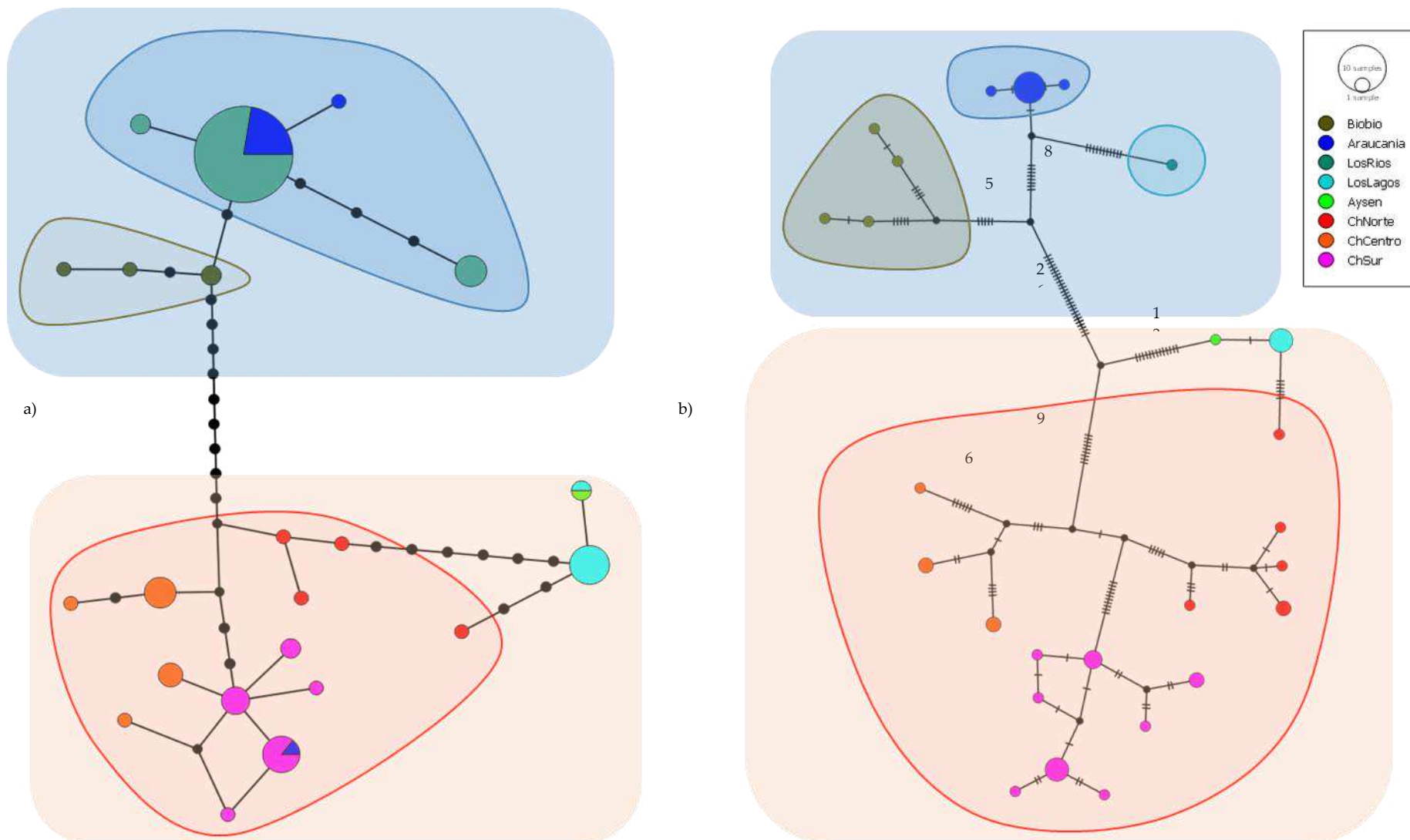


Figura 30. Red construida con TCS en PopArt utilizando las secuencias de ND2 mitocondrial. a) 297 pb, b) 1.125 pb. Los sitios de mutación aparecen indicados.

Discusión

Se logró un buen porcentaje de obtención y amplificación de ADN a partir de hisopados bucales, siendo un método de muestreo útil para análisis genéticos de anfibios tal como se ha reportado previamente (Pidancier, et al., 2003). Por otro lado, no se amplificó prácticamente ningún segmento mitocondrial de las muestras de museo debido, probablemente, a que el ADN haya estado degradado por el tiempo transcurrido o por la presencia de químicos que interfieran en la PCR (Pääbo, 1990; Ellegren, 1992) pues estas muestras llevan entre 30 a 180 años almacenadas.

La ranita de Darwin presentó una gran diversidad genética a lo largo de su rango geográfico, similar a lo descrito en *Eupsophus calcaratus* (Nuñez, et al., 2011) cuya distribución es ampliamente compartida. Se observa que esta diversidad es más elevada en Chiloé que en el Continente tanto en nh como en Hd. Sin embargo, es probable que estas medidas de diversidad no sean muy representativas del Continente pues las secuencias pertenecen solo a cuatro localidades, Contulmo (Biobío), Villarrica (Araucanía), Huilo-Huilo (Los Ríos) y Puyehue (Los Lagos).

Los filogramas obtenidos en *R. darwinii* evidencian una marcada estructuración genética en su área de distribución geográfica con dos agrupaciones principales, las cuales no comparten haplotipos: Continente, que incluye Biobío y Araucanía-Los Ríos y, el grupo Sur, formado por Aysén, Los Lagos (Puyehue) y Chiloé. Una gran estructuración y dos agrupaciones principales también fueron reportadas en *E. calcaratus*, atribuibles a zonas de elevaciones más bajas a lo largo de las áreas costeras y fuera de la extensión de la principal capa de hielo durante el UMG y otra a zonas montañosas más altas provenientes de ambientes previamente galaciados (Nuñez, et al., 2011).

En el grupo del Continente, las secuencias del Biobío son las únicas que corresponderían a áreas no glaciadas en el UMG, mostrando gran diferenciación respecto a Araucanía-Los Ríos que se agrupan juntas. Éstas, si bien corresponden a Regiones administrativas distintas, están distanciadas solo de 50 km entre sí y ubicadas en las faldas de los volcanes Quetrupillán y Choshuenco de la cordillera de los Andes, que son zonas que estuvieron cubiertas de hielo en el UMG (Hulton, et al., 2002; Hulton

& Sudgen, 1994). El grupo del Sur muestra a su vez dos subgrupos iniciales, uno formado por el haplotipo de la Patagonia, Los Lagos y un haplotipo de Chiloé norte (cercano al canal de Chacao) que aparecen como antecesores al otro subgrupo formado por la Isla de Chiloé (Norte, Centro y Sur). Esta gran estructuración descrita también es soportada por la red de haplotipos, que muestra una gran distancia genética entre los dos grupos principales.

Las ranas, debido a su limitada dispersión, con frecuencia muestran poblaciones con una estructura genética significativamente mayor en comparación con otros animales (Johns & Avise, 1998; Semlitsch, et al., 2009), siendo los anfibios la clase de vertebrados que exhiben el mayor grado de subdivisión en sus poblaciones (Ward, et al., 1992).

Chiloé presentó una gran divergencia con el Continente (4,35%) siendo menor la encontrada entre Chiloé-Norte y Los Lagos (2,3%) y Chiloé-Centro con Patagonia (2,5%). Esta distancia genética encontrada con el Continente también se relaciona con el mayor tiempo de divergencia estimado entre Chiloé-Patagonia-Los Lagos y Continente (± 365 mil años atrás) sugiriendo que estas poblaciones se separaron en el período transcurrido entre la Glaciación Más Fría del Pleistoceno (± 700 mil años atrás) y la Última Glaciación del Sur de la Patagonia (± 180.000 años atrás).

El límite norte de las capas de hielo de la última glaciación alcanzó aproximadamente los 33° de latitud sur en las regiones altoandinas, además de todo el territorio de la costa del Pacífico al sur desde los 42° S, siendo la Cordillera de la Costa y la Planicie Intermedia desde los 42° S al norte, áreas estables donde las especies habrían sobrevivido durante el UMG (Sérsic, et al., 2011; Villagrán, 2001; Villagrán, et al., 1995). De esta manera, Villarrica (Araucanía), Huilo-Huilo (Los Ríos) y Puyehue (Los Lagos), zonas previamente glaciadas, pudieron haber recibido expansiones poblacionales post UMG desde las zonas no glaciadas, hecho que es respaldado por la reciente diversificación de estas poblaciones datadas en cerca de 10 mil años atrás y por el MCRA compartido con Contulmo, un área no glaciada, en el caso de Araucanía-Los Ríos. Por otro lado, Contulmo muestra un Hd de 1, indicando la posible existencia de un mayor número de haplotipos, que no se ha podido pesquisar. Los hábitats estables,

históricamente restringidos, que permiten que las poblaciones permanezcan en su lugar a lo largo del tiempo, se correlacionan positivamente con los altos niveles de variabilidad genética intrapoblacional y el equilibrio demográfico, contrario a lo esperado en áreas que han estado expuestas a repetidas fluctuaciones climáticas, como las glaciaciones del pleistoceno (Muñoz-Mendoza, et al., 2017).

Es probable que exista un mayor número de haplotipos en la planicie intermedia y cordillera de la Costa que hayan servido de origen de las poblaciones cordilleranas y que, debido al muestreo, no hemos podido encontrar. Así, Núñez et al. (2011) infieren que las poblaciones de *E. calcaratus* de la zona costera pueden haber sobrevivido localmente en ambientes sin hielo existiendo refugios glaciares múltiples, consistente con la profunda divergencia genética entre los linajes del norte y el sur. Durante largos períodos de clima desfavorable, los rangos de la mayoría de las especies animales y vegetales se restringieron a áreas más cálidas alejadas de las zonas glaciadas que albergaron hábitats más adecuados (Comes & Kadereit, 1998; Hewitt, 1999).

El análisis del MRCA sugiere que las poblaciones de Chiloé, Patagonia y Los Lagos estuvieron conectadas hasta hace aproximadamente 200 mil años, hacia finales del penúltimo período interglaciar. Esta conexión pudo haber sido posible debido al descenso del nivel del mar (Husch & Ormazábal, 1996) que osciló en más de 120 metros (Rohling et al. 1998) en los períodos glaciares permitiendo la unión de las poblaciones a través del actual canal de Chacao y/o de un puente formado por las islas presentes entre Chaitén y Dalcahue. Actualmente, las profundidades del mar entre las islas ubicadas al este de Chiloé-Centro son menores de 100 m y no más de 200 entre los grupos de islas (Brüggen, 1950). Casos similares son reportados para las poblaciones de Chiloé y Continente en *Liolaemus pictus* y *Batrachyla leptopus* (Vidal et al. 2016; Vidal et al. 2012a).

Posteriormente, con el avance de los hielos de la última glaciación, gran parte de Chiloé quedó cubierto de hielo, pudiendo haber permanecido una población al oeste/noroeste de la Isla en un refugio glaciar, lo cual ha sido sugerido para varias especies animales y vegetales (Brüggen, 1950; Heusser, 1972; Heusser, 1982; Villagrán, et al., 1986; Vidal et al. 2012b; capítulo I de este trabajo). De esta manera, con la retirada de los hielos, la población de Chiloé se habría expandido hacia al este y sur de la Isla, lo

que es respaldado por la reciente divergencia de las subpoblaciones isleñas que coincide con el inicio de la retirada glacial (± 25 mil años) y por la alta Hd y la baja Pi encontrada en Chiloé.

El subgrupo representado por Patagonia y Los Lagos (Puyehue) se agrupa con un haplotipo de Chiloé y muestra una diversificación también reciente, siendo este grupo antecesor a Chiloé (Norte, Centro y Sur). Esto podría explicarse debido a la existencia de un posible refugio glacial en la Patagonia, el que habría originado una rápida expansión hacia el norte y al oeste permitiendo, además, un segundo contacto con Chiloé. En la Patagonia, se predice que las poblaciones afectadas por los cambios de hábitat del pleistoceno habrían experimentado una rápida expansión a medida que el hábitat anteriormente inadecuado se colonizara (Nuñez, et al., 2011). Refugios glaciares patagónicos también han sido reportado previamente en especies terrestres y acuáticas (Lessa et al., 2010; Sérsic et al., 2011; Zemlak et al., 2011; Marín, et al., 2013, capítulo I de este trabajo).

Algo similar se reportan en rana temporaria en Irlanda donde se propone que las ranas irlandesas sobrevivieron en un refugio donde algunas mutaciones fueron adquiridas y otras retuvieron su estado ancestral o, que hubo una colonización dual en la que algunas ranas sobrevivieron en un refugio en Irlanda y otras colonizaron a través de un puente terrestre (Teacher, et al., 2009).

Las oscilaciones climáticas, la heterogeneidad en la elevación, la posición topográfica y el tiempo de aislamiento en el suroeste de la Patagonia han sido importantes para promover la diversificación de la biota. Los estudios geológicos han demostrado que esta región tenía amplias zonas libres de hielo durante los períodos del último máximo glacial proporcionando refugios boscosos para la biota durante las glaciaciones del pleistoceno (Nuñez, et al., 2011; Sérsic, et al., 2011; Lessa, et al., 2010; Marín, et al., 2013). Del mismo modo, hallazgos paleoecológicos, paleobotánicos y genéticos de un número creciente de organismos en Eurasia, sugieren que muchas especies podrían haber sobrevivido a los máximos glaciales fuera de los ambientes más adecuados, en otras áreas sin hielo (Schmitt & Seitz, 2001; Bilton, et al., 1998). Así, en la

Patagonia debe haber existido al menos un refugio glaciar para *R. darwinii* que almacenó gran diversidad genética logrando una recolonización con la retirada de los hielos.

A pesar de las diferencias geográficas, las colonizaciones rápidas o escalonadas se caracterizarían por niveles bajos de diversidad genética, ya que cada nueva población fundadora representaba solo una fracción de la diversidad genética de la población ancestral (Nichols & Hewitt, 1994; Hewitt, 2000).

Aunque en este trabajo evidencian varias líneas evolutivas que debiesen tratarse como Unidades Evolutivamente Significativas para los planes de conservación, es necesario realizar un mayor y mejor muestreo que abarque toda el área de distribución de la especie para poder determinar de mejor manera los centros de diversidad genética. Para la conservación de una especie, es importante identificar las relaciones evolutivas entre las poblaciones con el fin de retener la máxima diversidad genética e incorporar información sobre los procesos históricos de las poblaciones (Avice, 1989; Moritz, 1994).

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO: IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

La alta estructuración poblacional y la gran diversidad genética encontrada en *Rhinoderma darwinii* se relaciona directamente con la compleja historia y estructura orogénica de la Patagonia y con los procesos glaciares del pleistoceno que generaron cambios climáticos y ambientales en toda el área de distribución de esta especie.

Las Unidades Evolutivamente Significativas sugeridas en este trabajo obedecen a los procesos de formaciones de grandes capas de hielo y retiradas de los mismos con la presencia de refugios glaciares en la Patagonia que habrían servido para recolonizar el territorio una vez retirados los hielos. Del mismo modo, la población continental no glaciada, debe albergar una gran variabilidad genética que ha servido, a su vez, para colonizar las zonas de la cordillera de los Andes que también fueron alcanzadas por los hielos. Chiloé, que también representa un refugio glaciar, puede haber recibido dos colonizaciones desde los refugios glaciares de la Patagonia y de las poblaciones continentales. Todo este panorama debe ser corroborado con un muestreo que represente toda el área de distribución, incluyendo poblaciones en áreas glaciadas y no glaciadas en el pleistoceno.

Los programas de reproducción exsitu de ranita de Darwin que hoy existen en Chile y dónde han reproducido con éxito esta especie en cautividad, deben tener consideración especial en los linajes genéticos que presenta la especie en su rango de distribución, sobre todo si se planea realizar algún tipo de reintroducción. Del mismo modo, deberían considerar mantener un *pool* genético de todas las líneas evolutivas mencionadas como reservorio en caso pérdidas poblacionales. Es sabido que la pérdida del hábitat es una de las principales amenazas de extinción de esta y otra especies, pero últimamente ha cobrado relevancia la quitridiomycosis, sospechando que esta enfermedad es responsable de la disminución del 30% de algunas especies de anfibios en el mundo en los últimos 15 años.

Los programas de conservación deben asegurar la mantención de la diversidad genética de la especie y mantener hábitat adecuados para su subsistencia.

BILIOGRAFÍA

- Avice, J., 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*. 43, 192–1208.
- Babik, W., Branicki, W., Sandera, M., Litvinchuk, S., Borkin, L.J., Irwin, J.T. & Rafiński, J., 2004. Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*. 13, 1469-1480.
- Bilton, D., Mirol, P.M., Mascheretti, S., Fredga, K; Zima, J. & Searle, J.B., 1998. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London*. 265, 1219–1226.
- Bourke, J., 2010. Darwin's frog captive rearing facility in Chile. *Froglog*. 94, 6-10.
- Bourke, J., 2012. Darwin's frogs in Chile. *Froglog*. 100, 32-33.
- Bourke, J. Barrientos, C., Ortiz, J.C., Bussea, K., Böhme, W. & Bakker, T.C.M., 2011. Colour change in Darwin's frogs (*Rhinoderma darwinii*, Duméril and Bibron, 1841) (Anura: *Rhinodermatidae*). *Journal of Natural History*. 45, 43-44.
- Bourke, J. et al., 2010. Batrachochytrium dendrobatidis in Darwin's frog *Rhinoderma spp.* in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*. 92, 217-221.
- Brüggen, J., 1950. *Geologia*. Santiago: Editorial Nascimento.
- Bürger, O., 1905. La neomelia de la *Rhinoderma darwinii*. Santiago: D & B. Imprenta Cervantes.
- Busse, K., 2004. Biología de la reproducción del Sapito de Darwin (*Rhinoderma darwinii*) y su cría en cautividad. In: A. Iriarte, et al. eds. *Cría en cautividad de fauna chilena*. Santiago: Servicio Agrícola y Ganadero; Parque Metropolitano, Zoológico Nacional; Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 139-145.
- Cei, J., 1962. *Batrachios de Chile*. Santiago.: Ediciones Universidad de Chile.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P. & Posada, D.C.K., 2002. TCS: Estimating gene genealogies. 2, 184., *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*.
- Comes, H. & Kadereit, J., 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Sciences*. 3, 432– 438.

- Crawford, A.J., 2003. Relative Rates of Nucleotide Substitution in Frogs. *Journal of Molecular Evolution*. 57, 636–641.
- Crump, M., 2002. Natural history of Darwin's, *Rhinoderma darwinii*. *Herpetological natural history*. 9, 21–30.
- Crump, M. & Veloso, A., 2005. El aporte de observaciones de terreno y del análisis genético para la conservación de *Rhinoderma darwinii* en Chile. In: C. Smith-Ramirez, J. Armesto & C. Valdovinos, eds. *Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile*. Santiago: Editorial Universitaria. 452-455.
- Díaz-Páez, H. & Ortiz, J., 2003. Evaluación del estado de conservación de los anfibios chilenos. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76, 509-525.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 29, 1969–1973.
- Ellegren, H., 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites—a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk Ornithological Advances*. 109, 886-895.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-79.
- Goicoechea, O., Garrido, O. & Jorquera, B., 1986. Evidence for a trophic paternal-larval relationship in the frog *Rhinoderma darwinii*. *Journal of Herpetology*. 20, 168–178.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Heusser, C., 1972. On the occurrence of *Lycopodium fuegianum* during late-Pleistocene interstades in the province of Osorno, Chile. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 99(4), 178-184.
- Heusser, C., 1982. Palynology of cushion bogs of the Cordillera Pelada. Province Valdivia, Chile. *Quaternary Research*. 17, 71-92.
- Hewitt, G., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68, 87-112.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405, 907–913.

- Husch B, Ormazabal C. 1996. Nuestro mundo cambiante. Ediciones Los Andes, Santiago. Chile.
- Hulton, N. Purves, RS., McCulloch, RD., Sudgen, DE. & Bentley, MJ., 2002. The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews*. 21, 233–241.
- Hulton, N. & Sudgen, D., 1994. Glacier Modeling and the Climate of Patagonia during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Research*. 42, 1-19.
- Johns, G. & Avise, J., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*. 15, 1481–1490.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 bigger dataset. *Molecular Biology and Evolution*, p. Submitted.
- Leigh, J., Bryant, D. & Nakagawa, S., 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 6 (doi:10.1111/2041-210X.12410), 1110-1116.
- Lessa, E., D'Elia, G. & Pardinas, U., 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian–Fuegian rodents. *Molecular Ecology*. 19, 3031-3037.
- Lobos, G. Vidal, M., Correa, C., Labra, A., Díaz-Páez, H., Charrier, A., Rabanal, F., Díaz, S. & Tala, C., 2013. Anfibios de Chile, un desafío para la conservación. Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y Red Chilena de Herpetología. ed. Santiago: Ministerio del Medio Ambiente.
- Marín, J. Varas, V., Vila, AR., Lopez R., Orozco-terWengel, P. & Corti, P., 2013. Refugia in Patagonian fjords and the eastern Andes during the Last Glacial Maximum revealed by huemul (*Hippocamelus bisulcus*) phylogeographical patterns and genetic diversity. *Journal of Biogeography*. 40, 2285-2298.
- Méndez, M. & Correa, C., 2008. Diversidad de especies: Anfibios. In: OLE. Ltda, ed. Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos. Santiago: Comisión Nacional de Medio Ambiente. 285-289.

- MINGESPRES, 2008. Clasificación de especies. Santiago: Ministerio General de la Presidencia.
- Moritz, C., 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9, 373–375.
- Muñoz-Mendoza, C., D'Elía, G., Panzera, A., Méndez, MA., Villalobos-Leiva, A., Sites Jr, JW. & Victoriano, PF., 2017. Geography and past climate changes have shaped the evolution of a widespread lizard from the Chilean hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 116, 157-171.
- Nichols, R. & Hewitt, G., 1994. The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity*. 72, 312–317.
- Núñez, J., Wood, NKÇ., Rabanal, FE., Fontanella, FM. & Sites Jr, JW., 2011. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 343-352.
- Pääbo, S., 1990. Amplifying ancient DNA. In: M. A. G. D. Innis, J. Sninsky & T. White, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Accademic Press. 159-166.
- Penna, M. & Veloso, A., 1990. Vocal diversity in frogs of the South American temperate forest. *Journal of Herpetology*. 24, 23-33.
- Pidancier, N., Miquel, C. & Miaud, C., 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in anphibians. *Herpetological Journal*. 13, 175-178.
- Posada, D., 2004. Collapse1.2. Program free available at <http://darwin.uvigo.es/>.
- Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25, 1253–1256.
- Rambaut A., 2012. FigTree v1.4.2 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W. & Drummond, A.J., 2013. Tracer v1.6.0 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J., 2013a. LogCombiner v1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J., 2013b. TreeAnnotator v1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version

- 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86, 248–249.
- Rohling, EJ., Fenton, M., Jorissen, FJ., Bertrand, P., Ganssen, G. & Caulet JP., 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature*. 394:162–165.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, DL., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, MA. & Huelsenbeck, JP., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61, 539–542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, JC., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, SE. & Sánchez-García, A., 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Dataset. *Molecular Biology and Evolution*. 34, 3299-3302.
- Schmitt, T. & Seitz, A., 2001. Intraspecific allozymatic differentiation reveals the glacial refugia and the postglacial expansions of European *Erebia medusa* (Lepidoptera: *Nymphalidae*). *Biological Journal of the Linnean Society*. 74, 429–458.
- Semlitsch, R., Todd, BD., Blomquist, SM., Calhoun, AJK., Gibbons, JW., Gibbs, JP., Graeter, GJ., Harper, EB., Hocking, DJ., Hunter Jr, ML., Patrick, DA., Rittenhouse, TAG. & Rothermel, BB., 2009. Effects of timber harvest on amphibian populations: understanding mechanisms from forest experiments. *Bioscience*. 59, 853-862.
- Sérsic, A., Cosacov, A., Cocucci, AA., Johnson, L., Pozner, R., Avila, LJ., Sites, JW. & Morando, M., 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 103, 475–494.
- Smith-Ramirez, C., 2004. The Chilean coastal range: a vanishing center of biodiversity and endemism in South American temperate rainforests. *Biodiversity and Conservation*. 13, 373-393.
- Soto-Azat, C., Valenzuela-Sánchez, A., Clarke, BT., Busse, K., Ortiz, JC., Barrientos, C. & Cunningham, AA., 2013a. Is chytridiomycosis driving Darwin's frogs to extinction? *PLOS One*, 8(11), p. e79862.

- Soto-Azat, C., Valenzuela-Sánchez, A., Collen, B., Rowcliffe, JM., Veloso, A. & Cunningham, A., 2013b. The Population Decline and Extinction of Darwin's Frogs. *Plos One*, 8(6), p. e66957. doi:10.1371/journal.pone.0066957.
- Stevens, M. & Cuthill, I., 2006. Disruptive coloration, crypsis and edge detection in early visual processing. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 273, 2141–2147.
- Stuart, S., Hoffmann, M., Chanson, JS., Cox, NA., Berridge, RJ., Ramani, P. & Young, BE., 2008. *Threatened Amphibians of the World*. Virginia: Lynx Edicions, Barcelona, Spain, IUCN, Gland, Switzerland, and Conservation International.
- Teacher, A., Garner, T. & Nichols, R., 2009. European phylogeography of the common frog (*Rana temporaria*): routes of postglacial colonization into the British Isles, and evidence for an Irish glacial refugium. *Heredity*. 102, 490–496.
- IUCN, 2018. IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2018. *Rhinoderma darwinii*. s.l.: The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T19513A79809372.
- Valenzuela-Sánchez, A., Harding, G., Cunningham, AA., Chirgwin, C. & Soto-Azat, C., 2014. Home range and social analyses in a mouth brooding frog: testing the coexistence of paternal care and male territoriality. *Journal of Zoology*. 294, 2015-223.
- Vidal, MA., Moreno, PI. & Poulin, E. 2012a. Genetic diversity and insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in north-western Patagonia. *Austral Ecology*. 37, 67–77.
- Vidal, MA., Ortiz, JC., Marin, JC., Poulin, E. & Moreno, PI. 2012b. Comparative phylogeography of two co-distributed species of lizards of the genus *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from Southern Chile. *Amphibia-Reptilia* 33, 55–67.
- Vidal, MA., Ibáñez, S., Moreno, P. & Pullin, E., 2016. Phylogeography of a Patagonian lizard and frog: Congruent signature of southern glacial refuges. *Austral Ecology*. 41,399-408.
- Vallan, D., 2002. Effects of anthropogenic environmental changes on amphibian diversity in the rain forests of eastern Madagascar. *Journal of Tropical Ecology*. 18, 725-742.

- Villagrán, C., 2001. Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena de Historia Natural*. 74, 793–803.
- Villagran, C., Armesto, J. & Leiva, R., 1986. Recolonization postglacial de Chiloe Insular: Evidencias basadas en la distribución geográfica y los modos de dispersion de la flora. *Revista Chilena de historia Natural*. 59, 19-39.
- Villagrán, C., Moreno, P. & Villa, R., 1995. Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. In: J. Armesto, C. Villagrán & M. Arroyo, eds. *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*. Santiago: Editorial Universitaria, Universidad de Chile. 51-53.
- Ward, R., Skibinski, D. & Woodwark, M., 1992. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology*. 26, 73-159.
- Zemlak, TS., Walde, SJ., Habit, E. & Ruzzante, DE., 2011. Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: the influence of glacial cycling. *Molecular Ecology*. 20, 5280–5294.

DISCUSIÓN GENERAL

Puesto que los tres capítulos que conforman esta Tesis de Doctorado incluyen una discusión pormenorizada de los resultados expuestos en cada uno de ellos, se considera oportuno tratar de evitar reiteraciones organizando una discusión final con una síntesis general de aquellos hallazgos más relevantes que tienen implicancia en la conservación, además de una rápida descripción de las líneas de investigación para la conservación de las especies de este estudio. Finalmente se exponen las principales conclusiones extraídas como resultados de los trabajos desarrollados.

Síntesis de los hallazgos más relevantes e implicancias en conservación

De las tres especies amenazadas de la ecorregión de bosque valdiviano incluidas en este estudio, el zorro chilote es la única cuya depauperada variabilidad genética puede significar un riesgo extra de extinción a las amenazas ya conocidas para estas especies, como son la alteración y destrucción del hábitat, la introducción de especies y patógenos exóticos o la caza furtiva. Esto está dado por la muy baja variabilidad genética encontrada, tanto para ADN mitocondrial, microsatélites y MHC, reportada en el capítulo I de esta Tesis.

Hasta el año 2016 el zorro chilote era catalogado en la UICN como “En peligro crítico” de extinción, debido a que solo se conocían dos poblaciones muy aisladas entre sí y donde una de ellas poseía más del 90% de la población (Jiménez et al., 2012). Posterior a los hallazgos de individuos en otras áreas, diferentes a Chiloé y Nahuelbuta (Silva-Rodríguez et al. 2018; Farías et al. 2014; D'Elía et al. 2013), se reclasificó la especie bajándola una categoría para quedar “En peligro” debido a que se estimaron tamaños poblacionales mayores a los establecidos para el primer criterio (Silva-Rodríguez et al., 2016). Sin embargo, dados los antecedentes aquí expuestos, se hace necesario incluir las condiciones genéticas a la hora de reevaluar esta especie, pues si bien el número poblacional puede ser mayor a lo inicialmente estimado, la evidencia de la baja variabilidad genética y el aislamiento de sus poblaciones reportado (capítulo I) suponen un gran riesgo para la supervivencia de la especie, pudiendo reducir la aptitud biológica de los individuos, quedando muy susceptibles ante brotes de enfermedades infecciosas

que pudiesen acabar con gran parte de la población, sobre todo aquellas transmitidas por los perros, como el virus del distemper canino.

Actualmente los muchos esfuerzos para de conservación del zorro chilote se centran en la población de la Cordillera de Nahuelbuta, un territorio reconocido a nivel internacional como uno de los “*hotspots*” de mayor riqueza de especies a nivel mundial, con un alto nivel de endemismo (Smith-Ramírez, 2004) y donde la población de zorro es muy pequeña. Sin embargo, como se menciona en el capítulo I, se deben también destinar recursos a identificar y reconocer nuevas poblaciones, las que pudiesen ser igual o más pequeñas y asiladas que la de Nahuelbuta o albergar una diversidad genética adicional, desestimándose hoy día la relevancia de tener esta información. Del mismo modo, es importante identificar las nuevas poblaciones y su distribución para poder proteger las zonas geográficas que las delimiten y así asegurar la viabilidad y variabilidad genética de cada una de ellas y sus ecosistemas.

Por otro lado, tanto el pudú (capítulo I) como la ranita de Darwin (capítulo III) mantienen una gran diversidad genética no suponiendo, la baja diversidad en la actualidad, un riesgo para su conservación, por lo que el foco para preservar estas especies debería basarse en mantener hábitats adecuados para cada una de las Unidades Significativamente Evolutivas (UES) descritas en esta Tesis. Sin embargo, es necesario aumentar el muestreo en la Patagonia para definir con mayor precisión las áreas de refugios del pleistoceno, los cuales se debiesen conservar de manera prioritaria. Afortunadamente en la Patagonia existe un gran número de reservas y parques nacionales y privados que formarán la Nueva Red de Parques en la Patagonia Chilena con una superficie de 59.433 km² de protección entre los 43° S y 53° S. Esta superficie incluye 24 parques y reservas en el área de distribución patagónica de la ranita de Darwin y el pudú.

Si bien existen instituciones que crían en cautividad con éxito tanto del pudú como de la ranita de Darwin, (Bourke, 2010; Busse, 2004; Reyes, et al. 2004; observación personal), es necesario que puedan incluir en sus programas reproductivos las diferentes líneas evolutivas para mantener la diversidad genética de cada una de las UES de

manera independiente. De esta forma, se permite preservar el acervo genético el que podría servir en caso de reintroducciones con fines de conservación.

En el caso del zorro chilote, sería aconsejable incentivar un programa de conservación ex situ para reproducir individuos de todas las UES de manera independiente capaz de proporcionar animales para reintroducciones o refuerzos de poblaciones silvestres en caso de ser necesario. Además, se podrían evaluar los aspectos reproductivos y de comportamiento de los animales en cautividad. Desde nuestro punto de vista, adicionalmente serían recomendables estrategias de manejo dirigidas a cruzar individuos de diferentes poblaciones para establecer un grupo de individuos con mayor diversidad genética para liberarlos en un ambiente natural controlado, evaluando el éxito de las reintroducciones y los cambios en la variabilidad genética, sirviendo además como laboratorios vivientes para verificar el impacto genético y demográfico de tales acciones y para evaluar los posibles efectos sobre la aptitud biológica.

Se ha identificado la presencia de agentes infecciosos en el zorro chilote (capítulo II) desconociendo si estos producen enfermedad o mortalidad en ellos, pues los individuos capturados en este estudio se evaluaron como clínicamente sanos. Durante los últimos años las poblaciones de carnívoros silvestres han presentado diversos eventos de mortalidad a causa de agentes infecciosos (Almberg, et al. 2009; Timm, et al. 2009; Goller, et al. 2010; Matchett, et al. 2010; Miller et al. 2010), que han llevado a la comunidad de especialistas a considerar la evaluación sistemática de los patógenos como un factor importante para su conservación, así como la necesidad de implementar medidas de control frente a los mismos (Murray, et al. 1999; Funk, et al. 2001; Deem, et al. 2005). Dentro de los factores que afectan el riesgo de aparición de brotes infecciosos en estas especies, se ha identificado la interacción con perros domésticos. Estos poseen poblaciones con número y susceptibilidad a los patógenos suficiente para funcionar como sus reservorios, lo cual hace necesario realizar un seguimiento del estado sanitario de sus poblaciones, especialmente aquéllas en contacto con poblaciones de carnívoros amenazados (Whiteman et al. 2007; Millán, et al. 2009; Almeida, et al. 2010).

En esta Tesis no se han estudiado enfermedades en pudú ni ranita de Darwin y, aunque hay reportes de enfermedades de ganado doméstico en pudú (Mengual-Chuliá

et al., 2018; salgado et al., 2018), aún existe un vacío de información sobre la ocurrencia actual y el impacto de estas enfermedades en las poblaciones silvestres. Para el caso de la ranita, últimamente ha cobrado relevancia la quitridiomycosis (Bourke, et al., 2010; Soto-Azat, et al., 2013), sospechando que esta enfermedad es responsable de la disminución del 30% de algunas especies de anfibios en el mundo en los últimos 15 años. De esta manera, la información sobre susceptibilidad a agentes infecciosos sugiere que estos pueden representar un factor importante para su salud y conservación de estas especies.

Hace 20 años ya se proyectaba que el análisis filogeográfico comparativo permitiría realizar estudios detallados de la evolución del paisaje, incluida la dispersión de taxones a través de una región, especiación, radiación adaptativa y extinción; es decir, se proyectaban investigaciones que buscarían los vínculos fundamentales entre los procesos poblacionales y los patrones regionales de diversidad y biogeografía (Bermingham & Moritz, 1998). La comparación de patrones filogeográficos de especies múltiples en una región permite hacer inferencias sobre los efectos diferenciales de los eventos históricos a gran escala (Bermingham & Moritz 1998; Arbogats & Kenagy 2001). Si las poblaciones de distintos taxones han sido co-distribuidas por un tiempo prolongado y han sido más o menos estables en los períodos entre los procesos de perturbación o generación de barreras, es razonable esperar que los patrones de divergencia de especies estrechamente relacionadas y ecológicamente similares sean congruentes debido a sus características biológicas y demográficas similares (Vidal, et al. 2016).

Si bien en esta Tesis no se ha realizado un estudio filogeográfico comparativo entre las especies incluidas en este trabajo, es importante mencionar que todas ellas han sido modeladas por los eventos paleoclimáticos del pleistoceno en su distribución y variabilidad genética. Estos procesos han tenido un gran impacto en las poblaciones de pudú y ranita de Darwin de la Patagonia compartiendo procesos históricos similares en el pleistoceno donde probablemente pudieron compartir los mismos refugios glaciares patagónicos aun siendo de distintos grupos taxonómicos (Capítulos I y III). Algunos linajes han persistido en diferentes refugios durante los ciclos glaciares en la Patagonia,

los cuales han sido compartidos entre plantas, roedores y reptiles (Breitman, et al., 2012; Barber, et al., 2012). Por otro lado, la Isla de Chiloé ha sido una importante fuente de diversidad genética en las tres especies, existiendo un refugio glacial común en el noroeste de la Isla, lo que corresponde hoy principalmente a las comunas de Ancud y Dalcahue en la Provincia de Chiloé.

La distribución geográfica de la diversidad genética entre las especies en las regiones de latitudes altas y medias a menudo se ha asociado con los ciclos glaciares del pleistoceno tardío (Hewitt, 1996, 1999) que han involucrado los siguientes procesos: (i) fragmentación de poblaciones ancestrales largamente extendidas en refugios durante los períodos de mayor cobertura glacial, (ii) con la subsecuente divergencia genética de estas pequeñas poblaciones aisladas, seguida finalmente de (iii) la expansión de su distribución durante la contracción glacial (Vidal, et al. 2012).

Tanto el zorro chilote como el pudú habrían ingresado a Chiloé en el último período interglaciar, entre la Última Glaciación Patagónica Austral (180.000 años atrás) y el Último Máximo Glaciar (26.000 - 17.500 años atrás) (capítulo I y II). Luego, con el avance de las capas de hielo en el UMG, estos mamíferos debieron haberse refugiado en el noroeste de la Isla de Chiloé como se ha propuesto para muchas otras especies de flora y fauna (Heusser, 1972; Villagrán, 1995; Sérsic, et al., 2011). Posteriormente, junto a la retirada de la capa de hielo, pudieron recolonizar la Isla de Chiloé. El caso de la ranita de Darwin parece ser un poco más antiguo, ingresando a Chiloé en el período transcurrido entre La Glaciación Más Fría del Pleistoceno (~700.000 años atrás) y La Última Glaciación del Sur de la Patagonia (~180.000 años atrás), pudiendo haber existido un contacto secundario con las poblaciones continentales en el último período interglaciar (Capítulo III).

Los trabajos presentados en esta Tesis de Doctorado aportan nuevos conocimientos científicos en las tres especies amenazadas del bosque valdiviano útiles para la toma de decisiones en programas de conservación.

Líneas de investigación y trabajos pendientes

Como complemento a la discusión general, revisamos someramente a continuación los trabajos pendientes e investigaciones futuras, relacionadas con esta Tesis de Doctorado y que actualmente están iniciando o ya están en desarrollo.

Genética de poblaciones de pudú

Si bien en el capítulo I hemos complementado la filogeografía e historia evolutiva de la especie, creemos que es necesario incluir un mayor muestreo en Patagonia para evaluar de mejor manera lo que aquí se ha propuesto y determinar la existencia de otros refugios glaciares u otras Unidades Significativamente Evolutivas. Además, en este mismo capítulo se han presentado 27 marcadores microsatélites específicos para esta especie que pueden ser utilizados para complementar el estudio poblacional aquí presentado, describiendo la variación y distribución de la frecuencia alélica en y entre las distintas poblaciones identificadas.

Identificación de patógenos que representan una amenaza para la salud y conservación del pudú.

Dentro de las causas principales que pueden originar la extinción de fauna nativa se menciona la introducción de especies y patógenos exóticos (Barnosky, et al., 2011). Las infecciones por microorganismos que producen enfermedades pueden ser debidas a virus, bacterias, hongos y protozoos o helmintos y artrópodos. Mientras estos agentes se desarrollan, causan un efecto potencialmente detrimental en la condición fisiológica de su hospedero, afectando tasas de crecimiento y de reproducción, provocando una reacción inmunológica o de defensa por parte de éste, y una menor probabilidad de supervivencia. En una población silvestre la mayoría de los individuos raramente han estado expuestos a estos patógenos, presentando baja inmunidad adquirida, y cuando las epidemias ocurren tienden a infectar una gran proporción de la población causando mayores niveles de mortalidad que los registrados a nivel de autorregulación (Mc Callum & Dobson, 1995; Millán et al., 2009).

En este contexto, los ungulados son un grupo taxonómico de interés debido a que comparten muchos patógenos con ganado doméstico y el ser humano y,

consecuentemente, pueden jugar un rol importante en la dinámica de enfermedades de importancia para la salud pública y ganadería.

Determinación de la distribución y estructura poblacional del zorro chilote.

En el capítulo II se presentan una serie de nuevas evidencias relacionadas con la diversidad e identidad genética de las dos principales poblaciones conocidas del zorro, además de indicios de nuevas poblaciones. Sin embargo, aún se desconoce la distribución de éstas, si pudiesen estar conectadas entre sí o no, el tamaño poblacional de las mismas e incluso si existen otras poblaciones. Dado lo anterior es necesario realizar una prospección del área comprendida entre la Reserva Costera Valdiviana y Maullín para determinar la presencia del zorro en esta zona y evaluar aspectos ecológicos, genéticos y sanitarios. Conocer estos antecedentes es fundamental para poder instaurar programas de conservación que se enfoquen en la diversidad genética de la especie o en las poblaciones con mayor riesgo. Actualmente, junto a otros científicos, formamos un grupo de investigación del zorro chilote donde estamos constantemente realizando trabajo de campo en este y otros aspectos descritos más abajo.

Aspectos sanitarios para la conservación del zorro chilote.

En el capítulo II se encontró una prevalencia mayor al 50% de *Mycoplasma spp.* en zorros y 14% a gamaherpesvirus, sin evidencias de signos clínicos de enfermedad, desconociendo si estos agentes pudiesen significar algún perjuicio para la conservación del zorro chilote o no. Teniendo en cuenta que las enfermedades pueden suponer un riesgo para especies amenazadas como el zorro chilote, es necesario profundizar en estos estudios para determinar la importancia de los hemoplasmas, herpesvirus y otros agentes infecciosos o parasitarios, no incluidos en esta Tesis como el distemper canino, que puede producir grandes mortalidades en poblaciones susceptibles.

Estudio y control del rol de perros en la transmisión de enfermedades hacia el zorro chilote.

En el capítulo II de esta tesis se menciona la posibilidad de transmisión de enfermedades de los perros a los zorros chilotos, siendo un riesgo potencial debido a la

condición de asilvestrado de estos cánidos en Chile. Los perros poseen poblaciones con número y susceptibilidad a los patógenos suficiente para funcionar como reservorio de estas enfermedades por lo que se hace necesario realizar un seguimiento del estado sanitario de sus poblaciones, especialmente aquellas que viven en contacto con el zorro chilote. Esto ayudaría a dilucidar si los perros son la fuente de la infección o si las infecciones se mantienen enzoóticamente en las poblaciones. Del mismo modo, estos conocimientos servirían para poder hacer planes sanitarios en estos perros como una manera de prevenir el contagio al zorro chilote. Este tipo de proyectos ya se están realizando y hemos participado activamente en la gestión y ejecución de ellos.

Filogeografía de ranita de Darwin

El estudio filogeográfico presentado en el capítulo III, si bien entrega información nueva y relevante para la conservación de esta especie, pues identifica varias líneas evolutivas con refugios glaciares en la Patagonia, carece de muestras representativas de la zona sur de su distribución y que, como hemos visto, pueden representar líneas evolutivas diferentes con otros refugios glaciares. Del mismo modo, no hay información suficiente sobre la presencia actual de individuos en su distribución más austral. Se hace necesario poder esclarecer estas incógnitas para tomar mejores decisiones a la hora de instaurar medidas de conservación y esto conlleva aumentar el muestreo en las zonas indicadas.

Bibliografía

- Almberg, E., David, LM., Smith; DW., Sheldon, JW. & Crabtree, RL., 2009. A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community. Plos One. 4(9), e7042.
- Almeida, AP., Souza, TD., Marcili, A. & Labruna, MB., 2013. Novel Ehrlichia and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. Journal of Medical Entomology. 50, 640–646.
- Arbogast, B. & Kenagy, G., 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. Journal of Biogeography. 28, 819-825.

- Barber, BR., Xu, J., Pérez-Losada, M., Jara, CG. & Crandall, KA., 2012. Conflicting evolutionary patterns due to mitochondrial introgression and multilocus phylogeography of the Patagonian freshwater crab *Aegla neuquensis*. PLoS One 7(6), e37105.
- Barnosky, AD., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, GO., Swartz, B., Quental, TB., Marshall, C., McGuire, JL., Lindsey, EL., Maguire, KC., Mersey, B. & Ferrer, EA., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature 471, 51–57.
- Bermingham, E. & Moritz, C., 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. Molecular Ecology. 7, 367-369.
- Breitman, MF., Ávila LJ., Sites, WJ Jr. & Morando, M., 2012. How lizards survived blizzards: phylogeography of the *Liolaemus lineomaculatus* group (Liolaemidae) reveals multiple breaks and refugia in southern Patagonia and their concordance with other codistributed taxa. Molecular Ecology. 21, 6068–85.
- Bourke, J., Mutschmann, F., Ohst, T., Ulmer, P., Gutsche, A., Busse, K., Werning, H. & Boehme, W., 2010. Batrachochytrium dendrobatidis in Darwin's frog *Rhinoderma* spp. in Chile. Diseases of Aquatic Organisms. 92: 217–221
- Busse, K., 2004. Biología de la reproducción del Sapito de Darwin (*Rhinoderma darwinii*) y su cría en cautividad. In: A. Iriarte, et al. eds. Cría en cautividad de fauna chilena. Santiago: Servicio Agrícola y Ganadero; Parque Metropolitano, Zoológico Nacional; Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 139-145.
- D'Elía, G., Ortloff, A., Sánchez, P., Guíñez, B. & Varas, V., 2013. A new geographic record of the endangered Darwin's Fox *Lycalopex fulvipes* (Carnivora: Canidae): filling the distributional gap. Revista Chilena de Historia Natural, 86, 485-488.
- Deem, S. & Emmons, L., 2005. Exposure of free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) to infection and parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado National Park. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 36 (2), 192-197.
- Farías, A., Sepúlveda, MA., Silva-Rodríguez, EA., Eguren, A., González, D., Jordán, NI., Ovando, E., Stowhas, P. & Svensson, GL., 2014. A new population of Darwin's

- Fox (*Lycalopex fulvipes*) in the Valdivian Coastal Range. *Revista Chilena de Historia Natural*. 87, 1-3.
- Funk, S., Fiorello, C., Cleaveland, S. & Gompper, ME., 2001. The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: Gittleman, J., Funk, S., Macdonald, D. & Wayne, R. eds. *Carnivore Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press. 443 p.
- Goller, K., Fyumagwa, RD., Nikoli, V., East, ML., Kilewo, M., Speck, S., Müller, T., Maztke, M. & Wibbelt, G., 2010. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Veterinary Microbiology*. 146, 245–252.
- Heusser, C., 1972. On the occurrence of *Lycopodium fuegianum* during late-Pleistocene interstades in the province of Osorno, Chile. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 99(4), 178-184.
- Hewitt, GM., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal Linnean Society*. 58: 247-276.
- Hewitt, G., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68, 87-112.
- Jiménez, JE., Lucherini, M. & Novaro, AJ., 2012. *Pseudalopex fulvipes*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 24 January 2013.
- Matchett, M. Biggins, DE., Carlson, V., Powell, B. & Rocke, T., 2010. Enzootic plague reduces black-footed (*Mustela nigripes*) Survival in Montana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(1), p. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0053>.
- Mengual-Chuliá, B., Wittstatt, U., Olias, P. & Bravod, IG., 2018. Genome Sequences of Two Novel Papillomaviruses Isolated from Healthy Skin of *Pudu puda* and *Cervus elaphus* Deer. *Genome Announcement*. 6:e00298-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00298-18>.
- McCallum, H. & Dobson, A., 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*. 10, 190–194

- Millán, J., Candela, MG., Palomares, F., Cubero, MJ., Rodríguez, A., Barral, M., De la Fuente, J., Almería, S. & León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). The Veterinary Journal. 182,114–124.
- Miller, Conrad, PA., Harris, M., Hatfield, B., Langlois, G., Jessup, D., Magargal, SP., Packham, AE., Toy-Choutka, S., Melli, A, Murrayf., Gulland, FM. & Grigg, ME., 2010. A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: Mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. Veterinary Parasitology. 172, 183-194.
- Murray, D., Kapke, C., Evermann, J. & Fuller, T., 1999. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. Animal Conservation. 2, 241–254.
- Reyes, E., Lobos, A., Carrasco, C., Cortés, R., Bubenik, G., Schams, D., Bartos, L. & Acuña, A., 2004. Programa conservación de la especie nativa *Pudu pudu*, Molina (Mammalia, Cervidae). Pp. 365-370 en: Cría en cautividad de fauna chilena, A. Iriarte, C. Tala, B. González, B. Zapata, G. González, & M. Maino eds. Impresiones Luis Flores, Santiago, Chile.
- Salgado, R., Hidalgo-Hermoso, E. & Pizarro-Lucero, J., 2018. Detection of persistent pestivirus infection in pudú (*Pudu puda*) in a captive population of artiodactyls in Chile. BMC Veterinary Research.14:37.
- Sérsic, A., Cosacov, A., Cocucci, AA., Johnson, L., Pozner, R., Avila, LJ., Sites, JW. & Morando, M., 2011. Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. Biological Journal of the Linnean Society. 103, 475-794.
- Silva-Rodríguez, E., Farias, A., Moreira-Arce, D., Cabello, J., Hidalgo-Hermoso, E., Lucherini, M. & Jiménez, J., 2016. *Lycalopex fulvipes* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species. [Online]
- Silva-Rodríguez, E., Ovandoc, E., Gonzálezc, D., Zambranod, B., Sepúlveda, M., Svenssone, G., Cárdenas, R., Contrerasf, P. & Farías, A., 2018. Large-scale assessment of the presence of Darwin's fox across its newly discovered range. Mammalian Biology. 92, 45-53.

- Smith-Ramírez, C., 2004. The Chilean coastal range: a vanishing center of biodiversity and endemism in South American temperate rainforests. *Biodiversity and Conservation*. 13 (2), 373-393.
- Soto-Azat, C., Valenzuela-Sánchez, A., Clarke, BT., Busse, K., Ortiz, JC., Barrientos, C. & Cunningham, AA., 2013. Is Chytridiomycosis Driving Darwin's Frogs to Extinction? *PlosOne*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079862>.
- Timm, S., Munson, L., Summers, BA., Terio, KA., Dubovi, EJ., Rupprecht, ChE., Kapil, S. & Garcelon, DK., 2009. A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline un Satna Catalina Island Foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). *Journal of Wildlife Disease*. 45(2), 333-343.
- Vidal, MA., Moreno, PI. & Poulin, E. 2012. Genetic diversity and insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in north-western Patagonia. *Austral Ecology*. 37, 67-77.
- Vidal, MA., Ibáñez, S., Moreno, P. & Pullin, E., 2016. Phylogeography of a Patagonian lizard and frog: Congruent signature of southern glacial refuges. *Austral Ecology*. 41,399-408.
- Villagrán, C., Moreno, P. & Villa, R., 1995. Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. En: *Ecología de los bosques nativos de Chile* (Armesto, J.J.; Villagrán, C.; Kalin Arroyo, M.; editores), p. 51-69, Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 470 pp.
- Whiteman, CW., Matushima, ER., Cavalcanti-Confalonieri, UE., Correia-Palha, MD., Lima da Silva, AS. & Monteiro, V.C., 2007. Human and domestic animal populations as a potential threat to wild carnivore conservation in a fragmented landscape from the Eastern Brazilian Amazon. *Biological Conservation* 138, 290-296.

CONCLUSIONES

1. Los marcadores microsatélites desarrollados en otras especies de cérvidos no son útiles en estudios poblacionales del pudú por ser poco informativos.
2. El pudú presenta una gran diversidad genética en todas las poblaciones estudiadas incluida las poblaciones cautivas, no siendo un aspecto de amenaza para su conservación.
3. El pudú presenta estructura genética marcada hacia la mitad sur de su distribución (Patagonia) relacionada directamente con la compleja historia y estructura orogénica de la zona y con los procesos glaciares del pleistoceno.
4. Se reconocen 4 Unidades Evolutivamente Significativas en el pudú, Continente, Patagonia Norte, Patagonia Sur y Chiloé, que debiesen tratarse de manera independiente en cualquier plan de conservación.
5. Existen al menos 2 refugios glaciares para el pudú en la Patagonia continental que permitieron conservar, durante las glaciaciones, una diversidad genética particular permitiendo una expansión posterior a la retirada de los hielos.
6. Las translocaciones de pudúes en el Continente no precisan de cautela especial en lo relacionado a la integridad del acervo genético de las poblaciones.
7. El zorro chilote está genéticamente empobrecido tanto en ADN mitocondrial como microsatélites neutrales y el MHC funcional, presentando la diversidad genética más reducida entre los cánidos más amenazados del planeta.
8. El zorro chilote sufrió un severo cuello de botella antes de que se separaran las poblaciones de Chiloé y el Continente.
9. La población de zorros chilote de Chiloé, aunque es aparentemente más abundante, es la que posee menor variabilidad genética.
10. Existe evidencia genética de nuevas poblaciones de zorro chilote, las que podrían estar aisladas entre sí. Estas serían: Chiloé, Nahuelbuta, Oncol-Gorbea y Reserva Costera-Maullín.
11. Aún no está claro si la baja variabilidad en alelos MHC genera problemas para la supervivencia de las poblaciones de zorro chilote o no. Sin embargo, se considera que representa un riesgo potencial para su conservación.

12. El zorro chilote presenta una prevalencia mayor al 50% de *Mycoplasma* y 14% de gamaherpesvirus, sin evidencias de signos clínicos de enfermedad. Estos son los primeros reportes de estos agentes infecciosos en la especie.
13. La ranita de Darwin presenta una gran diversidad genética no siendo un aspecto de amenaza para su conservación.
14. La ranita de Darwin presenta una gran estructuración genética relacionada con la compleja historia y estructura orogénica de la Patagonia y con los procesos glaciares del pleistoceno.
15. Existe al menos un refugio glaciar en la Patagonia continental para la ranita de Darwin que permitió conservar, durante las glaciaciones, una diversidad genética particular permitiendo una expansión posterior a la retirada de los hielos.
16. Se reconocen al menos 3 Unidades Evolutivamente Significativas en la ranita de Darwin, Continente, Patagonia y Chiloé, que debiesen tratarse de manera independiente en cualquier plan de conservación.
17. Las tres especies incluidas en este estudio han sido modeladas por los eventos paleoclimáticos del pleistoceno en su distribución y variabilidad genética.
18. Pudú y zorro chilote ingresaron a Chiloé en el último periodo interglaciar entre la Última Glaciación Patagónica Austral (180.000 años atrás) y el Último Máximo Glaciar (26.000 – 17.500 años atrás) con la formación de puentes terrestres debido al descenso del nivel del mar. La ranita de Darwin lo habría hecho en el período interglaciar anterior.
19. El noroeste de Chiloé fue un refugio glaciar para las 3 especies estudiadas, las cuales se expandieron por Chiloé una vez retirados los hielos.

AGRADECIMIENTOS

La gratitud es un sentimiento, una emoción o una actitud de reconocimiento de un beneficio que se ha recibido. Sin duda que esta tesis de doctorado no hubiera sido posible sin la ayuda desinteresada de una gran cantidad de personas, amigos y amigas que me ayudaron y alentaron desde mi partida de Chile en el año 2005 hasta mi retorno a España para finalizar el doctorado el 2018. Agradecer probablemente es la única manera en la cual podré retribuir la gran ayuda que muchos de ellos me entregaron. GRACIAS a todos y todas por el apoyo ... gracias de corazón.

Es complejo comenzar a agradecer individualmente cuando han pasado más de 10 años desde que comencé con este desafío y probablemente pueda olvidarme de algunos de ellos. Y sí, realmente ha sido un gran desafío porque dejar mi país para viajar “con las patas y el buche”, como decimos en Chile, ha sido un largo y dificultoso recorrido en donde, además de concluir una tesis doctoral, me ha servido para obtener inmensas y profundas experiencias de vida, positivas y negativas, que me han enriquecido individualmente y me han hecho la persona que soy. En este recorrido también he forjado grandes amistades que, a pesar de la distancia, mantenemos incondicionalmente.

Sin lugar a dudas a quien más debo agradecer es a mi hija Alaia que, si bien hoy no entenderá muchas de las cosas que he pasado, algún día, cuando sea de mayor, leerá estas líneas y quizás conversaremos en relación de esto. A Alaia le estaré eternamente agradecido simplemente por ser ella. Debo disculparme también por no dedicarle el tiempo que hubiese querido y que quizás ella necesitaba cuando yo estaba en terreno recolectando muestras o realizando cualquier actividad de mi doctorado. Quienes han hecho una tesis, saben a lo que me refiero. ¡Te amo hija!

Del mismo modo debo agradecer a toda mi familia que siempre me apoyó a persistir. Dentro de ellos al “primo” Mijndert y su familia holandesa, quienes fueron los primeros en acogerme en Europa no solo ofreciéndome alojamiento, sino trabajo y comida (las hamburguesas de Holanda son re-buenas), con él hicimos una amistad que no teníamos porque no nos conocíamos, pero que ahora perdurará por siempre.

En España muchos son las personas que colaboraron y con las cuales aún mantengo amistad. Aunque no los llamaré españoles, para no herir susceptibilidades, jejeje, mis agradecimientos especiales a Julen y Marijo junto a las pardillas y “los habitantes del bosque Antzoreño”, quienes nos acogieron cuando Alaia nació y con quienes aprendí y reforcé mi forma de percibir las cosas y entender la vida... fueron, son y serán unos maestros para mí. Ahora solo espero recibirlos en Chiloé para devolverles un poco la mano.

También debo mencionar a la Euskaldunas Gemma y Amaia, a quienes también las espero en Chiloé y con quienes compartimos en Basondo y en otras instancias un montón de cosas que creo, nos cambiaron la vida de una u otra forma. A Arkaitz, que aún me cuesta entenderle cuando habla y a tantos otros que me apoyaron en mis primeros meses en la península Ibérica.

Trasladándome a Ciudad Real, debo agradecer en primer lugar a Jose (José) quien no fue solo mi tutor, sino que se transformó en estos años en un gran amigo. No tengo dudas que sin él no hubiese podido terminar mi doctorado, no solo por el apoyo en la investigación y en los proyectos que sacó para financiar parte del muestreo, sino por el apoyo en lo personal, ofreciéndome techo y comida cuando más lo necesité, pues él sabe todas las dificultades que tuve que sortear, desde el punto de vista económico, ya que prácticamente no tuve ninguna beca para mi doctorado, y también en lo personal. Muchas gracias José, ya sabes que tienes donde alojar en Ancud, cabañas hay de sobra y comida también.

Desde los primeros años del doctorado (en ese tiempo comenzaba con el DEA) tuve la suerte de conocer gente especial y amable..., gracias a todos ellos por su compañía y colaboración: Silvia, Carolina, Catarina y en especial a Javitxa que hasta hacía de niñera de mi hija dibujándole a pocoyó. Con javitxa tenemos algunas cosas pendientes, como su viaje a Chile y las migas manchegas... no faltará oportunidad. A Paqui y Pablo por su cariño inagotable cada vez que retornaba a España y a todos los compañeros con los cuales coincidí en el IREC en todos estos años.

Mención especial también para Mauricio y Valeria, los mexicuates, que igualmente me acogieron dándome hospedaje en CR por unos meses donde compartimos una gran amistad. De ahí que hicimos el pacto de no más tv y hasta ahora lo cumplimos. Me fueron a ver a Chile y me ayudaron en terreno. Aún les debo mi visita a México pues tengo que recuperar todo lo que comieron en mi casa. jajaj, pa ya voy!

Los del equipo del basket con quienes compartimos penas y glorias en especial Javato, Valen, Javitxa otra vez y Chule, que me apoyó en algunos momentos difíciles.

Para el muestreo en Chile conté con mucha colaboración, mi gratitud hacia ellos partiendo por la elaboración de las primeras 3 trampas de capturas por parte de mi gran amigo Danilo, con las cuales inicié el muestro de los zorros en Chiloé. Ezequiel, Darío y Millán con quienes formamos un grupo de trabajo y con los cuales hemos salido a terreno muchas veces hasta casi perder la vida, y no es chiste... Eze sabe de qué hablo. A todos los voluntarios, practicantes y tesisistas nacionales y extranjeros que participaron en los muestreos, en especial a Aitor con su frase “Non gogoa, ¡han zangoa!”, o “sin prisa, pero sin pausa”. A los funcionarios de CONAF, SAG, Parque Tantauco, Parque Ahuenco, Parque Oncol, Forestal Arauco, Parque Pumalín, Criadero de Pudú Valdivia, Naviera Austral y Sindicato de Pescadores de río Chepu por su ayuda en facilitar permisos, transporte y acceso a las áreas de muestreo (lanchas, botes, caballos, camioneta, alojamiento, etc.). A Don Patricio Viluñir por su soporte en los terrenos de Nahuelbuta y también por su amistad.

A Víctor vitolín, no sé realmente por qué, pero él quería que lo pusiera en los agradecimientos, jajaj. No, Víctor fue un gran apoyo en esta tesis dándonos hospedaje al equipo de terreno (cuando Tim se comió una panera entera), colaborando en todo tipo de cosas incluso asuntos legales, por su aporte y apoyo en la resolución, gráfica e interpretación de datos algoritmos y exponenciales (chamuyo), además de ser el “guea” que escucha mis problemas y la de mis conocidos, empeorando su estado mental. Ha sido un gran amigo desde los 6 años hasta ahora. Gracias pastelín.

También agradecer a quienes colaboraron con muestras: Eugenia Reyes, Buin Zoo, Zoológico Nacional, Senda Romahue, Claudio Soto, SAG, Marcelo Fuentes, Juliana

Viana, E. MacMahon, W. Johnson. Constanza Napolitano y muchos otros que al saber de mi investigación me guardaban muestras o me daban el aviso de ellas.

Sumo mis agradecimientos a Pedro el grande (GdN), quien me ayudó bastante en las labores de laboratorio incluido los micros, María y Conchi con quienes compartimos el LAB por algún tiempo, Mariajo y Raúl en algunos análisis informáticos de este último período y a todos los del IRÉ (C) quienes en este último tiempo hicieron mi estadía en Ciudad Real más amena, a pesar del trabajo y el tiempo.

A la Universidad San Sebastián por darme la posibilidad de retornar a España a finalizar el doctorado y a los colegas por tenerme paciencia.

A Viviana por darme todo su apoyo y confianza en los últimos 6 meses que estuve en Ciudad Real escribiendo la tesis y a mis amigos Reinaldo y Frank por su gran apoyo y motivación desde que llegué a Puerto Montt.

No quiero dejar pasar a nadie, ya que hay muchos amigos que de una u otra forma han colaborado conmigo en todos estos años, por eso quiero agradecerles de igual forma: Jimmy L., Marcelo C., Felipe L., Rodrigo P., Cristián D., Christian R., Cristian T., Juan D., Jorge A., Cristian V., Henry M., José U., Boris B., Alejandro T. y muchos más.

Finalmente, las gracias a mi familia más cercana, principalmente a mi papá (Carlos), mamá (Ingrid) y hermana (Valeria) a quienes los he llenado de “cachitos” desde entregar trampas a colaboradores, enviarme muestras, hospedar gente, enviar papeles, prestar el auto, prestar plata, hacer trámites, acarrearnos de un lugar a otro y un sinfín de papeleos y cosas que parecen pequeñas pero que no lo son y que han significado muchísimo para mí en todo momento en esta tesis y en mi vida. ¡Gracias amada Familia!

Seguro me estoy olvidando de alguien, no porque sea menos importante sino por el apuro de entregar la tesis de una vez por todas, mis disculpas a ellos y mis más sinceros agradecimientos y respeto.

GRACIAS A TODAS Y TODOS LOS QUE APORTARON EN ESTA TESIS.

ANEXOS

Anexo 1. Listado de muestras de *Pudu puda*

ID	Muestra	Origen	Localidad	Sexo	Edad	Georreferencia		
Ppu001	pelo	Valdivia	Valdivia	M	Adulto	18	655749	5588041
Ppu002	pelo	Llanquihue	Ensenada	M	Viejo	18	706656	5430340
Ppu003	pelo	Llanquihue	Ensenada	M	Adulto	18	706656	5430340
Ppu004	pelo	Llanquihue	Ensenada	M	Adulto	18	706656	5430340
Ppu005	pelo	Pto. Varas	Pto. Varas	M	Joven	18	675581	5421190
Ppu006	pelo	Valdivia	Valdivia	H	Adulto	18	655749	5588041
Ppu007	pelo	Pto. Varas	Pto. Varas	M	Adulto	18	675581	5421190
Ppu008	músculo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu009	músculo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu010	sangre	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu011	sangre	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu012	sangre	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu013	pelo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu014	pelo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu015	pelo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu016	músculo	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu017	pelo	Araucanía	Villarrica	M	Adulto	18	754089	5644358
Ppu018	músculo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu019	músculo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu020	pelo	Chiloé	Quemchi	H	Adulto	18	625108	5334103
Ppu021	pelo	Chiloé	Quemchi	H	Adulto	18	625108	5334103
Ppu022	pelo	Chiloé	Ancud	H	Adulto	18	599235	5362329
Ppu023	pelo	Chiloé	Ancud	ND	ND	18	599235	5362329
Ppu024	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	Viejo	18	675510	5922924
Ppu025	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	Viejo	18	675510	5922924
Ppu026	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu027	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu028	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu029	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Adulto	18	675510	5922924
Ppu030	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	Adulto	18	675510	5922924
Ppu031	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu032	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu033	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	Joven	18	675510	5922924
Ppu034	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Joven	18	675510	5922924
Ppu035	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	Cría	18	675510	5922924
Ppu036	pelo	Concepción	Criadero Conc	M	Adulto	18	675510	5922924

Ppu037	pelo	Concepción	Criadero Conc	H	adulto	18	675510	5922924
Ppu038	pelo	Concepción	Concepción	M	Joven	18	683359	5918217
Ppu039	pelo	Zoo	Criadero Bzoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu040	pelo	Zoo	Criadero Bzoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu041	pelo	Zoo	Criadero Bzoo	M	adulto	19	347163	6296590
Ppu042	pelo	Zoo	Criadero Bzoo	M	adulto	19	347163	6296590
Ppu043	músculo	Zoo	Criadero Bzoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu044	músculo	Zoo	Criadero Bzoo	M	adulto	19	347163	6296590
Ppu045	músculo	Zoo	Criadero Bzoo	M	adulto	19	347163	6296590
Ppu046	pelo	Zoo	Criadero NZoo	M	Adulto	19	347163	6296590
Ppu047	pelo	Zoo	Criadero NZoo	M	Adulto	19	347163	6296590
Ppu048	pelo	Zoo	Criadero NZoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu049	pelo	Zoo	Criadero NZoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu050	pelo	Zoo	Criadero NZoo	M	Cría	19	347163	6296590
Ppu051	pelo	Zoo	Criadero NZoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu052	pelo	Zoo	Criadero NZoo	H	adulto	19	347163	6296590
Ppu053	pelo	Zoo	Criadero NZoo	M	Adulto	19	347163	6296590
Ppu054	pelo	Zoo	Criadero NZoo	H	Adulto	19	347163	6296590
Ppu055	pelo	CRFS	CRFS	ND	ND	18	ND	ND
Ppu056	cuero	Chiloé	Quemchi	ND	ND	18	622782	5334355
Ppu057	cuero	Frontera	Frontera	ND	ND	19	251070	5488819
Ppu058	pelo	Hualaihué	Hualaihué	H	Adulto	18	690691	5348126
Ppu059	pelo	Valdivia	Niebla	H	Joven	18	638028	5586718
Ppu060	pelo	Valdivia	Cayumapu	M	Adulto	18	663288	5599899
Ppu061	pelo	Valdivia	Cayumapu	M	Adulto	18	663288	5599899
Ppu062	pelo	Valdivia	Valdivia	H	Adulto	18	655749	5588041
Ppu063	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	577859	5333043
Ppu064	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	578832	5335383
Ppu065	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	578772	5335236
Ppu066	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	578736	5335156
Ppu067	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	578703	5335114
Ppu068	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	578646	5335057
Ppu069	heces	Chiloé	Río Pescado	ND	ND	18	575749	5331140
Ppu070	heces	Chiloé	Río Pescado	ND	ND	18	575791	5331185
Ppu071	heces	Chiloé	Isla Venado	ND	ND	18	577586	5333441
Ppu072	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	577580	5332836
Ppu073	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	579080	5337243
Ppu074	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	577238	5332355
Ppu075	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	577738	5333236
Ppu076	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	576128	5332171
Ppu077	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	579718	5337408

Ppu078	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	579670	5337230
Ppu079	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	579397	5336986
Ppu080	heces	Chiloé	Tongoy	ND	ND	18	579217	5336960
Ppu081	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578437	5338015
Ppu082	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578672	5337805
Ppu083	pelo	Curicó	Molina	H	Joven	19	293233	6110289
Ppu084	cuero	Chiloé	Linao	M	adulto	18	618935	5356493
Ppu085	heces	Chiloé	Degañ	ND	ND	18	605232	5333886
Ppu086	heces	Chiloé	Degañ	ND	ND	18	605232	5333886
Ppu087	músculo	Chiloé	Degañ	M	adulto	18	605232	5333886
Ppu088	pelo	Chiloé	Lar	H	adulto	18	578240	5333426
Ppu089	pelo	Chiloé	Calen	H	Joven	18	626810	5313656
Ppu090	pelo	Valdivia	Niebla	H	Adulto	18	638028	5586718
Ppu091	pelo	Valdivia	Valdivia	H	Adulto	18	655749	5588041
Ppu092	pelo	Valdivia	Paillaco	M	Adulto	18	680287	5564168
Ppu093	pelo	Valdivia	CRFS	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu094	pelo	Valdivia	Niebla	H	Adulto	18	638028	5586718
Ppu095	pelo	Valdivia	CRFS	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu096	pelo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu097	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu098	pelo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu099	pelo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu100	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu101	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu102	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu103	pelo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu104	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu105	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu106	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu107	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu108	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu109	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu110	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu111	pelo	Valdivia	Criadero Vald	M	Adulto	18	661248	5601403
Ppu112	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu113	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu114	pelo	Valdivia	Criadero Vald	H	Adulto	18	661248	5601403
Ppu115	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	ND	ND
Ppu116	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	ND	ND
Ppu117	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	ND	ND
Ppu118	Pelo	Chiloé	Quemchi	ND	ND	18	612315	5226038

Ppu119	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	586041	5225745
Ppu120	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585945	5225607
Ppu121	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585352	5225735
Ppu122	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585163	5225564
Ppu123	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	584175	5225163
Ppu124	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	584881	5225513
Ppu125	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	580535	5224490
Ppu126	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	580786	5224309
Ppu127	heces	Chiloé	Inio	ND	ND	18	571609	5201733
Ppu128	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	597220	5361488
Ppu129	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	597220	5361488
Ppu130	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	597220	5361488
Ppu131	heces	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	597220	5361488
Ppu132	sangre	Chiloé	Quellón	ND	ND	18	612315	5226038
Ppu133	Pelo	Chiloé	Castro	ND	ND	18	598187	5299437
Ppu134	Pelo	Chiloé	Castro	ND	ND	18	598187	5299437
Ppu135	músculo	Chiloé	Castro	ND	ND	18	606056	5309484
Ppu136	cuero	Chiloé	Yaldad	ND	ND	18	598019	5236315
Ppu137	cuero	Chiloé	Yaldad	ND	ND	18	598941	5236773
Ppu138	sangre	Chiloé	Quellón	ND	ND	18	612315	5226038
Ppu139	sangre	Chiloé	Quellón	ND	ND	18	612315	5226038
Ppu140	sangre	Chiloé	Quellón	ND	ND	18	612315	5226038
Ppu141	sangre	Chiloé	Quellón	ND	ND	18	612315	5226038
Ppu142	pelo	Cañete	Criadero Cañe	M	Adulto	18	640894	5814449
Ppu143	pelo	Cañete	Criadero Cañe	M	Adulto	18	640894	5814449
Ppu144	pelo	Cañete	Criadero Cañe	M	Adulto	18	640894	5814449
Ppu145	pelo	Cañete	Criadero Cañe	M	Adulto	18	640894	5814449
Ppu146	pelo	Cañete	Criadero Cañe	M	Adulto	18	640894	5814449
Ppu147	músculo	Aysén	Aysén	M	adulto	18	678520	4965208
Ppu148	músculo	Aysén	Aysén	M	Cría	18	678520	4965208
Ppu149	pelo	Chiloé	Castro	M	Adulto	18	598187	5299437
Ppu150	sangre	Chiloé	Butalcura	ND	ND	18	606074	5324750
Ppu151	músculo	Chiloé	Cruce Chepu	H	Adulto	18	596751	5346423
Ppu152	músculo	Chiloé	Aguas buenas	ND	adulto	18	612553	5338489
Ppu153	músculo	Chiloé	Ancud	ND	adulto	18	598434	5362886
Ppu154	músculo	Chiloé	El Quilar	M	Adulto	18	611114	5361952
Ppu155	pelo	Pto. Montt	Puerto Montt	ND	ND	18	674662	5406854
Ppu156	sangre	Chiloé	El Quilar	H	Adulto	18	611114	5361952
Ppu157	músculo	Cañete	Cañete	ND	ND	18	640894	5814449
Ppu158	músculo	Chiloé	Butalcura	ND	ND	18	605992	5325608
Ppu159	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	575850	5331731

Ppu160	heces	Aysén	PNLSR	ND	ND	18	587240	4833631
Ppu161	heces	Aysén	PNLSR	ND	ND	18	587240	4833631
Ppu162	heces	Aysén	PNLSR	ND	ND	18	587240	4833631
Ppu163	pelo	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585963	5225839
Ppu164	heces	Chiloé	Rancho Grande	ND	ND	18	575215	5285486
Ppu165	heces	Chiloé	Rancho Grande	ND	ND	18	575637	5285791
Ppu166	heces	Chiloé	Rancho Grande	ND	ND	18	576065	5286556
Ppu167	pelo	Valdivia	Paillaco	ND	ND	18	680287	5564168
Ppu168	pelo	Valdivia	Paillaco	ND	ND	18	680287	5564168
Ppu169	pelo	Valdivia	Paillaco	ND	ND	18	680287	5564168
Ppu170	heces	Chiloé	Lar	ND	ND	18	575548	5331418
Ppu171	pelo	Cañete	Cañete	ND	ND	18	670288	5422987
Ppu172	pelo	Pto. Varas	Pto. Varas	ND	ND	18	670288	5422987
Ppu173	pelo	Pto. Varas	Pto. Varas	ND	ND	18	670288	5422987
Ppu174	pelo	Pto. Varas	Pto. Varas	ND	ND	18	670288	5422987
Ppu175	músculo	Concepción	Hualqui	ND	ND	18	684890	5906539
Ppu176	músculo	Concepción	Coihueco	ND	ND	19	250067	5942106
Ppu177	músculo	Concepción	Coihueco	ND	ND	19	250067	5942106
Ppu178	músculo	Puyehue	Puyehue	ND	ND	19	244138	5646850
Ppu179	sangre	Llanquihue	Llanquihue	ND	ND	18	666089	5429414
Ppu180	sangre	Llanquihue	Llanquihue	ND	ND	18	666089	5429414
Ppu181	sangre	Llanquihue	Llanquihue	ND	ND	18	666089	5429414
Ppu182	sangre	Araucanía	Coñaripe	s/i	s/i	19	757114	5616789
Ppu183	sangre	Valdivia	San José...	ND	ND	18	674829	5621989
Ppu184	sangre	Valdivia	Criadero Vald	ND	ND	18	661248	5601403
Ppu185	sangre	Valdivia	Collico	ND	ND	18	656314	5592568
Ppu186	sangre	Valdivia	Máfil	ND	ND	18	675725	5607245
Ppu187	músculo	Araucanía	Pucón	ND	ND	19	243748	5647785
Ppu188	músculo	Araucanía	Coñaripe	ND	ND	19	757114	5616789
Ppu189	músculo	Araucanía	Villarrica	ND	ND	18	754089	5644358
Ppu190	músculo	Araucanía	Villarrica	ND	ND	18	754089	5644358
Ppu191	músculo	Araucanía	Loncoche	ND	ND	18	702788	5639817
Ppu192	músculo	Araucanía	Licanray	ND	ND	18	744031	5626478
Ppu193	cuero	Chiloé	El Quilar	ND	ND	18	584155	5365149
Ppu194	cuero	Chiloé	El Quilar	ND	ND	18	584155	5365149
Ppu195	cuero	Chiloé	El Quilar	ND	ND	18	584155	5365149
Ppu196	músculo	Valdivia	Niebla	ND	ND	18	638028	5586718
Ppu197	músculo	Valdivia	Mehuín	ND	ND	18	653911	5634147
Ppu198	músculo	Valdivia	Panguipulli	ND	ND	18	726233	5603961
Ppu199	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu200	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041

Ppu201	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu202	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu203	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu204	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu205	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu206	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu207	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu208	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu209	secuencias	Valdivia	Valdivia	ND	ND	18	655749	5588041
Ppu210	músculo	Chiloé	CRFS	ND	ND	18	ND	ND
Ppu211	músculo	Chiloé	Chacao	ND	ND	18	620350	5366664
Ppu212	pelo	Pto. Montt	Puerto Montt	ND	ND	18	674662	5406854
Ppu213	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	694331	5260830
Ppu214	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	692926	5260707
Ppu215	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	692373	5260721
Ppu216	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	691885	5261025
Ppu217	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	692081	5260675
Ppu218	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	692304	5260659
Ppu219	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	697945	5268036
Ppu220	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	697939	5267981
Ppu221	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	696664	5284944
Ppu222	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	696664	5284944
Ppu223	heces	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	696664	5284944
Ppu224	pelo	Aysén	Queulat	ND	ND	18	698927	5098977
Ppu225	heces	Aysén	PNLSR	ND	ND	18	587240	4833631
Ppu226	cuero	Huinay	Huinay	H	Adulto	18	709811	5301141
Ppu227	cuero	Pichicolo	Pichicolo	ND	ND	18	699230	5347012
Ppu228	pelo	Huinay	Huinay	H	ND	18	712799	5304816
Ppu229	pelo	Huinay	Huinay	ND	ND	18	713163	5305795
Ppu230	pelo	Huinay	Huinay	ND	ND	18	712799	5304816
Ppu231	médula	Pumalín	Caleta Gonzalo	ND	ND	18	696664	5284944
Ppu232	músculo	Chiloé	Huentetique	M	s/i	18	588294	5364039
Ppu233	músculo	Chiloé	Castro	H	s/i	18	598187	5299437
Ppu234	pelo	Valdivia	Nontuela	ND	ND	18	711209	5558355
Ppu235	músculo	Chiloé	Quetalmahue	M	adulto	18	586263	5365326
Ppu236	pelo	Aysén	La Junta	ND	ND	18	707612	5128017
Ppu237	pelo	Aysén	Coyhaique	ND	ND	18	730824	4946561
Ppu238	pelo	Huinay	Huinay	ND	ND	18	712946	5304758
Ppu239	cuero	Huinay	Vududahue	ND	ND	18	714720	5293575
Ppu240	cuero	Huinay	Vududahue	ND	ND	18	714720	5293575
Ppu241	cuero	Huinay	Vududahue	ND	ND	18	714720	5293575

Ppu242	pelo	Pto. Montt	Las Quemadas	H	Adulto	18	652530	5415546
Ppu243	pelo	Pumalín	Reñihué	ND	ND	18	717679	5292504
Ppu244	pelo	Pumalín	Reñihué	ND	ND	18	717679	5292504
Ppu245	pelo	Pumalín	Reñihué	ND	ND	18	717679	5292504
Ppu246	pelo	Pumalín	Reñihué	ND	ND	18	717679	5292504
Ppu247	pelo	Aysén	PNLSR	ND	ND	18	587240	4833631
Ppu248	cuero	Aysén	Coyhaique	ND	ND	18	730824	4946561

BZoo: Buin zoo; NZoo: zoológico Nacional; CRFS: centro de rehabilitación de fauna silvestre; ND: no determinado; M: Macho; H: hembra; s/i: sin información.

Anexo 2. Listado de muestras de *Lycalopex fulvipes*

ID	Muestra	Origen	Localidad	Sexo	Edad	Georreferencia		
Pfu001	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Adulto	18	578473.47	5337988.24
Pfu002	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Adulto	18	578805.46	5337935.47
Pfu003	sangre	Chiloé	Lar	H	Adulto	18	577786.77	5333176.43
Pfu004	sangre	Chiloé	Lar	M	Adulto	18	577752.86	5333114.39
Pfu005	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Sub Adulto	18	579715.49	5336866.76
Pfu006	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Sub Adulto	18	579766.63	5336980.45
Pfu007	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Sub Adulto	18	579385.84	5338698.08
Pfu008	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Juvenil	18	579313.01	5338421.06
Pfu009	sangre	Chiloé	Chepu	H	Sub Adulto		s/i	s/i
Pfu012	pelo	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578184,8965	5338019,885
Pfu013	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578759,5611	5337964,308
Pfu014	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578856,3991	5337846,407
Pfu016	heces	Chiloé	Lar	xx	ND	18	577388,9158	5332998,7
Pfu017	heces	Chiloé	Lar	xx	ND	18	577793,6193	5333153,378
Pfu018	heces	Chiloé	Rancho Grande	xx	ND	18	575134,7098	5284566,629
Pfu019	heces	Chiloé	Rancho Grande	xx	ND	18	575542,6463	5285444,025
Pfu020	heces	Chiloé	Rancho Grande	xx	ND	18	574922,4187	5284918,124
Pfu021	cuero	Chiloé	Rahue	xx	ND	18	572092,3617	5273131,663
Pfu022	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578833,852	5337893,298
Pfu023	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578386,7609	5338140,465
Pfu024	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578928,8652	5337797,293
Pfu025	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578739,8281	5337981,851
Pfu026	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578373,75	5338026,121
Pfu027	sangre	Chiloé	Yaldad	H	Adulta	18	598924.24	5236679.98
Pfu028	sangre	Chiloé	Yaldad	M	Joven	18	598667.78	5236575.17
Pfu029	sangre	Chiloé	Rahue	H	Adulto	18	572170.30	5273440.24
Pfu030	sangre	Chiloé	Rahue	M	Sub Adulto	18	572449.11	5273370.36
Pfu031	sangre	Chiloé	Rahue	M	Sub Adulto	18	572965.55	5273196.68
Pfu032	sangre	Chiloé	Yaldad	ND	ND	18	598188.87	5236444.88
Pfu033	sangre	Chiloé	Yaldad	M	Sub Adulto	18	598640.60	5236521.69
Pfu034	cuero	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	Adulto	18	678701,144	5811530,483
Pfu035	cuero	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	Adulto	18	673009,840	5811786,138

Pfu038	sangre	Chiloé	Yaldad	H	Adulto	18	598995,45	5236509,12
Pfu040	heces	Chiloé	Chaiguaco	ND	ND	18	581672,0005	5224095,323
Pfu041	heces	Chiloé	Chaiguaco	ND	ND	18	582066,1432	5224380,476
Pfu042	heces	Chiloé	Chaiguaco	ND	ND	18	580303,2848	5223655,322
Pfu043	heces	Chiloé	Inio	ND	ND	18	568678,1349	5204380,158
Pfu044	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585794,025	5225624,98
Pfu045	heces	Chiloé	Chaiguaco	ND	ND	18	580631,5188	5223739,745
Pfu046	heces	Chiloé	Rancho Grande	ND	ND	18	575519,5819	5285655,279
Pfu047	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	585189,1995	5225609,905
Pfu048	heces	Chiloé	Chaiguata	ND	ND	18	582906,9092	5225003,169
Pfu049	heces	Chiloé	Chaiguaco	ND	ND	18	580693,5436	5224361,656
Pfu050	heces	Chiloé	Ahuenco	ND	ND	18	578476,575	5337955,242
Pfu052	heces	Chiloé	Pirámide	ND	ND	18	571150,0863	5222538,44
Pfu053	heces	Chiloé	Pirámide	ND	ND	18	571711,084	5222703,042
Pfu054	heces	Chiloé	Pirámide	ND	ND	18	571748,54	5222738,299
Pfu055	sangre	Chiloé	Palomar	M	Adulto	18	601721,1898	5342584,113
Pfu056	sangre	Chiloé	Palomar	H	Adulto	18	601721,1898	5342584,113
Pfu057	sangre	Chiloé	Palomar	M	Adulto	18	601721,1898	5342584,113
Pfu058	sangre	Chiloé	Rancho Grande	H	Adulto	18	575089,5656	5285447,714
Pfu059	sangre	Chiloé	Chaiguaco	H	Adulto	18	580267,2441	5223571,891
Pfu060	sangre	Chiloé	Emerenciana	M	Adulto	18	558796,4719	5222579,412
Pfu061	sangre	Chiloé	Emerenciana	M	Adulto	18	558139,6133	5222517,747
Pfu062	sangre	Chiloé	Lar	H	Sub Adulto	18	577511,1622	5332986,698
Pfu063	sangre	Chiloé	Lar	M	Adulto	18	577165,3792	5332846,128
Pfu064	heces	Chiloé	Emerenciana	ND	ND	18	560120,84	5222414,7
Pfu065	heces	Chiloé	Emerenciana	ND	ND	18	558457,4753	5222525,578
Pfu066	heces	Chiloé	Emerenciana	ND	ND	18	557594,419	5222581,24
Pfu067	heces	Chiloé	Pirámide	ND	ND	18	571084,4354	5222380,415
Pfu068	heces	Chiloé	Pirámide	ND	ND	18	571043,1727	5222299,324
Pfu069	heces	Chiloé	Emerenciana	ND	ND	18	559690,9407	5222842,62
Pfu070	heces	Chiloé	Emerenciana	ND	ND	18	565110,6916	5222661,369
Pfu071	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu072	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu073	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu074	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu075	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu076	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu077	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu078	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu079	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu080	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu081	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu082	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu083	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu084	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu085	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu086	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ

Pfu088	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu089	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu090	ADN	Nahuelbuta	P.N. Nahuelbuta	ND	ND	18	WJ	WJ
Pfu091	sangre	Chiloé	San Antonio	H	Juvenil	18	597098.68	5354186.17
Pfu092	sangre	Chiloé	San Antonio	M	Juvenil	18	597098.68	5354186.17
Pfu093	sangre	Chiloé	San Antonio	H	Juvenil	18	597098.68	5354186.17
Pfu094	sangre	Chiloé	San Antonio	H	Adulto	18	597098.68	5354186.17
Pfu097	pelo	Chiloé	Lar	M	Adulto	18	578249,7538	5333502,906
Pfu098	heces	Chiloé	San Antonio	ND	ND	18	597098,6813	5354186,181
Pfu099	heces	Chiloé	San Antonio	ND	ND	18	597098,6813	5354186,181
Pfu100	musculo	Gorbea	Gorbea	M	Adulto	18	691407,4487	5659461,184
Pfu101	cuero	Chiloé	Museo	H	Adulto		s/i	s/i
Pfu102	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Adulto	18	578311.78	5338089.56
Pfu103	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Adulto	18	578326.12	5338084.79
Pfu104	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Adulto	18	578339.40	5338103.20
Pfu105	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Adulto	18	579072.00	5337343.00
Pfu106	sangre	Chiloé	Lar	M	Adulto	18	577842.51	5333292.41
Pfu107	sangre	Chiloé	Lar	H	Adulto	18	577511.16	5332986.68
Pfu108	sangre	Nahuelbuta	Butamalal	H	Adulto	18	672011.00	5812349.00
Pfu109	sangre	Nahuelbuta	Butamalal	H	Juvenil	18	672592.00	5812806.00
Pfu110	sangre	Nahuelbuta	Butamalal	H	Juvenil	18	672496.00	5812649.00
Pfu111	sangre	Nahuelbuta	Butamalal	M	Adulto	18	672810.00	5812029.00
Pfu112	sangre	Chiloé	Cole-Cole	H	Adulto	18	567848.96	5295715.96
Pfu113	sangre	Chiloé	Cole-Cole	M	Adulto	18	567582.00	5295217.00
Pfu114	sangre	Chiloé	Yaldad	M	Adulto	18	599361.35	5236660.18
Pfu115	sangre	Chiloé	Chaiguata	H	Adulto	18	583318.47	5224791.42
Pfu116	sangre	Chiloé	Chaiguata	M	Adulto	18	583952.86	5224884.74
Pfu117	sangre	Chiloé	Chaiguaco	M	Adulto	18	580050.69	5223463.24
Pfu118	sangre	Chiloé	Tara	M	Adulto	18	597103.85	5269900.01
Pfu119	sangre	Chiloé	Puntra	H	Adulto	18	598369.08	5335210.08
Pfu120	sangre	Chiloé	Caleta zorra	H	Adulto	18	558290.63	5222526.95
Pfu121	sangre	Chiloé	Caleta zorra	M	Adulto	18	559068.26	5222561.22
Pfu122	sangre	Chiloé	Queilen	M	Adulto	18	618077.69	5238839.29
Pfu123	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Juvenil	18	577716.21	5333105.94
Pfu124	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Juvenil	18	579614.18	5336993.56
Pfu125	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Adulto	18	578349.34	5338070.21
Pfu126	sangre	Chiloé	Chaiguaco	M	Adulto	18	580806.00	5226667.00
Pfu127	sangre	Chiloé	Tablaruca	M	Adulto	18	573053	5248571
Pfu128	sangre	Chiloé	Tablaruca	M	Adulto	18	573053	5248571
Pfu129	sangre	Chiloé	Tablaruca	H	Juvenil	18	572608	5248902
Pfu130	sangre	Chiloé	Tablaruca	M	Adulto	18	576789	5248707
Pfu131	sangre	Oncol	Oncol	H	adulto	18	643012.08	5603739.77
Pfu132	sangre	Nahuelbuta	Butamalal	M	Adulto	18	672534.29	5812531.14
Pfu133	sangre	Oncol	Oncol	H	Adulto	18	642628.12	5604072.34
Pfu134	sangre	Chiloé	Chaiguata	H	Adulto	18	586012.49	5225914.55
Pfu135	sangre	Chiloé	Ahuenco	H	Juvenil	18	578980.38	5337730.52
Pfu136	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Juvenil	18	579051.26	5337687.53

Pfu137	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Juvenil	18	579072.23	5337329.95
Pfu138	sangre	Chiloé	Ahuenco	M	Adulto	18	578172.09	5338043.11
Pfu139	sangre	Valdivia	Reserva Costera	H	Sub Adulto		s/i	s/i
Pfu140	sangre	Valdivia	Reserva Costera	M	Adulto		s/i	s/i
Pfu141	sangre	Valdivia	Reserva Costera	H	Adulto		s/i	s/i
Pfu142	sangre	Chiloé	Guabún	M	Adulto	18	582308.32	5372934.21
Pfu143	sangre	Chiloé	Huite	s/i	s/i		s/i	s/i
Pfu144	sangre	Chiloé	Yaldad	M	Sub Adulto		s/i	s/i
Pfu145	sangre	Chiloé	Chaiguata	H	Sub Adulto		s/i	s/i
Pfu146	sangre	Chiloé	Chaiguata	M	Adulto		s/i	s/i
Pfu147	sangre	Chiloé	Yaldad	H	Adulto	18	594579	5234034
Pfu148	sangre	Chiloé	Chaiguata	H	Adulto	18	585254	5225927
Pfu149	sangre	Chiloé	Chaiguata	M	Adulto	18	593619.11	5234010
Pfu150	sangre	Chiloé	Yaldad	H	Adulto	18	592511	5233776

P.N.: Parque Nacional; ND: no determinado; M: Macho; H: hembra; s/i: sin información.

Anexo 3. Listado de muestras de *Rhinoderma darwinii*

ID	Muestra	Origen	Localidad	Georreferencia		
Rda01	Tejido Museo	Bahía Mansa, Osorno.	Los Lagos	18	653760	5509730
Rda02	Tejido Museo	Bahía Mansa, Osorno.	Los Lagos	18	653760	5509730
Rda03	Tejido Museo	Bahía Mansa, Osorno.	Los Lagos	18	653760	5509730
Rda04	Tejido Museo	?	Los Lagos		s/i	s/i
Rda05	Tejido Museo	Cerro Derrumbes, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	735940	5442162
Rda06	Tejido Museo	Cerro Derrumbes, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	735940	5442162
Rda07	Tejido Museo	Valdivia	Los Ríos	18	650185	5590793
Rda08	Tejido Museo	Puyuhuapi	Aysén	18	694502	5089724
Rda09	Tejido Museo	Valdivia	Los Ríos	18	650185	5590793
Rda10	Tejido Museo	Isla Mocha	Biobío	18	595164	5752215
Rda11	Tejido Museo	Isla Mocha	Biobío	18	595164	5752215
Rda12	Tejido Museo	Isla Mocha	Biobío	18	595164	5752215
Rda13	Tejido Museo	Isla Mocha	Biobío	18	595164	5752215
Rda14	Tejido Museo	Isla Mocha	Biobío	18	595164	5752215
Rda15	Tejido Museo	Lago Llanquihue	Los Lagos	18	697967	5451619
Rda16	Tejido Museo	Bahía Mansa, Osorno.	Los Lagos	18	653760	5509730
Rda17	Tejido Museo	Valdivia	Los Ríos	18	650185	5590793
Rda18	Tejido Museo	Bosque el Quilar, cercano a Ancud, Chiloé.	Chiloé	18	614586	5356038
Rda19	Tejido Museo	Bosque el Quilar, cercano a Ancud, Chiloé.	Chiloé	18	614586	5356038
Rda20	Tejido Museo	Bosque el Quilar, cercano a Ancud, Chiloé.	Chiloé	18	614586	5356038
Rda21	Tejido Museo	Bosque el Quilar, cercano a Ancud, Chiloé.	Chiloé	18	614586	5356038
Rda22	Tejido Museo	Bosque el Quilar, cercano a Ancud, Chiloé.	Chiloé	18	614586	5356038
Rda23	Tejido Museo	Valdivia	Los Ríos	18	650185	5590793
Rda24	Tejido Museo	Valdivia	Los Ríos	18	650185	5590793
Rda25	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda26	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda27	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049

Rda28	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda29	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda30	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda31	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda32	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda33	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda34	Tejido Museo	M.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda35	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda36	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda37	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda38	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda39	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda40	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda41	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda42	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda43	Tejido Museo	Caleta Manzano, Llanquihue.	Los Lagos	18	695423	5344451
Rda44	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda45	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda46	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda47	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda48	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda49	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda50	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda51	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda52	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda53	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda54	Tejido Museo	Llanquihue, PN V. Pérez Rosales.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda55	Swab Bucal	Butamalal, Cañete.	Biobío	18	671806	5814026
Rda56	Swab Bucal	Butamalal, Cañete.	Biobío	18	671806	5814026
Rda57	Swab Bucal	Butamalal, Cañete.	Biobío	18	671806	5814026
Rda58	Swab Bucal	Butamalal, Cañete.	Biobío	18	671806	5814026
Rda59	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda60	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda61	Swab Bucal	Coñaripe	Los Ríos	18	756966	5616716
Rda62	Swab Bucal	Coñaripe	Los Ríos	18	756966	5616716
Rda63	Swab Bucal	Coñaripe	Los Ríos	18	756966	5616716
Rda64	Swab Bucal	Salto del Puma, Huilo Huilo.	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda65	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	748175	5451290
Rda90	Tejido Museo	Ramadillas, Arauco.	Biobío	18	654816	5870097
Rda91	Tejido Museo	Chiloé.	Chiloé	18	589184	5310030
Rda92	Tejido Museo	Chiloé.	Chiloé	18	589184	5310030
Rda93	Tejido Museo	Ramadillas, Arauco.	Biobío	18	654816	5870097
Rda94	Tejido Museo	Elicura, San Ernesto, Contulmo.	Biobío	18	655557	5798899
Rda95	Tejido Museo	8 Km al Norte de Valdivia.	Los Ríos	18	655908	5596757
Rda96	Tejido Museo	Lago Lanalhue, Contulmo.	Biobío	18	646142	5804004
Rda97	Tejido Museo	Lago Yelcho, La Cabaña.	Los Lagos	18	710855	5209910
Rda98	Tejido Museo	Lago Lanalhue, Contulmo.	Biobío	18	646142	5804004

Rda99	Tejido Museo	Río Manzanares, Nahuelbuta.	Araucanía	18	677637	5812802
Rda100	Tejido Museo	Alto La Cueva, Nahuelbuta.	Biobío	18	665934	5824478
Rda101	Tejido Museo	Yerbas Buenas, 15 km al sur de P. Montt.	Los Lagos	18	678263	5405713
Rda102	Tejido Museo	Alto La Cueva, Nahuelbuta.	Biobío	18	665934	5824478
Rda103	Tejido Museo	Pucatrihue, Osorno.	Los Lagos	18	655076	5508625
Rda104	Tejido Museo	Pucatrihue, Osorno.	Los Lagos	18	655076	5508625
Rda105	Tejido Museo	Pucatrihue, Osorno.	Los Lagos	18	655076	5508625
Rda106	Tejido Museo	Hueicolla, La Unión.	Los Ríos	18	614234	5553067
Rda107	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda108	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda109	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda110	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda111	Tejido Museo	Alto La Cueva, Nahuelbuta.	Biobío	18	665934	5824478
Rda112	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda113	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda114	Tejido Museo	P.N. Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda115	Swab Bucal	R.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda116	Swab Bucal	R.N. Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda117	Swab Bucal	HMIM	Los Lagos	18	s/i	s/i
Rda118	Swab Bucal	Mirador Iníó, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda119	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda120	Swab Bucal	El Natre, Contulmo.	Biobío	18	655439	5791049
Rda121	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda122	Swab Bucal	Sendero Botánico, Huilo Huilo.	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda123	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda124	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	750748	5499768
Rda125	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	750748	5499768
Rda126	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda127	Swab Bucal	Mirador Iníó, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda128	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda129	Larva etanol	Pirámide (Parada Ciprés), Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	565028	5222648
Rda130	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda131	Swab Bucal	Loteo Pudú, Huilo Huilo.	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda132	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda133	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda134	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	19	267403	5629873
Rda135	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda136	Swab Bucal	Caulín, Chiloé.	Chiloé	18	607688	5368594
Rda137	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda138	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda139	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda140	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda141	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	19	267403	5629873
Rda142	Swab Bucal	Mirador Iníó, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda143	Swab Bucal	Alerzales, cerca de Cucao, Chiloé.	Chiloé	18	573267	5281569
Rda144	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda145	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873

Rda146	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda147	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda148	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda149	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, P.N. Puyehue.	Los Lagos	19	267403	5629873
Rda150	Swab Bucal	Alerzales, cerca de Cucao, Chiloé.	Chiloé	18	573267	5281569
Rda151	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda152	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda153	Swab Bucal	Mirador Inío, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda154	Swab Bucal	Alerzales, cerca de Cucao, Chiloé.	Chiloé	18	573267	5281569
Rda155	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda156	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda157	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda158	Swab Bucal	P.N. Alerce Costero	Los Ríos	18	628847	5548498
Rda159	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda160	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	750748	5499768
Rda161	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda162	Swab Bucal	Mirador Inío, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda163	Swab Bucal	Alerzales, cerca de Cucao, Chiloé.	Chiloé	18	573267	5281569
Rda164	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda165	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda166	Swab Bucal	Quetrupillán, P.N. Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda167	Swab Bucal	P.N. Alerce Costero	Los Ríos	18	628847	5548498
Rda168	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda169	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	750748	5499768
Rda170	Swab Bucal	Refugio huillín, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	569044	5215559
Rda171	Swab Bucal	Mirador Inío, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda172	Swab Bucal	Alerzales, cerca de Cucao, Chiloé.	Chiloé	18	573267	5281569
Rda173	Swab Bucal	Senda Darwin, Chiloé.	Chiloé	18	610700	5362304
Rda174	Swab Bucal	El Natre, Contulmo.	Biobío	18	655439	5791049
Rda175	Swab Bucal	Mirador Inío, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	571945	5200559
Rda176	Swab Bucal	Quetrupillán, PN Villarrica.	Araucanía	19	267403	5629873
Rda177	Swab Bucal	Sendero Botánico, Huilo Huilo.	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda178	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda179	Swab Bucal	El Natre, Contulmo.	Biobío	18	655439	5791049
Rda180	Swab Bucal	Yaldad, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	586025	5225579
Rda181	Swab Bucal	Salto del Indio, Anticura, PN Puyehue.	Los Lagos	18	750748	5499768
Rda182	Adulto etanol	El Natre, Contulmo.	Biobío	18	655439	5791049
Rda183	Juvenil etanol	Leñera, Angostura, PN Queulat.	Aysén	18	698157	5098587
Rda184	Juvenil etanol	Leñera, Angostura, PN Queulat.	Aysén	18	698157	5098587
Rda185	Juvenil etanol	Agua, Inio, Tantauco, Chiloé.	Chiloé	18	619618	5246601
Rda186	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda187	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda188	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda189	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda190	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda191	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda192	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601

Rda193	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda194	Swab Bucal	Isla Tranqui-Chiloé	Chiloé	18	619618	5246601
Rda195	Swab Bucal	Huilo-Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda196	Swab Bucal	Huilo-Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda197	Swab Bucal	Huilo-Huilo, salto Puma- macho	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda198	Swab Bucal	Huilo-Huilo, salto Puma- hembra	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda199	Swab Bucal	Huilo-Huilo, salto Puma- macho	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda200	Swab Bucal	Huilo-Huilo sitio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda201	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda202	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda203	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel-macho	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda204	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel-hembra	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda205	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda206	Swab Bucal	Huilo Huilo, hotel	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda207	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu1	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda208	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu1	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda209	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu1	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda210	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu2	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda211	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu2	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda212	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu2	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda213	Swab Bucal	Huilo Huilo sitio pudu2	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda214	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda215	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda216	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda217	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda218	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda219	Swab Bucal	Huilo Huilo stio pudu3	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda220	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda221	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda222	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda223	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda224	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda225	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda226	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda227	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda228	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda229	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda230	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda231	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda232	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda233	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda234	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda235	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda236	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda237	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda238	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda239	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850

Rda240	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda241	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda242	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda243	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda244	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda245	Swab Bucal	Huilo Huilo	Los Ríos	19	251406	5583850
Rda246	Swab Bucal	P.N. Puyehue Pajaritos Send. Chile.	Los Lagos	18	727751	5490340
Rda247	Swab Bucal	P.N. Puyehue Pajaritos Send. Chile.	Los Lagos	18	727751	5490340
Rda248	Swab Bucal	P.N. Puyehue Pajaritos Send. Chile.	Los Lagos	18	727751	5490340
Rda265	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda266	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda267	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda268	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda269	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda270	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda271	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda272	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda273	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda274	Museo dedo	Mehuín	Los Ríos	18	655047	5634374
Rda275	Museo dedo	Nahuelbuta	Araucanía	18	677637	5812802
Rda276	Museo dedo	Contulmo	Biobío	18	655439	5791049
Rda277	Museo dedo	La Zaval- Vald	Los Ríos	18	649039	5592672
Rda278	Museo dedo	La Zaval- Vald	Los Ríos	18	649039	5592672
Rda279	Museo dedo	La Zaval- Vald	Los Ríos	18	649039	5592672

P.N.: Parque Nacional; M.N: Monumento Nacional.



Instituto de Investigación en
Recursos Cinegéticos

CSIC - UCLM - JCCM



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Castilla-La Mancha