

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Estructura genética poblacional de roedores de la especie  
*Akodon azarae* en ambientes fragmentados de la Pampa

Interior

por

**Lic. Noelia Soledad Vera**

**Directora: Dra. Cristina Noemí Gardenal**  
**Co-Director: Dr. José Waldemar Priotto**

Lugar de Trabajo

**Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA)**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2015

## **Comisión asesora**

Dra. Cristina Noemí Gardenal

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Beatriz García

Facultades de Ciencias Médicas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Marcelo Kittlein

Facultades de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata

## **Defensa oral y pública**

Lugar y Fecha:

Calificación:

## **Tribunal**

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

*A mis amores*  
*Juan Manuel y Aldana*

## Agradecimientos

El siguiente trabajo ha sido logrado gracias a la colaboración y el esfuerzo de muchas personas quienes han brindado su tiempo, conocimientos, paciencia... “y sobre todo su confianza y solidaridad”.

- A mis directores: Dra Noemí Gardenal y el Dr José Priotto por haber depositado su confianza para la realización de este emprendimiento, por haberme guiado y acompañado a lo largo de todo este camino de formación.
- A los miembros de mi Comisión Asesora, Dra. Beatriz García y Dr. Marcelo Kittlein por sus sugerencias, consejos y buena predisposición en todas las reuniones de tesis.
- A la Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigación Científicas y Tecnológicas por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.
- A la Dra Marina Chiappero: por apuntalar mi trabajo durante todos estos años con ayuda y entrenamiento en los trabajos del laboratorio y análisis de datos.
- Al Dr. Raúl González Ittig y la Dra. Fabiana Carletto Körber: Por su buena predisposición, compañerismo y confianza en la realización de otros trabajos que contribuyen a mi formación científica y académica.
- A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que me acompañaron y acompañan a lo largo de estos años donde compartimos momentos académicos, personales, tantas horas de “banalidad”, mates, charlas y salidas. Simplemente gracias por el calor humano que los caracteriza, por la mano siempre solidaria, por la confianza, por hacerme sentir cómoda y extrañar menos mi querida tierra colorada.
- A todas las personas que componen el grupo de Río Cuarto, por su calidez, amabilidad, hospitalidad y compañerismo en los muestreos, congresos y cursos compartidos. Muchas gracias por el aporte de bibliografía, fotos y otras consultas sobre ecología de la especie.
- A mis amigas de la vida Lety, Pato y Romi por su amistad incondicional, por acompañarme en este proyecto así como en cada momento de mi vida aquí y a la distancia; especialmente a Romi por abrirme las puertas de su casa, por su compañía, confianza, optimismo y por ayudarme a dar mis primeros pasos en Córdoba.

- A mis amigas de la Facu que aunque estemos dispersas por todo el país, siempre existe un punto de encuentro en algún lugar, por sus consejos, por el aliento, por la hospitalidad en congresos o cursos y sobre todo por estar en ese mensaje alentador todos los días. A las chicas de Córdoba gracias por los mates y charlas compartidas, por revivir viejos momentos, por los consejos, sugerencias y por su inmensa solidaridad.
- A mi hermana Mirna y cuñado Ariel por apoyarme desde el primer día, por estar siempre y en cada momento, por ser incondicionales, por sus palabras de aliento y por hacer que tanto cariño aminoren las distancias.
- Y finalmente a los amores de mi vida:  
 A mi esposo Juan Manuel: por acompañarme en este proyecto desde el primer día, por haber decidido transitar juntos la vida en esta nueva ciudad, por su aliento, optimismo, ayuda cotidiana, entrega, compañerismo, fuerzas y sobre todo por el amor que me brinda día a día.  
 A la luz de mis ojos, mi pequeña Aldana quien es el principal motor de mi vida. Su sonrisa, alegría e inocencia son las fuerzas para seguir siempre adelante.

Fuentes de financiamiento que hicieron posible este trabajo:

- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, FONCYT 2006-2009 (PICT 353) Genética del paisaje: estructura poblacional de especies de roedores que utilizan diferencialmente ambientes fragmentados. Titular: Dra. Cristina Noemí Gardenal
- Secretaría de Ciencia y Técnica (Universidad Nacional de Córdoba) 2008- 2011. Estructura genética poblacional a nivel microgeográfico en especies de roedores silvestres que utilizan diferencialmente ambientes fragmentados. Titular: Dra Marina B. Chiappero
- Conicet PIP 2011-2013 .Caracterización de la estructura poblacional de roedores sigmodontinos en ambientes fragmentados de agroecosistemas del centro de argentina. Titular Dr. José W. Priotto

## **Publicaciones derivadas de la tesis**

Vera NS, Chiappero MB, Priotto JW, Gardenal CN (2011). Isolation of microsatellite loci in *Akodon azarae* (Muridae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other Akodontini species. *Journal of Genetics* 90: 25-29.

# Índice

<b>Comisión asesora</b> .....	i
<b>Dedicatoria</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Publicaciones derivadas de esta Tesis</b> .....	v
<b>Índice</b> .....	vi
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1 Fragmentación del hábitat y cambios en el paisaje.....	3
1.2 Estructura genética de poblaciones naturales. ....	4
1.2.1 Fuerzas evolutivas que influyen en la estructura genética de las poblaciones.....	5
1.3 Aportes de los marcadores moleculares a la genética de poblaciones .....	6
1.4 Ecología Molecular y Genética del Paisaje.....	7
1.5 Dispersión. ....	7
1.5.1 Estimación de la dispersión.....	8
1.6 Herramientas estadísticas para el análisis de la estructura genética.....	9
1. 6. 1. Estadísticos F de Wright .....	9
1. 6. 2. Pruebas de asignación .....	10
1. 6. 3 Análisis de autocorrelación espacial.....	11
1. 6. 4 Aislamiento por distancia.....	11
1. 7 Antecedentes de estudios de la dispersión en pequeños mamíferos.....	12
1. 8 La especie.....	14
1. 9 Patrones de dispersión en roedores del centro-sur de la provincia de Córdoba.....	18
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
General.....	21
Específicos.....	21
<b>Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>
2.1 Área de estudio .....	23
2.2 Obtención de muestras .....	24
2.2.1 Dispositivo de muestreo para el estudio de la estructura genética de <i>A. azarae</i> a escala geográfica fina.....	24

2.2.2 Dispositivo de muestreo para el análisis de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de <i>A. azarae</i> .....	26
2.3 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para <i>A. azarae</i> .....	27
2.3.1 Extracción de ADN.....	28
2.3.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	28
2.3.3 Unión de adaptadores a los fragmentos de ADN.....	28
2.3.4 Enriquecimiento con perlas magnéticas para la detección de fragmentos de ADN con microsatélites.....	29
2.3.5 PCR de fragmentos de ADN enriquecidos.....	30
2.3.6 Inserción del ADN enriquecido en un vector de clonación.....	30
2.3.7 Transformación.....	31
2.3.8 Secuenciación de los fragmentos con microsatélites.....	32
2.3.9 Análisis de secuencias y diseño de cebadores.....	32
2.3.10 Estandarización de la amplificación de los microsatélites.....	32
2.4 Análisis de la estructura genética de <i>A. azarae</i> a escala geográfica fina.....	33
2.4.1 Extracción de ADN y amplificación de loci de microsatélites.....	33
2.4.2 Estimación de la variabilidad, equilibrio de Hardy-Weinberg y diferenciación genética poblacional.....	34
2.4.3 Estructura Genética Espacial (EGE).....	35
2.5 Análisis del efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de <i>A. azarae</i> .....	36
2.5.1 Extracción de ADN y amplificación de loci de microsatélites.....	36
2.5.2 Identificación de subpoblaciones por métodos “a posteriori”.....	36
2.5.3 Análisis de aislamiento por distancia.....	37
<b>3. Resultados.....</b>	<b>38</b>
3.1 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para <i>A. azarae</i> .....	38
3.2 Análisis de la estructura genética de <i>A. azarae</i> a escala geográfica fina.....	41
3.2.1 Resultados del muestreo estacional.....	41
3.2.2 Estimación de la variabilidad y equilibrio de Hardy-Weinberg. ....	41



3.2.3 Diferenciación genética entre poblaciones.....	41
3.2.4 Estructura genética espacial.....	46
3.3 Análisis del efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de <i>A. azarae</i> .....	50
3.3.1 Análisis de la estructuración poblacional mediante análisis de agrupación bayesiana.....	50
3.3.2 Aislamiento por distancia.....	55
<b>4.Discusión.....</b>	<b>56</b>
4.1 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para <i>A. azarae</i> .....	56
4.2 Análisis de la estructura genética de <i>A. azarae</i> a escala geográfica fina.....	56
4.2.1 Niveles de variabilidad genética y Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	57
4.2.2 Estructura genética de <i>A. azarae</i> en ambientes lineales de agroecosistemas pampeanos.....	59
4.2.3 Estructura genética espacial por sexo y estación.....	60
4.3 Efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de <i>A. azarae</i> .....	64
<b>5.Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>6 Referencias bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

## Resumen

Los agroecosistemas del sur de la provincia de Córdoba son un buen ejemplo del proceso de fragmentación del hábitat. Como parte de un proyecto tendiente a evaluar los efectos de barreras naturales y artificiales sobre la estructura genética de poblaciones que habitan la región, en esta Tesis se utilizó como modelo biológico a *Akodon azarae*, un especialista en relación al uso del hábitat, numéricamente dominante en los ambientes más estables como los pastizales naturales, bordes de cultivos, caminos y arroyos y terraplenes de ferrocarril. Esta especie presenta fluctuaciones estacionales en la abundancia, con un mínimo en los meses de primavera e invierno y valores máximos hacia finales de otoño. Se utilizaron microsátélites como marcadores moleculares; se aislaron y caracterizaron 10 loci específicos para *A. azarae*, de los cuales 8 resultaron altamente polimórficos. Para el análisis de la dispersión por sexo en las diferentes estaciones de un período reproductivo completo a escala geográfica fina, los roedores se capturaron en líneas de trampa ubicadas en bordes de caminos de un agroecosistema del departamento de Río Cuarto, Córdoba. Los valores de diferenciación genética entre poblaciones temporales y los patrones de autocorrelación espacial revelaron que los límites de las poblaciones genéticas ocupan una extensión mayor que la del área geográfica considerada en este análisis. El alto flujo génico a lo largo de hábitats de bordes y la corta duración de la fase de baja densidad poblacional garantizarían el mantenimiento de niveles elevados de variabilidad genética en la población durante los ciclos anuales. La dispersión en estos hábitats varió según el sexo. En hembras, el principal factor limitante fue la disponibilidad de cobertura vegetal que sirva como alimento o refugio; en los machos la dispersión depende de la posibilidad de acceso a hembras reproductivas, lo cual está relacionado con el sistema de apareamiento poligínico que opera en defensa de las hembras.

Para estudiar el efecto de posibles barreras para la dispersión a escala de paisaje sobre la estructuración genética de *Akodon azarae*, se instalaron 13 líneas de trampas cubriendo un área de aproximadamente 1000 km<sup>2</sup> a ambos lados de caminos rurales, rutas pavimentadas y no pavimentadas, campos de cultivo y un arroyo. La presencia de discontinuidades genéticas se determinó mediante análisis bayesiano. Se identificaron nueve poblaciones, demostrando una clara subdivisión espacial dentro del área estudiada.

## Abstract

Agroecosystems of southern Córdoba province is a good example of the process of habitat fragmentation. As part of a project to assess the effects of natural and artificial barriers on the genetic structure of populations inhabiting the region, in this Thesis we used as *Akodon azarae* as a biological model. The species is a habitat specialist, numerically dominant in relatively stable environments such as remnant areas of native vegetation, crop field and stream borders, roadsides and railway banks. *A. azarae* shows seasonal fluctuations in abundance, with a minimum in spring and winter, and peaks in late autumn. We used microsatellite loci as molecular markers; we isolate and characterized 10 loci specific for *A. azarae*, 8 of them being highly polymorphic. For the analysis of possible sex biased dispersal during the breeding season at fine geographical scale, rodents were captured seasonally in trap lines located on roadsides in an agroecosystem of the Río Cuarto Department, Córdoba. Values of genetic differentiation among populations and temporal patterns of spatial autocorrelation revealed that the limits of genetic populations are larger than the extension of the sampled area. The high levels of gene flow along linear habitats and the short duration of the phase of low population density would contribute to the maintenance of high polymorphic populations during the annual cycles. The dispersion along linear habitats was influenced by sex. In females, the main limiting factor was the availability of vegetation serving as food or shelter. In males, dispersal depends on the accessibility to reproductive females, which is related to the polygynous mating system operating in defense of females.

We also studied the effect of potential barriers to dispersal on the genetic structure of *A. azarae* at a landscape scale. Thirteen trap lines were installed covering an area of about 1000 km<sup>2</sup>, on either side of rural roads, paved and unpaved highways, crop fields and streams. The presence of genetic discontinuities was determined by Bayesian analysis. Nine populations were identified, showing a clear spatial subdivision within the study area.

# 1 Introducción

## 1.1 Fragmentación del hábitat y cambios en el paisaje.

La alteración de los paisajes naturales producida por la agricultura y silvicultura intensiva, la expansión urbanística, los procesos de industrialización y la creciente expansión de infraestructuras como rutas, carreteras, caminos rurales, entre otras actividades humanas, ha transformado los hábitats naturales modificando sus características originales; estos cambios pueden representar una de las amenazas más serias a la diversidad de especies (Aars et al. 1999, Mauritzen et al. 1999, Santos y Tellería 2006, Fahrig 2003, Tallmon et al. 2002, Fischer y Lindenmayer 2007).

Uno de los principales efectos de la modificación del paisaje es la fragmentación, definida como el proceso por el cual un hábitat extenso y continuo es transformado en pequeños parches, comúnmente denominado “hábitat de parches”, de formas y tamaños variables, aislados unos de otros por áreas sub-óptimas llamadas “hábitat matriz” (Fahring 2003 y Bennett 2010). Este proceso puede ser resultado de la existencia de barreras artificiales (caminos, rutas), como así también de barreras o eventos naturales (océanos, lagos, montañas, inundaciones, incendios, erupciones volcánicas, etc.) (Gerlach y Musolf 2000, Rico et al. 2007).

Los cambios en el paisaje representan un proceso dinámico y continuo. Se pueden distinguir un gradiente continuo con cuatro niveles de alteración del paisaje: I) *paisajes intactos*: donde la mayoría de la vegetación permanece con poca o ninguna modificación. II) *paisajes variados o salpicados* (“variegated”): dominados por vegetación original pero que presentan un marcado gradiente de modificación del hábitat. III) *paisajes fragmentados*: se caracterizan por poseer fragmentos de tamaño pequeños, rodeados por paisajes modificados por la acción antrópica y IV) *paisajes relictos*: distinguidos por una pequeña cobertura de vegetación original establecida dentro de un entorno muy modificado (Bennett et al. 2010).

El proceso de fragmentación trae consecuencias espaciales, que pueden resumirse en: disminución de la superficie de hábitat, reducción en el tamaño de los fragmentos y aumento de las distancias entre ellos. Esto ha llevado a que en muchos lugares del mundo las especies silvestres se vean obligadas a persistir en remanentes de hábitat, frecuentemente en forma de parches embebidos en una matriz inhóspita para ellas (Bennett 1990, Fahrig 2003, Tallmon et al. 2002,).

Las especies poseen atributos ecológicos como la escala de movimiento, la longevidad, el tamaño del área de acción, conducta diferencial según el sexo, etc., que influyen en la forma en la cual los individuos perciben el paisaje, así como en su habilidad para sobrevivir en ambientes fragmentados (Bennett 1990, Taylor et al. 1993, Bennett et al. 2010).

La principal transformación que realiza el hombre es la conversión de sistemas naturales en agroecosistemas, que son manejados con el fin de producir alimentos, fibras y combustibles. La implementación de estos sistemas implica una serie de profundas transformaciones que afectan el comportamiento de los individuos, la dinámica de las poblaciones, la composición y estructura de las comunidades y los flujos de materia y energía (Bilenca et al. 2009). A escala local en los agroecosistemas los remanentes de hábitats naturales principalmente persisten como franjas lineales (uni-dimensionales) a lo largo de bordes de camino, rutas, campos de cultivos etc. En pequeños mamíferos estos “corredores de hábitat” optimizan la dispersión entre las poblaciones distribuidas irregularmente, proporcionando cobertura vegetal y protección a los individuos dispersantes (Bennett et al. 2010).

Tanto la pérdida de hábitat como el aislamiento de los parches en un proceso de fragmentación pueden interrumpir o disminuir la dispersión y el consecuente flujo de genes entre poblaciones que históricamente intercambiaban migrantes, generan un deterioro rápido o gradual de condiciones ecológicas como la pérdida de alimento, posibilidad de encontrar pareja, refugio, etc. Este proceso trae como consecuencia una mayor subdivisión de las poblaciones, lo que puede llevar a una disminución de su variabilidad genética, así como a una mayor probabilidad de extinción y menor posibilidad de recolonización de poblaciones aisladas (Gaines et al. 1997, Gerlach y Musolf 2000, Mech y Hallet 2001, Rodríguez-Matamoros et al. 2012).

En función de lo antes mencionado, es importante dilucidar de qué manera la heterogeneidad espacial afecta la dispersión, lo cual se verá reflejado en la estructuración genética de las poblaciones.

## **1.2 Estructura genética de poblaciones naturales.**

Los organismos de una especie no viven aislados, sino se agrupan en poblaciones, al menos en alguna parte de su ciclo de vida. Las poblaciones constituyen el escenario donde se desarrollan las relaciones entre los individuos, tales como cooperación, competencia por la obtención de alimento o elección de pareja para

reproducirse. Estas relaciones condicionan la evolución de la población, es decir su crecimiento o extinción, su adaptación al medio, etc. La evolución de una población depende de los cambios en su *pool* génico. La población mendeliana o demo es el escenario sobre el que actúan los cambios genéticos y se la puede definir como un grupo espacio temporal de individuos de la misma especie, que viven en un área geográfica determinada, donde cada miembro puede potencialmente aparearse con otro miembro de la misma población (Hartl 1997).

La genética de poblaciones es la disciplina que estudia los cambios en las frecuencias alélicas en el tiempo y en el espacio y analiza las fuerzas evolutivas que los determinan, utilizando modelos teóricos que permitan explicar las observaciones empíricas realizadas en poblaciones naturales. Una de las principales complicaciones en este tipo de estudios surge cuando se pretende establecer los límites geográficos de las poblaciones. En general, sus límites se definen en base a las colecciones o sitios de muestreo, los cuales no coinciden necesariamente con las unidades reales de entrecruzamiento, que son determinadas a posteriori del análisis. Es decir, si los individuos dentro de una colección son más homogéneos genéticamente entre sí que con individuos de otras colecciones, entonces ese conjunto se asigna a una población genética (Hedrick 2000).

#### 1.2.1 Fuerzas evolutivas que influyen en la estructura genética de las poblaciones.

La diversidad genética está influenciada por una multiplicidad de factores, los cuales varían considerablemente entre las poblaciones. Para una población ideal (ausencia de mutación, migración, selección, ocurrencia de apareamientos al azar entre individuos de reproducción sexual) el modelo de Hardy- Weinberg supone que las frecuencias génicas del conjunto de gametos que contribuyen a la siguiente generación representan exactamente las frecuencias génicas de la generación paterna. Esto debido a que el tamaño de la población se considera lo suficientemente grande para que no se produzcan desviaciones estocásticas de estas frecuencias en el proceso de formación de cigotos.

Sin embargo, las poblaciones tienen un tamaño finito y las frecuencias alélicas pueden modificarse de una generación a la siguiente debido al efecto del error de muestreo aleatorio de las gametas que formarán parte de las sucesivas generaciones. Este proceso recibe el nombre de deriva genética y tiene dos efectos: en primer lugar provoca la pérdida de alelos que por azar no se encuentren en la muestra de gametas que

dará origen a la próxima generación, provocando la reducción de la variabilidad genética y, en segundo lugar, conduce a la diferenciación de las poblaciones. Dos casos extremos de deriva genética son el “efecto fundador” y “el efecto cuello de botella”. El primero ocurre cuando un grupo reducido de individuos se separa de una población original para fundar otra nueva. La deriva genética en estos casos es el resultado del muestreo de la población de origen, sumado al de una cierta cantidad de generaciones durante las cuales el tamaño de la nueva población permanece reducido. El efecto “cuello de botella” se da en poblaciones que atraviesan una reducción drástica en su tamaño. La severidad del cuello de botella depende del tamaño de la población resultante y de la velocidad a la cual recupera su tamaño. Aún cuando las poblaciones pueden recuperar su tamaño original, el efecto genético de la deriva durante el cuello de botella puede tener impacto a largo plazo, ya que los alelos que se pierden durante este proceso solo se recobrarían por mutación recurrente o por migración.

Una fuerza evolutiva opuesta a la deriva genética es el flujo génico, mediante el cual ocurre un intercambio de genes a través de individuos que migran de una a otra población, tendiendo a homogenizarlas.

Otra fuerza que pueden generar cambios en las frecuencias alélicas de una población es la selección natural, que depende de la aptitud relativa o *fitness* de los diferentes individuos en la población. Puede definirse simplemente como la capacidad relativa de diferentes genotipos de transmitir sus alelos a las generaciones futuras, como resultado de la interacción genotipo-ambiente (Hedrick 2000).

En síntesis, la distribución de la variación genética en las poblaciones naturales es decir, su estructura genética, está determinada por la acción conjunta de varias fuerzas evolutivas.

### **1.3 Aportes de los marcadores moleculares a la genética de poblaciones.**

Los marcadores moleculares conforman métodos de análisis basados en la detección de polimorfismos en proteínas y en ácidos nucleicos. Se utilizan para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, por ejemplo, nos permite cuantificar la diversidad genética, caracterizar nuevas especies, determinar patrones filogeográficos, resolver e identificar relaciones taxonómicas, recrear patrones recientes de dispersión, etc. (Freeland et al. 2011).

Existen diferentes marcadores moleculares para el análisis de la variación genética, cuya elección depende del objetivo del estudio planteado: las isoenzimas, la

secuenciación de determinados fragmentos de ADN nuclear o mitocondrial, los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), los fragmentos de ADN polimórfico amplificados al azar (RAPDs), las secuencias entre repeticiones simples (ISSRs), los microsatélites y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNIPs), entre otros.

#### **1.4 Ecología Molecular y Genética del Paisaje.**

Las interacciones entre los organismos y su entorno fueron estudiadas tradicionalmente a través de observaciones a campo y manipulación experimental. Sin embargo, las complejas interacciones entre el genotipo y el ambiente plantearon nuevos interrogantes en el campo de la ecología, que no podían ser resueltos con las técnicas convencionales. En función de esta necesidad, a finales de los años 90 surge una nueva disciplina conocida como “*Ecología molecular*” que, como su nombre lo indica, utiliza herramientas moleculares para resolver problemas en ecología de poblacionales y especies (Freeland et al. 2011).

El incremento de la cantidad de datos genéticos que puede ser generado con la aplicación de técnicas moleculares permitió a los ecólogos contar con nuevas herramientas para relacionar características ambientales con datos genéticos a los fines de estudiar, por ejemplo, cómo la heterogeneidad espacial afecta la dispersión, el flujo de genes y la estructuración genética de las poblaciones. Estos aspectos se enmarcan en el área del conocimiento denominada “*Genética del paisaje*”; esta disciplina combina la genética de poblaciones y la ecología del paisaje para detectar discontinuidades genéticas y correlacionarlas con variables ambientales que afectan la dispersión de los individuos a través del paisaje (Manel et al. 2003, Holderegger y Wagner 2008).

#### **1.5 Dispersión.**

Uno de los temas de gran interés en ecología y biología evolutiva es el movimiento de los individuos y de los genes entre poblaciones de una especie. Esto debido que su conocimiento resulta fundamental para comprender aspectos de la ecología del paisaje, ecología evolutiva, ecología comportamental, epidemiología y conservación de vida silvestre (Coulon et al.2004).

Desde un punto de vista genético la dispersión se define como el movimiento de los organismos desde el sitio o grupo de nacimiento hasta el sitio o grupo de apareamiento, lo cual conduce al flujo de genes (Clobert et al. 2001; Coulon et al.



2004). La dispersión tiene profundas consecuencias sobre las poblaciones: desde una perspectiva ecológica influye en la dinámica y la persistencia de las poblaciones, la distribución y la abundancia de las especies y la estructura de las comunidades. Desde un punto de vista evolutivo, la dispersión determina el nivel de flujo génico entre poblaciones y afecta procesos como la adaptación local y la especiación (Dieckmann et al. 1999).

#### 1.5.1 Estimación de la dispersión.

Para tratar de medir los niveles de dispersión y por lo tanto, estimar niveles de flujo génico, se han utilizado métodos directos e indirectos. Los primeros se basan en observaciones o experimentos que realizan mediciones de la movilidad de los individuos a través de técnicas de captura, marcado y recaptura, el uso de “radio tracking” en un área restringida, entre otros. Estas técnicas permiten estimar la dispersión actual de los individuos dentro y entre poblaciones, las características de los dispersantes, las condiciones ecológicas en las cuales ocurre y qué factores intervienen en este proceso. Los métodos directos cuentan con la desventaja de que se necesita observar un gran número de individuos que deben ser monitoreados durante el momento de la dispersión, subestiman la frecuencia de dispersión a larga distancia, ya que técnicamente son difíciles de llevar a cabo, e implican mucho tiempo de seguimiento de los individuos. Además, muchas veces las marcas, transmisores o radio collares se pierden, se rompen o se agotan, perdiéndose de esta manera información. Los métodos directos no tienen en cuenta las extinciones y las recolonizaciones como una fuente de flujo génico y no necesariamente reflejan el movimiento de genes, porque el movimiento no necesariamente significa reproducción exitosa (Freeland et al. 2011, Eguiarte 2007).

Los métodos indirectos son aquellos que permiten estimar la dispersión efectiva, es decir determinan los niveles de flujo génico que dependen del éxito reproductivo de los dispersantes en la nueva población (Winters y Waser 2003, Coulon et al. 2004, Fontanillas et al. 2004, Schweizer et al. 2007). Entre estos métodos se destacan los que evalúan genotipos de ancestría mixta. La técnica de microsatélites es una de las herramientas más usadas para estos fines, ya que permite estudiar con gran resolución la variación genética de las poblaciones a escala geográfica fina. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN, repetidas en tándem, de 1 a 6 pares de bases, que se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del genoma. Los microsatélites

han sido detectados en la mayoría de los organismos, están localizados a lo largo de los genomas cloroplásticos y nucleares y han sido encontrados en los genomas mitocondriales de algunas especies (Eguiarte et al. 2007, Freeland et al. 2011).

Para trabajar con este tipo de marcadores se debe conocer la secuencia de la región flanqueante, a fin de desarrollar cebadores específicos que amplifiquen la región repetitiva, responsable de la variación observada. Si bien se caracterizan por ser especie-específicos, a veces resultan homólogos entre especies relacionadas, lo cual permite realizar estudios comparativos entre especies de un mismo género. Estos marcadores segregan como co-dominantes y, por ser altamente polimórficos, brindan información para estimar niveles recientes y/o contemporáneos de migración. Además, son los más adecuados para analizar el grado de parentesco entre individuos muestreados en áreas geográficas reducidas (Gerlach y Mulsof 2000, Kimberly et al. 2006) y actualmente están siendo ampliamente utilizados para la obtención de bases de datos aplicables en estudios de Genética del Paisaje.

## **1.6 Herramientas estadísticas para el análisis de la estructura genética.**

### **1.6.1 Estadísticos F de Wright.**

Entre los estadísticos tradicionalmente más utilizados para estimar la diferenciación y la estructura de la población se destacan los F desarrollados por Wright (1951), quien los definió como coeficientes que miden el grado de correlación entre pares de alelos tomados al azar a diferentes niveles de organización (individuos, subpoblación y población) (Piñero et. al. 2008).

F<sub>is</sub>: mide la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones. Estima la desviación entre la heterocigosis observada y esperada debida a apareamientos no al azar dentro de cada subpoblación, y se expresa como:

$$F_{is} = (H_s - H_i) / H_s \quad (*)$$

En el caso de que las subpoblaciones se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg este coeficiente no difiere significativamente de 0; cuando existe endogamia, toma valores positivos significativos (deficiencia de heterocigotas), o puede ser negativo en el caso de exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo el supuesto de apareamientos al azar (exogamia).

Fst: es una medida de la diferenciación genética entre las subpoblaciones (es una estimación de la varianza de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones). Se puede definir también como una medida de la reducción de la heterocigosis comparado con una población ideal, debido a la subdivisión de las poblaciones (efecto Wahlund):

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t^{(*)}$$

Los valores de este parámetro pueden oscilar entre 0, cuando todas las subpoblaciones tienen las mismas frecuencias génicas y 1, cuando las subpoblaciones tienen fijados distintos alelos.

Fit: mide la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para la población total. Estima la desviación entre la heterocigosis observada en cada subpoblación con respecto a la esperada si la población total se comportara como una unidad panmíctica. Incluye la contribución debida a apareamientos no al azar dentro de las subpoblaciones ( $F_{is}$ ) y la debida a la subdivisión en sí misma ( $F_{st}$ ):

$$F_{it} = (H_t - H_i) / H_t^{(*)}$$

(\*):  $H_i$  = Heterocigosis observada de los individuos en cada subpoblación,  $H_s$  = Heterocigosis esperada en una subpoblación, suponiendo apareamientos al azar y  $H_t$  = Heterocigosis esperada en la población total suponiendo apareamientos al azar y ausencia de subdivisión.

### 1.6.2 Pruebas de asignación.

La principal desventaja de los estadísticos F es que asumen “a priori” que los grupos que están siendo comparados son poblaciones mendelianas o demos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este no siempre es el caso. Para lograr una delimitación más precisa de los individuos que constituyen esas poblaciones locales, se desarrollaron nuevas herramientas estadísticas que se basan en modelos Bayesianos para inferir estructuración genética poblacional, conocidas como “pruebas de asignación”. Éstas se basan en la información genética para asignar a qué población pertenece un individuo sin suponer poblaciones predefinidas. Permiten estimar la probabilidad de que un individuo pertenezca a un grupo o población en base a su genotipo multilocus, comparando la frecuencia alélica de los loci analizados entre todos los individuos de las

diferentes poblaciones geográficas. Estos métodos han sido ampliamente utilizados para estimar tasas de dispersión entre poblaciones y por sexo, analizar la distribución de las muestras en el espacio y detectar barreras que afectan el flujo de genes a escala de paisaje (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013).

Bajo estas premisas se han propuesto una gran cantidad de programas estadísticos como por ejemplo: STRUCTURE (Pritchard et al. 2000), PARTITION (Dawson y Belkhir 2001), BAPS (Corander et al. 2004), GENECLUST (François et al. 2006), TESS (Chen et al. 2007), GENELAND (Guillot et al. 2005a) etc.

#### 1.6.3 Análisis de autocorrelación espacial.

Este tipo de análisis pone a prueba la dependencia de una variable en una localidad con respecto a otras, es decir la probabilidad de que entidades más cercanas en el espacio resulten más parecidas (autocorrelación positiva) o menos parecidas (autocorrelación negativa) que lo esperado por azar.

La autocorrelación espacial genética se da cuando las frecuencias alélicas de los individuos se correlacionan con la presencia o ausencia de los mismos alelos en otros individuos cercanos. Teniendo en cuenta la posición geográfica y los datos del genotipo multilocus de una muestra de individuos, esta herramienta estadística calcula un coeficiente de autocorrelación “ $r$ ” que mide la similitud genética entre pares de individuos separados por una determinada distancia geográfica (Sokal y Oden 1978, Manel 2003).

La estructura espacial en un análisis de autocorrelación se describe a través de gráficas como los correlogramas, que se obtienen a través de coeficientes de autocorrelación que miden la intensidad de la relación (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013). La estructura genética puede cuantificarse mediante este tipo de análisis ya que permiten analizar las consecuencias genéticas de la dispersión a escalas espaciales pequeñas (Epperson 1990).

#### 1.6.4 Aislamiento por distancia.

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también resulten las más parecidas desde el punto de vista genético, ya que se supone que el flujo génico es más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. Este patrón se

conoce como de “aislamiento por distancia” (Wright 1943), modelo que asume equilibrio entre deriva y flujo génico.

Uno de los métodos clásicos para evaluar aislamiento por distancia es la prueba de Mantel, que estima la correlación entre matrices de distancias genética y geográfica. Si el coeficiente de correlación es positivo, indica que las poblaciones se distribuyen según dicho modelo (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013).

### **1.7 Antecedentes de estudios de la dispersión en pequeños mamíferos.**

Estudios experimentales y descriptivos realizados en mamíferos revelaron que la extensión en la cual la modificación del paisaje provoca un decrecimiento en el flujo génico y aislamiento entre las poblaciones depende de factores ambientales (presencia de corredores de dispersión entre los fragmentos, la forma y el tamaño de los fragmentos, la distancia entre fragmentos y el contraste que puede existir entre el fragmento y la matriz) así como también factores propios de la especie como sexo, edad, habilidad dispersiva, grado de especificidad del hábitat, tolerancia a la predación, entre otros. (Aars et al. 1998, Aars et al. 1999, Fahrig 2007, Fischer and Lindenmayer 2007). Por ejemplo, estudios realizados a una escala geográfica fina utilizando loci de microsatélites, mostraron una débil diferenciación poblacional y un patrón de aislamiento por distancia significativo en la rata australiana *Rattus fuscipes* en bosques fragmentados del sudeste del Queensland (McQueen et al. 2008). Los autores explicaron estos resultados por la capacidad de la especie para moverse entre los remanentes de bosque nativo utilizando corredores de dispersión. Laurence et al. (2013), no observaron diferenciación genética entre las poblaciones de rata almizclera (*Ondatra zibethicus*) en las cuencas hidrográficas del este de Canadá, concluyendo que la composición del paisaje no afecta el flujo génico entre poblaciones y que las rutas o caminos lindantes a las cuencas son utilizadas como corredores de dispersión para esta especie semi-acuática.

Con el objetivo de estudiar los efectos de los corredores de hábitat sobre la dispersión y el grado de entrecruzamiento entre poblaciones de *Microtus oeconomus*, Aars et al. (1999) emplearon una combinación de técnicas demográficas y genéticas para entender la importancia relativa de los corredores de hábitat en poblaciones ubicadas en ambientes fragmentados experimentalmente, con o sin conexión entre ellos. Los autores observaron que, en general, la dispersión y la tasa de entrecruzamiento de individuos de poblaciones comunicadas por corredores, aumentó con respecto a

poblaciones aisladas. Además, se comprobó que la tasa de dispersión en los machos fue mayor que en las hembras, debido a que éstas son filopátricas y tienden a reproducirse en su fragmento de hábitat original. Otros estudios también hacen referencia a la existencia de dispersión sesgada según el sexo en pequeños mamíferos. Peakall et al. (2003), utilizando microsatélites como marcadores genéticos y análisis de autocorrelación espacial, detectaron que la escala a la cual se encontraba estructuración genética en *Rattus fuscipes* oscilaba entre los 500 y los 1000 metros, siendo mayor en hembras que en machos, debido probablemente a un comportamiento filopátrico por parte de las mismas. Los autores remarcan la importancia de combinar estas herramientas moleculares y estadísticas a una escala fina en el paisaje, ya que aportan nuevas perspectivas evolutivas que no son tenidas en cuenta en estudios tradicionales de genética de poblaciones a una escala mayor. Estudios en *Microtus arvalis* en el cual se combinaron métodos directos e indirectos para estimar la dispersión, Schweizer et al. (2007) encontraron que la diferenciación genética entre las poblaciones muestreadas se mantuvo constante debido a una dispersión desviada hacia los machos en la que solo unos pocos inmigrantes se reprodujeron con éxito en las nuevas poblaciones.

Tallmon et al. (2002) estudiaron el efecto de la fragmentación del hábitat en la estructura genética poblacional de *Clethrionomys californicus*, combinando datos demográficos y genéticos. Los análisis de la región control del ADN mitocondrial revelaron que, en paisajes fragmentados, las poblaciones estuvieron parcialmente aisladas y sufrieron depresión por endogamia. Por el contrario, los loci de microsatélites indicaron que existe una alta proporción de individuos migrantes entre las poblaciones de hábitats fragmentados y bosques aledaños. Ante estos resultados contradictorios, los autores llegaron a la conclusión de que el flujo génico entre hábitats fragmentados y no fragmentados es mantenido solamente por la dispersión de los machos.

Booth et al. (2009) analizaron el efecto de las distintas barreras de hábitat sobre la estructuración genética de poblaciones de *Apodemus sylvaticus*, utilizando 7 loci de microsatélites. A pesar de que estudios previos ecológicos y de comportamiento indicaron que la especie se dispersaría grandes distancias fuera de su área de acción, los autores observaron niveles significativos de diferenciación poblacional a escalas micro y macrogeográficas. Los resultados sugieren que a escala microgeográfica, donde no existen barreras para la migración, el flujo génico es inhibido o limitado debido a una tendencia a reproducirse cerca del grupo de nacimiento, a pesar de tener la capacidad de dispersarse a grandes distancias. Los resultados observados a escala macrogeográfica

también revelaron dispersión y flujo génico limitado entre poblaciones, aunque en este caso como consecuencia de la presencia de barreras naturales y artificiales.

McDonald y St. Clair (2004) estudiaron los efectos de barreras naturales y artificiales sobre el movimiento de tres especies de muridos: *Mycrotus pennsylvanicus*, *Peromyscus maniculatus* y *Clethrionomys gapperi*, demostrando que los individuos fueron menos exitosos en cruzar una ruta nacional (barrera artificial) que un bosque fragmentado (barrera natural). La importancia de los cuerpos de agua y autopistas como barreras para la dispersión de los animales se evidenció en un estudio realizado en el ratón de patas blancas *P. leucopus*, en el cual se pudo observar, por análisis bayesianos, la existencia de cuatro poblaciones genéticamente distintas en parcelas de bosques fragmentados del sur de Canadá (Rogic et al. 2013).

En esta tesis se utiliza a *Akodon azarae* (roedor del pastizal pampeano), especialista en el uso del hábitat, como modelo para el estudio de las consecuencias de la fragmentación del hábitat sobre la estructura genética de las poblaciones de la fauna del sur de Córdoba.

## **1.8 La especie.**

Algunas de las especies que componen el ensamble de pequeños roedores sigmodontinos de los agroecosistemas pampeanos son: *Calomys musculinus*, *C. laucha*, *C. venustus*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oxymycterus rufus*, *Akodon azarae* y *A. dolores* (Crespo et al. 1970, de Villafañe et al. 1977, Polop y Sabattini 1993, De Villafañe et al. 1994, Busch et al. 2001). En la provincia de Córdoba, las especies más abundantes son *C. musculinus*, *C. venustus* y *A. azarae*, (De Villafañe 1981, Priotto y Polop 1997, Priotto y Steinmann 1999).

*Akodon azarae* (Fisher 1829) comúnmente conocido como el “ratón del pastizal pampeano”, pertenece a la familia Sigmodontidae, tribu Akodontini, la segunda en importancia de acuerdo al número de especies (Reig 1984). Posee una amplia distribución geográfica: sudeste de Brasil, Uruguay, Paraguay y Argentina. En nuestro país ha sido capturado en las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, La Pampa, Buenos Aires, Chaco y Formosa. (de Villafañe 1981). Esta especie, especialista en el uso del pastizal, es dominante numérico en los ambientes más estables

de los agroecosistemas como los pastizales naturales, bordes de cultivos, caminos y cursos de agua, terraplenes de ferrocarril y ocasionalmente se lo puede encontrar en los campos de cultivo (Zuleta et al. 1988, Bonaventura y Kravetz 1989, de Villafañe et al. 1994, Bush et al. 2001).

Con respecto a las características morfológicas, Bonatto et al. (2012) destacan que los machos son más grandes que las hembras. Por lo general los individuos adultos alcanzan un peso promedio de 22 a 31 gramos (Crespo et al. 1970; de Villafañe 1981) y un largo total del cuerpo entre 160-180 mm, con una longitud de cola promedio de 55-85 mm; el pelaje en el dorso es de color marrón oliváceo, salpicado de amarillo en los costados, mientras que el vientre es de color grisáceo y amarillo (Bonatto 2013). Esta especie es comúnmente parasitada por larvas de moscardón (*Rogenhofera bonariensis*, Diptera Cuterebridae) en la zona de la base de la cola, característica no influenciada por el sexo del individuo pero que es más frecuente en los adultos que en los juveniles (Zuleta y Vignau 1990) (Fig.1). Estudios realizados en poblaciones experimentales de clausura seminaturales demostraron que la parasitosis causada por la mosca no tiene influencia en la demografía de las poblaciones de *A. azarae*. Los autores asociaron estos resultados a la baja tasa de infección y a la alta tasa de recuperación registrada en los individuos de esta especie (Gelin et al. 2013).

En cuanto a los hábitos alimenticios, *A. azarae* es omnívora oportunista, se alimenta de vegetación verde, semillas e insectos; es principalmente crepuscular, aunque se observan individuos en actividad durante horas del día (Dalby 1975; Bonaventura et al. 1991; Bilenca et al. 1992, Priotto y Polop 1997).

*Akodon azarae* es una especie competitivamente dominante sobre otras especies de roedores en los bordes de los agroecosistemas (Busch y Kravetz 1992; Busch et al. 2005). Estudios llevados a cabo en el sur de la provincia de Córdoba con el objetivo de evaluar la relación entre la abundancia poblacional, el clima y las prácticas agrícolas en dos especies de *Akodon* demostraron la gran habilidad competitiva de *A. azarae* con respecto a *A. dolores* en hábitats de borde de la región. Los autores observaron que las prácticas agrícolas, condiciones climáticas y hábitos alimenticios exclusivos en *A. dolores* (carnívoro) provocaron un descenso en la abundancia de esta especie a lo largo de los años, lo que dio lugar a un aumento en la densidad poblacional de *A. azarae*, que reemplazó paulatinamente a la especie anterior (Polop et al. 2012).

En *A. azarae* las poblaciones se renuevan anualmente (Pearson 1967) y los individuos presentan una longevidad máxima de 18 meses (Suárez et al. 2004). Las



poblaciones de esta especie muestran fluctuaciones estacionales en la abundancia, con un mínimo en primavera (septiembre-diciembre), alcanzando valores máximos hacia finales de otoño y principios del invierno (mayo-junio), con una caída drástica en la abundancia entre finales del invierno y comienzos de la primavera (agosto-septiembre) (Andreo et al. 2009, Gómez et al. 2011, Bonatto et al. 2012; Bonatto et al. 2013).

El ciclo reproductivo abarca un periodo de 6 a 8 meses, iniciándose en primavera y finalizando en otoño (Zuleta et al. 1988, Suárez et al. 2004, Bonatto et al. 2013). Diferentes autores estimaron periodos de gestación de 21 días (Suárez 1996), de 22,7 días (Dalby 1975) y de 24,5 días (de Villafañe 1981). Cada hembra puede producir dos camadas por año y, en promedio, entre 2,8 y 4.6 (Dalby 1975, de Villafañe 1981, Suárez et al. 2004) individuos por parto. De acuerdo con estos últimos autores el tamaño de la camada y el peso de las crías varían con la estación del año en la que nacen, siendo las camadas de otoño las que presentan menor número de crías, con mayor peso. Con respecto a la existencia de celo post-parto en esta especie, si bien de Villafañe (1981) informa que su ocurrencia en bioterio es muy baja, Bonatto (2013) registró celo post-parto en el 63% de hembras que se reprodujeron exitosamente en condiciones de cautiverio. El destete ocurre entre los 14 -15 y 23 días y alcanzan la madurez sexual a los 60 días de edad (Dalby 1975, de Villafañe 1981). Se consideran adultos a los machos cuyo peso es mayor o igual a 18 g y a las hembras con peso mayor o igual a 16 g. El cuidado de la descendencia es exclusivo de las hembras (Dalby 1975, de Villafañe 1981, Bonaventura et al. 1992, Suárez 1996). Las hembras preñadas y amamantando despliegan comportamientos agresivos hacia los machos, excluyéndolos del nido a través de confrontaciones agonísticas (de Villafañe 1981, Suárez y Kravetz 2001).

Existen algunas controversias en cuanto al sistema de apareamiento en esta especie. A partir de estudios del uso del espacio en poblaciones naturales, Zuleta (1989) y Bonaventura et al. (1992) infieren un sistema de apareamiento promiscuo. Otros estudios en poblaciones naturales del sur de la provincia de Córdoba (Priotto y Steinmann 1999), análisis de los cambios estacionales en la proporción de sexo en juveniles (Zuleta y Bilenca 1992) y observaciones de las interacciones entre machos y hembras en parejas de bioterio (Suárez y Kravetz 2001) sugieren un sistema de apareamiento promiscuo-poligínico. Estudios llevados a cabo en cautiverio a partir del análisis de interacciones comportamentales (Suárez y Kravetz 1998a, b; 2001), el tamaño del área de acción, el grado de solapamiento y el dimorfismo sexual en machos

y hembras de la especie (Bonatto et al 2012) indican un sistema de apareamiento poligínico (sistema de apareamiento en el cual un grupo de hembras se aparea con un único macho). Según investigaciones recientes a través de estudios realizados en clausuras experimentales, Bonatto et al. (2013) confirmaron la hipótesis de que en *A. azarae* el sistema de apareamiento poligínico podría operar a través de la defensa de las hembras por parte de los machos.

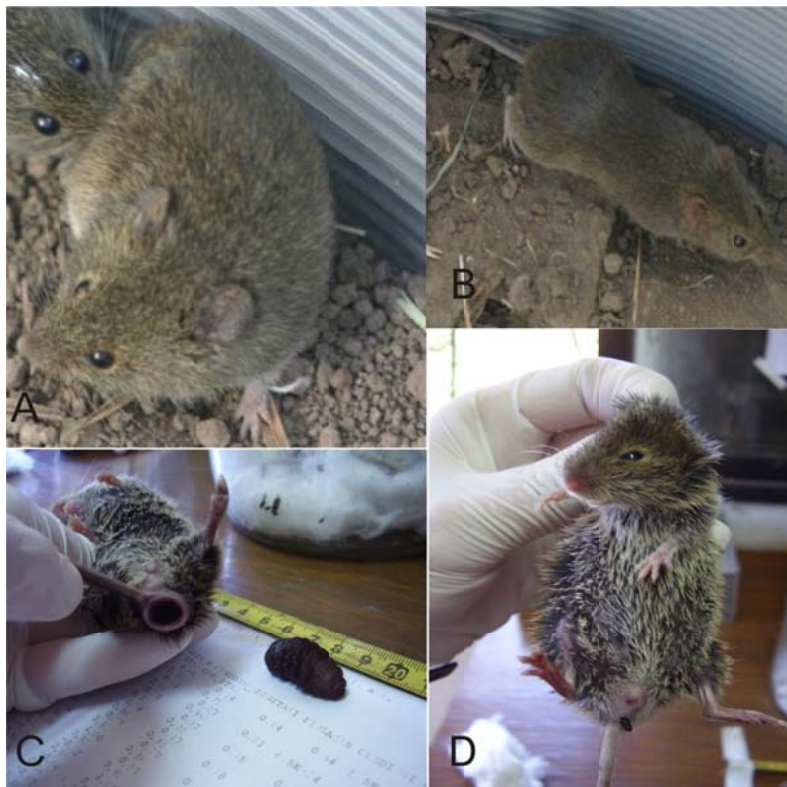
Con respecto al uso del espacio, el tamaño del área de acción en esta especie está determinado por el sexo y el periodo reproductivo. Estudios realizados en ambientes naturales bidimensionales sugieren que el tamaño del área de acción de los machos es mayor que de las hembras, lo cual se hace más evidente durante el periodo reproductivo (Zuleta 1989, Priotto y Steinmann 1999). En estudios realizados en ambientes naturales se observó que tanto los machos como las hembras mantienen áreas exclusivas con respecto a otros individuos de su mismo sexo. Los mayores valores de solapamiento fueron registrados entre individuos de distintos sexos (mayores al 35%) (Priotto y Steinmann 1999).

En los machos el uso del espacio está influenciado por la búsqueda de pareja, mientras que en las hembras está dado por los recursos (alimento y espacio) (Priotto y Steinmann 1999, Cittadino et al. 2002). El incremento de la densidad poblacional no influiría sobre el tamaño del área de acción pero si sobre el grado de solapamiento intersexual (Priotto y Steinmann 1999). De acuerdo con Zuleta (1989) el tamaño del área de acción no sería influenciado por la edad de los individuos, pero si por el status reproductivo de los machos, siendo mayor en machos activos que en los inactivos. En concordancia con estas observaciones, Gómez et al. (2011) encontraron, en hábitat lineales de agroecosistemas, que el patrón de movimiento está determinado por el sexo y el periodo reproductivo, independientemente de la abundancia poblacional. Los machos muestran largas distancias de movimientos con respecto a las hembras en primavera y en verano (principio y mediados del periodo reproductivo).

En estudios de remoción realizados en bordes de cultivo, Cittadino (1995) y Cittadino et al. (1998) encontraron que las tasas de dispersión de los individuos de *A. azarae* varían de acuerdo al periodo del año, siendo éstas elevadas en las fases de incremento y disminución de la densidad poblacional. Los autores afirmaron que en primavera el movimiento de las hembras es reducido, debido a que están confinadas en un territorio al cuidado parental, mientras que los machos se mueven grandes distancias. A finales del periodo reproductivo (otoño) observaron altas tasas de dispersión en

juveniles, lo cual podría estar relacionado con la búsqueda de nuevos sitios reproductivos, diferentes al de sus padres. Durante el invierno, algunos autores sostienen que las altas tasas de dispersión podrían estar relacionadas con el empobrecimiento del hábitat (disminución de cobertura vegetal y disponibilidad de alimento) (Bonaventura y Kravetz 1989; Cittadino et al. 1994).

No existen estudios previos sobre la estructura genética en *A. azarae*. El único antecedente de estudios poblacionales en esta especie se refiere a una estimación de los niveles de variabilidad genética utilizando isozimas como marcadores en poblaciones de la localidad de Manfredi, Córdoba (Apfelbaum y Blanco, 1985). Los autores remarcan los altos niveles de polimorfismo detectados, los cuales podrían relacionarse con la capacidad de la especie para enfrentar cambios ambientales.



**Figura 1:** Fotografías de un individuo adulto de *Akodon azarae*. En la imagen se observan algunas de las características morfológicas externas de esta especie. A y B: color del pelaje, oliváceo y amarillo en el lomo; C: individuo parasitado por una larva de moscardón (*Rogenhofera bonariensis*, Diptera Cuterebridae) y D se observa el vientre, de color grisáceo amarillento.

### **1.9 Patrones de dispersión en roedores del centro-sur de la provincia de Córdoba.**

Los estudios de dispersión en poblaciones de roedores sigmodontinos se han orientados especialmente a una escala de parches de hábitat. Con el fin de evaluar el papel que juega la dispersión en la regulación poblacional, por lo general distintos autores se han focalizado en el estudio de la dispersión instantánea (métodos directos) a través del análisis de los movimientos registrados en grillas o a lo largo de línea de trampeo. Así por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en clausuras experimentales, Priotto et al. (2004) observaron que en *C. venustus* la dispersión de los juveniles ocurre en relación a su sexo y al sexo de sus padres. Así, por lo general, las hembras juveniles se dispersan más que los machos y a su vez los juveniles de ambos sexos muestran mayor dispersión con respecto a la madre que al padre. Esto indica una fuerte influencia de la madre sobre la dispersión de los juveniles. En estudios realizados en poblaciones de clausura de *C. musculinus*, Austrich et al. (2014) encontraron que tanto machos como hembras adultas excluyen activamente a los juveniles de ambos sexos de su área de acción.

Con el objetivo de estudiar de qué manera el paisaje afecta el patrón de movimiento y por lo tanto el flujo de genes en especies que utilizan diferencialmente el hábitat, se llevaron a cabo muestreos estacionales en hábitats lineales de agroecosistemas del sur de Córdoba. Los estudios de movimiento utilizando la metodología de captura, marcado y recaptura (CMR) demostraron que en *C. musculinus*, generalista con respecto al uso del hábitat, los machos se mueven a mayores distancias que las hembras durante el período reproductivo. En este tipo de hábitats, los individuos se mueven a mayores distancias en bordes angostos que en bordes anchos (Sommaro 2010). Por su parte Gómez et al. (2011) observaron que el sexo y la abundancia poblacional fueron los factores que más influyen el movimiento de *C. venustus*, especialista con respecto al uso del hábitat. Por lo general los machos de esta especie se mueven a mayores distancias que las hembras y cuando la densidad poblacional aumenta la distancia de dispersión de los individuos disminuye.

Por otra parte, los estudios de dispersión efectiva utilizando loci de microsatélites como marcadores moleculares y análisis de autocorrelación espacial, revelaron que en *C. musculinus* la dispersión varía estacionalmente con relación al sexo y a la densidad poblacional. Los machos se dispersan a mayores distancias que las hembras, lo cual fue coincidente con los resultados observados en estudios de CMR.

Las distancias de dispersión en éstos últimos disminuyen con el aumento de la densidad poblacional debido a la alta disponibilidad de hembras reproductivas (recurso clave). En las hembras, las distancias de dispersión aumentan con el incremento de la densidad poblacional como consecuencia de la disminución de espacios reproductivos disponibles (Sommaro 2012).

En *C. venustus*, la dispersión mostró variación de acuerdo al sexo y estación. En machos se observó autocorrelación positiva durante el periodo reproductivo (densidades poblacionales bajas e intermedias), mientras que a comienzos del periodo no reproductivo (alta densidad poblacional) presentaron una estructuración al azar. Estos resultados podrían estar relacionados con la tardía dispersión de los machos juveniles de la cercanía de sus madres y con la tolerancia intrasexual de los machos adultos de esta especie. En hembras, los patrones de autocorrelación mostraron estructura genética al azar en primavera y verano (periodo reproductivo) debido probablemente a la alta dispersión de hembras juveniles que compiten con las adultas por obtener espacios reproductivos en hábitats de bordes. En otoño (comienzos del periodo no reproductivo) la estructura fue positiva y se extendió hasta los 1100 m, lo cual podría estar relacionado con el final de la actividad reproductiva que hace que en este periodo las hembras permanezcan filopátricas. (M. B. Chiappero, comunicación personal.).

# Objetivos

## Objetivo general.

Analizar la estructura genética de *A. azarae* en agroecosistemas pampeanos y evaluar los efectos de las barreras de hábitats naturales y artificiales sobre dicha estructuración, con el fin de contribuir al análisis de las consecuencias de la fragmentación del paisaje sobre especies que utilizan diferencialmente el hábitat.

## Objetivos específicos.

- 1- Desarrollar cebadores para amplificar marcadores genéticos (microsatélites) para el estudio genético-poblacional de *A. azarae*.
- 2- Analizar, en ambientes lineales de agroecosistemas pampeanos, la estructura genética espacial de *A. azarae* (especialista en el uso del hábitat) a una escala geográfica fina (< 10 km).
- 3- Determinar si existen diferencias en la estructuración genética espacial de machos y hembras, en distintas fases del ciclo reproductivo anual (con alta o baja densidad poblacional).
- 4- Analizar, en un área geográfica más amplia que la referida en el objetivo 2, el efecto de diferentes barreras de hábitats como caminos rurales, rutas, campos de cultivos y cursos de agua, sobre la estructuración genética de poblaciones de *A. azarae*.

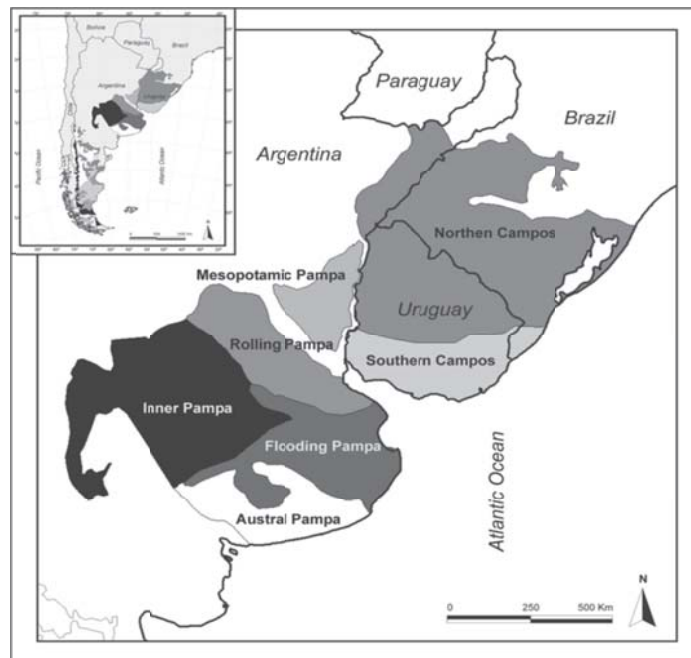
## Hipótesis

- En agroecosistemas, existen niveles significativos de estructuración genética entre poblaciones a escala geográfica fina como resultado de una distribución discontinua de los parches de hábitat.
- En agroecosistemas, el grado de estructuración genética espacial en machos de *A. azarae* es menor que en las hembras. Este patrón está relacionado con un sistema de apareamiento poligínico, donde la búsqueda y defensa de hembras reproductivas influye en la dispersión de los machos y es independiente de la densidad poblacional.
- En ambientes fragmentados de agroecosistemas, la organización de *A. azarae* en poblaciones locales, genéticamente definidas, es producto de aislamiento por conformación del paisaje, debido a que los caminos rurales, rutas y campos de cultivo funcionan como barreras físicas para la dispersión de esta especie.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Área de estudio.

La región pampeana de nuestro país conforma una gran área denominada “*pastizales del Río de la Plata*” que abarca aproximadamente 700.000 km<sup>2</sup> del este de Argentina, Brasil, y Uruguay. Este territorio se encuentra subdividido en 7 zonas: la Pampa Ondulada, los Campos del Sur, la Pampa Mesopotámica, los Campos del Norte, la Pampa Austral, la Pampa Inundable y la Pampa Interior (Fig. 2). Con la creciente inmigración europea a comienzos del siglo 20, la región pampeana se vio afectada por un proceso acelerado de reemplazo de vegetación natural por cultivos. La Pampa Interior se caracteriza por poseer suelos pocos inundables, cubiertos con escasa vegetación nativa, con predominio de malezas como *Sorghastrum pellitum* y *Elionurus muticus* (Paruelo et al. 2007). Los agroecosistemas de esta región presentan un mosaico de ambientes donde alternan campos de cultivos (maíz, soja, girasol etc.) y pastizales naturales separados por cercas, carreteras, vías de ferrocarril y otros hábitat de bordes los cuales funcionan como relicto de una comunidad de malezas nativas (Crespo 1966, Zuleta et al. 1988).



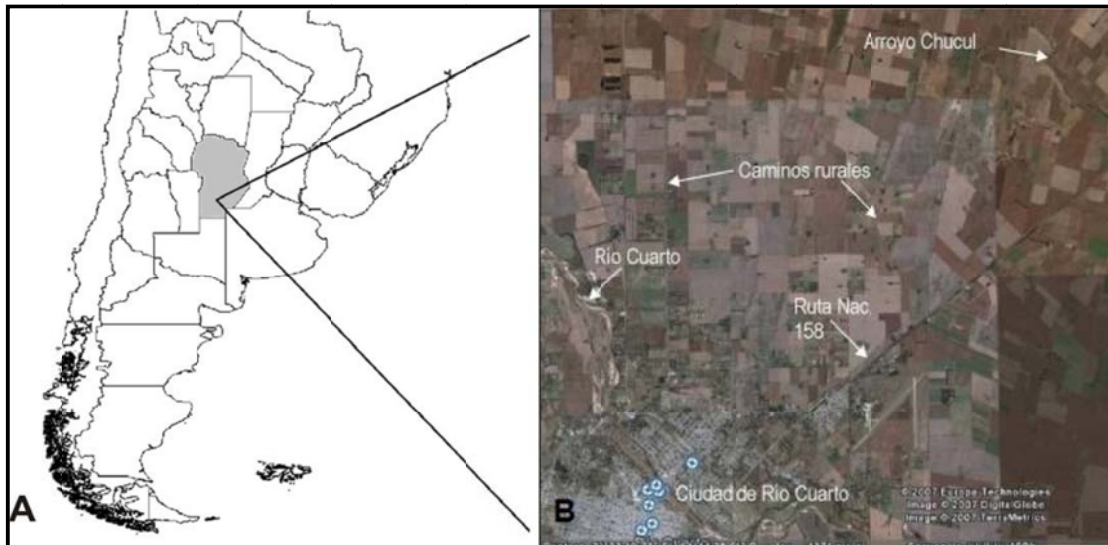
**Figura 2:** Principales subdivisiones de los pastizales del Río de la Plata. Rolling Pampa = Pampa ondulada, Southern campos= Campos del Sur, Mesopotamic Pampa = Pampa mesopotámica, Northern Campos = Campos del Norte, Flooding Pampa = Pampa Inundable, Inner Pampa = Pampa Interior y Austral Pampa = Pampa Austral. Tomado de “The Physical Geography of South America”. Oxford University Press, 2007.



## 2.2 Obtención de muestras.

### 2.2.1 Dispositivo de muestreo para el estudio de la estructura genética de *A. azarae* a escala geográfica fina.

Se tomaron muestras en poblaciones de *A. azarae* de la zona rural de la localidad de Chucul ( $33^{\circ} 0' 35''$  S y  $64^{\circ} 10' 17''$  O), departamento Río Cuarto (provincia de Córdoba), perteneciente desde un punto de vista florístico, a la “Provincia del Espinal” (Cabrera 1976) (Fig.3 A y B). La región se caracteriza por ser una planicie de baja elevación (600 a 900 m) con vegetación dominada por algarrobo (*Prosopis alba*, *P. nigra*) acompañada por quebracho blanco (*Apidosperma quebracho blanco*), mistol (*Zyzyplus mistol*) e itín (*Portulaca kuntzie*). Actualmente la vegetación ha sufrido una marcada alteración como resultado de la agricultura y la ganadería. El paisaje consiste en una matriz de campos de cultivos rodeados por alambrados, bordes de camino, terraplenes de ferrocarril y otros hábitats de bordes que sostienen una comunidad de especies de plantas nativas y malezas introducidas. Los hábitats de bordes los cuales se caracterizan por ser más largos que anchos (hábitats lineales) proveen a los roedores de una cobertura vegetal más estable que los campos de cultivo (Fig.4).



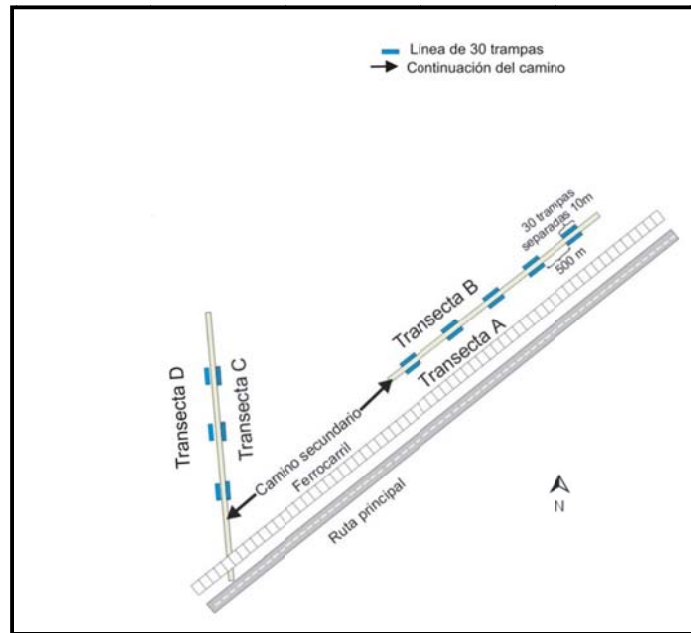
**Figura 3:** Área de estudio: A) Ubicación geográfica del área de estudio. B) Imagen satelital mostrando la fragmentación del hábitat en parcelas de diferentes tipos de cultivos, caminos rurales, rutas, arroyos y ríos.



**Figura 4:** Fotografías de bordes de cultivos en el departamento Río Cuarto: A y B muestran las características de los hábitats de bordes lindantes a los campos de cultivos, donde predominan algunas especies nativas y malezas introducidas, que sirven de refugio y alimento para muchas especies. En C y D se pueden observar, como ejemplo, la disposición de un camino rural y una ruta pavimentada en el área de muestreo.

Los hábitats seleccionados para cumplir con los objetivos 2 y 3 fueron bordes de camino (hábitats lineales). El dispositivo de muestreo consistió en cuatro transectas, A, B, C y D. Dos de ellas (A y B) estuvieron constituidas por cinco líneas de 30 trampas y se ubicaron en bordes opuestos de un camino secundario de 7 m de ancho, sin cobertura vegetal. Las transectas C y D consistieron en tres líneas de 30 trampas, que se ubicaron en bordes opuestos de un camino rural perpendicular al anterior y de características similares (Fig. 5). Cada una de las trampas fueron cebadas con pasta de maní y grasa de vaca. Se realizaron muestreos estacionales de captura, marcado y recaptura (CMR) durante cinco días consecutivos. Los muestreos se realizaron durante dos años consecutivos e incluyeron el inicio, mediados y finales del período reproductivo. Cada individuo capturado fue marcado con clave numérica en sus pabellones auriculares y se registró el peso, el sexo y el estado reproductivo. En los machos se registró la posición de los testículos (escrotales o abdominales) y en las hembras, el estado de la vagina (cerrada o abierta), evidencia de preñez y mamas visibles o no. Para análisis genéticos

se tomó, de cada ejemplar, una muestra de aproximadamente 1 cm de punta de la cola (no afecta la supervivencia del animal) que fue conservada en tubos de 1,5 ml con etanol 90%. Se registró el posicionamiento geográfico de cada captura utilizando un GPS (GARMIN eTrex Legend Cx).



**Figura 5:** Esquema del dispositivo de muestreo. Se observa la ubicación aproximada de todas las transectas y líneas, del terraplén del ferrocarril y de la Ruta Nacional 158. El esquema no está realizado a escala.

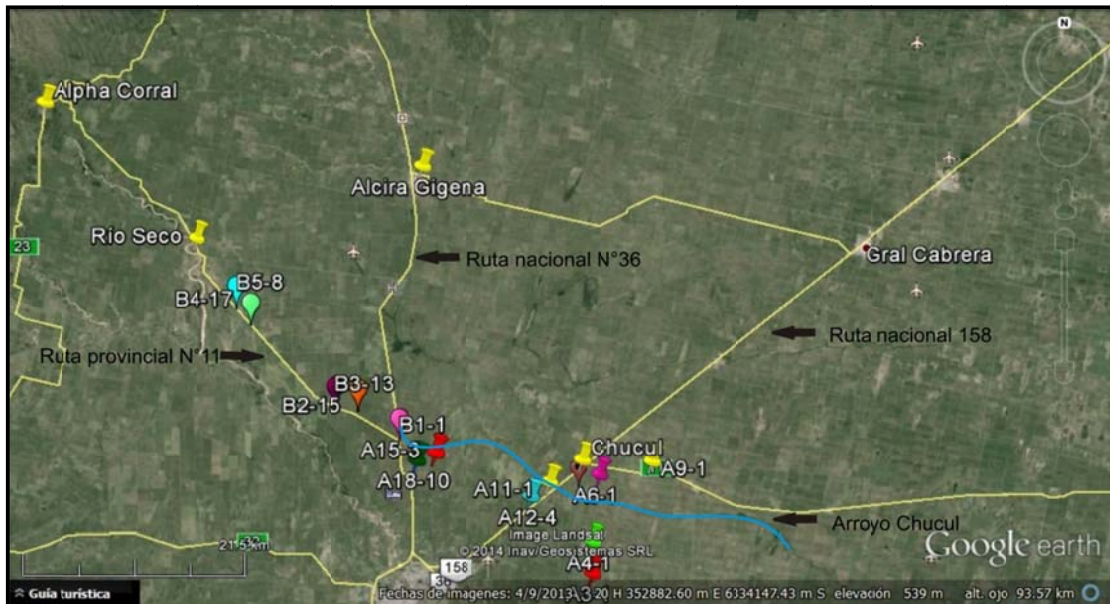
### 2.2.2 Dispositivo de muestreo para el análisis de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de *A. azarae*.

El muestreo se llevó a cabo en el centro-sur de la Provincia de Córdoba: de norte a sur entre las localidades de Alcira Gigena (32°45'S; 64°19'O) y Chucul (33°0'S; 64°10'O) y de este a oeste, entre las proximidades de la localidad de General Cabrera (32° 48' S; 63° 52' O) y Río Seco (32°48'S; 64°33'O). La región se encuentra sometida a un uso intensivo de la tierra, principalmente como resultado de la agricultura.

Se instalaron 13 líneas de trampas en ambientes de borde, cubriendo un área de aproximadamente 1000 km<sup>2</sup>, a ambos lados de distintas barreras potenciales para la dispersión de la especie: campos de cultivo, rutas Nacionales pavimentadas N° 36 y 158, ruta Provincial N°11 que no se encuentra pavimentada y conecta las localidades de Río Cuarto con Alpha Corral, así como también líneas de trampas separadas por el

Arroyo Chucul (Fig. 6). Cada animal capturado se identificó taxonómicamente en el campo por características exomorfológicas y se llevó al laboratorio, donde se determinó el sexo por inspección visual; se tomó además el peso y el largo del cuerpo y de la cola. Este muestreo se realizó con la técnica de remoción, siguiendo las normas para el manejo y cuidado de mamíferos de la American Society of Mammalogist (Gannon et al. 2007).

Al igual que para el estudio a escala fina, de cada ejemplar se tomó una muestra de la punta de la cola que fueron conservadas en etanol al 90 %. El resto del material obtenido de cada ejemplar fue destinado a estudios de morfometría geométrica desarrollado por otros investigadores, dentro del mismo proyecto general.



**Figura 6:** Diseño del dispositivo de muestreo: Los sitios señalados en color indican la posición de las líneas que se analizaron para observar el efecto de las barreras sobre la estructuración genética de *A. azarae*

### 2.3 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para *A. azarae*.

Para el aislamiento de los microsatélites de *Akodon azarae* se construyó una librería genómica enriquecida utilizando el protocolo de Glenn y Schable (2005) con algunas modificaciones, ya que actualmente la estrategia predominante para el desarrollo de microsatélites es la selección, por hibridación, de los fragmentos que contienen la secuencia de repetición.

### 2.3.1 Extracción de ADN.

El ADN total fue extraído del corazón de un individuo de la especie *A. azarae* (macho N° 013) proveniente de las muestras conservadas en nuestro laboratorio, utilizando el protocolo de extracción con fenol-cloroformo según Maniatis et al. (1982).

El ADN de la muestra fue sometido a electroforesis con el fin de evaluar su calidad y concentración. Se sembraron 5 µl de ADN total del individuo mezclado con 1 µl de *buffer* de siembra (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilencianol FF; 40% sacarosa) en un gel de agarosa al 0,8% P/V preparado con 0,005 µg/ml de bromuro de etidio, en *buffer* TBE 0,5X (45 mM Tris; 45 mM ácido bórico; 1mM EDTA). La muestra se sembró junto a un marcador de tamaño molecular (Lambda HindIII) de concentración conocida (250 ng/µl). El gel fue sometido a corriente eléctrica de 6V/cm durante 90 minutos. La calidad del ADN obtenido se evaluó en base a la intensidad y morfología de las bandas en un transiluminador ultravioleta; la concentración de la muestra se estimó por comparación visual con el marcador.

### 2.3.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción son una manera sencilla de fragmentar el ADN reconociendo secuencias específicas. El objetivo de este paso fue obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pb, fáciles de secuenciar y con alta probabilidad de contener suficiente ADN flanqueante a regiones de microsatélites que serían utilizadas para el diseño de los cebadores. En este trabajo el ADN genómico fue digerido con la enzima Hae III utilizando la siguiente reacción: 2,50 µl de 10X Ligase buffer; 0,25 µl de 100X BSA (Albúmina de suero bovino); 0,25 µl de NaCl 5M (50 mM final); 1 µl de la enzima Hae III y 20,0 µl de DNA genómico (100 ng/µl). El proceso de digestión se realizó en un baño termostatzado a 38°C por 1 hora. La calidad y el tamaño los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % utilizando un marcador de tamaño molecular de 100 pb.

### 2.3.3 Unión de adaptadores a los fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión con un tamaño de aproximadamente de 300 a 1000 pb, fueron incubados y ligados a los oligonucleótidos SNX-F y SNX-R (Fig. 7). Los adaptadores de doble hebra proveen tanto de un sitio de unión para cebadores (que permitirán su amplificación por PCR en pasos posteriores), como su ligado en vectores de clonación.



**Figura 7:** Secuencia de los adaptadores SNX-F (“Forward”) en la parte superior y SNX-R (“Reverse”) en la parte inferior. Tomado de Glenn y Schable (2005).

En primer lugar se trató de lograr la alineación en doble cadena de los adaptadores; para ello se mezclaron 100  $\mu$ l de cada adaptador a una concentración de 10  $\mu$ M con 4  $\mu$ l de NaCl 5M. Esta solución se calentó por 5 minutos a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de ligamiento tuvo la siguiente composición: 7,0  $\mu$ l de adaptadores; 1,0  $\mu$ l de 10X buffer; 2,0  $\mu$ l de ADN ligasa y 1,0  $\mu$ l de XmnI. Se agregó el ADN previamente digerido y se dejó incubar a 16°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo y para comprobar si la reacción fue exitosa, se realizó una PCR con las siguientes condiciones: 2,5  $\mu$ l de 10X PCR buffer; 1,3  $\mu$ l de adaptadores a una concentración final de 10  $\mu$ M; 1,5  $\mu$ l de dNTP Mix 2,5  $\mu$ M; 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> de concentración 25  $\mu$ M; 13  $\mu$ l de agua destilada; 0,2  $\mu$ l de Taq Polimerasa (5u/ $\mu$ L) y 2  $\mu$ l del producto de la ligación.

El programa de PCR comenzó con un periodo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 95°C por 20 segundos., 60°C por 20 segundos., 72°C por 1.5 minutos y finalmente un periodo de extensión a 15°C durante 10 minutos.

El producto de PCR se observó en un gel de agarosa (al 1%) utilizando un marcador de tamaño molecular de 100 pb.

#### 2.3.4 Enriquecimiento con perlas magnéticas para la detección de fragmentos de ADN con microsatélites.

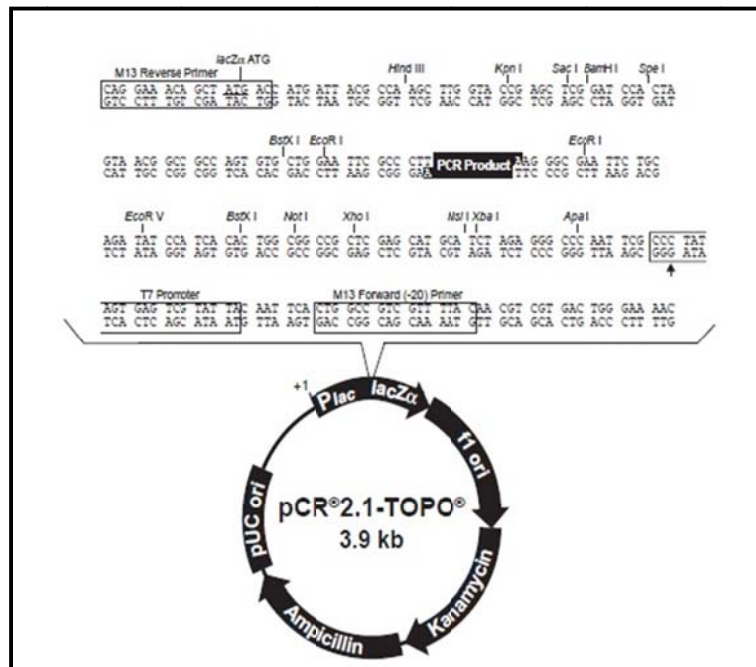
Los fragmentos que contienen microsatélites fueron enriquecidos mediante el método de hibridación selectiva a 50°C, con oligonucleótidos biotinilados que contienen diferentes repeticiones de microsatélites [(AG)<sub>12</sub>, (TG)<sub>12</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACTC)<sub>6</sub>, y (ACTG)<sub>6</sub>] y capturados con bolitas de estreptavidina. El ADN enriquecido fue recuperado del complejo biotina-estreptavidina utilizando una solución de Tris 10 mM pH 8-EDTA 0,2mM a 95°C por 5 minutos.

### 2.3.5 PCR de fragmentos de ADN enriquecidos.

Para verificar que el enriquecimiento de las secuencias fue exitoso e incrementar la concentración del ADN obtenido, se realizó una PCR utilizando como cebador el adaptador Super SNX (“forward”) y los demás reactivos de la mezcla, mencionados en el punto 2.3.3. El ciclo de PCR consistió de un paso de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C durante 90 segundos y finalmente una extensión a 72°C por 30 minutos. Posteriormente, se mantuvo a 15°C. El producto de PCR se visualizó por electroforesis, al igual que en los pasos anteriores.

### 2.3.6 Inserción del ADN enriquecido en un vector de clonación.

Los fragmentos de ADN recuperados fueron incorporados a un plásmido bacteriano Topo Pcr2.1 del kit comercial TA-Cloning (Invitrogen; Carlsbad CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fig. 8). Una vez ligado dentro del vector de clonación, el ADN es reconocido como un inserto.



**Figura 8:** Características del vector de clonación utilizado en el proceso de aislamiento de microsatélites en *A. azarae*. Obtenido del manual TOPO TA Cloning Kit, (Invitrogen; Carlsbad USA)

### 2.3.7 Transformación.

Los vectores con inserto fueron utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* de la cepa DH5a de acuerdo al siguiente protocolo: se mezclaron 75 µl de células competentes en un microtubo con 6 µl de la reacción de ligación, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, luego fue sometida a un shock térmico a 42°C durante 120 segundos, seguido de 2 o 3 minutos en hielo (este proceso permite la incorporación del plásmido recombinante al genoma bacteriano). Esta mezcla se llevó a un volumen final de 1ml con medio LB fresco y posteriormente se incubó, con agitación lenta, durante una hora a temperatura ambiente; finalmente se sembró 150 µl de la reacción de transformación en placas con medio de cultivo LB agar-Ampicilina- X-gal. Este último es un sustrato cromogénico para la enzima β-galactosidasa, la cual es codificada por el gen reportero Lac-Z de los vectores plasmídicos. La reacción con X-gal (5-bromo-4cloro-3 indol – β-D-galactosa) produce un precipitado que le da una coloración azul a las colonias bacterianas. En los vectores, el sitio de inserción del ADN extraño se encuentra en la secuencia del gen lac-Z, por lo cual una “inserción exitosa” interrumpe su secuencia y por lo tanto la síntesis de β-galactosidasa, por lo que no se dará la reacción cromogénica con X-gal y se observarán colonias de color blanco. Se utilizó una cepa bacteriana sensible a la ampicilina y un vector de clonación con un gen que confiere resistencia a la misma. La bacteria recombinante, que incorpora el vector, transforma su fenotipo de sensible a resistente a la ampicilina. Cuando una mezcla de bacterias es “plaqueada” sobre un medio que contiene dicho antibiótico, únicamente las bacterias resistentes crecen y forman colonias. Del experimento de clonación se obtienen tres tipos de células bacterianas en las placas de cultivo: a) bacterias no transformadas: son aquellas que carecen de plásmido y no crecen en la placa dado que son sensibles al antibiótico ampicilina; b) bacterias transformadas con plásmido no recombinante (sin inserto de ADN de la especie que estamos estudiando): crecen formando colonias de color azul dado que son resistentes a ampicilina y tienen actividad β-galactosidasa y c) bacterias transformadas, con plásmido recombinante: crecen formando colonias de color blanco dado que son resistentes al antibiótico y no presentan actividad β-galactosidasa .

Se tomaron muestras de cada colonia recombinante con palillos estériles, se sumergieron en 50 µl de agua destilada y esas suspensiones se sometieron a 95°C por 15 minutos para provocar la lisis celular y liberar el ADN. En el proceso de transformación las bacterias pueden incorporar plásmidos con fragmentos de tamaño no deseados y en



este proceso es necesario seleccionar clones con un inserto de tamaño entre 500 y 1200 pb. Con este fin, se realizó una PCR diagnóstico con cada clon positivo, utilizando los cebadores universales M13 bajo las siguientes condiciones: 2,50 µl de 250µg/ml BSA (Bovine Serum Albumin); 2,50 µl de buffer 10X; 0,5 µl de 10 µM de M13 F; 0,5 µl de 10 µM de M13 R; 2,00 µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,50 µl de 2,5mM de dNTP's; 12,80µl de agua destilada; 0,20 µl de Taq DNA Polymerase (2,5 Units/µl) y 1,50 µl de ADN de las colonias recombinantes. Las condiciones del ciclado fueron las siguientes: 95°C por 3 min.; luego, 35 ciclos a 95°C por 20 seg., 50°C por 20 seg. y 72°C por 1,5 min.

El tamaño molecular de los insertos fue chequeado por electroforesis en geles de agarosa al 1% por comparación del tamaño del fragmento con un estándar de tamaño molecular. Las colonias recombinantes con un inserto de tamaño apropiado fueron conservadas en medio LB-Amp y glicerol a -80°C.

#### 2.3.8 Secuenciación de los fragmentos con microsatélites.

Las colonias recombinantes que generaron productos de PCR de tamaño entre 500 y 1200 pb fueron secuenciadas usando el primer universal M13, utilizando el servicio de secuenciación comercial de Macrogen Inc. (EE.UU.).

#### 2.3.9 Análisis de secuencias y diseño de cebadores.

La identificación de las secuencias con microsatélites se realizó mediante la visualización de cromatogramas con el programa Chromas (McCarthy, 1996). Se determinó el tipo y número de repeticiones de cada microsatélite y se seleccionaron las secuencias que tuvieran regiones flanqueantes adecuadas para el diseño de cebadores.

Este diseño se realizó utilizando el software FASTPCR (Kalendar 2004). Los loci se nombraron con el prefijo Aaz seguido por un número.

#### 2.3.10 Estandarización de la amplificación de los microsatélites.

Las condiciones de amplificación para cada cebador se optimizaron utilizando como templado el ADN extraído de 4 individuos capturados en dos poblaciones naturales, Piamonte (32°7'60'' S y 61° 58' 60''O) y Chucul (33° 0' 35'' S y 64° 10' 17'' O), variando la temperatura de unión del primer, número de ciclos y la concentración de MgCl<sub>2</sub> con el objetivo de obtener bandas nítidas. Las condiciones finales de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 5 min. a 92°C, seguido por 30 ciclos de 30 seg. a 92° C, 30 seg. en la temperatura de unión del

primer y 30 seg. a 72° C, finalizando con 5' a 72°C. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra UnoII. La mezcla de reacción de PCR contiene 1X de buffer de reacción (10mM Tris-HCL, 50 mM de KCl Ph 8.3); 60 µM de cada dNTP (deoxi-nucleótidos trifosfatos); 0,4 µM de cada cebador; 1,3 M de Betaína; 1U de Taq polimerasa, 10 ng de ADN templado y la concentración MgCl<sub>2</sub> varió con cada cebador (Tabla 1), todo en un volumen final de 10 µl.

Los alelos amplificados fueron separados por electroforesis utilizando el sistema de buffer Tris-Glicina en geles de poliacrilamida nativa (White et al. 2002) y teñidos con nitrato de plata (Neilan et al. 1994). Los cebadores diseñados fueron, además, utilizados para amplificar microsatélites en individuos de las siguientes especies de la tribu Akodontini: *A. dolores*, *A. simulator*, *A. polopi*, *A. spegazini*, *Oxymycterus rufus* y *Necromys sp.*, bajo las mismas condiciones empleadas en *A. azarae*.

## **2.4 Análisis de la estructura genética de *A. azarae* a escala geográfica fina.**

### **2.4.1 Extracción de ADN y amplificación de loci de microsatélites.**

Se realizaron las extracciones de ADN total a partir del extremo de la cola de 357 individuos capturados durante el primer año de muestreo, primavera 2005-Invierno 2006. Para ello se utilizó el protocolo de extracción salina y precipitación estándar con etanol según Maniatis (1982). Las muestras de ADN fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa de acuerdo a lo explicado en el punto 2.3.1 con el fin de examinar su calidad y concentración.

Para el análisis de la estructura genética espacial a nivel microgeográfico, se utilizaron 7 de los 8 pares cebadores obtenidos en el primer año de tesis (Aaz1, Aaz2, Aaz5, Aaz8, Aaz4, Aaz6 y Aaz3). Los cebadores directos fueron marcados con fluorocromo. El locus Aaz11 fue eliminado de estos análisis debido a que las amplificaciones de las muestras con este cebador marcado no fueron exitosas, probablemente debido a un error en su síntesis por parte de la empresa que brinda ese servicio.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra Uno II variando la temperatura de unión del primer y el número de ciclos según el cebador (Tabla 1). Las condiciones de amplificación fueron, en general, las siguientes: 5 minutos de desnaturalización a 92°C, seguido por entre 28 y 36 ciclos de 30 segundos a 92° C, 30 segundos en la temperatura de unión del primer y 30 segundos a 72° C, finalizando con

5 minutos de extensión a 72°C. Luego de la amplificación por PCR; los fragmentos se separaron por electroforesis en un secuenciador de capilares ABI 3730XLs (Macrogen Inc - Corea). La lectura de los picos de los microsatélites y la determinación del tamaño de los fragmentos se realizaron con los programas PeakScanner v.1.0 (Applied Biosystems, 2006) y MsatAllele (Manaster, 2002). Este último provee un novedoso método que utiliza la información de la distribución de los tamaños de fragmentos de microsatélite registrados en una base de datos en R 2.9.0 (R Development CoreTeam; www.r-project.org) para clasificarlos según clases de tamaño, que se corresponden con los diferentes alelos.

Cuando se trabaja con microsatélites, algunos errores de lectura pueden generar confusión a la hora de diferenciar entre individuos homocigotas y heterocigotas. Los errores más frecuentes son los debidos a la amplificación diferencial del alelo de tamaño pequeño frente a los de mayor tamaño en un mismo locus y los asociados con el “tartamudeo de picos o “stutters peaks” (Pompanon 2005). Con objeto de corroborar la fiabilidad de los datos se empleó el programa MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al. 2004), que permite detectar posibles errores durante el proceso de amplificación y de genotipado.

#### 2.4.2 Estimación de la variabilidad, equilibrio de Hardy-Weinberg y diferenciación genética poblacional.

Se estimó el grado de variabilidad genética para cada muestra estacional mediante los siguientes índices: Heterocigocis media esperada ( $H_e$ ), Heterocigosis media observada ( $H_o$ ) y Riqueza alélica media (RA). La estructura genética de las poblaciones de *A. azarae* se analizó mediante los estadísticos F desarrollados por Wright (1951). Weir y Cockerham (1984) propusieron los estimadores  $f$  de  $F_{is}$  y  $\theta$  de  $F_{st}$ , que tienen en cuenta las fuentes de variación debidas a las características de muestreo tales como número de poblaciones analizadas, número de individuos estudiados por población y número de alelos observados por locus. El equilibrio de Hardy-Weinberg por locus y estación fue evaluado utilizando el índice  $f$ . Los niveles de significancia de  $f$  se calcularon con 28.000 permutaciones al azar de alelos entre los individuos dentro de cada muestra y se ajustaron utilizando la corrección de Bonferroni ( $P < 0,002$ ).

El grado de diferenciación genética entre transectas por estación de muestreo se calculó utilizando el índice  $\theta$ . La significación de los valores de  $\theta$  se determinó

mediante permutación al azar de genotipos entre transectas utilizando el método de corrección de Bonferroni. Dado el bajo número de individuos obtenidos en las transectas C y D en las estaciones de primavera, verano e invierno, las estimaciones de diferenciación genética se realizaron considerando ambas transectas como una subpoblación. En otoño (pico de densidad poblacional) cada una de las transectas fue considerada como una subpoblación distinta. Los niveles de diferenciación genética total entre machos y hembras separados por transectas (considerando a cada transecta como un grupo separado) y estación del año se calcularon a partir de los valores de  $\theta$  y sus intervalos de confianza. Todas estas estimaciones se llevaron a cabo utilizando el programa FSTAT versión 2.9.3 (Goudet 2001). El número efectivo de migrantes ( $Nm$ ) por sexo y estación de muestreo se estimó a partir de:  $(1/F_{st}-1)/4$  (Wright 1951).

#### 2.4.3 Estructura Genética Espacial (EGE).

Los análisis de autocorrelación espacial (Smouse y Peakall 1999) se realizaron con el programa GenalEx 6.5 (Peakall y Smouse 2006) por estación y por sexo. Este programa utiliza la posición geográfica de cada individuo junto con los datos de genotipos multilocus individuales, para calcular un coeficiente de autocorrelación “ $r$ ” en grupos de individuos separados por una distancia geográfica determinada. Esta prueba estima la extensión geográfica en la cual los individuos están más relacionados genéticamente que lo esperado por azar. El coeficiente de autocorrelación  $r$  en función de las clases de distancia (en metros) se grafica en un correlograma en el cual se evalúa la magnitud y la extensión de la autocorrelación. Para los análisis se utilizaron las opciones “Single Pop” y “Multiple D Class” con la opción de “clases de distancias variables”, que permite crear manualmente clases de tamaños desiguales, con el fin de incluir un componente intra-línea (100m, 200m, 300m) y un componente inter-líneas (1100m, 1900m, 1900m, 2700m, etc). En cada análisis se realizaron 999 permutaciones y réplicas de *bootstrap* para evaluar la significancia estadística de “ $r$ ” bajo la hipótesis nula de no existencia de autocorrelación ( $r=0$ ), y para estimar un intervalo de confianza del 95% alrededor de “ $r$ ”. Se tuvo en cuenta la significancia de la prueba de una cola; por lo tanto, la autocorrelación espacial se consideró positiva y significativa cuando el valor “ $r$ ” superó el intervalo de confianza del 95%. La extensión geográfica de la autocorrelación positiva se estableció en el valor de la clase de distancia en donde “ $r$ ” cruzó el eje de  $x$  en el correlograma ( $r=0$ ) (Peakall et al. 2003).

## **2.5 Análisis del efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de *A. azarae*.**

### 2.5.1 Extracción de ADN y amplificación de loci de microsatélites.

Se realizaron las extracciones de ADN total a partir del extremo de la cola de 80 individuos capturados ambos lados de las rutas Nacionales y la ruta Provincial (barreras artificiales), líneas de trampas separadas por el Arroyo Chucul y campos de cultivos (barreras naturales) (Fig.6). Se utilizaron los 8 pares de cebadores polimórficos obtenidos para la especie (Aaz1, Aaz2, Aaz5, Aaz8, Aaz4, Aaz11, Aaz6 y Aaz3). La metodología empleada para la extracción de ADN, amplificación de las muestras por PCR, determinación del tamaño de los fragmentos amplificados y verificación del genotipo multilocus para cada individuo se realizó siguiendo la metodología mencionada previamente en el punto 2.4.1.

### 2.5.2 Identificación de subpoblaciones por métodos “a posteriori”.

Se utilizó la metodología implementada en el programa Geneland 4.0.0 (Guillot et al. 2005 a y b) extensión del programa R 2.13.2 (R Development CoreTeam; [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

A partir de un conjunto de individuos, cada uno caracterizado por su genotipo multilocus y por sus coordenadas geográficas, este programa utiliza la estadística bayesiana a fin de determinar la cantidad más probable de subpoblaciones presentes, identificar discontinuidades genéticas en el paisaje y establecer el área geográfica que ocupa cada subpoblación. Este test identifica discontinuidades genéticas y las ubica espacialmente lo cual permite, mediante comparación con la estructura y característica del paisaje, reconocer barreras para la dispersión. El programa dibuja mapas con los límites que abarcarían cada una de las subpoblaciones y líneas de probabilidad de pertenencia de los individuos a cada una de ellas. El número de K subpoblaciones se estimó utilizando un método de re-muestreo mediante simulación de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) con los siguientes parámetros:  $10 \times 10^6$  iteraciones (MCMC), con muestreos cada 1000 iteraciones, con la K mínima fijada en 1 y la máxima fijada en 13 (cantidad de líneas diferentes de las que provenía la muestra); las primeras 2000 cadenas se descartaron como “burn-in”.

### 2.5.3 Análisis de aislamiento por distancia.

El efecto de la estructura paisajística sobre el flujo génico en *A. azarae* se evaluó calculando la correlación entre las matrices de distancias genéticas y de distancias geográficas entre pares de individuos, utilizando la prueba de Mantel (Mantel 1967), con el programa Genalex 6.5 (Peakall y Smouse 2006).

## 3 Resultados

### 3.1 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para *A. azarae*.

Mediante el protocolo de extracción de ADN utilizado fue posible obtener ADN genómico de buena calidad y pureza adecuada para el aislamiento de loci de microsatélites. El enriquecimiento de las secuencias que contienen repeticiones mediante la técnica de hibridación selectiva con oligonucleótidos biotinilados permitió recuperar de forma exitosa fragmentos con microsatélites.

El ligamiento de los fragmentos con microsatélites a los plásmidos así como la transformación de las bacterias fue eficiente. A partir de las placas de cultivo, se recuperaron en total 494 colonias recombinantes, de las cuales 41 generaron productos de PCR entre 500 y 800 pb, que fueron secuenciados utilizando el servicio de Macrogen Inc. (EE.UU). Treinta y tres colonias contuvieron insertos con repeticiones de microsatélites. Trece secuencias mostraron repeticiones y secuencias flanqueantes adecuadas para el diseño de cebadores específicos, ya que tenían la longitud suficiente a ambos lados de la secuencia repetida en tándem como para seleccionar a los cebadores directo y reverso a partir del mismo segmento. Los cebadores diseñados para diez loci mostraron una buena calidad en los patrones de amplificación; ocho de ellos (Aaz1, Aaz2, Aaz3, Aaz4, Aaz5, Aaz6, Aaz8 y Aaz11) resultaron altamente polimórficos en ensayos preliminares con 4 individuos de la localidad de Chucul. A fin de confirmar la utilidad de estos cebadores para estudios poblacionales, se analizaron en 21 individuos de las dos poblaciones naturales mencionadas en el punto 2.3.10. Para estos loci el número de alelos por locus varió entre 11 y 16. Los niveles de heterocigosis fueron elevados (Tabla 1). El locus Aaz 6 mostró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en las dos poblaciones analizadas, mientras que los loci Aaz2 y Aaz5 solo lo hicieron en las poblaciones de Chucul y Piamonte, respectivamente. En las poblaciones estudiadas no se detectó desequilibrio de ligamiento entre loci.

En cuanto a la amplificación de microsatélites con los cebadores polimórficos en otras especies de la tribu Akodontini (*A. dolores*, *A. simulator*, *A. polopi*, *A. spegazini*, *Oxymycterus rufus* y *Necromys sp*), se obtuvieron resultados positivos en al menos tres loci; el locus Aaz8 no mostró resultados positivos en ninguna de ellas (Tabla 2). Es importante mencionar que además demostraron ser polimórficos, con un buen número

de alelos amplificados en relación al número de individuos de cada una de las especies analizadas.



**Tabla 1:** Características de los loci de microsatélites aislados de *A. azarae*. Los datos de heterocigocis observada ( $H_o$ ) y heterocigocis esperada ( $H_e$ ) por locus representan un promedio entre las dos poblaciones analizadas. F, cebador “forward”, R, cebador “reverse”, T, temperatura de unión al cebador.

Locus	Motivo de repetición	Secuencias de los primers	T°C	MgCl <sub>2</sub> (mM)	N° de ciclos	% del gel	Rango del tamaño de alelos	N° de Allelos	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	N° de acceso al GeneBank
Aaz1	(ACAT) <sub>8</sub> ATAAA(TG) <sub>6</sub>	F:GCACAGGACCTTTGTGCT R:GGTCTAGGGTATCCAACACCT	52	2	28	7	170-194	13	0,764	0,869	HM046488
Aaz2	(GA) <sub>20</sub>	F:GCAGAATCCCAGCCTCGTCTAC R:TCAGAGGCCTCATCAATCTTGCCAC	52	2,5	30	8	156-194	16	0,445	0,843	HM046489
Aaz3	(AC) <sub>15</sub>	F:CTAGCAGAATCCCTCTGTGTGAAA R:GCCTCTCTAAAAAACGAGATTTGC	48	1,2	36	8	146-170	12	0,859	0,888	HM046490
Aaz4	(GT) <sub>2</sub> T(GT) <sub>5</sub> ATGCGAG TAT(GT) <sub>4</sub> AT (GT) <sub>18</sub>	F:GATCTTCTTTCTGGTAAGGATAAAAAC R:TGATTGACATACTTGAACAATGT	50	2,5	30	6	180-242	13	0,775	0,913	HM165271
Aaz5	(AGAC) <sub>6</sub> (AC) <sub>17</sub>	F:GCAATGATTCTTTAGAAAATACACCA R:CAAACAATTAAGGATTTTGGTC	50	2,5	28	8	116-142	11	0,614	0,886	HM046491
Aaz6	(AC) <sub>25</sub>	F:CCCAGGAAAACAGAGCATCGT R: TGCACACTGCGTGAGTGA	49	1,25	32	7	160-188	15	0,473	0,919	HM046492
Aaz7	(GA) <sub>22</sub>	F: GATAAATCCATATTCAAACCTAACC R: GATTCTGTTGATTTGGAGACTT	45	2,5	32	8	130	1	0	0	HM560015
Aaz8	(GT) <sub>6</sub> (GAGT) <sub>2</sub> (GTGA) <sub>2</sub> (GT) <sub>11</sub> (GA) <sub>11</sub> AA(GA) <sub>10</sub>	F:CTTTACAGTGTGCTTTTCA R: TGCTTTCAAGGAGACATT	48	1,5	33	8	122-166	16	0,618	0,895	HM046493
Aaz9	(AC) <sub>24</sub>	F: GGAGACTGTTCTGACTCCCACAA R: AGAGACCCCGTGTCAGGG	48	1,5	30	7	120	1	0	0	HM560016
Aaz11	(CA) <sub>16</sub>	F:GCCTATAGCACACATGTGCA R:AGCAGAATCTTTTCATTTCCAAGTA	49	1,5	33	8	112-138	15	0,764	0,883	HM046494

**Tabla 2:** Amplificación de los ocho loci de microsatélites diseñados para *A. azarae* en otras especies de Akodontinos. Para cada locus se muestra el número de individuos con amplificación exitosa / número total de individuos analizados por especie (N/T), el rango de alelos en pares de bases y el número total de alelos (entre paréntesis). “-” indica que no hubo amplificación.

Locus	N/T	<i>A. dolores</i>	N/T	<i>A. polopi</i>	N/T	<i>A. simulator</i>	N/T	<i>A. espezazini</i>	N/T	<i>O. rufus</i>	N/T	<i>Necromys sp.</i>
<b>Aaz1</b>	4/4	166-180(4)	2/2	180-188(2)	2/2	190-210(4)	2/2	164-180(3)	4/4	180(1)	4/4	198-208(3)
<b>Aaz2</b>	2/4	156-170(3)		-		-	2/2	168-170(2)		-		-
<b>Aaz3</b>	3/4	164-180(5)	2/2	176-190(2)		-	2/2	184-196(2)	1/4	168-190(2)		-
<b>Aaz4</b>	3/4	200-226(5)	1/2	208-214(2)		-	1/2	200-210(2)	4/4	200 (1)	3/4	200-214(3)
<b>Aaz5</b>	3/4	122-142(5)	2/2	116-120(2)	2/2	130-136(4)	2/2	126-150(4)	4/4	148-152(2)	1/4	116(1)
<b>Aaz6</b>	2/4	160-168(2)		-	1/2	164(1)	2/2	168-176(2)		-		-
<b>Aaz8</b>		-		-		-		-		-		-
<b>Aaz11</b>	3/4	104-122(5)	1/2	132-142(2)	2/2	132-146	2/2	104-140		-		-

### **3.2 Análisis de la estructura genética de *A. azarae* a escala geográfica fina.**

#### 3.2.1 Resultados del muestreo estacional.

Se obtuvieron en total 357 individuos de *A. azarae* en el primer año de muestreo (primavera del 2005-invierno del 2006); todos ellos fueron utilizados para los estudios de estructura genética a nivel microgeográfico. El número de individuos varió entre las estaciones del año; se capturaron 83 individuos en primavera, de los cuales 47 fueron machos y 37 hembras, 75 ejemplares en verano con un total de 36 machos y 39 hembras, 133 en otoño con una captura de 67 machos y 66 hembras y 66 individuos en invierno, con 35 machos y 31 hembras (Tabla 3).

En la tabla 4 se muestran las cantidades de individuos de cada clase etaria obtenidos por estación. Siguiendo a de Villafañe (1981) y a Dalby (1975), se consideraron adultos a los machos cuyo peso fue mayor o igual a los 18 g y a hembras cuyo peso fue mayor o igual a los 16 g.

#### 3.2.2 Estimación de la variabilidad y equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los datos del genotipo multilocus de 357 individuos revelaron altos niveles de variabilidad genética en cada estación (Tabla 3). El promedio de la heterocigosis observada ( $H_o$ ) para todos los loci fue similar en todas las estaciones, variando entre 0,811 y 0,815. El promedio de la heterocigosis esperada fluctuó entre de 0,875 y 0,885. La riqueza alélica promedio fue alta y varió entre 16,61 (invierno) y 18,41 (otoño) (Tabla 3).

Con respecto a errores en el genotipado, el análisis de “microchecker” sugirió un error de tartamudeo en el locus Aaz8 en la muestra de otoño, que fue corregido por revisión del tamaño de los alelos con el programa PeakScanner v.1.0 (Applied Biosystems, 2006) y MsatAllele (Manaster 2002).

Se observaron desviaciones del equilibrio de Hardy y Weinberg en todas las estaciones ( $P < 0,002$ , según la corrección de Bonferroni) lo cual se relaciono con valores de Fis positivos, que oscilaron entre 0,081 (invierno) a 0,104 (verano) (Tabla 5).

#### 3.2.3 Diferenciación genética entre poblaciones.

En general, se registraron niveles bajos de diferenciación genética entre transectas en las distintas estaciones muestreadas. Los valores de divergencia ( $\Theta$ ) fueron

mayores en las comparaciones entre transectas de otoño, los cuales variaron entre 0,0033 y 0,0281, que entre transectas y grupos de transectas en las demás estaciones del año, en las cuales los valores oscilaron entre 0,0020 y 0,0099. Las comparaciones realizadas en las mismas transectas entre primavera y verano no mostraron valores significativos de diferenciación genética (Tabla 6). Los valores de  $\Theta$  fueron significativos entre las transectas A vs. B y A vs. C+D en invierno (Tabla 5) y entre A vs C, A vs D, B vs C, B vs D y C vs D en otoño (Tabla 7).

En cuanto a la diferenciación genética por sexo y estación, se observó que las hembras presentaron valores significativos de  $\Theta$  en primavera (inicio del periodo reproductivo), en otoño (fines del periodo reproductivo) y en invierno (periodo no reproductivo). En los machos, en cambio, los valores  $\Theta$  fueron no significativos en todas las estaciones (Tabla 8).

El número efectivo de migrantes en hembras varió entre 2,50 en verano y 192,30 en otoño; en los machos el  $Nm$  alcanzó valores que oscilaron entre 20,58 en verano e infinito en primavera e invierno.

Se utilizaron los mismos datos para efectuar análisis de asignación con el fin de analizar la estructura genética espacial de *A. azarae* a escala geográfica fina con los programas Geneland (Guillot et al., 2005) y Structure (Pritchard *et al.* 2000). Ambos programas utilizan la estadística Bayesiana para identificar la cantidad más probable de grupos genéticos en la muestra (K). Se realizaron diversos análisis variando, en cada corrida, el número de poblaciones o “clusters” (K), el “burning” y la cantidad de iteraciones de MCMC (Cadenas de Markov de Monte Carlo), a los fines de alcanzar la fase estacionaria o de convergencia de las simulaciones. En ninguno de esos análisis se logró alcanzar el estado estacionario de las simulaciones en las corridas realizadas, lo cual se determinó por visualización de Cadenas de Markov de Monte Carlo. Esto puede deberse a que en primavera, verano e invierno el tamaño muestral es relativamente bajo; además, tanto en verano como en otoño se registró una importante superposición de generaciones (individuos adultos y juveniles) lo cual podría impedir que en cada corrida los re-muestreos asignen correctamente los individuos a uno u otro cluster genético y por ello no se encuentren los límites reales de las poblaciones a la escala microgeográfica en la que se trabajó (< 10 km). Este resultado reafirmaría la idea de una alta tasa de dispersión en *A. azarae*, en concordancia con los bajos valores de  $\Theta$  detectados.

**Tabla 3:** Tamaño muestral analizado y niveles de variabilidad estacional en 7 loci de microsatélites en *A. azarae*. **Ho:** heterocigosis media observada; **He:** heterocigosis media esperada; **RA:** riqueza alélica; TrA, TrB, TrC y TrD: transectas A, B, C y D.

	Primavera				Verano				Otoño				Invierno			
Descripción	M	H		Total	M	H		Total	M	H		Total	M	H		Total
Cantidad de individuos por transecta	TrA	TrB	TrC	TrD	TrA	TrB	TrC	TrD	TrA	TrB	TrC	TrD	TrA	TrB	TrC	TrD
	47	36		83	36	39		75	67	66		133	35	31		66
	41	30	8	4	37	24	6	8	40	56	15	22	18	25	15	8
Ho	0,811				0,815				0,812				0,812			
He	0,885				0,885				0,875				0,879			
Ra	16,71				17,57				18,41				16,61			

**Tabla 4:** Cantidad de individuos obtenidos por clase etaria en cada estación de muestreo, entre paréntesis se indica la proporción de cada uno de ellos.

	Adultos	Juveniles
<b>Primavera</b>	78 (99,98 %)	5 (6,02 %)
<b>Verano</b>	52 (69,34 %)	23 (30,66 %)
<b>Otoño</b>	36 (27,00 %)	97 (73,00%)
<b>Invierno</b>	22 (33,34 %)	44 (66,60 %)

**Tabla 5:** Valores  $f$  por locus y estación de muestreo.

Locus	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Aaz1	0,059	0,086	0,030	0,103
Aaz2	<b>0,182</b>	0,158	<b>0,141</b>	0,047
Aaz5	0,040	0,069	0,053	0,102
Aaz8	<b>0,153</b>	0,049	<b>0,167</b>	0,062
Aaz4	-0,002	0,121	0,023	0,065
Aaz6	<b>0,145</b>	<b>0,188</b>	0,031	0,091
Aaz3	0,054	0,068	<b>0,128</b>	0,093
Promedio	<b>0,090</b>	<b>0,104</b>	<b>0,082</b>	<b>0,081</b>

Los valores estadísticamente significativos después de aplicar la corrección de Bonferroni ( $P < 0,002$ ) se marcan en negrita

**Tabla 6:** Valores de diferenciación genética ( $\Theta$ ) entre grupos de transectas en primavera, verano e invierno. Entre paréntesis se indica la cantidad de individuos analizados por subpoblación.

Estaciones	Primavera			Verano			Invierno		
	A (41)	B (30)	C+D (12)	A (37)	B (27)	C+D (14)	A (18)	B (25)	C+D (23)
A	0,0000	-0,0020	0,0032	0,0000	0,0025	0,0088	0,0000	<b>0,0099*</b>	<b>0,0098*</b>
B		0,0000	0,0076		0,0000	0,0071		0,0000	0,0047
C+D			0,0000			0,0000			0,0000

La significación de los valores  $\Theta$  se obtuvo después de realizar la corrección de Bonferroni \* $P < 0,05$

**Tabla 7:** Valores de diferenciación genética ( $\Theta$ ) entre transectas en otoño. Entre paréntesis se indica la cantidad de individuos por transecta.

Estación	Otoño			
Transectas	A (40)	B (56)	C (15)	D (22)
A	0,0000	0,0033	<b>0,0281**</b>	<b>0,0173**</b>
B		0,0000	<b>0,0167*</b>	<b>0,0113**</b>
C				<b>0,0189*</b>
D				0,0000

La significación de los valores  $\Theta$  se obtuvo después de realizar la corrección de Bonferroni \* $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$ .

**Tabla 8:** Valores de diferenciación genética ( $\Theta$ ) y  $Nm$  por estación y sexo en *A. azarae*. El rango del intervalo de confianza de  $\Theta$  se indica entre paréntesis. M y H indican la cantidad de hembras y machos analizados por estación. Los valores estadísticamente significativos (5%) se marcan en negrita.

Estación	Machos Tr A, B, C y D	Hembras Tr A, B, C y D
<b>Primavera</b> (M: 47; H: 36)	$\Theta = -0,000$ (-0,007-0,004) $Nm = \infty$	<b><math>\Theta = 0,0013</math></b> <b>(0,007-0,018)</b> $Nm = 192,05$
<b>Verano</b> (M: 36; H: 39)	$\Theta = 0,012$ (-0,004-0,032) $Nm = 20,58$	$\Theta = 0,091$ (-0,011-0,022) $Nm = 2,50$
<b>Otoño</b> (M: 67; H: 66)	$\Theta = 0,008$ (0,000-0,016) $Nm = 31$	<b><math>\Theta = 0,017</math></b> <b>(0,012-0,023)</b> $Nm = 14,46$
<b>Invierno</b> (M: 35; H: 31)	$\Theta = 0,000$ (0,000-0,006) $Nm = \infty$	<b><math>\Theta = 0,034</math></b> <b>(0,017-0,052)</b> $Nm = 7,10$

### 3.2.4 Estructura genética espacial

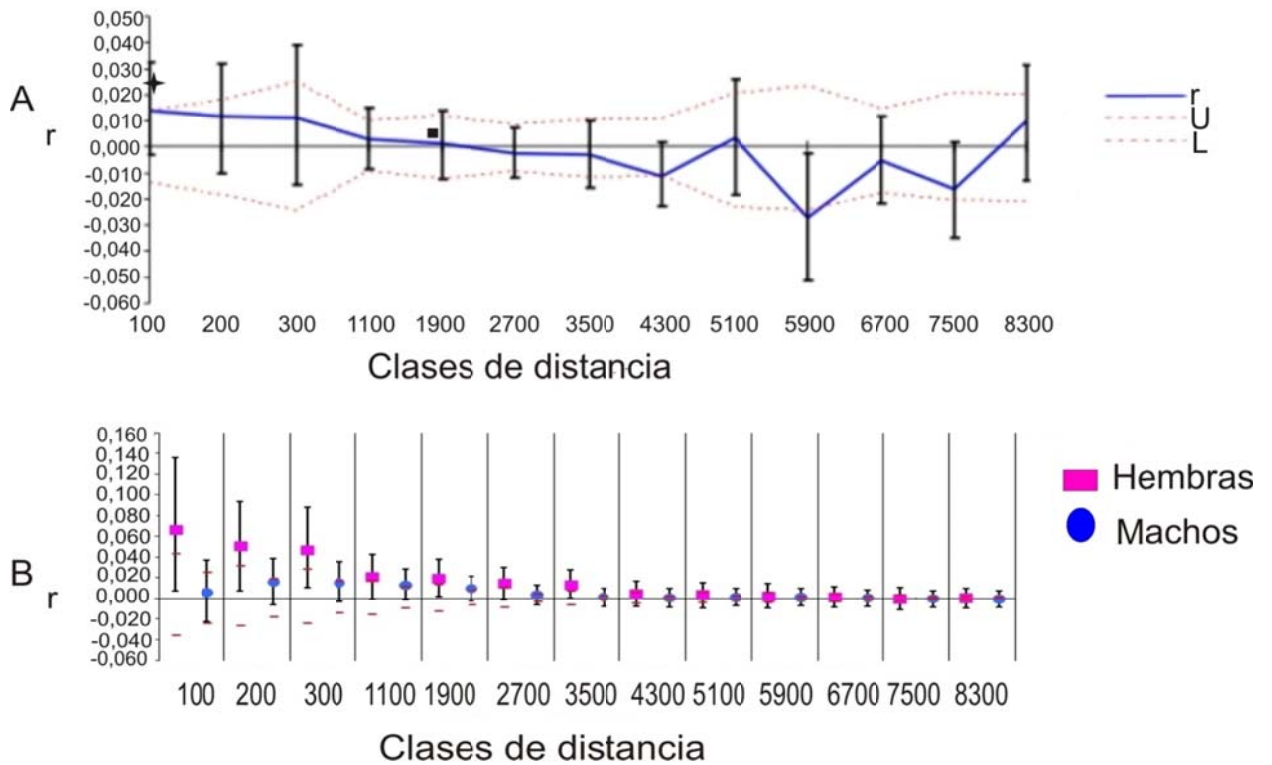
Se analizaron 7 loci de microsatélites en cada una de las estaciones del muestreo; se observaron diferencias significativas en el patrón de estructura genética espacial (EGE) por estación y por sexo (Figuras 9 a 12).

#### Primavera:

En primavera, inicio del periodo reproductivo, la población estuvo compuesta principalmente por individuos adultos, nacidos a fines del periodo reproductivo anterior. El análisis en la población total detectó EGE positiva hasta los 2182 m y significativa en la primera clase de distancia, a los 100 m ( $P < 0,05$ ) (Fig.9A).

Se compararon las 36 hembras y los 47 machos de dicha estación. La EGE de las hembras fue positiva y significativa hasta los 1900 m ( $P < 0,05$ ). Por su parte, los machos mostraron EGE significativa a 300, 1100 y 1900 m ( $P < 0,05$ ) (Fig.9B).

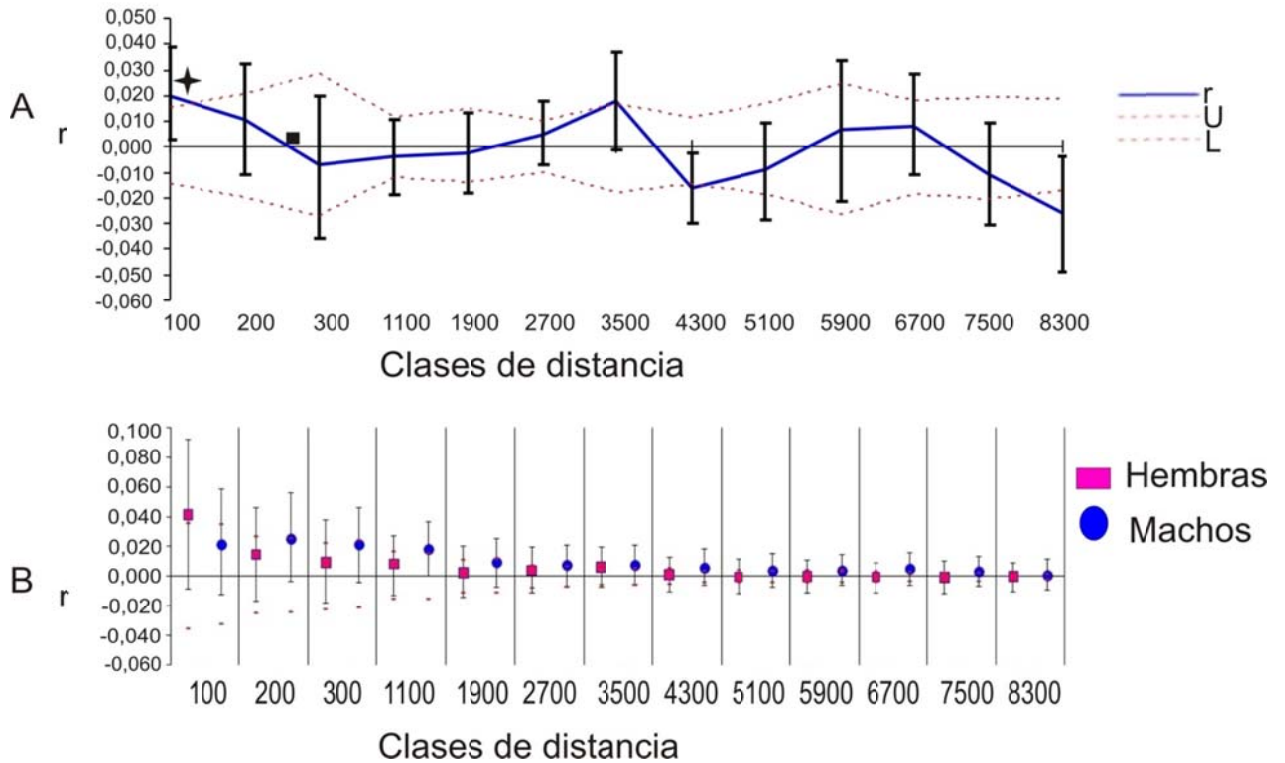




**Figura 9:** A) Correlograma de la población en primavera. Línea continua: coeficiente de autocorrelación  $r$ . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se indican las clases de distancia geográfica. (★) Autocorrelación espacial positiva y significativa con el test de una cola. (•) Extensión de la autocorrelación espacial positiva. B) Estructura genética espacial por sexo en primavera. Las hembras están representadas por cuadrados rosados y los machos, por círculos azules. Las barras de error representan el intervalo de confianza alrededor de  $r$  obtenido mediante bootstrap.

Verano:

Como se observa en la Tabla 4, en esta estación la población estuvo compuesta en su mayoría por individuos adultos y en una pequeña proporción de juveniles de ambos sexos. En la población total se detectó EGE positiva hasta los 259 m y significativa en la primera clase de distancia, a los 100 m ( $P < 0,05$ ) (Fig. 10A). Se compararon las hembras y machos de dicha estación y en ambos sexos la EGE fue al azar (Fig. 10B).

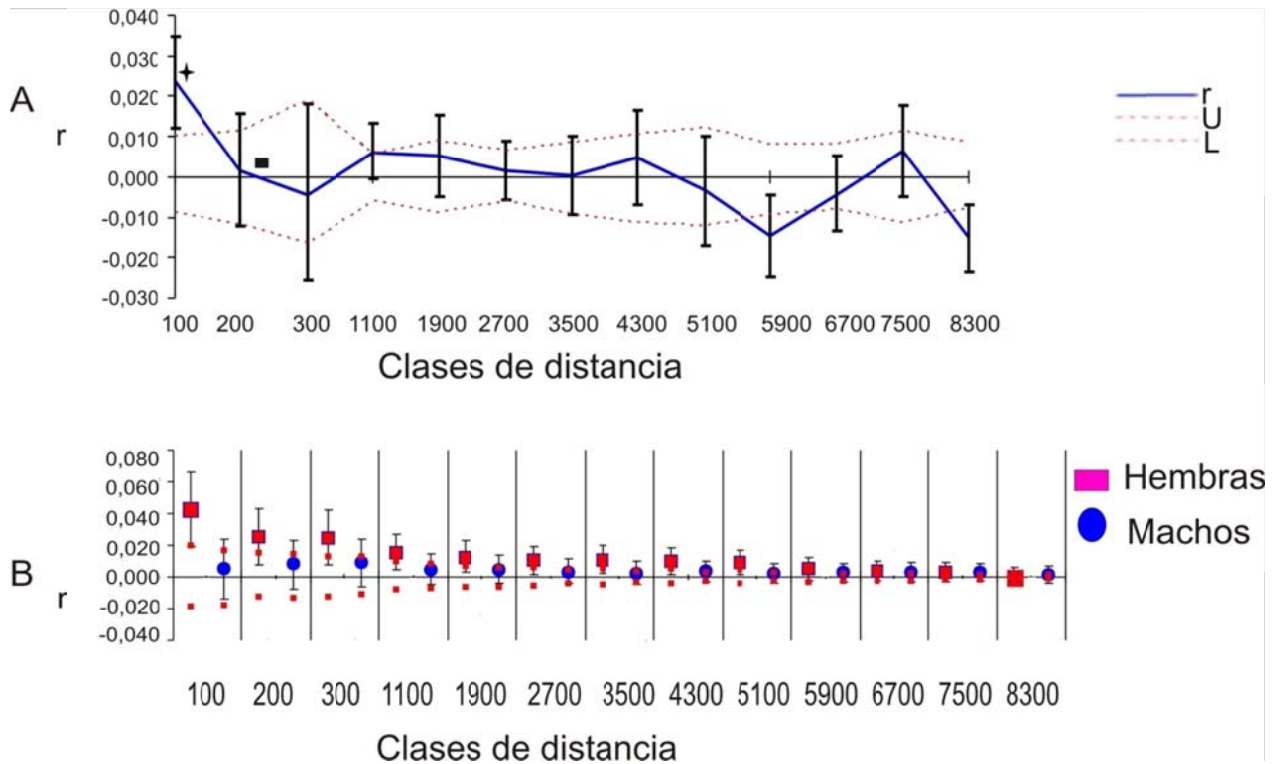


**Figura 10:** A) Correlograma de la población en verano. Línea continua: coeficiente de autocorrelación  $r$ . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se indican las clases de distancia geográfica. (★) Autocorrelación espacial positiva y significativa con el test de una cola. (•) Extensión de la autocorrelación espacial positiva. B). Estructura genética espacial por sexo en verano. Las hembras están representadas por cuadrados rosados y los machos, por círculos azules. Las barras de error representan el intervalo de confianza alrededor de  $r$  obtenido mediante bootstrap.

#### Otoño:

En otoño, pico de densidad poblacional, la población estuvo compuesta en su mayoría por individuos juveniles (Tabla 4). El análisis de EGE en la población total detectó estructura positiva hasta los 225 m y significativa en la primera clase de distancia, a los 100 m ( $P < 0,05$ ) (Fig. 11A).

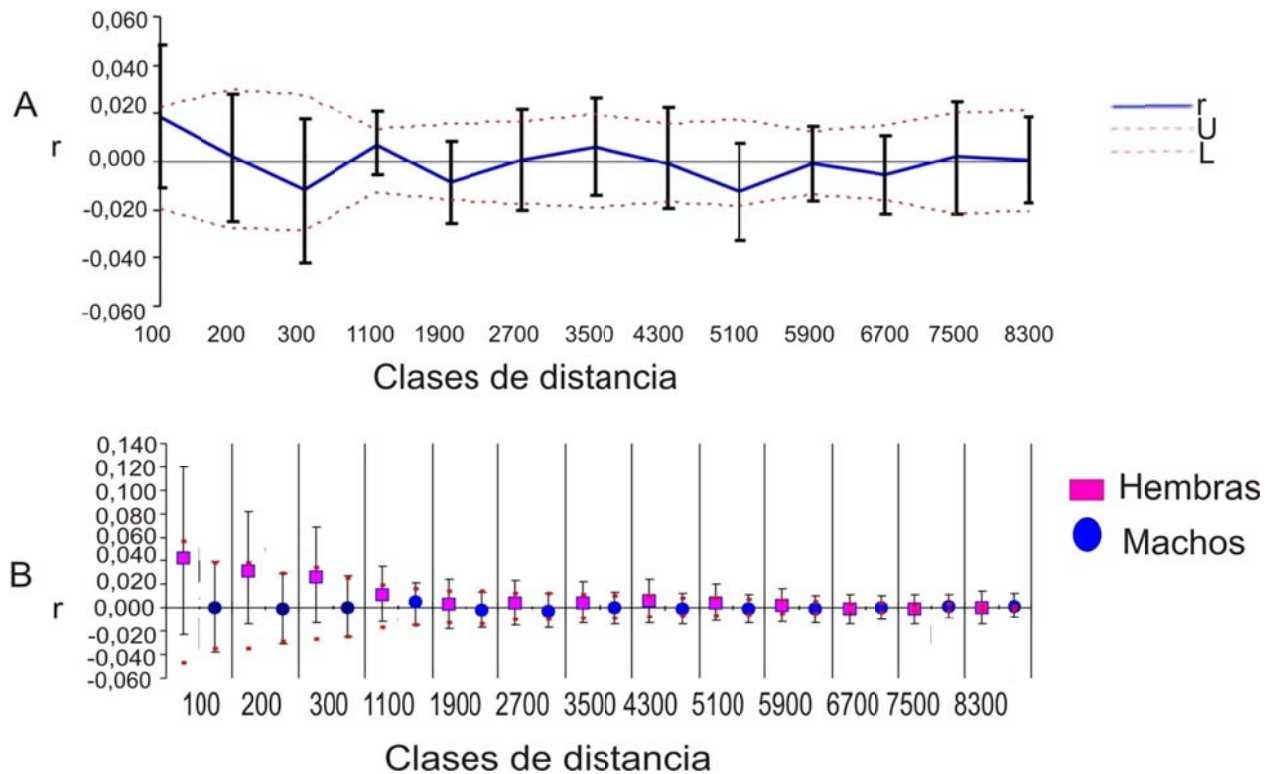
Cuando se compararon las hembras y machos de dicha estación, la EGE de las hembras fue positiva y significativa hasta los 1900 m ( $P < 0,05$ ). Los machos mostraron una distribución al azar de los genotipos (Fig. 11B).



**Figura 11:** A) Correlograma e la población en otoño línea continua: coeficiente de autocorrelación  $r$ . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas. (+) Autocorrelación espacial positiva y significativa con el test de una cola. (•) Extensión de la autocorrelación espacial positiva. B) Estructura genética espacial por sexo en otoño. Las hembras están representadas por cuadrados rosados y los machos, por círculos azules. Las barras de error representan el intervalo de confianza alrededor de  $r$  obtenido mediante bootstrap.

Invierno:

En invierno, periodo no reproductivo, la población estuvo compuesta en su mayoría por individuos juveniles nacidos a finales del periodo reproductivo (Tabla 4). El análisis de EGE en la población total y por sexos demostró que en esta estación existe una distribución al azar de los genotipos (Fig. 12A y B).



**Figura 12:** A) Correlograma de la población en invierno. Línea continua: coeficiente de autocorrelación  $r$ . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se indican las clases de distancia geográfica. (★) Autocorrelación espacial positiva y significativa con el test de una cola. (●) Extensión de la autocorrelación espacial positiva. B) Estructura genética espacial por sexo en invierno. Las hembras están representadas por cuadrados rosados y los machos, por círculos azules. Las barras de error representan el intervalo de confianza alrededor de  $r$  obtenido mediante bootstrap.

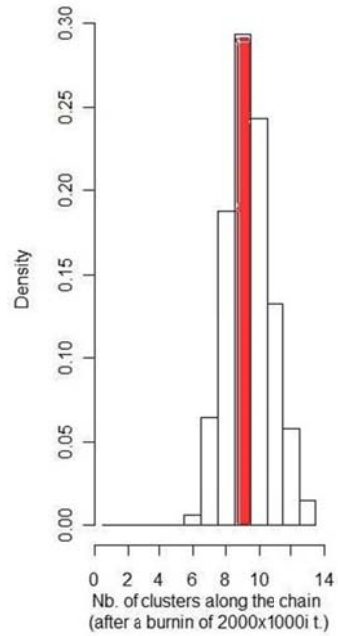
### 3.3 Análisis del efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de *A. azarae*.

#### 3.3.1 Análisis de la estructuración poblacional mediante análisis de agrupación bayesiana.

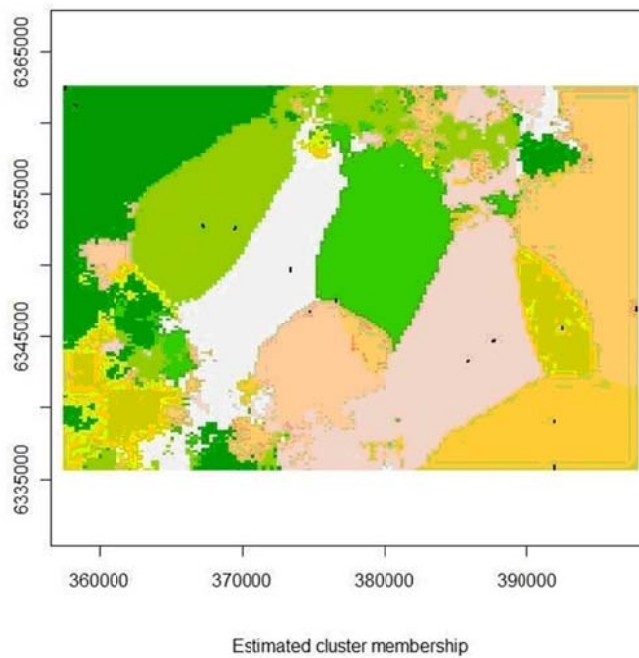
Luego de la implementación del programa “microchecker”, los resultados indicaron ausencia de errores debidos a la asignación del tamaño de los alelos.

El programa Geneland estimó un total de 9 poblaciones ( $K=9$ ) (Fig. 13 y 14), lo que indicó la existencia de estructuración poblacional en el área de estudio.

En general, los individuos situados a lo largo del hábitat lineal se agruparon juntos, lo cual corrobora que la dispersión ocurre preferentemente a lo largo de los bordes de cultivo y de caminos (Fig.15 -H y E). Con respecto a los cursos de agua, las muestras tomadas en líneas situadas a uno y otro lado del arroyo Chucul indicaron que éste actúa como barrera física para la dispersión de los roedores (Fig. 15 D, E y F). Los campos de cultivos representaron barreras para la dispersión de esta especie, según lo demostraron líneas de muestreo separadas entre sí por una distancia lineal de 2 a 14,23 Km. (Fig.15 A, B, D, F, G e I). Las rutas nacionales 158 y 36 constituyeron barreras físicas para la dispersión en *A. azarae*. Los individuos capturados en lados opuestos de esas rutas conformaron grupos diferentes. (Fig.15 B, D, E, G y H). Por el contrario la ruta provincial N° 11, que no se encuentra pavimentada, no significa una barrera para la dispersión ya que los individuos muestreados en lados opuestos de la misma se agruparon juntos con un 70% de probabilidad posterior (Fig.15 A y C), lo que hace suponer que los caminos secundarios tampoco representan barreras físicas para la dispersión de esta especie.

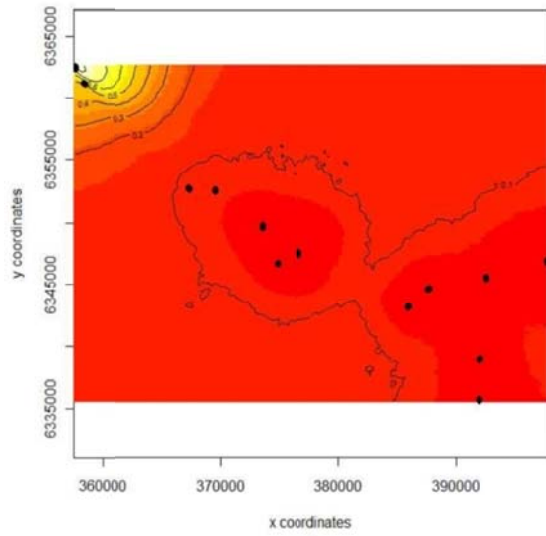


**Figura 13:** Densidad de probabilidad posterior del número de poblaciones de *A. azarae*

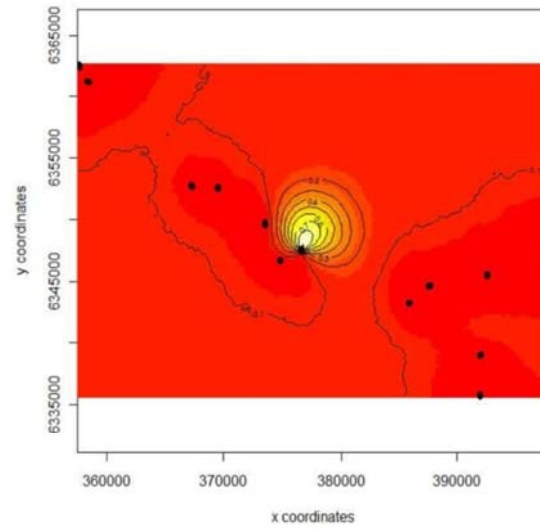


**Figura 14:** Mapa de asignación de los individuos (puntos negros) a cada uno de los grupos poblacionales, inferidos mediante Geneland.

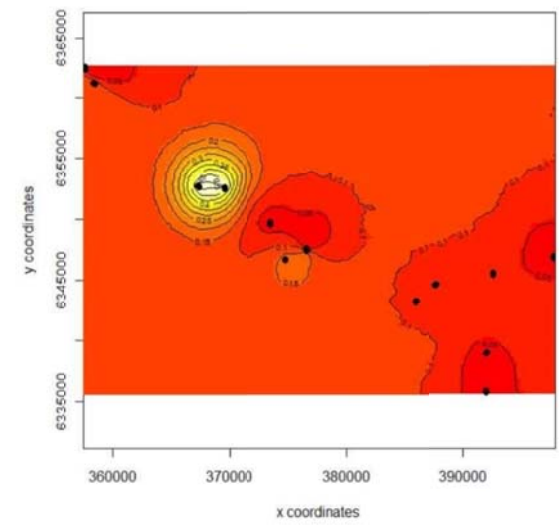
**A**  
Map of posterior probability to belong to cluster 1



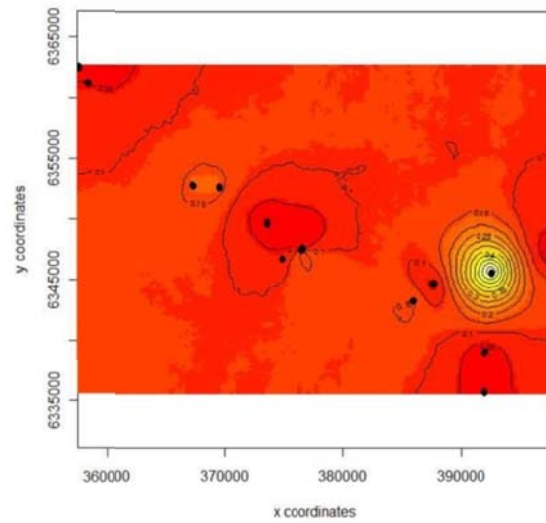
**B**  
Map of posterior probability to belong to cluster 2



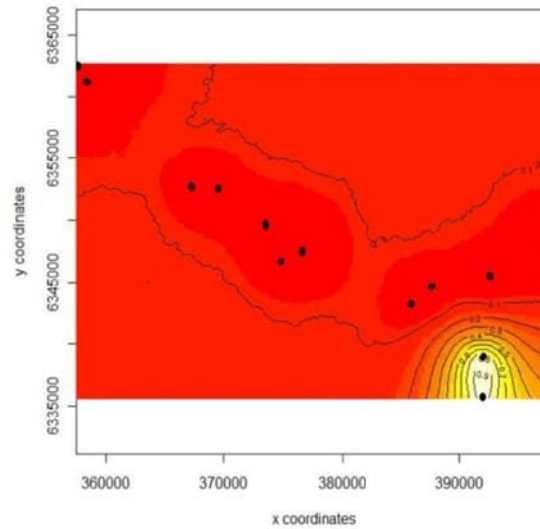
**C**  
Map of posterior probability to belong to cluster 3



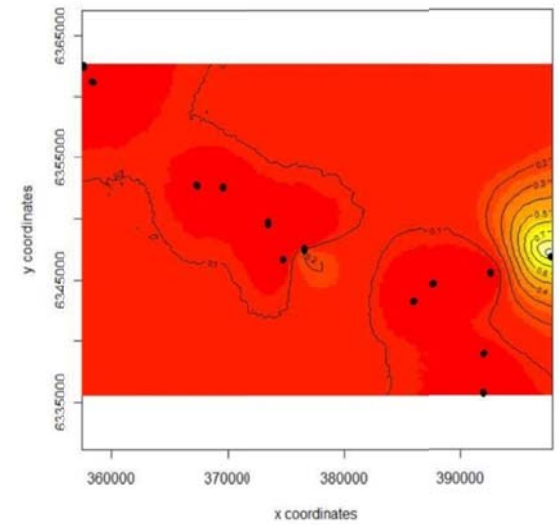
**D**  
Map of posterior probability to belong to cluster 4



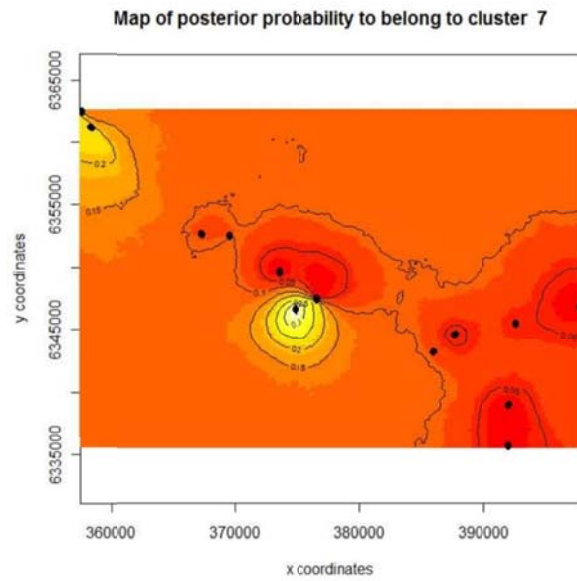
**E**  
Map of posterior probability to belong to cluster 5



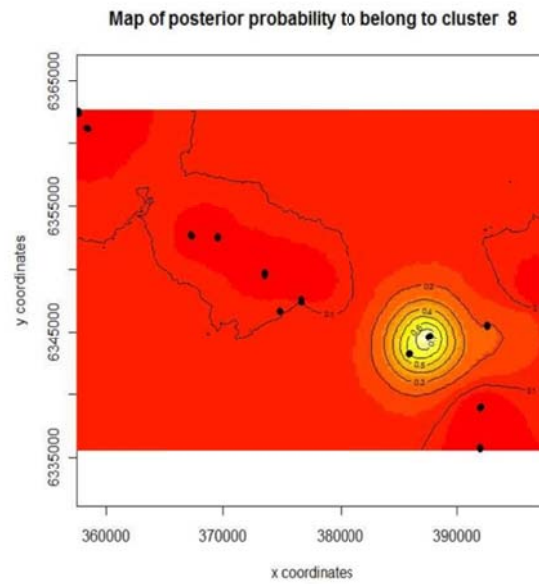
**F**  
Map of posterior probability to belong to cluster 6



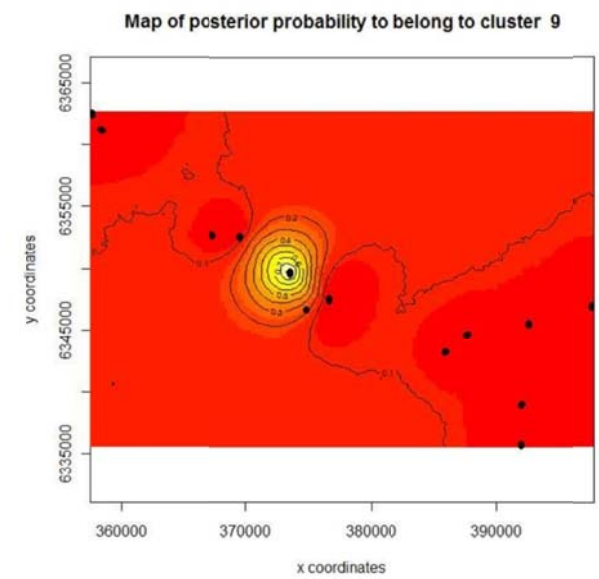
G



H



I

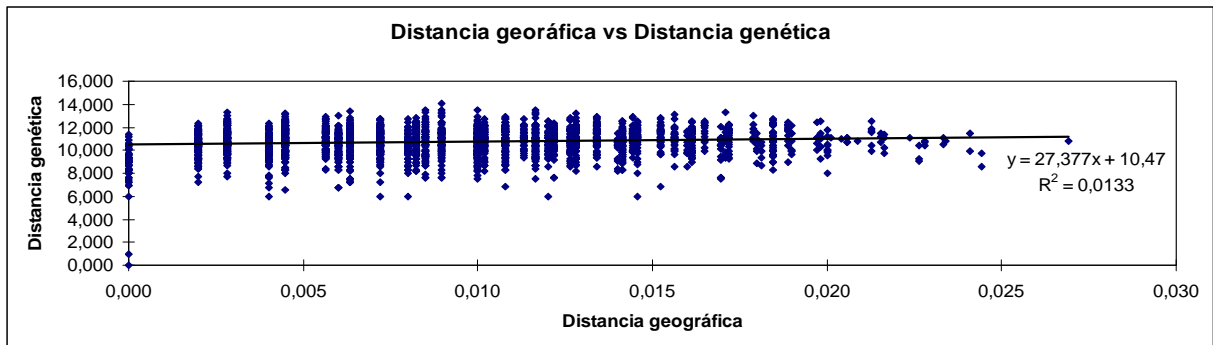


**Figura 15:** Mapas de la probabilidad posterior de pertenecer a cada una de las 9 poblaciones identificadas por Geneland. Cada punto representa un individuo. Las probabilidades de pertenecer al grupo indicado se señalan con líneas de contorno. Colores más claros indican altas probabilidades de pertenencia.



### 3.3.2 Aislamiento por distancia.

Los resultados del test de Mantel revelaron un ligero pero significativo patrón de aislamiento por distancia para esta especie ( $R=0,116$  y  $P= 0,001$  basado en 999 permutaciones) (Fig. 16).



**Figura 16:** Resultado del test de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de individuos, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) y las distancias geográficas (en kilómetros). Alrededor del 1,31% ( $R= 0,116$ ) de la variación en las distancias genéticas entre pares de individuos es explicada por la distancia geográfica ( $P=0,001$ , basado en 999 permutaciones).

## 4 Discusión

### 4.1 Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para *A. azarae*

Los cebadores de microsatélites obtenidos son los primeros desarrollados para *A. azarae*. Pruebas preliminares realizadas en 21 individuos de dos poblaciones naturales mostraron niveles muy altos de polimorfismo, lo cual indicó que los loci caracterizados aportarían información suficiente para el estudio de la estructura genética a nivel microgeográfico de *A. azarae*. Por otra parte, el éxito de las amplificaciones de estos cebadores en otras especies de Akodontinos hace prever su posible utilidad para estudios de genética de poblaciones en las especies *A. dolores*, *A. polopi*, *A. simulator*, *A. spegazini*, *O. rufus* y *Necromys sp.*

### 4.2 Análisis de la estructura genética de *A. azarae* a escala geográfica fina.

Como ya se señalara, la fragmentación de los hábitats naturales afecta en gran medida la estructura genética de las poblaciones debido a que produce una disminución del tamaño efectivo poblacional e incrementa el grado de aislamiento entre poblaciones, provocando una reducción del flujo génico y favoreciendo la acción de procesos estocásticos como la deriva genética. La pérdida de variación genética resultante y el posible aumento en los niveles de endogamia, podría reducir la capacidad de los individuos de adaptarse a cambios ambientales, influyendo sobre la supervivencia de las poblaciones (Haag et al. 2010, Nora et al 2011).

Los agroecosistemas del sur de la provincia de Córdoba son un buen ejemplo del proceso de fragmentación. Es un ambiente complejo, donde coexisten diferentes parches de distintos tipos de hábitat creados o modificados por el hombre y parches naturales remanentes a lo largo de ríos, terraplenes de ferrocarril, bordes de campos de cultivo, de caminos rurales y rutas. Estos últimos tienen, en general, una estructura lineal o unidimensional en lugar de la bidimensional de los campos de cultivo; mantienen a lo largo del año una alta cobertura de plantas nativas y malezas introducidas que funcionan como corredores de dispersión y proveen, a pequeños mamíferos, recursos para la supervivencia y reproducción. En esta Tesis se utilizó, como modelo biológico, una de las especie de roedores más abundantes en estos ambientes debido a que, por un lado, se pueden conseguir tamaños de muestras adecuadas en periodos cortos a escala de paisaje y porque también en la región de estudio coexisten especies con diferentes estrategias en el uso del hábitat (generalistas y especialistas). Esta última característica permite

realizar estudios comparativos de la dinámica poblacional entre especies que podrían percibir la fragmentación del paisaje de manera diferencial.

En el presente estudio realizamos el primer análisis de la estructura genética de *A. azarae*, especialista en relación al uso de hábitat, aplicando marcadores moleculares de microsátélites, a fin de analizar la estructura genética espacial de este roedor de acuerdo al sexo y a las distintas fases del ciclo reproductivo anual (con alta y baja densidad poblacional).

#### 4.2.1 Niveles de variabilidad genética y Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los niveles de variabilidad genética obtenidos para *A. azarae* fueron muy elevados (en promedio,  $R_a = 17,33$ ;  $H_o = 0,81$  y  $H_e = 0,88$ ) y similares a los observados en otras dos especies de roedores sigmodontinos capturados en los mismos ambientes y procedentes de muestreos con idéntica localización geográfica, *Calomys musculinus* (generalista en el uso del hábitat) y *Calomys venustus* (especialista). En *C. musculinus*, el número efectivo de alelos ( $R_a$ ) varió entre 10,53 en primavera y 10,75 en verano y la heterocigosis media esperada ( $H_e$ ) alcanzó valores entre 0,844 y 0,877 (Sommaro 2012) mientras que en el roedor especialista, la  $R_a$  varió entre 7,543 y 8,440 y la  $H_e$  osciló entre 0,689 y 0,732 (M. B Chiappero, comunicación personal).

*A. azarae* se caracteriza por presentar variaciones en la densidad poblacional a lo largo de todo el periodo reproductivo. Andreo et al. (2009), Gómez et al. (2011), Bonatto et al. (2012 y 2013) observaron que los valores máximos de densidad se alcanzan en otoño, con una importante caída en la abundancia poblacional en invierno. A pesar de estas variaciones en el ciclo poblacional anual, los niveles de polimorfismo se mantuvieron constantes a lo largo de los muestreos estacionales, lo cual sugiere ausencia de cuellos de botella anuales en la especie a pesar de la marcada reducción en la densidad en invierno. Cabe destacar que esta densidad se mide como éxito de captura; por ello, puede no corresponderse con un incremento de la mortalidad en esta estación, sino más bien reflejar una mayor permanencia de los individuos en potenciales refugios. Al respecto, Hodara (2000) sugiere que la disponibilidad de refugios es un factor limitante para la supervivencia de *A. azarae* en invierno.

Podría plantearse una explicación alternativa, aunque no excluyente, para el caso de especies que presentan ciclos anuales como *A. azarae*; en estos casos, la fase de baja densidad poblacional es corta y está seguida por un aumento rápido en el número poblacional en los meses de otoño. Esto favorecería el mantenimiento de la variabilidad

a lo largo de todo el año, debido a que procesos estocásticos como la deriva genética tendrían pocas posibilidades de producir una pérdida significativa del polimorfismo.

En otros micromamíferos con períodos poblacionales cíclicos, también se reportaron niveles altos y constantes de variabilidad genética. Por ejemplo, en poblaciones de *Arvicola terrestris* de Francia, un monitoreo espacio temporal a escala geográfica fina demostró que la diversidad genética permaneció alta (Ra promedio de 8,00 y He promedio de 0,80) tanto en las fases de densidad poblacional baja como alta (Berthier et al. 2006). En un estudio en *Microtus aconomus* durante 5 años de muestreo, Pilot et al. (2010) observaron que las medidas de diversidad genética no variaron significativamente en el tiempo y permanecieron relativamente altas, a pesar de que las poblaciones de esta especie sufrieron importantes cambios demográficos y de estructura social (Ra entre 10,6 y 11,2 y He entre 0,72 y 0,78). Vuorinen y Eskelinen (2005) analizaron la variabilidad genética en *Myopus schisticolor*, un roedor que además de presentar variaciones cíclicas en la densidad poblacional se caracteriza por una dispersión diferencial según el sexo. Los autores observaron que los niveles de variabilidad permanecieron estables a lo largo de 21 años de muestreo, que incluyeron el análisis de 40 a 50 generaciones de esta especie en poblaciones naturales de Finlandia. Resultados similares se obtuvieron en poblaciones de *Lepus americanus* (número medio de alelos por locus=13,4 y He promedio de 0,67), a pesar de los abruptos cambios en la densidad poblacional plurianual, característicos en esta especie (Burton et al. 2002). En general, en todos estos trabajos se concluye que los altos niveles de variabilidad genética se mantuvieron constantes debido a la dispersión de los individuos a largas distancias, lo cual aumenta el tamaño efectivo de las poblaciones, preservando el polimorfismo.

Los valores positivos de Fis obtenidos en *A. azarae* a escala geográfica fina (<10 km) (Tabla 5) demostraron desvíos del Equilibrio de Hardy-Weinberg en el sentido de un significativo déficit de heterocigotas, en todas las estaciones analizadas. La presencia de alelos nulos, endogamia y la existencia de algún nivel no detectado de subdivisión poblacional (efecto Wahlund) son procesos que pueden causar estos desvíos. La existencia de alelos nulos se puede descartar de nuestros análisis, debido a que no se detectó ningún individuo que mostrara ausencia de amplificación de los alelos para un locus en particular. Teniendo en cuenta los antecedentes del uso del espacio y el sistema de apareamiento poligínico de la especie en estudio (Bonatto et al 2012-2013), no se espera endogamia en las poblaciones analizadas de *A. azarae*; resta entonces considerar

si la composición de la muestra puede generar un exceso significativo de homocigotos, ya sea por subdivisión espacial o temporal de las poblaciones consideradas *a priori* como una unidad reproductiva.

En primavera, comienzos del periodo reproductivo, la población estuvo formada en su mayoría por individuos adultos, sobrevivientes de la estación reproductiva anterior. En verano (mediados del periodo reproductivo) se produce un cambio en la composición de las poblaciones de *A. azarae*, debido al incremento en la proporción de individuos jóvenes. Hacia fines de verano, periodo en el cual se realizó el muestreo de esa estación, la población estuvo compuesta por algunos individuos viejos nacidos en la estación reproductiva anterior, individuos nacidos a fines de primavera-principios de verano y juveniles pertenecientes a la cohorte estival. En otoño (pico de densidad poblacional), la población estuvo formada en su mayoría por individuos juveniles nacidos a fines del verano y en otoño. En invierno (periodo no reproductivo), la población incluye individuos adultos nacidos a fines del verano-comienzos de otoño, con predominio de juveniles nacidos a fines de otoño. De acuerdo con nuestros análisis, el solapamiento de diferentes clases de edades (juveniles y adultos) contribuiría al efecto Wahlund originado por subdivisión espacial (ver punto 4.2.3), compatible con el déficit de heterocigotas obtenido en este estudio. Una explicación similar fue propuesta para la estructuración temporal observada en *C. musculus* del sur de Córdoba (Sommaro 2012) y en el lemúrido *Microcebus murinus* de Madagascar (Fredsted et al. 2005).

#### 4.2.2 Estructura genética de *A. azarae* en ambientes lineales de agroecosistemas pampeanos.

En este estudio combinamos la estadística F con medidas de autocorrelación espacial para analizar la estructura genética de *A. azarae*, en hábitats lineales, a escala geográfica fina (<10 km). Estas últimas herramientas estadísticas tienen la ventaja de cuantificar, a través de los correlogramas construidos a partir del coeficiente “r” de autocorrelación, el tamaño del parche genético; de esta manera, es posible analizar las consecuencias genéticas de la dispersión a escalas espaciales pequeñas.

Los niveles bajos de diferenciación genética (estimada como  $\Theta$ ) entre grupos de transectas en primavera, verano e invierno (tabla 6) y entre transectas en otoño (tabla 7) indican, en general, niveles de flujo génico moderados a muy altos a la escala geográfica en la cual se realizó el muestreo (Tablas 6 y 7). Además, los análisis de

autocorrelación espacial mostraron un patrón de estructura genética al azar a largas distancias. Estos resultados sugieren una alta tasa de dispersión en *A. azarae*. Sin embargo es importante considerar, en estos análisis, el sesgo observado cuando se comparan los valores según el sexo (ver sección 4.2.3).

Un patrón similar de baja diferenciación genética entre poblaciones locales se encontró en estudios realizados en conejos pigmeos *Brachylagus idahoensis* en ambientes fragmentados de Idaho, Norteamérica (Este-Zumpf et al. 2010). Los autores observaron que a pesar de que la especie es especialista en el uso del hábitat y las poblaciones son pequeñas y aisladas, no mostraron una estructuración genética marcada debido a que mantenían elevado flujo génico. Fredsted et al. (2005) observaron valores bajos de  $F_{st}$  en poblaciones del lemúrido *Microcebus marinus*, que fueron atribuidos a las grandes distancias recorridas por estos mamíferos durante la actividad de forrajeo, lo cual genera altas tasas de dispersión entre las poblaciones definidas a priori en el estudio. Los análisis de estructura genética espacial en *C. musculinus* (generalista) y *C. venustus* (especialista) a escala geográfica fina en base a muestras tomadas contemporáneamente con las del presente trabajo, dieron resultados similares a los obtenidos para *A. azarae* (Sommaro et al 2010, M.B. Chiappero, comunicación personal). Los correlogramas revelaron que, en *Calomys*, la escala geográfica del análisis no fue lo suficientemente grande como para definir el límite espacial de conjuntos de individuos genéticamente independientes.

En *A. azarae*, estudios llevados a cabo con la metodología de captura, marcado y recaptura (CMR) en los mismos hábitats demostraron que el 10% de los individuos marcados se movieron mas allá de los límites de su línea de trampa (300 m); un macho alcanzó a recorrer 900 m entre líneas a lo largo del mismo borde y 19 individuos cruzaron el camino rural que separa las transectas A y B, también utilizadas en nuestros estudios. Si bien los resultados obtenidos a campo utilizando métodos directos para medir dispersión no reflejan el éxito reproductivo de los dispersantes en la nueva población, apoyan la idea de que hábitats lineales como bordes de campos de cultivo favorecen el flujo génico, al menos a la escala a la cual se realizó este estudio (25 km<sup>2</sup>).

#### 4.2.3 Estructura genética espacial por sexo y estación.

Los valores  $\Theta$  y de  $Nm$  muestran que las hembras presentan mayor grado de estructuración genética que los machos durante todo el periodo reproductivo (Tabla 8). Además, todos los patrones de autocorrelación espacial (Fig. 9 a 12.) indican que la

distribución de los genotipos en los machos fue al azar. Estos resultados pueden explicarse por una mayor dispersión de los machos para evitar la competencia intrasexual por el acceso a las hembras. Este comportamiento estaría relacionado con un sistema de apareamiento poligínico que opera a través de la defensa de las hembras, tal como fue propuesto por Bonatto et al (2012 y 2013).

En estudios del patrón de movimiento de *A. azarae* en hábitat lineales, como los bordes de los campos de cultivo y utilizando CMR, Gómez et al. (2011) observaron que los machos se mueven grandes distancias al inicio y mediados del periodo reproductivo, mientras que a finales de dicho periodo ocurre lo contrario. Basándose en la idea aceptada hasta ese momento de que *A. azarae* era una especie promiscua poligínica (Zuleta y Bilenca 1992, Suárez y Kravetz 2001, Priotto y Steinmann 1999), los autores llegaron a la conclusión de que a fines del periodo reproductivo, la gran cantidad de hembras disponibles en los bordes determinaría que los machos no tengan que desplazarse largas distancias para reproducirse. Sin embargo, Bonatto et al. (2012 y 2013) demostraron que el sistema de apareamiento en *A. azarae* es poligínico (no promiscuo-poligínico). En estudios comportamentales, en presencia de las hembras, la intensidad del comportamiento agresivo exhibido por los machos varió según si el enfrentamiento ocurría con machos residentes o con intrusos. Los machos residentes mostraron altos niveles de agresión hacia los intrusos y este comportamiento de dominancia fue ratificado por el comportamiento sumiso de los últimos. Los autores plantean que, en condiciones naturales, el incremento del tiempo de residencia de los machos de *A. azarae* en sus territorios podría desencadenar una fuerte agresividad contra otros machos que intentan traspasar sus límites territoriales reproductivos (Bonatto et al 2013). En especies poligínicas en las cuales el recurso “hembras” es un factor limitante, los machos jóvenes se dispersarían de sus áreas natales como respuesta a la expulsión activa por parte de los adultos (Dobson 1982; Boonstra et al. 1987). Además, estudios del uso del espacio indicaron que los machos de *A. azarae* poseen extensas áreas de acción que se solapan con varias hembras, pero que no se solapan con otros machos reproductivos. Esta evitación espacial podría reflejar la competencia entre machos por monopolizar hembras receptivas (Bonatto et al. 2012). Si bien los estudios referidos se realizaron en poblaciones de clausuras experimentales, resultados obtenidos en esta Tesis como los valores no significativos de divergencia genética entre poblaciones temporales y los patrones al azar de autocorrelación espacial en los machos

a lo largo de todo el año en poblaciones naturales, confirman la hipótesis de que *A. azarae* se comporta como una especie poliginica.

En la población total de primavera, la autocorrelación espacial observada estaría explicada por una menor dispersión en las hembras con respecto a los machos. Las hembras tendrían un comportamiento territorial, tanto para la defensa de espacios reproductivos con cobertura vegetal y alimento, como para optimizar el cuidado maternal. Estudios sobre el patrón de movimiento de *A. azarae* en hábitats lineales del sur de la provincia de Córdoba (Gómez et al. 2011) revelaron que, a comienzos y mediados del periodo reproductivo, las hembras se mueven pequeñas distancias comparado con los machos, lo cual es concordante con un comportamiento territorial. Por otro lado, Bilenca y Kravetz (1998) encontraron que en el periodo reproductivo, las hembras sexualmente activas ocuparon microhábitats con mucha cobertura vegetal comparada con aquéllas que son inactivas. Andreo (2008) sugirió que en el área rural del centro de Argentina las lluvias y la cobertura vegetal permitirían una mejor condición para la reproducción de los individuos sobreinvernantes y probablemente de sus descendientes. Tanto los valores de  $F_{st}$  como los autocorrelogramas presentados en esta tesis apoyan las conclusiones de los estudios ecológicos mencionados.

En verano, los correlogramas muestran que el tamaño del parche disminuye notablemente (Fig.10 A y B.); la estructura genética espacial (EGE) es al azar en ambos sexos. Probablemente esto se deba a la existencia de individuos transeúntes que migran hacia los campos de cultivos adyacentes a los bordes en busca de alimento. Varios estudios confirman la hipótesis de que *A. azarae* puede desplazarse ocasionalmente a los campos de cultivo. Experimentos realizados en sistemas de borde-campo (Zuleta 1989) demostraron que en esta especie las migraciones se producen hacia el cultivo independientemente del tipo de mosaico ambiental; estos comportamientos se denominan “*desplazamientos del tipo presaturación*” debido a que coinciden con la fase de incremento de la densidad poblacional. En agroecosistemas, Bilenca et al. (1992), Hodara y Busch (2006) y Cavia et al. (2005) observaron que los movimientos de individuos desde el borde hacia los campos ocurrían generalmente antes de la cosecha, durante el período de florecimiento y maduración de los cultivos, retornando a los hábitats de borde ante perturbaciones antrópicas. Si bien las poblaciones de la especie se hallan confinadas a los hábitats más estables de los agroecosistemas, los campos con rastrojo también parecen ser un hábitat alternativo que podría invadir para luego recolonizar los bordes, de acuerdo a los cambios demográficos y a las actividades



agrícolas (Zuleta et al. 1988). Sin embargo, estos estudios fueron realizados antes de que se generalizara la siembra directa, lo cual implica un importante control de malezas, con la consiguiente pérdida de cobertura vegetal como refugio. En esta situación, es poco probable que *A. azarae* se desplace masivamente a los campos, en especial si se tiene en cuenta que es competitivamente dominante en los ambientes de borde. Resultaría de interés repetir los estudios ecológicos “a campo” arriba mencionados, en áreas donde la práctica usual es la siembra directa a fin de corroborar la hipótesis de migración ocasional hacia los cultivos para explicar la ausencia de estructuración espacial en ambos sexos durante el verano.

En otoño (máxima densidad), la población estuvo formada en su mayoría por individuos juveniles, nacidos entre marzo y mayo. La EGE positiva y significativa se explicaría por el establecimiento de las hembras juveniles cerca del territorio de sus madres. La muerte de hembras sobreinvernantes permitiría la colonización de hábitats óptimos por parte de las hembras adultas y juveniles de otoño. Si bien estas últimas no se reproducen hasta la siguiente estación, la permanencia cerca del territorio de sus madres aumentaría su probabilidad de sobrevivir al invierno, ya que recibirían mayores cuidados maternos que garantizarían su supervivencia bajo las condiciones desfavorables de otoño e invierno (Suárez 1996 y Zuleta 1989).

En invierno, por lo general el hábitat se deteriora notablemente, el espacio es el recurso limitante tanto para machos como hembras (Zuleta 1989) y por lo tanto, la selección de microhábitats con alta disponibilidad de cobertura que asegure alimento y refugio tendría un efecto adaptativo (Bilenca y Kravetz 1998). La estructura genética al azar en *A. azarae* durante el invierno se explicaría por la existencia de desplazamientos inter-hábitats. Los adultos, que en general son transeúntes que responden a los cambios de vegetación, podrían ser considerados como colonizadores desplazándose hacia los sitios con mayor disponibilidad de cobertura verde; si bien los recursos son escasos, aumenta de esta manera su probabilidad de sobrevivir a la estación desfavorable y alcanzar la próxima estación reproductiva (Bonaventura y Kravetz 1989; Zuleta 1989).

Con el fin de profundizar la evaluación de los efectos de la fragmentación sobre la dispersión y el flujo génico entre poblaciones de especies que utilizan de manera diferencial el hábitat, los resultados de esta tesis serán comparados con estudios similares que se están realizando en *C. musculus* (generalista en relación al uso del hábitat) y *C. venustus* (especialista) capturados en los mismos ambientes de borde.

De acuerdo con los datos obtenidos hasta el momento en cada una de las especies, la EGE varió de acuerdo al sexo y estación del año. Se encontraron mayores diferencias en la estructuración genética entre los dos especialistas (*A. azarae* y *C. venustus*) que entre estas últimas y la especie generalista. Al parecer la condición “especialista” o “generalista” no influye sobre la estructura genética de estas especies.

Estos resultados abren nuevos interrogantes, que deben tener en cuenta otras características ecológicas y de comportamiento como el sistema de apareamiento, el tamaño del área de acción en cada uno de los sexos, el comportamiento con relación al uso del espacio, el tamaño del cuerpo, etc., factores que podrían afectar la dispersión diferencial en cada una de las especies. Resulta también de interés ampliar estos estudios a otras poblaciones que ocupan hábitats diferentes a los aquí analizados, a fin de evaluar si el ambiente tiene un papel preponderante en estos patrones de comportamiento.

#### **4.3 Efecto de diferentes elementos del paisaje sobre la estructuración genética de poblaciones de *A. azarae*.**

Una de las características más importante de los agroecosistemas es la fragmentación resultante de la conversión de grandes extensiones en pequeñas parcelas para el cultivo o ganadería y la implementación de rutas o caminos rurales, que pueden actuar como barreras para el movimiento de pequeños mamíferos (Clarke et al. 2001, Banks et al. 2005). La presencia de estas barreras tiene numerosas consecuencias sobre las poblaciones naturales: reducción del tamaño poblacional, aparición del efecto borde, restricción del movimiento de los individuos que están limitados por ellas, reducción del flujo génico, aumento de la endogamia y disminución de los niveles de variabilidad genética (Gerlach y Musolf 2000, Rico et al. 2007).

Los agroecosistemas del centro de Argentina ofrecen un ámbito experimental ideal para estudiar las consecuencias de la subdivisión espacial sobre la estructuración poblacional en pequeños mamíferos. En este estudio combinamos técnicas moleculares con análisis de agrupación Bayesiana para dilucidar el efecto de posibles barreras para la dispersión sobre la estructuración genética de *A. azarae* en agroecosistemas.

Nuestros resultados validan la existencia de al menos 9 grupos poblacionales distintos en el área de estudio, demostrando una clara subdivisión espacial. En general,

campos de cultivo, rutas pavimentadas y el arroyo representaron barreras para la dispersión de esta especie (Fig. 15 A, B, D, E, F, G, I y H). En cambio, los caminos rurales no parecen formar barreras físicas para la dispersión de *A. azarae* (Fig. 15 A y C), lo cual concuerda con lo observado en estudios de CMR por Gómez et al. (2011). En otros micromamíferos se identificaron características del paisaje similares a las de este estudio, que influyen en la estructuración espacial. Por ejemplo, Gerlach y Musolf (2000) estudiaron los efectos de varias vías de comunicación terrestres en la estructuración genética de poblaciones del ratón de campo *Clethrionomys glareolus* y demostraron que existe subdivisión significativa en poblaciones de esta especie a ambos lados de una autopista, pero no entre poblaciones separadas por un camino rural o un área de hábitat continuo. Rico et al. (2007) en un estudio realizado en tres especies de mamíferos, (*Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis* y *Sorex araneus*) observaron que las rutas y caminos restringen el desplazamiento de los individuos que se encuentran en uno y otro lado. Detectaron además que la intensidad del tráfico no afecta la tasa de cruce de rutas y caminos en estas especies, pero existen diferencias interespecíficas en la capacidad de cruzar, debido a que las especies generalistas son menos afectadas que las especialistas por el efecto barrera. En estudios de la estructura genética y el patrón de flujo génico en *Microtus arvalis* en un área caracterizada por un uso intensivo de la tierra y el cruce de una autopista, Gauffré et al. (2008) demostraron, mediante análisis bayesianos, la existencia de una sola población debido a que la autopista no representa una barrera física para la dispersión de esta especie. La importancia de los cuerpos de agua como barreras al flujo génico se evidenció en un estudio realizado en el ratón de cuello amarillo *Apodemus flavicollis*, en bosques fragmentados en el NE de Polonia (Gortat et al. 2010).

Los resultados de correlación entre distancias genéticas y geográficas muestran la existencia de un ligero pero significativo patrón de aislamiento por distancia para individuos de *A. azarae* en el área de estudio. Esto parece indicar que tanto las barreras del paisaje como las distancias influyen simultáneamente sobre el flujo génico en esta especie. En un estudio filogeográfico a escala regional, Trimarchi (2012) demostró que poblaciones de *A. azarae* presentan altos niveles de diferenciación genética, con un patrón significativo de aislamiento por distancia.

Dentro del mismo proyecto en el que se enmarca esta Tesis y con el objetivo de comprender de qué manera la presencia de barreras creadas por la fragmentación afectan las poblaciones de roedores según su nivel de especialización de hábitat,

Martínez et al. (2014) evaluaron los patrones espaciales y ambientales de variación fenotípica en agroecosistemas del centro de Argentina. Mediante el uso de técnicas de morfometría geométrica del cráneo y mandíbula en especies especialistas y generalistas en relación al uso de hábitat, los autores confirmaron que la estructura espacial del fenotipo está influenciada por variables ambientales, la intensidad en el uso de la tierra y del grado de especialización de la especie. Por ejemplo, *A. azarae* presentó mayor diferenciación y estructura espacial que el generalista *C. musculus*.

Los análisis realizados en este trabajo son los primeros sobre la estructura genética de *A. azarae* a escala de paisaje. Los resultados aquí presentados deberán ampliarse con un mayor tamaño muestral, ya disponible a partir de otras líneas de captura, a los fines de confirmar el número y distribución de poblaciones genéticas en el área de estudio. De este modo, nuestros estudios podrán cotejarse con los obtenidos por análisis de morfometría geométrica y genético-poblacionales en otros sigmodontinos procedentes de la misma área, a fin de dilucidar los mecanismos que permiten la persistencia de las poblaciones en ambientes fragmentados.

## 5 Conclusiones

- Los altos niveles de polimorfismo detectados en *Akodon azarae* indican que los marcadores moleculares utilizados brindan información suficiente para el estudio de la estructura genética en la especie. El éxito en las amplificaciones de los mismos loci de microsatélites en otras especies de akodontinos *A. dolores*, *A. polopi*, *A. simulator*, *A. spegazini*, *O.rufus* y *Necromys sp.* permite suponer que serán de utilidad en estudios genéticos poblacionales en esas especies.
- Los análisis a escala geográfica fina revelaron que las poblaciones genéticas de *A. azarae* ocupan una extensión que sobrepasa los límites geográficos de este análisis, determinados en base a estudios de movimiento realizados previamente con métodos indirectos. El alto flujo génico a lo largo de los hábitats de bordes y la corta duración de la fase de baja densidad poblacional garantizarían el mantenimiento de niveles elevados de variabilidad genética en la población durante los ciclos anuales.
- La dispersión en *A. azarae* varía según el sexo, de acuerdo con la disponibilidad del recurso limitante (cobertura vegetal para el caso de las hembras y acceso a hembras reproductivas en los machos). Los cambios en la densidad poblacional, tanto a lo largo del periodo reproductivo como del no reproductivo, no tendrían influencia significativa en los patrones de dispersión.
- A través del análisis de la estructuración genética a escala de paisaje se puede inferir que la dispersión de *A. azarae* está limitada por las distancias y configuración del paisaje en los agroecosistemas del sur de la Provincia de Córdoba. La presencia de barreras naturales como el arroyo Chucul, y artificiales como rutas pavimentadas o campos de cultivos condicionan la dispersión de los individuos a lo largo de los hábitats de bordes, los cuales funcionarían como corredores.

## 6. Referencias bibliográficas

- Aars J, Ims MA, Liu HP, Mulvey M y Smith MH (1998). Bank voles in linear habitats show restricted gene flow as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 7: 1393-1389.
- Aars J, Ims RA (1999). The effect of habitat corridors on rates of transfer and interbreeding between vole demes. *Ecology* 80: 1648–1655.
- Andreo V, Lima M, Provencal C (2008). Population dynamics of two rodent species in agro-ecosystems of central Argentina: intra-specific competition, land-use, and climate effects. *Population Ecology* 51: 297-306.
- Andreo V, Provencal C y Scavuzzo M (2009). Environmental factors and population fluctuations of *Akodon azarae* (Muridae: Sigmodontinae) in central Argentina. *Austral Ecology* 34: 132-142.
- Apfelbaum L.I., Blanco A, 1985. Genetic polymorphism in populations of *Akodon* rodents. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 27: 12-16.
- Austrich A, Steinmann AR, Bonatto F y Gómez D. (2014). Efecto de adultos en el establecimiento de juveniles de *Calomys musculus* (Rodentia: Sigmodontinae). *Mastozoología Neotropical*, en prensa.
- Banks SC, Finlayson GR y Lawson SJ (2005). The effects of habitat fragmentation due to forestry plantation establishment on the demography and genetic variation of a marsupial carnivore, *Antechinus agilis*. *Biology Conservation* 122: 581–97.
- Bennett AF (1990). Habitat corridors and the conservation of small mammals in a fragmented forest environment. *Landscape Ecology* 4: 109-122.
- Bennett AF y Saunders DA (2010). Habitat fragmentation and landscape change. *Conservation biology for all* 93: 1544-1550.
- Berthier K, Charbonnel N, Galan M, Chaval Y y Cosson JF (2006). Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations. *Molecular Ecology* 15: 2665-2676.
- Bilenca DN y Kravetz FO (1998). Seasonal variation in microhabitat use and feeding habits of the pampas mouse *Akodon azarae* in agroecosystems of central Argentina. *Acta Theriologica* 43:195-203.
- Bilenca DN, Kravetz FO y Zuleta GA (1992). Food habits of *Akodon azarae*

and *Calomys laucha* (Cricetidae, Rodentia) in agroecosystems of central Argentina. *Mammalia* 56: 371- 383.

- Bilenca, DN., Codesido M, González Fischer CM y Perez Carusi LC (2009). Impactos de la Actividad Agropecuaria Sobre la Biodiversidad en la Ecorregión Pampeana: Impactos de la Expansión Agrícola y de la Intensificación de la Agricultura y de la Ganadería, con Algunas Recomendaciones de Manejo Para su Mitigación. Ediciones INTA: Buenos Aires.
- Bonatto F (2013). Tesis doctoral. “Sistema de apareamiento y efecto de la proporción de sexo sobre el comportamiento de espaciamiento en roedores: *Akodon azarae* como modelo comportamental”. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químico y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Bonatto F, Coda J, Gómez D, Priotto J y Steinmann A (2013). Inter-male aggression with regard to polygynous mating system in Pampean grassland mouse, *Akodon azarae* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Journal Ethology* 31: 223-231.
- Bonatto F, Gómez D y Priotto J (2012). Mating strategies of Pampean mouse males. *Animal Biology* 62: 381-396.
- Bonaventura S y Kravetz F (1989). Relación roedor vegetación: Importancia de la disponibilidad de cobertura verde para *Akodon azarae* durante el invierno. *Physis* 47: 1-5.
- Bonaventura S, Piantanida M, Gurinin L y Sanchez López M (1991). Habitat selection in population of cricetine rodents in the Delta region (Argentina). *Mammalia* 53: 339-354.
- Bonaventura SM, Kravetz FO y Suárez OV (1992). The relationship between food availability, space use and territoriality in *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). *Mammalia* 56: 407-416.
- Boonstra R, Xia X y Pavone L (1993). Mating system of the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*. *Behavioral Ecology* 4: 83-89.
- Booth W, Montgomery WI y Prodöhl PA (2009). Spatial genetic structuring in a vagile species, the European wood mouse. *Journal of Zoology* 279: 219-228.
- Burton C, Krebs CJ y Taylor EB (2002). Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. *Molecular Ecology* 11: 1689-1701.

- Busch M, Bilenca DN, Cittadino EA y Cueto GR (2005). Effect of removing a dominant competitor, *Akodon azarae* (Rodentia, Sigmodontinae) on community and population parameters of small rodent species in Central Argentina. *Austral. Ecology* 30:168–178.
- Busch M, Kravetz FO (1992). Competitive interactions among rodents (*Akodon azarae*, *Calomys laucha*, *C. musculinus* and *Oligoryzomys flavescens*) in a two-habitat systems. I. Spatial and numerical relationships. *Mammalia* 56: 541-554.
- Bush M, Miño MH, DadonJR y Hodara K (2001). Habitat selection by *Akodon azarae* and *Calomys laucha* (Rodentia, Muridae) in pampean agroecosystems. *Mammalia* 65: 29-48.
- Cabrera AL (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. En *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, Tomo II, Editorial ACME, Buenos Aires.
- Cavia R, Gómez Villafañe IE, Cittadino EA, Bilenca ND, Miño MH y Busch M (2005). Effects of cereal harvest on abundance and spatial distribution of the rodent *Akodon azarae* in central Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107: 95-99.
- Chen C, Durand E, Forbes F y Francois O (2007). Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* 7:747-756.
- Cittadino EA, Bilenca DN, Busch M y Kravetz FO (2002). Characteristics of Dispersing Pampean Grassland Mice (*Akodon azarae*) in Agroecosystems of Central Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 37: 1-7.
- Cittadino EA, Busch M y Kravetz F (1998). Population abundance and dispersal in *Akodon azarae* (pampean grassland mouse) in Argentina. *Canadian Journal of Zoology* 76: 1011-1018.
- Cittadino EA, De Carli P, Busch M y Kravetz FO (1994). Effects of food supplementation on rodents in winter. *Journal of Mammalogy* 75: 446-453.
- Cittadino EA. (1995). Movimientos y dispersión en el ratón del pastizal pampeano *Akodon azarae*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Clobert J, Nichols JD, Danchin E, Dhondt A (2001). *Dispersal*. Oxford University Press: Oxford, UK.



- Corander J, Waldmann P, Marttinen P y Sillanpaa M (2004). BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20: 2363-2369.
- Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N y Hewison AJM (2004). Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular ecology* 13: 2841-2850.
- Crespo JA (1966). Ecología de una comunidad de roedores silvestres en el Partido de Rojas, Provincia de Buenos Aires. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Ecología* 1: 79-134
- Crespo JA, Sabbatini MS, Piantanida MJ y de Villafañe G (1970). Estudios ecológicos sobre roedores silvestres. Comisión Nacional de Estudio y Lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina.
- Dalby PL (1975). Biology of pampa rodents: Balcarce Area, Argentina. *Publications of the museum, Michigan State University Biological Series* 5: 149 – 272.
- Dawson, K. y K. Belkhir (2001). A Bayesian approach to the identification of panmictic population and the assignment of individuals. *Genetic Research* 78: 59-77.
- de Villafañe G (1981). Reproducción y crecimiento de *Akodon azarae azarae*. *Historia Natural (Argentina)*. 1: 193-204.
- de Villafañe G, Kravetz FO, Donadio O, Percich R, Knecher L, Torres MP y Fernandez N (1977). Dinámica de las comunidades de roedores en agro-ecosistemas pamasicos. *Medicina* 37: 128-140.
- de Villafañe G, Quintana RD, Merler JA y Bonaventura SM (1994). Selección de habitat en *A. azarae* y *Calomys laucha* en semicautividad. I efecto de la densidad de *Calomys laucha* sobre *A. azarae*. *Mastozoología Neotropical* 1 :123-133.
- Dieckmann U, O'Hara B y Weisser W (1999). The evolutionary ecology of dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 88–90.
- Dobson FS (1983). Agonism and territoriality in the California ground squirrel. *Journal of Mammalogy*. 64: 218-225.
- Eguiarte LE, Souza V y Aguirre V (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. Pp.541-562 en *Ecología Molecular* (Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre eds) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio) Delegación Tlalpan, México, D.F.

- Epperson BK (1990). Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics* 124: 757-771.
- Estes-Zumpf WA, Rachlow JL., Waits LP y Warheit KI (2010). Dispersal, gene flow, and population genetic structure in the pygmy rabbit (*Brachylagus idahoensis*). *Journal of Mammalogy* 91: 208-219.
- Fahrig L (2007). Non optimal animal movement in human - altered landscapes.. *Functional Ecology* 21: 1003-1015.
- Fahrig L (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 487-515.
- Fischer J y Lindenmayer DB (2007). Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16: 265-280.
- Fontanillas P, Petit E y Perrin E (2004). Estimating sex-specific dispersal rates with autosomal markers in hierarchically structured populations. *Evolution* 58: 886-894.
- François O, Ancellet S y Guillot G (2006) . Bayesian clustering using hidden markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* 174: 805-816.
- Fredsted T, Pertoldi C, Schierup MH y Kappeler PM (2005). Microsatellite analyses reveal fine scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Molecular ecology* 14: 2363-2372.
- Freeland JR, Kira H y Petersen SD (2011).“Molecular Ecology”. Wiley-Blackwell, Oxford Pp. 50-62 y 148-150
- Gaines MS, Diffendorfer JE, Tamarin RH y Whittam TS (1997). The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304.
- Gannon WL y Sikes RS (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92: 235-253.
- Garrido-Garduño T y Vázquez-Domínguez E (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista mexicana de biodiversidad* 84: 1031-1054.
- Gauffre B, Estoup A, Bretagnolle V y Cosson JF (2008). Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular Ecology* 17: 4619-4629.

- Gelin Spessot ML, Gomez MD y Priotto JW (2013). Mastozoología neotropical 20: 387-392
- Gerlach G y Musolf K (2000) . Fragmentation of Landscape as a Cause for Genetic Subdivision in Bank Voles. Conservation Biology 14: 1066-1074.
- Glenn TC y Schable NA (2005). Isolating microsatellite DNA loci. Methods in Enzymology 395: 202-222.
- Gomez D, Sommaro L, Steinmann A, Chiappero M y Priotto J (2011). Movement distance of two species of sympatric rodent in linear habitats of Central Argentine agro-ecosystems. Mammalian. Biology 76: 58-63.
- Gortat T, Gryczyńska-Sięmiątkowska A, Rutkowski R, Kozakiewicz A, Mikoszewski A y Kozakiewicz M (2010). Landscape pattern and genetic structure of a yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* population in north-eastern Poland. Acta Theriologica 55: 109-121.
- Goudet J, 2002. Fstat (Version 2.9.3.2). A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Guillot G, Estoup A, Mortier F y Cosson JF (2005a). A spatial statistical model for landscape genetics. Genetics 170: 1261-1280.
- Guillot G, Mortier F y Estoup A (2005b). Geneland: a program for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5: 712-715.
- Haag T, Santos AS, Sana DA, Morato RG, Cullen Jr L, Crawshaw Jr PG y Eizirik E (2010). The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). Molecular Ecology 19: 4906-4921.
- Hartl DL y Clark AG (1997). Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick PW (2000). Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts, USA. 553 pp.
- Hodara K, Busch M (2006). Return to preferred habitats (edges) as a function of distance in *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae) in cropfield-edge systems of central Argentina. Journal of ethology 24: 141-145.

- Hodara K, Busch M y Kravetz FO (2000). Effects of shelter addition on *Akodon azarae* and *Calomys laucha* (Rodentia, Muridae) in agroecosystems of Central Argentina during winter. *Mammalia* 64: 295-306.
- Holderegger R y Wagner H (2008). Landscape Genetics. *BioScience* 58:199-208.
- Kalendar R (2004). Fast PCR: PCR primer design, DNA and protein tools , repeat and own database searches program. Available from:[http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1\\_html/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm).
- Kimberly A y Robert J (2006). Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Laurence S, Smith MJ y Schulte - Hostedde AI (2013). Effects of structural connectivity on fine scale population genetic structure of muskrat, *Ondatra zibethicus*. *Ecology and evolution* 3: 3524-3535.
- Macqueen PE, Nicholls JA, Hazlitt SL y Goldizen AW (2008). Gene flow among native bush rat, *Rattus fuscipes* (Rodentia: Muridae), populations in the fragmented subtropical forests of south - east Queensland. *Austral Ecology* 33: 585-593.
- Manaster CJ (2002). Allelogram: a program for normalizing and binning microsatellite genotypes [Internet]. Available from: <http://code.google.com/p/allelogram/>.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G. y Taberlet P (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189-197.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 205. New York, USA.
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 09-220.
- Martínez JJ, Millien V, Simone I y Priotto JW (2014). Ecological preference between generalist and specialist rodents: spatial and environmental correlates of phenotypic variation. *Biological Journal of the Linnean Society* 112: 180-203.
- Mauritzen M, Bergers P, Andreassen HP , Bussink H y Barendse R (1999). Root vole movement patterns: do ditches function as habitat corridors?. *Journal of applied ecology* 36: 409-421.

- McCarthy C (1996). Chromas version 1.45. School of Health science, Griffith University, Gold Coast Campus, Queensland, Australia.
- McDonald RW. y St Clair C (2004). The effects of artificial and natural barriers on the movement of small mammals in Banff National Park, Canada. *Oikos* 105: 397-407.
- Mech SG, Hallet JG (2001). Evaluating the Effectiveness of Corridors: a Genetic Approach. *Conservation Biology* 15: 467–474.
- Neilan BA, Leigh DA, Rapley E y McDonald BL (1994). Microsatellite genome screening: rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeat análisis. *BioTechniques* 17: 708-712.
- Nora SV, Albaladejo RG, González-Martínez SC, Robledo-Arnuncio JJ y Aparicio A (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas* 20: 35-46.
- Paruelo JM, Jobbágy EG, Oesterheld M, Golluscio RA y Aguiar MR (2007). The Grasslands and Steppes of Patagonia and the Río de la Plata Plains, en : *The Physical Geography of South America* (Thomas T. Veblen, Kenneth R. Young y Antony R. Orme eds.) Oxford University Press.
- Peakall R, Ruibal M y Lindenmayer DB (2003). Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57: 1182-1195.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6.0: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Pearson O (1967). La estructura por edades y la dinámica reproductiva en una población de ratones de campo *Akodon azarae* . *Physis* 74: 53-58.
- Pilot M, Dąbrowski MJ, Jancewicz E, Schtickzelle N y Gliwicz, J. (2010). Temporally stable genetic variability and dynamic kinship structure in a fluctuating population of the root vole *Microtus oeconomus*. *Molecular ecology* 19: 2800-2812.
- Piñero
- D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha Olivares A, Salas Lizana A (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435.

- Polop F, Provencal MC, Priotto J, Steinmann A y Polop JJ (2012). Differential effects of climate, environment, and land use on two sympatric species of *Akodon*. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 47: 147-156.
- Polop JJ y Sabbatini MS (1993). Rodent abundance and distribution in habitats of agroecosystems in Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 28: 39-46.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E y Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and Solutions. *Nature reviews. Genetics*. 6: 847-59.
- Priotto J y Steinmann A (1999). Factors effecting home range size and overlap in *Akodon azarae* (Muridae: Sigmodontinae) in natural pasture of Argentina. *Acta Theriologica* 44: 37-44.
- Priotto JW y Polop J (1997). Space and time use in syntopic populations of *Akodon azarae* and *Calomys venustus* (Rodentia, Muridae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 62:30-36.
- Priotto JW, Steinmann AR, Provencal C y Polop J (2004). Juvenile dispersal in *Calomys venustus* (Muridae: Sigmodontinae). *Acta Oecologica* 25: 205-210
- Pritchard JK, Stephens M y Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R Development Core Team (2007). R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Available from: URL <http://www.Rproject.org>
- Reig OA (1984). Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Revista Brasileira de Genética* 7: 333-365.
- Rico A, Kindlmann P y Sedlacek F (2007). Barrier effects of roads on movements of small mammals. *Folia zoologica-praha* 56: 1-12.
- Robert McDonald W y Cassady St Clair C (2004). The effects of artificial and natural barriers on the movement of small mammals in Banff National Park, Canada. *Oikos* 105: 397-407.
- Rodríguez-Matamoros J, Villalobos-Brenes F y Gutiérrez-Espeleta GA (2012). Viabilidad poblacional de *Alouatta palliata* (Primates: Atelidae) y *Cebus capucinus* (Primates: Cebidae) en el Refugio de Vida Silvestre Privado Nogal, Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 60: 809-832.

- Rogic A, Tessier N, Legendre P, Lapointe FJ y Millien V (2013). Genetic structure of the white - footed mouse in the context of the emergence of Lyme disease in southern Québec. *Ecology and evolution* 3: 2075-2088.
- Santos T y Tellería JL (2006). Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas* 15: 3-12.
- Schweizer M, Excoffier L y Heckel G (2007). Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular ecology* 16: 2463-2473.
- Smouse P y Peakall R (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Sokal RR, Oden NL (1978). Spatial autocorrelation in biology. I Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society* 10:199-228.
- Sommaro LV (2012). Tesis doctoral “Movimiento de *Calomys musculinus* en poblaciones naturales y experimentales. Facultas de Ciencias Exactas, Físico-Químico y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Sommaro LV, Steinmann AR, Chiappero MB, Priotto JW (2010). Effect of high density on the short term *Calomys musculinus* spacing behaviour: A fencing experiment. *Acta Oecologica* 36: 343-348.
- Suárez O y Kravetz F (1998 a). Transmission of food selectivity from mothers to offspring in *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). *Behaviour* 135: 251 - 259.
- Suárez O y Kravetz F (1998 b). Patrón copulatorio y sistema de apareamiento en *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). *Iheringia Serie Zoologica* 84: 133 – 140.
- Suárez O y Kravetz F (2001). Male-female interaction during breeding and non-breeding seasons in *Akodon Azarae* (Rodentia, Muridae). *Iheringia, Série Zoologica* 91: 171-176.
- Suárez O, Bush M y Kravetz FO (2004). Reproductive strategies in *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). *Journal of Zoology* 82: 1572–1577.
- Suárez OV (1996). Estrategias reproductivas y cuidado parental en *Akodon azarae* (Rodentia, Muridae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Tallmon DA, Draheim HM, Mills LS y Allendorf FW (2002). Insights into recently fragmented vole populations from combined genetic and demographic data. *Molecular Ecology* 11:699-709.

- Taylor PD, Fahrig L, Henein K y Merriam G (1993). Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 571-573.
- Trimarchi LI (2012). Tesis de grado. “Patrones filogeográficos de *Akodon azarae* en ambientes fragmentados del centro-este argentino”. Facultad de Ciencias Exactas físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM y Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vuorinen JA y Eskelinen O (2005). Long-term stability of allozyme frequencies in a wood lemming, *Myopus schisticolor*, population with a biased sex ratio and density fluctuations. *Heredity* 94: 443-447.
- Weir BS y CC Cockerham (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358 – 1370.
- White E, Sahota R y Edes S (2000). Rapid microsatellite analysis using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis. *Genome* 45: 1107-11.
- Winters JB y Waser PM (2003). Gene dispersal and outbreeding in a philopatric mammal. *Molecular Ecology* 12: 2251–2259.
- Wright S (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1: 323-334.
- Zuleta G y Bilenca DN (1992). Seasonal shifts within juvenile recruit sex ratio of Pampas mice (*Akodon azarae*). *Journal of Zoology* 227: 397-404.
- Zuleta G, Kravetz FO, Busch M y Percich RE (1988). Dinámica poblacional del ratón del pastizal pampeano (*Akodon azarae*) en ecosistemas agrarios de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*. 61: 231 - 244
- Zuleta G.A. (1989). Tesis doctoral “Estrategia de historias de vida del ratón del pastizal pampeano, *Akodon azarae*”. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Zuleta GA y Vignau ML. (1990). Bot fly parasitism (*Rogenhofera bonarensis*) (Diptera, Cuterebridae) in the pampean grassland mouse (*Akodon azarae*), in Argentina. *Journal of Wildlife Diseases* 26: 11-17.



## ONLINE RESOURCES

# Isolation of microsatellite loci in *Akodon azarae* (Muridae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other Akodontini species

N. S. VERA<sup>1</sup>, M. B. CHIAPPERO<sup>1</sup>, J. W. PRIOTTO<sup>2</sup> and C. N. GARDENAL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 299, 5000 Córdoba, Argentina*

<sup>2</sup>*Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia Postal No 3, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina*

[Vera N. S., Chiappero M. B., Priotto J. W. and Gardenal C. N. 2011 Isolation of microsatellite loci in *Akodon azarae* (Muridae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other Akodontini species. *J. Genet.* **90**, e25–e29. Online only: <http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e25.pdf>]

## Introduction

Fragmentation of natural habitats is an increasing problem worldwide, having profound consequences on the genetic and demographic structure of natural populations (Mech and Hallet 2001). A representative example of a fragmentation process occurs in central Argentina, an area of approximately 500,000 km<sup>2</sup> formerly occupied by prairies, but currently consisting almost exclusively of crops and livestock pastures separated by fencelines, roads and railroads, along which native and introduced weeds grow: the 'border' habitats. One of the most important components of the fauna in this region are rodents of the subfamily Sigmodontinae, a highly speciose group of mostly South American distribution, assembled in seven different tribes (Reig 1984). Three of the most abundant Sigmodontine species in agroecosystems of central Argentina are *Calomys musculinus* and *C. venustus* (tribe Phyllotini), and *Akodon azarae*, pertaining to the tribe Akodontini, the second most important according to the number of species (Reig 1984). Previous studies have established that these species differ in several ecological and behavioural characteristics like habitat use (*A. azarae* and *C. venustus* preferentially use borders while *C. musculinus* inhabits both borders and crop fields; Mills *et al.* 1992; Polop and Sabattini 1993; Busch *et al.* 1997), space use (home range size vary by sex and breeding period in *A. azarae* and *C. musculinus*, and by population abundance in *C. venustus*; Priotto and Steinmann 1999; Priotto *et al.* 2002), mating system (promiscuous/polygynous in *C. venustus* and *A. azarae* and promiscuous in *C. musculinus*; Priotto and Steinmann

1999; Priotto *et al.* 2002; Steinmann *et al.* 2009) and competition (*A. azarae* is competitively dominant over *C. musculinus*; Busch *et al.* 2005). On these bases, it is predictable that these species will differentially perceive landscape fragmentation. Our research interest focusses on comparing the movement and the genetic structure of their populations in agroecosystems, as a model to assess the genetic consequences of fragmentation on the fauna of the region.

The development of codominant microsatellite DNA markers are an invaluable tool for studying fine-scale genetic differences. For this purpose we already isolated and characterized nine microsatellite loci in *C. musculinus* that also amplify in *C. venustus* (Chiappero *et al.* 2005, 2011). As part of our studies on population structure at a small spatial scale, we describe here results of the isolation and characterization of 10 microsatellite loci in *A. azarae*. We also investigated if the polymorphic primers developed amplify in other species of the tribe Akodontini.

This is, to our knowledge, the first report of microsatellite loci designed for the genus *Akodon*. Since this taxon has nearly 40 species distributed throughout South America from Colombia to southern Argentina and Chile, occupying a wide variety of habitats from 0 to 5000 m above sea level (Redford and Eisenberg 1984), our work has a potential utility for population genetic studies in the genus.

## Materials and methods

The total genomic DNA was extracted from the heart of a single *A. azarae* (male no. 013) from a laboratory colony, using a standard phenol–chloroform procedure (Maniatis *et al.* 1982). For microsatellite isolation we followed the protocol of Glenn and Schable (2005). Briefly, genomic DNA

\*For correspondence. E-mail: ngardenal@efn.uncor.edu.

**Keywords.** microsatellites; Akodontini; Sigmodontinae; *Akodon azarae*.

**Table 1.** Characteristics of microsatellite loci isolated from *Akodon azarae*.

Locus	Core motif	Primers pair sequences (5'-3')	T (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Number of cycles	Gel%	Range of allele size	No. of Alleles	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	GeneBank accession no.
<i>Aaz1*</i>	(ACAT) <sub>8</sub>	F:GCACAGGACCTTTGTGCT R:GGTCTAGGGTATCCAACACCT	52	2	28	7	170-194	13	0.764	0.869	HM046488
<i>Aaz2*</i>	(GA) <sub>19</sub>	F:GCAGAAATCCCAGCCTCGTCTAC R:TCAGAGGCCTCAACAATCTTGCCAC	52	2.5	28	8	156-194	16	0.445	0.843	HM046489
<i>Aaz3*</i>	(AC) <sub>15</sub>	F:CTAGCAGAATCCCTCTGTGTGAAA R:GCCCTCTAATAAAAACGAGATTTCG	48	1.2	36	8	146-170	12	0.859	0.888	HM046490
<i>Aaz4*</i>	(GT) <sub>2</sub> T(GT) <sub>3</sub> ATGCCGAG TAT(GT) <sub>4</sub> AT (GT) <sub>18</sub>	F:GATCTCTTCTGGTAAGGATAAAC R:TGATTTGACATACTTGAACAATGT	50	2.5	30	6	180-242	13	0.775	0.913	HMI65271
<i>Aaz5*</i>	(AGAC) <sub>6</sub> (AC) <sub>17</sub>	F:GC AATGATCTTTAGAAATATCACC R:CAACAATAAGGATTTTGGTC	50	2.5	28	8	116-142	11	0.614	0.886	HM046491
<i>Aaz6*</i>	(AC) <sub>25</sub>	F:CCCAAGAAACAGAGCATCGT R:TGCACACTGCNTGAGTGA	54	1.5	30	7	160-188	15	0.473	0.919	HM046492
<i>Aaz7</i>	(GA) <sub>22</sub>	F:GATAAATCCATATTCAAAATAACC R:GATTCGTGGATTTGGAGACTT	45	2.5	32	8	130	1	0	0	HMS60015
<i>Aaz8*</i>	(GT) <sub>6</sub> (GAGT) <sub>2</sub> (GTGA) <sub>2</sub> (GT) <sub>11</sub> (GA) <sub>11</sub> AA(GA) <sub>10</sub>	F:CTTTACAGTGTGCTTTTCA R:TGCTTTC AAGGAGACATT	48	1.5	30	8	122-166	16	0.618	0.895	HM046493
<i>Aaz9</i>	(AC) <sub>24</sub>	F:GGAGACTGTTCTGACTCCACAA R:AGAGACCCCGTGTCAAGG	48	1.5	30	7	120	1	0	0	HMS60016
<i>Aaz11*</i>	(CA) <sub>16</sub>	F:GCCTATAGCACACATGTGCA R:AGCAGAAATCTTTTCATTTTCCAAGA	52	2	33	8	112-138	15	0.764	0.883	HM046494

(Mean observed (H<sub>o</sub>) and expected (H<sub>e</sub>) heterozygosities are an average over two populations. F, forward primer; R, reverse primer; T, annealing temperature; \*, indicates those loci that were polymorphic.)

was digested with *Hae*III (New England Biolabs, Ipswich, England) and separated by agarose gel electrophoresis. Fragments of sizes ranging from 300 to 1000 bp were isolated from gel and ligated to the linker-oligonucleotides SNX-F and SNX-R (5'-GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC-3'; 5'-pGATTCTGCTAGCTAGGCCTAAACAAAA-3'). Enrichment of the selected fragments was performed by hybridization at 50°C with biotinylated oligonucleotides containing different microsatellite repeats ((AG)<sub>12</sub>, (TG)<sub>12</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACTC)<sub>6</sub>, and (ACTG)<sub>6</sub>) and captured on streptavidin beads. The recovered DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using SNX-F as the primer, ligated into the Pcr2.1-Topo Vector (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) and transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells.

Approximately 494 recombinant colonies were picked from agar plates, individually suspended in 50 μL of distilled water and boiled for 5' to release DNA. The molecular size of the inserts was checked by a PCR reaction, using M13 forward and reverse primers. Forty one colonies, which generated PCR products between 500 bp and 800 bp, were sequenced using M13 universal primers at Macrogen (Rockville, USA). Of them, 33 contained unique inserts with microsatellite repeats. Primers were designed for 13 sequences showing adequate microsatellite repeats and flanking sequences, using the software FASTPCR (Kalendar 2004). Loci were named using the prefix Aaz followed by a number.

Amplification conditions for each primer were optimized using as template DNA extracted from four individuals captured in two natural populations. Amplifications were performed using Biometra *Uno*II thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany), varying the annealing temperature, number of cycles and MgCl<sub>2</sub> concentration in order to obtain amplification of neat bands. The final cycling condition consisted in an initial denaturation step of 5 min at 92°C, followed by 30 cycles of 30 s at 92°C, 30 s at the annealing temperature (table 1) and 30 s at 72°C, ending with 5 min at 72°C. The optimized PCR mix contained 1× reaction buffer (10 Mm Tris-HCL, 50 Mm KCl, pH 8.3), 60 μM of each dNTP (Invitrogen), 0.4 μM of each primer, 1.3 M of betaine (Sigma, Buenos Aires, Argentina), 1 U of *Taq* polymerase (Fermentas Life Sciences, Buenos Aires, Argentina), 10 ng of template ADN, and MgCl<sub>2</sub> varied according to each primer (table 1) in a total volume of 10 μL. Amplified alleles were separated by electrophoresis using the Tris-Glycine buffer system (White *et al.* 2000) on 20-cm long, 8% native polyacrylamide gels along with a 10-pb molecular marker (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) and stained with silver nitrate (Neilan *et al.* 1994).

Primer pairs producing good quality amplification patterns were tested for polymorphism using 21 individuals from two natural populations in central Argentina: Chucul (33°0'35"S, 64°10'17"W) and Piamonte (32°7'60"S, 61°58'60"W). Polymorphic primer pairs for these loci were

**Table 2.** Cross amplification of eight microsatellite loci designed for *Akodon azarae*. The number of individuals showing a successful amplification versus the total number of individuals analysed per species (N/T), the allele range in base pairs and the total number of alleles (in parentheses) are indicated; '-' indicates no amplification.

Locus	N/T	<i>A. dolores</i>	N/T	<i>A. polopi</i>	N/T	<i>A. simulator</i>	N/T	<i>A. espegazini</i>	N/T	<i>O. rufus</i>	N/T	<i>Necomys</i> sp.
<i>Aaz1</i>	4/4	166-180 (4)	2/2	180-188 (2)	2/2	190-210 (4)	2/2	164-180 (3)	4/4	180 (1)	4/4	198-208 (3)
<i>Aaz2</i>	2/4	156-170 (3)					2/2	168-170 (2)				
<i>Aaz3</i>	3/4	164-180 (5)	2/2	176-190 (2)			2/2	184-196 (2)	1/4	168-190 (2)		
<i>Aaz4</i>	3/4	200-226 (5)	1/2	208-214 (2)			1/2	200-210 (2)	4/4	200 (1)	3/4	200-214 (3)
<i>Aaz5</i>	3/4	122-142 (5)	2/2	116-120 (2)	2/2	130-136 (4)	2/2	126-150 (4)	4/4	148-152 (2)	1/4	116 (1)
<i>Aaz6</i>	2/4	160-168 (2)			1/2	164 (1)	2/2	168-176 (2)				
<i>Aaz8</i>												
<i>Aaz11</i>	3/4	104-122 (5)	1/2	132-142 (2)	2/2	132-146	2/2	104-140 (3)				

also tested for amplification in individuals of the following species of the tribe Akodontini: *A. dolores*, *A. simulator*, *A. polopi*, *A. spegazzini*, *Oxymycterus rufus* and *Necomys* sp. Conditions for amplification were the same as those for *A. azarae*.

Conformance to Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) were tested using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2002).

## Results and discussion

Primers for 10 loci produced good quality amplification patterns; eight of them (*Aaz1*, *Aaz2*, *Aaz3*, *Aaz4*, *Aaz5*, *Aaz6*, *Aaz8* and *Aaz11*) were polymorphic. Characteristics of the loci (locus name, GenBank accession no., repeat core, primers sequences, annealing temperature, range of allele size, number of alleles amplified, average observed and expected heterozygosities and MgCl<sub>2</sub> concentration) are provided in table 1.

Locus *Aaz6* deviated from HWE in both populations, and loci *Aaz2* and *Aaz5* deviated only in Chucul and Piemonte populations, respectively. Since no null homozygotes were observed, the presence of null alleles in a low frequency can not be discarded. Number of alleles per locus ranged from 11 to 16. Levels of heterozygosity were high (table 1) and were similar to those observed in other Sigmodontinae rodents, for example:  $H_o$  between 0.278 and 0.889 in *C. musculus* (tribe Phyllotini, Chiappero et al. 2005), between 0.371 and 0.896 in *Oligoryzomys longicaudatus* (tribe Oryzomini, González-Ittig et al. 2008), between 0.462 and 0.783 in *Necomys squamipes* (tribe Oryzomini, Maroja et al. 2003). There was no evidence of LD between pairs of loci in any population.

Results of cross-species amplifications are shown in table 2. All primers produced successful amplifications in at least one of the species of the tribe Akodontini assayed, with the exception of locus *Aaz8* that failed to amplify in all of them.

The high levels of polymorphism detected indicate that the loci here developed would provide enough information for the study of the microgeographic genetic structure in *A. azarae*. Also, it is worth noting that these primers cross-amplified successfully in other species of the tribe Akodontini and appear to be highly polymorphic, given the high number of alleles amplified in relation to the number of individuals of each species tested (table 2). The cross amplification of these primers in other species of the tribe Akodontini highlight their potential usefulness for population genetic studies in those species.

## Acknowledgements

We thank Dr Raúl González-Ittig and Lic. Lucía V. Sommaro for technical assistance and advice in the analysis of electrophoretic patterns. We are also grateful to Biol. Juan José Martínez and to

Lic. Luis Ignacio Ferro for providing some of the samples. Funding was provided by Grants of the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT no. 353) and the Secretaría de Ciencia y Tecnología (Universidad Nacional de Córdoba), both of Argentina. MBC, CNG and JWP are career investigators of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) of Argentina and NSV is a doctoral fellow of ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) and a Ph.D. student of the Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional de Córdoba-Argentina.

## References

- Busch M., Alvarez M. R., Cittadino E. A. and Kravetz F. O. 1997 Habitat selection and interspecific competition in rodents in pampean agroecosystems. *Mammalia* **61**, 167–184.
- Busch M., Bilenca D. N., Cittadino E. A. and Cueto G. R. 2005 Effect of removing a dominant competitor, *Akodon azarae* (Rodentia, Sigmodontinae) on community and population parameters of small rodent species in Central Argentina. *Aust. Ecol.* **30**, 168–178.
- Chiappero M. B., Gardenal C. N. and Panzetta-Dutari G. 2005 Isolation and characterization of microsatellite markers in *Calomys musculus* (Muridae, Sigmodontinae, Phyllotini) the natural reservoirs of Junin virus. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 593–595.
- Chiappero M. B., Panzetta-Durati G. M., Gomez D., Castillo E., Polop J. J. and Gardenal C. N. 2011 Contrasting genetic structure of urban and rural populations of the wild rodent *Calomys musculus* (Cricetidae, Sigmodontinae). *Mamm. Biol.* **76**, 41–50.
- Glenn T. C. and Schable N. A. 2005 Isolating microsatellite DNA loci. *Methods Enzymol.* **395**, 202–222.
- González-Ittig R. E., Salazar-Bravo J., Polop J. J. and Gardenal C. N. 2008 Isolation and characterization of microsatellite markers in *Oligoryzomys longicaudatus* (Muridae, Sigmodontinae, Oryzomini), the natural reservoir of genotype Andes hantavirus. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 1466–1468.
- Goudet J. 2002 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3.2. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Kalendar R. 2004 Fast PCR: PCR primer design, DNA and protein tools, repeat and own database searches program. Available from: [http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1\\_html/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm).
- Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. 1982 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Maroja L. S., Almeida F. C., Cerqueira R., Seuánez H. N. and Moreira M. A. M. 2003 *Necomys squamipes* microsatellites and homologous loci in sigmodontine rodents. *J. Hered.* **94**, 171–174.
- Meeh S. G. and Hallet J. G. 2001 Evaluating the Effectiveness of Corridors: a Genetic Approach. *Conserv. Biol.* **15**, 467–474.
- Mills J. M., Ellis B. A., McKee K. T., Maiztegui J. I. and Childs J. E. 1992 Reproductive characteristics of rodent assemblages in cultivated regions of central Argentina. *J. Mamm.* **73**, 515–526.
- Neilan B. A., Leigh D. A., Rapley E. and McDonald B. L. 1994 Microsatellite genome screening: rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeat analysis. *BioTechniques* **17**, 708–712.
- Polop J. J. and Sabattini M. S. 1993 Rodent abundance and distribution in habitats of agroecosystems in Argentina. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* **28**, 39–46.

*Microsatellite loci in Akodon azarae*

- Priotto J. and Steinmann A. 1999 Factors effecting home range size and overlap in *Akodon azarae* (Muridae: Sigmodontinae) in natural pasture of Argentina. *Acta Theriol.* **44**, 37–44.
- Priotto J. W., Steinmann A. R. and Polop J. J. 2002 Factors affecting home range size and overlap in *Calomys venustus* (Muridae: Sigmodontinae) in Argentine agroecosystems. *Mamm. Biol.* **67**, 97–104.
- Redford K. H. and Eisenberg F. 1984 *Mammals of the neotropics. The southern cone*, vol 2. The University of Chicago press, Chicago and London.
- Reig O. A. 1984 Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev. Bras. Genet.* **7**, 333–365.
- Steinmann A. R., Priotto J. W. and Polop J. J. 2009 Territorial behaviour in corn mice, *Calomys musculus* (Muridae: Sigmodontinae), with regard to mating system. *J. Ethol.* **27**, 51–58.
- White E., Sahota R. and Edes S. 2000 Rapid microsatellite analysis using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis. *Genome* **45**, 1107–1109.

Received 22 June 2010, in revised form 1 July 2010; accepted 31 August 2010  
Published on the Web: 19 May 2011