

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en  
Ciencias Biológicas

**“Estudios Genético-Poblacionales de *Salvator  
merianae* (Reptilia, Teiidae) en Argentina.  
Aportes a la optimización de los programas de  
uso sustentable”**

**Lic. Carolina G. Imhoff**

**Directora: Dra. Patricia Amavet  
Co-director: Méd. Vet. Alejandro Larriera**

**Laboratorio de Genética - Departamento de  
Ciencias Naturales - FHUC - UNL**

**-2021-**



*"Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor"*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado.
- ✓ Al Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC), por otorgarme el espacio físico para desarrollar mi trabajo de investigación y por la camaradería de cada una de las personas que allí trabajan.
- ✓ Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme el financiamiento para llevar a cabo mi formación Doctoral.
- ✓ A mi directora, la Dra. Patricia Amavet, por brindarme sus conocimientos, así como por su dedicación y estímulo constantes para alcanzar las metas establecidas.
- ✓ A mi director, el Méd. Vet. Alejandro Larriera, por su acompañamiento a lo largo del desarrollo de la tesis.
- ✓ Al Dr. Federico Giri, por brindarme su tiempo, paciencia y conocimientos para la elaboración de una parte importante del presente trabajo.
- ✓ Al Dr. Gualberto Pacheco-Sierra por sus conocimientos generosamente compartidos y aplicados en el desarrollo de la Tesis.
- ✓ A todos los integrantes del laboratorio de Genética de FHUC, en particular a Eva, Guille y Agu, por las charlas amenas, los consejos y los buenos momentos compartidos.
- ✓ A los integrantes del Laboratorio de Zoología aplicada (FHUC- MMA-MUPCN) por su colaboración, especialmente a Gisela Schaumburg y Pablo Siroski por su ayuda y aportes para que este trabajo pudiera ser realizado.
- ✓ A los integrantes del Gabinete Docente, Natalí, Ulises, Luciana, Ruth, Wanda y Julieta, por su compañerismo y gratos momentos compartidos.
- ✓ A mis compañeras y amigas entrañables, Gisela, Pamela y Paula, por brindarme su amistad, sus consejos y su sostén a lo largo de estos años, agradezco que nuestros caminos hayan coincidido.
- ✓ A mis padres, Zulma y Lindor, por su cariño, por apoyarme y acompañarme de manera incondicional en cada etapa y en cada paso dado a lo largo de mi vida.
- ✓ A mis hermanos, Jorgelina y Leandro, por su cariño, por su ayuda y por estar siempre presentes.
- ✓ A los seres queridos que ya no están físicamente, pero son parte de mí...

## **PUBLICACIONES**

- CG **Imhoff**, F Giri, P Siroski, PS Amavet (2015) Phenotypic variability and heritability of the cephalic region of *Caiman latirostris*. *J Morphol* 277 (3): 370-378.
- CG **Imhoff**, F Giri, P Siroski, PS Amavet (2018) Analysis of morphological variability and heritability in the head of the Argentine Black and White Tegu (*Salvator merianae*): undisturbed vs. disturbed environments. *Zoology* 127: 47-62.

## ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos.....	1
1. Resumen.....	3
1.1 Resumen.....	3
1.2 Abstract .....	5
2. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
2.1 Distribución actual de la Familia Teiidae, del Género <i>Salvator</i> y de la especie <i>S. merianae</i> .....	7
2.2 Historia evolutiva de la Familia Teiidae y del género <i>Salvator</i> .....	9
2.3 Características morfológicas y ecológicas del lagarto overo .....	12
2.4 Estrategias de conservación y manejo de la especie .....	18
2.5 Importancia de los estudios moleculares y morfológicos en lagartos teídos.....	22
2.6 Temática a desarrollar y organización de la tesis.....	26
3. OBJETIVOS .....	28
3.1 OBJETIVOS GENERALES .....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. CAPÍTULO I: Marcadores moleculares.....	29
I. Introducción .....	29
I.I Marcadores moleculares y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction: PCR</i> ).....	29
I.II Tipos de marcadores moleculares .....	29
I.II.I Secuencias de ADN: Marcadores mitocondriales.....	30
I.II.II Microsatélites: Marcadores nucleares.....	31
I.III Antecedentes en el uso de marcadores moleculares para la especie <i>Salvator merianae</i> .....	31
II Objetivos del capítulo I: .....	33
III Materiales y Métodos .....	33
III.I Colección de muestras y obtención de ADN .....	33
III.II Visualización de ADN mediante la técnica de electroforesis .....	36
III.III Desarrollo de nuevos marcadores microsatélites específicos para <i>S. merianae</i> .....	37
III.IV Optimización de marcadores microsatélites específicos para <i>S. merianae</i> desarrollados por otros autores.....	40
III.V Visualización de los productos de PCR mediante la técnica de electroforesis.....	41
III.VI Marcaje con fluorescencia de los marcadores microsatélites y genotipificación.....	42
III.VII Optimización del marcador de ADN mitocondrial .....	43
IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	45
IV.I Resultados.....	45

IV.II Conclusiones .....	49
5. CAPÍTULO II: Análisis filogenético y genético-poblacional empleando el marcador mitocondrial .....	50
I Introducción .....	50
I.I Análisis filogenético .....	50
I.II Teoría de la Coalescencia.....	52
I.III Análisis de dinámicas poblacionales a través del tiempo .....	53
I.IV Redes de haplotipos .....	54
I.V Reloj Molecular y estimación de los tiempos de divergencia.....	54
I.VI Variabilidad genética y estructura poblacional.....	56
I.VII Pseudogenes o <i>numts</i> .....	56
II Objetivos del capítulo II .....	58
III MATERIALES Y MÉTODOS .....	58
III.I Detalles del muestreo de individuos amplificados con el marcador de ADN mitocondrial .....	58
III.II. Análisis filogenético realizado a partir del marcador ND4 .....	59
III.III Prueba de hipótesis para detectar presencia/ausencia de fuerzas de selección en las secuencias obtenidas .....	62
III.IV Análisis de dinámicas poblacionales a través del tiempo .....	68
IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	71
IV.I Resultados.....	71
IV.I.I Análisis filogenético realizado a partir del marcador ND4 .....	71
IV.I.II Prueba de hipótesis para detectar presencia/ausencia de fuerzas de selección en las secuencias obtenidas .....	75
IV.I.III Estimación de los tiempos de divergencia entre especies de los géneros <i>Tupinambis</i> y <i>Salvator</i> .....	80
IV.I.IV Dinámicas poblacionales pasadas.....	83
IV.II Conclusiones .....	85
6. CAPÍTULO III: estudios genético-poblacionales realizados mediante el empleo de microsatélites.....	92
I. Introducción .....	92
I.I Genética de poblaciones: concepto e historia.....	92
I.II Agentes de cambio en las frecuencias alélicas de las poblaciones.....	92
I.III Análisis de diversidad genética y estructura mediante los marcadores microsatélites	93
II Objetivos del capítulo III.....	95
III Materiales y Métodos .....	96
III.I Amplificación y genotipificación de muestras con los marcadores microsatélites.....	96

III.II Estructura y variabilidad genética de los datos obtenidos con los marcadores microsatélites en los sitios muestreados .....	97
IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	99
IV.I Resultados.....	99
IV.II Conclusiones .....	107
7. CAPÍTULO IV: estudio del sistema de apareamiento .....	110
I Introducción .....	110
I.I Sistemas de apareamiento y análisis de parentesco .....	110
I.II Antecedentes de estudios del sistema de apareamiento en reptiles .....	113
I.III Aspectos reproductivos de las especies del género <i>Salvator</i> .....	114
II Objetivos del capítulo IV.....	117
III. Materiales y Métodos .....	117
III. I Colección de muestras .....	117
III.II Análisis de muestras .....	119
IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	122
IV.I Resultados.....	122
IV.II Conclusiones .....	157
8. CAPÍTULO V: Estudios de morfometría geométrica.....	162
I. INTRODUCCIÓN .....	162
I.I Datos históricos y desarrollo de la morfometría.....	162
I.II Metodología de la morfometría geométrica .....	163
I.III Variabilidad morfológica en lagartos, influencia del ambiente y empleo de la morfometría geométrica en esos estudios .....	164
I.IV Morfometría geométrica y genética cuantitativa .....	166
II Objetivos del capítulo V .....	167
III. Materiales y Métodos .....	167
III. I Muestreo, capturas fotográficas, configuraciones de <i>lm</i> y pruebas de error .....	167
III.II Análisis preliminares con morfometría geométrica.....	174
III.III Análisis de la región cefálica dependiendo del tipo de ambiente (natural o perturbado) .....	175
III.IV Análisis de la región cefálica dependiendo de la ecorregión en la cual se hallan los sitios de muestreo .....	181
III.V Análisis de caracteres con valor taxonómico en la región cefálica del lagarto overo, en base a la hipótesis de la existencia de dos clados en las poblaciones estudiadas .....	182
III.VI Heredabilidad de la forma y tamaño .....	184
IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	185
IV.I Resultados.....	185

IV.II Conclusiones .....	204
9. CONCLUSIÓN GENERAL .....	216
ANEXO A.....	219
ANEXO B.....	223
ANEXO C.....	224
ANEXO D.....	227
ANEXO E.....	231
ANEXO F.....	238
ANEXO G.....	239
ANEXO H.....	246
BIBLIOGRAFÍA.....	249

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Unidades de medida</b>	
<b>Abreviatura</b>	<b>Concepto</b>
AP	Años antes del presente
cm	Centímetros
°C	Grados centígrados
has	Hectáreas
Kg	Kilogramos
μl	Microlitros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MA	Millones de años atrás
M	Molar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
pH	potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades
V	Voltios
<b>Compuestos químicos</b>	
<b>Abreviatura</b>	<b>Concepto</b>
HCl	Ácido Clorhídrico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
KCl	Cloruro de Potasio
NaCl	Cloruro de Sodio
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
SDS	Dodecilsulfato sódico
TE	Tris – EDTA
TBE	Tris – Ácido Bórico – EDTA
<b>Otras siglas generales</b>	
<b>Abreviatura</b>	<b>Concepto</b>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ASP	<i>Age of the Southern Plains</i>
ANOVA	Análisis de varianza
AMOVA	Análisis de Varianza Molecular
ADC	Análisis discriminante canónico
AGP	Análisis Generalizado de Procrustes
ACA4	<i>Auto-inhibited Ca<sup>2+</sup>-ATPase, isoform 4</i>
BSP	<i>Bayesian skyline plot</i>
CVA	<i>Canonical variate analysis</i>
CS	<i>Centroid sizes</i>
Cit b	Citocromo b
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
BIC	Criterio de información Bayesiano
AIC	Criterio de información de Akaike
CICuR	Cámara de Industriales Curtidores de Reptiles de Argentina

DFA	<i>Discriminant function analysis</i>
HWE	Equilibrio de Hardy–Weinberg
HPD	<i>Highest posterior density</i>
<i>lm</i>	<i>Landmarks</i>
LGM	<i>Last Glacial Maximum</i>
LC	<i>Least Concern</i>
LHC	Longitud Hocico-Cloaca
MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i>
MJ	<i>Median Joining</i>
ND4	NADH deshidrogenasa 4
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
obs. pers.	Observaciones personales
OTUs	<i>Operational taxonomic units</i>
PLS	<i>Partial Least Squares method</i>
PNC	<i>Phylogenetic niche conservatism hypothesis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PP	Probabilidad bayesiana <i>a posteriori</i>
PI	Proyecto Iguana
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i>
ARNasa	Ribonucleasa
SIG	Sistema de Información Geográfica
$N_e$	Tamaño efectivo poblacional
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
DT	Teoría de decisiones
TPS	<i>Thin plate spline</i>
$\tau$	Tiempo generacional
TMRCA	<i>Time to the Most Recent Common Ancestor</i>
TD-PCR	<i>Touchdown- Polymerase Chain Reaction</i>
TSA	<i>Trend Surface Analysis</i>
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
WWF	<i>World Wild Fund for Nature</i>
OVN	Órganos vomero-nasales

## 1. RESUMEN

### 1.1 RESUMEN

La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones evolucionen y se adapten a las condiciones imperantes en los entornos donde habitan; por lo tanto, su evaluación es fundamental en el estudio de las poblaciones y para el desarrollo de estrategias de conservación y manejo, ya que aporta al conocimiento de la biología evolutiva, y de la ecología de ecosistemas. Los lagartos de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* son los teñidos neotropicales (Squamata: Teiidae) de mayor tamaño y los más explotados comercialmente. El lagarto overo (*Salvator merianae*) es una de las especies del género con distribución más austral en Sudamérica, y en Argentina su distribución es amplia, ocupando la región Chaco-pampeana y Mesopotámica. La conservación de esta especie es fundamental, tanto desde el punto de vista biológico como para las economías regionales ya que ha sido tradicionalmente utilizada como recurso alimenticio, y el cuero de sus ejemplares es empleado en marroquinería, por lo que en las últimas décadas las poblaciones de este lagarto han sido sometidas a explotación intensiva.

El presente trabajo de investigación aborda estudios genético-poblacionales y morfológicos de la especie *S. merianae*. Se llevaron a cabo estudios moleculares con el objetivo de analizar la variabilidad y estructura genética de poblaciones de las provincias de Santa Fe, Misiones, Córdoba y Buenos Aires. Por un lado se estudió el gen mitocondrial ND4 y se halló baja diferenciación genética entre los sitios, sin observarse un patrón influenciado por la distribución geográfica. Además, las secuencias obtenidas se utilizaron en combinación con secuencias de las bases de datos públicas, para analizar los tiempos de divergencia entre las especies pertenecientes a los géneros *Salvator* y *Tupinambis*, con el fin de indagar acerca de sus historias evolutivas. Como resultado se halló que los tiempos de divergencia y la distribución geográfica actual de estos géneros respaldarían la hipótesis de que estos lagartos habrían habitado durante el Mioceno en la Patagonia Argentina y luego se habrían expandido hacia el norte de Sudamérica. Este hecho, sumado a los eventos ambientales y orogénicos sucedidos a través de millones de años, habrían favorecido la diversificación y el surgimiento de las especies actuales de Teñidos. A su vez se halló un grupo de secuencias mitocondriales a nivel del gen ND4 altamente divergentes, obtenidas a partir de ejemplares muestreados en sitios de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe. Dichas secuencias poseen bajos valores de similitud genética en relación con secuencias pertenecientes a individuos de los géneros *Salvator* o *Tupinambis*, por lo que fueron propuestas diferentes hipótesis con el objetivo de explicar su origen: a) que dicho haplogrupo corresponde a un pseudogen, b) que sea producto de un barrido (*sweep*) mitocondrial, c) que corresponda a un linaje hasta ahora desconocido para el lagarto overo.

También se emplearon diez marcadores microsatélites específicos para *S. merianae*, y como resultado se encontraron valores de estructura poblacional bajos a moderados, todos estadísticamente significativos. Los sitios que más se diferenciaron entre sí fueron Alejandra y

Ceres (provincia de Santa Fe) y los que menos se diferenciaron entre sí fueron Villa del Rosario (provincia de Córdoba), La Paqueta (provincia de Córdoba) y Sa Pereira (provincia de Santa Fe). No se halló aislamiento por distancia, dato respaldado por los resultados obtenidos en el test de Mantel y la información obtenida a partir de los marcadores microsátélites, ya que, entre sitios cercanos geográficamente, la diferenciación genética fue mayor que la hallada entre sitios separados por grandes distancias. También mediante el empleo de los marcadores microsátélites, se determinó la presencia de dos grupos genéticos como agrupación más probable en el lote de datos. Se propone que esta agrupación puede tener relación con los índices de humedad de las ecorregiones donde se localizan los sitios, los cuales mostrarían un gradiente longitudinal Este-Oeste. Los microsátélites a su vez se emplearon para estudiar el sistema de apareamiento de la especie, y se pudo constatar que el lagarto overo presenta poligamia, con la presencia de una sola madre por nido y, generalmente, más de un padre por nidada, es decir, multipaternidad.

Complementariamente, empleando herramientas de morfometría geométrica, se analizó la forma y tamaño de la región cefálica en ejemplares juveniles de lagarto overo muestreados en diferentes sitios de la provincia de Santa Fe (Alejandra, Romang, Reconquista, Costa del Salado, Sa Pereira y San Cristóbal). Además, mediante la combinación de las metodologías de morfometría geométrica y de la genética cuantitativa, se llevó a cabo el estudio de la heredabilidad de la forma y del tamaño de la región cefálica de los ejemplares analizados de *S. merianae*. A través de estos análisis se detectaron diferencias significativas en la forma y tamaño de la región cefálica entre los ejemplares analizados y se obtuvieron altos valores de heredabilidad de dichos caracteres, lo que lleva a la conclusión de que el lagarto overo exhibe variabilidad fenotípica heredable en la estructura corporal estudiada, lo cual le permitiría responder a las condiciones ambientales de las zonas donde habita. Se hipotetiza que, en los sitios muestreados, las variaciones de forma halladas responden a una estrategia evolutiva que evita el solapamiento del nicho trófico mediante la reducción de la competencia por los ítems alimenticios disponibles.

Todo lo expuesto hasta aquí pone en evidencia la importancia del empleo de enfoques integrales para el análisis de las poblaciones de interés, ya que las diferentes metodologías abordadas en la presente Tesis, como las técnicas moleculares, las herramientas de morfometría geométrica y los análisis de genética cuantitativa, permitieron el hallazgo de información relevante en las poblaciones de lagarto overo estudiadas, que aporta datos a su biología, a su sistemática y al desarrollo de estrategias de conservación y manejo de esta especie.

## 1.2 ABSTRACT

Genetic diversity is essential for populations to evolve and adapt to the prevailing conditions in the environments where they inhabit; therefore, its evaluation is crucial for the execution of population inquiries and the development of conservation and management strategies, considering its contribution to evolutionary biology studies and the ecology of ecosystems. Two main genera of lizards, *Salvator* and *Tupinambis*, are known to be the largest neotropical *teiid* subspecies (Squamata: Teiidae) and the most commercially exploited, too. The black and white *tegu* (*Salvator merianae*) is the most outspread along the southern part of South America, and the most widely spread throughout the Argentinian territory, taking over the Chaco-Pampeana and Mesopotamian region. The conservation of this species is fundamental, not only from a biological point of view but also for regional economies: their specimens have traditionally been used as a food source and manufacturing resource for leather goods, subjecting the population to intensive exploitation in the last decades.

This study specifically approaches population genetics and morphological studies of *S. merianae*. Molecular studies were conducted to analyze variability and genetic structure of populations from Santa Fe, Misiones, Córdoba, and Buenos Aires provinces. On one hand, we analyzed the mitochondrial gene ND4 and detected a low level of genetic differentiation among sites — no pattern influenced by geographic distribution was found—. Additionally, the sequences obtained were used in combination with sequences from public databases to analyze the time divergence between species belonging to the *Salvator* and *Tupinambis* genera with the aim of investigating their evolutionary histories. As a result, it was determined that the divergence time and the current geographic distribution of these genera would support the stated hypothesis: these lizards might have inhabited the Argentinean Patagonia during the Miocene epoch and then expanded to the north of South America. Taken together with the environmental and orogenic events that have occurred over the course of millions of years, these would have favored the diversification and emergence of currently existing species of *Teiidae*. On the other hand, another group of highly divergent mitochondrial sequences at the ND4 gene level —obtained from specimens sampled in areas of Buenos Aires and Santa Fe— was found. These sequences showed low values of genetic similarity in regards to sequences belonging to the *Salvator* or *Tupinambis* genera, for which different hypotheses were proposed in order to explain their origin: a) this haplogroup corresponds to a pseudogene, b) it is the result of a mitochondrial sweep, c) it corresponds to an unknown clade for the black and white *tegu*.

Ten microsatellite markers were implemented to study *S. merianae* specimens, and as a result, were detected low to moderate values of population structure, all statistically significant. Locations such as Alejandra and Ceres (Santa Fe province) differed the most from one another, unlike Villa del Rosario (Córdoba province), La Paqueta (Córdoba province) and Sa Pereira (Santa Fe province) which shared most similarities. No traces of isolation by distance were detected,

supported by both the obtained results provided by the Mantel test and the data shown by the microsatellite markers —the genetic differentiation between geographically close sites was greater than that found between areas separated by vast distances—. Furthermore, the presence of two genetic groups was pointed out as the most liable in the batch of data by using microsatellite markers. It is suggested that these clusters may be straight related to humidity levels of the ecoregions where these sites are located, registering an East-West longitudinal gradient. Microsatellites were also used to analyze the mating system of this species, and we were able to conclude that these lizards are certainly polygamous: there's a single mother per nest and, generally, more than one father (multipaternity).

In addition to this, we examined the shape and size of the cephalic region in juvenile specimens of the black and white *tegu* sampled throughout the province of Santa Fe (Alejandra, Romang, Reconquista, Costa del Salado, Sa Pereira y San Cristóbal) using geometric morphometry tools. We also conducted a heritability study of the shape and size of the cephalic region of the analyzed specimens of *S. merianae*, combining geometric morphometry and quantitative genetics methodologies. Through these assessments, significant differences in both shape and size of the cephalic region among specimens were detected and high values of heritability were obtained. This leads to the conclusion that black and white *tegus* exhibit heritable phenotypic variability in its examined body structure, which allows it to properly respond to the environmental conditions of the places where it inhabits. We can hypothesize that the shape variations respond to an evolutionary strategy to avoid the trophic niche overlapping by reducing feeding competition.

Everything we have presented so far brings out the importance of integrated and comprehensive approaches for specific population assessments; the different methodologies used in this thesis —molecular techniques, geometric morphometrics, and quantitative genetic analysis— facilitated the discovery of key information on this *tegu* populations, providing details on their biology, systematics and the development of conservation and management strategies of this species.

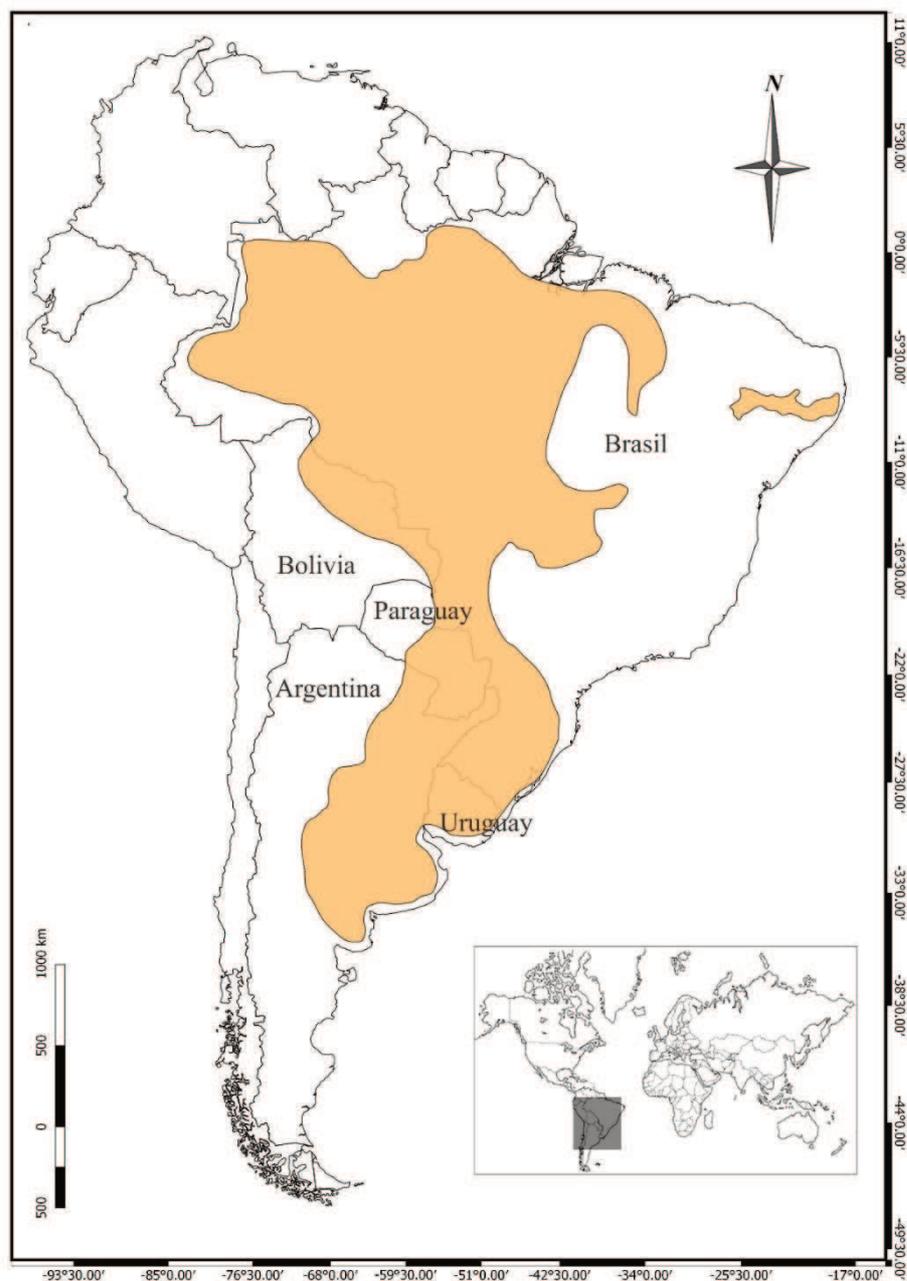
## 2. INTRODUCCIÓN GENERAL

### **2.1 Distribución actual de la Familia Teiidae, del Género *Salvator* y de la especie *S. merianae***

La Familia Teiidae ocupa la región Neotropical del continente americano y se distribuye desde el nordeste de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina y el sur de Chile. Incluye cerca de 151 especies, clasificadas dentro de 18 géneros y dos subfamilias: Teiinae y Tupinambinae [1][2]. Dentro de la subfamilia Tupinambinae se hallan, entre otros, los géneros *Salvator* y *Tupinambis*, los cuales incluyen a los reptiles más grandes y más explotados comercialmente, y cuya taxonomía permanece conflictiva [2][3][4][5][6]. Hasta hace unos pocos años todas las especies pertenecientes a los géneros *Salvator* y *Tupinambis* estaban incluidas dentro del género *Tupinambis*. En base a estudios moleculares y morfológicos, Fitzgerald y col. [3], determinaron las relaciones filogenéticas entre cinco de dichas especies, lo cual les permitió detectar la existencia de dos clados altamente divergentes a los que denominaron “clado norte o amazónico” (*T. teguixin* y *T. longilineus*) y “clado sur” (*T. merianae*, *T. rufescens* y *T. duseni*). Posteriormente, Harvey y col. [5], realizaron un análisis exhaustivo de los caracteres morfológicos de las especies de la familia Teiidae y descubrieron numerosos caracteres con valor taxonómico no reportados previamente para dicha familia. Mediante el estudio combinado de estos nuevos rasgos morfológicos junto con otros caracteres empleados tradicionalmente, estos autores realizaron un nuevo análisis filogenético y propusieron una taxonomía modificada de la familia Teiidae. Una de las conclusiones a la que arribaron los autores fue que el género *Tupinambis* es polifilético, ya que descubrieron que el "clado sur" establecido por Fitzgerald y col. [3] estaría estrechamente relacionado con el género *Dracaena*, mientras que el “clado norte” estaría relacionado con el género *Crocodilurus*. Entonces, para resolver este problema, los autores plantearon restablecer al género *Salvator* propuesto por Duméril y Bibron en 1839, para denominar a los ejemplares de estos teíidos pertenecientes al “clado sur”.

El lagarto overo (*Salvator merianae*) y el lagarto colorado (*Salvator rufescens*) son las especies del género con distribución más austral en Sudamérica y ocupan diferentes ecorregiones: *S. merianae* habita el Chaco húmedo, la selva tropical Paranaense, el Espinal y La Pampa, mientras que *S. rufescens* habita principalmente el Chaco seco. Sin embargo, sus hábitats se superponen en la región central de Argentina, en el ecotono entre el Chaco seco y el Espinal [7][8][9][10].

La especie *Salvator merianae* en particular habita en el norte y sur de Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina [11] (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución geográfica de la especie *Salvator merianae*. Mapa elaborado mediante el programa QGIS, empleando la capa vectorial obtenida de la página de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [11].

En Argentina, la distribución de *S. merianae* es amplia y ocupa las regiones Chaco pampeana y Mesopotámica; específicamente se encuentra en las provincias de Misiones, Formosa, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Buenos Aires, Chaco, Santiago del Estero, La Pampa, San Luis y Córdoba. Sus ejemplares habitan una gran variedad de ambientes, tanto naturales como sometidos a perturbación antrópica [12][13][14].

## 2.2 Historia evolutiva de la Familia Teiidae y del género *Salvator*

América del Sur es un territorio biogeográficamente diverso y compuesto por una variedad de ecorregiones que albergan a la mayor diversidad biológica a nivel mundial. La interacción entre los eventos orogénicos Mioceno (23–5 millones de años atrás: MA) y del Plioceno (5,33-2,59 MA) y las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (2,59 MA-10000 años antes del presente: AP) han dado forma a la diversidad y distribución actual de los linajes de especies en las regiones tropicales y templadas. En los últimos años, diversos estudios moleculares han proporcionado nuevas ideas sobre los patrones y procesos que rigen la evolución de la herpetofauna sudamericana, concluyendo que la mayoría de sus linajes han experimentado divisiones intraespecíficas durante el Plioceno/Mioceno, mucho antes que otros organismos, ya que mamíferos, aves, peces, invertebrados y plantas se estructuraron en linajes principalmente durante el Pleistoceno Sudamericano. Además, se ha registrado la existencia de gran diversidad críptica en varios *taxa* de anfibios y reptiles [15][16].

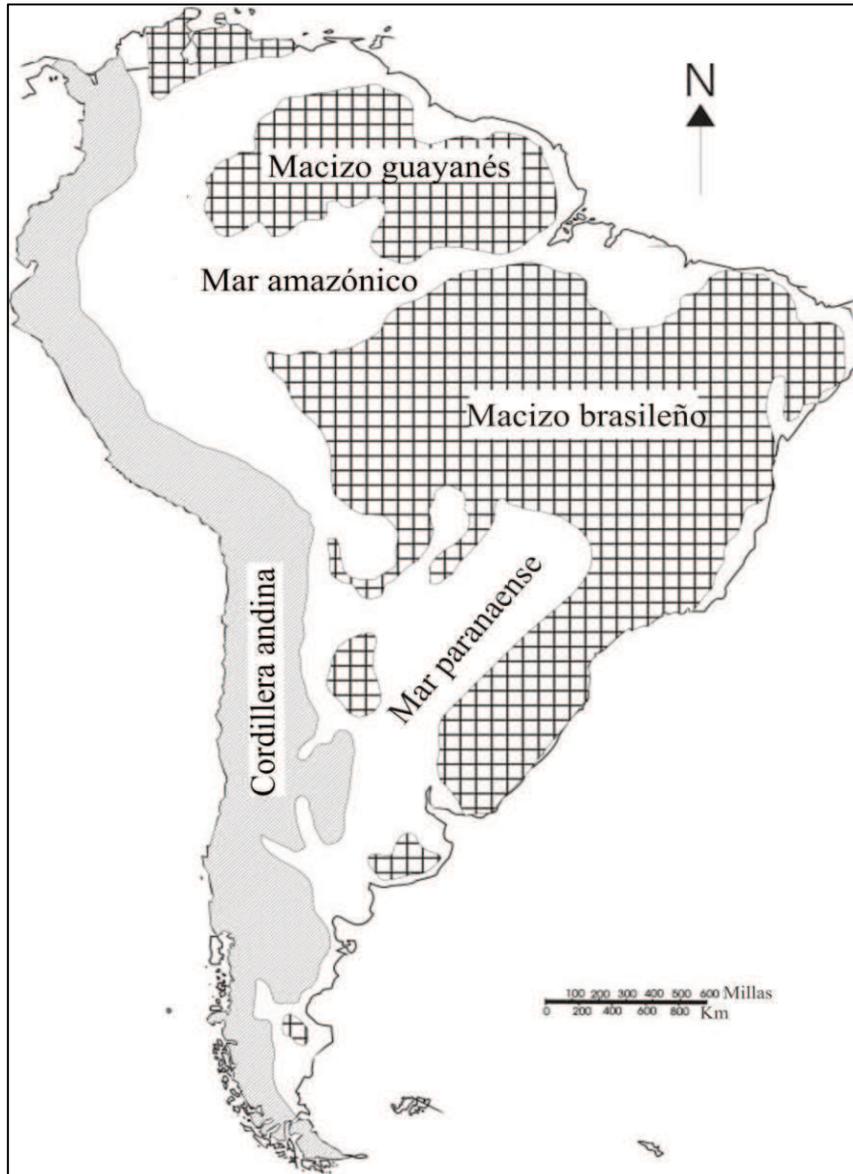
En cuanto a los principales eventos orogénicos que moldearon Sudamérica y su biodiversidad, estudios paleoclimáticos realizados en la Patagonia demuestran que, durante el Eoceno (55-33 MA) predominaron los bosques subtropicales y tropicales con períodos de sequía estacional. Luego, en el Oligoceno (33-23 MA), las condiciones climáticas más secas y frías fueron dando lugar al desarrollo de sabanas boscosas más abiertas, llevando a que, en el Mioceno temprano (23-27 MA), la Patagonia se caracterice por la presencia de hábitats abiertos de sabana y temperaturas constantes [17]. Además, en el Mioceno medio (17-15 MA), se alcanzó un “*Optimum Climaticum*” con una reducción en el espesor de la capa de hielo de la Antártida y un ligero aumento de las temperaturas oceánicas [18].

En relación a estos eventos, el hallazgo de una especie extinta que habría vivido en el norte argentino durante el Eoceno temprano y que fuera clasificada como miembro de la subfamilia Tupinambinae, indica que en ese período geológico la familia ya se había diversificado en las subfamilias Tupinambinae y Teiinae, lo que lleva a pensar en un posible origen de la familia Teiidae [19][20] en el Cretácico–Paleoceno (hace aproximadamente 70 MA). Esta hipótesis se sustenta también en datos moleculares: Giugliano y col. [21], realizaron un análisis filogenético de los teíidos empleando marcadores mitocondriales y presentaron el escenario evolutivo de los diferentes géneros de dicha familia. Los autores concluyen que los actuales géneros de teíidos se originaron en forma aislada en América del Sur y que, en su mayoría, se diversificaron durante el Eoceno, coincidiendo con la expansión de las sabanas, para luego migrar hacia el norte.

Particularmente en lo que refiere a *Tupinambis*, la hipótesis más aceptada hasta el momento es que el género se originó en la Patagonia y luego se extendió hacia el norte por el territorio sudamericano [22][23]. Cabe mencionar que esta hipótesis también incluye a las especies del actual género *Salvator*, el cual fue revalidado por Harvey y col. [5] en una fecha posterior a la publicación de dicha hipótesis. Los estudios paleontológicos realizados a partir de

diversas piezas dentarias encontradas en un yacimiento de Chubut, indican que el fósil más antiguo hallado para el género *Tupinambis* data de unos 20 MA. Aunque la morfología de dichas piezas no es útil para distinguir especies, su hallazgo representa el registro fósil más antiguo para el género, el cual estaría localizado en el Mioceno temprano [22].

Continuando con los procesos orogénicos, cabe mencionar que a partir del Mioceno medio y hasta el Mioceno tardío (14-10 MA), los ambientes meridionales y septentrionales de América del Sur estuvieron divididos por sucesivas introgresiones marinas denominadas comúnmente "Mar paranaense" [17][24][25][26] (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de Sudamérica donde se observan las principales áreas geográficas afectadas por las introgresiones marinas durante el Mioceno medio-tardío. (Figura modificada a partir del trabajo de Donato y col. [25]).

Posteriormente, a fines del Mioceno tardío se produjo la "Fase Quechua" del diastrofismo andino. Bajo su influencia, las Cordilleras Patagónicas y Principales fueron elevadas

sucesivamente, formando progresivamente una barrera importante para los vientos del Pacífico sur cargados de humedad [17]. Como consecuencia el "Mar paranaense" se retrajo hacia el Atlántico y las grandes superficies que ocupaba fueron reemplazadas por amplias llanuras que se extendieron hacia el norte desde la Patagonia [17][24]. Estas planicies se desarrollaron hasta la época del Plioceno tardío (3 MA) dando lugar a la llamada "Edad de las grandes planicies sudamericanas" o ASP (por sus siglas en inglés *Age of the Southern Plains*) [27], las cuales estaban dominadas por pastizales, estepas y matorrales. Los árboles probablemente se restringieron a bosques en galería siguiendo los cursos de los ríos en las áreas del sur y el oeste, siendo más extendidos en el noreste. Durante la ASP, el clima era más fresco y la estacionalidad más marcada que en el Mioceno Medio [17].

En este punto, cabe mencionar que Albino [23] propuso que las introgresiones marinas del denominado "mar paranaense" ocurridas durante el Mioceno medio-tardío (17-10 MA), que se extendían desde el norte de la Patagonia al sur del Paraguay y desde el este de la cordillera de los Andes al oeste de Uruguay, habrían favorecido la diversificación de las especies del género *Tupinambis* (y del actual género *Salvator* propuesto por Harvey y col [5]). Según el autor es probable que *T. rufescens* (= *S. rufescens*; Harvey y col. [5]) se haya diferenciado y adaptado a los ambientes áridos del sur y que luego siguiendo el desarrollo de las llanuras se dispersara hacia el norte, mientras que *T. meriana* (= *S. meriana*; Harvey y col. [5]) se diferenció en los ambientes más cálidos y húmedos del este de Brasil, al sur de la Amazonia, para luego colonizar hacia el sur el bioma del Chaco, en períodos más recientes.

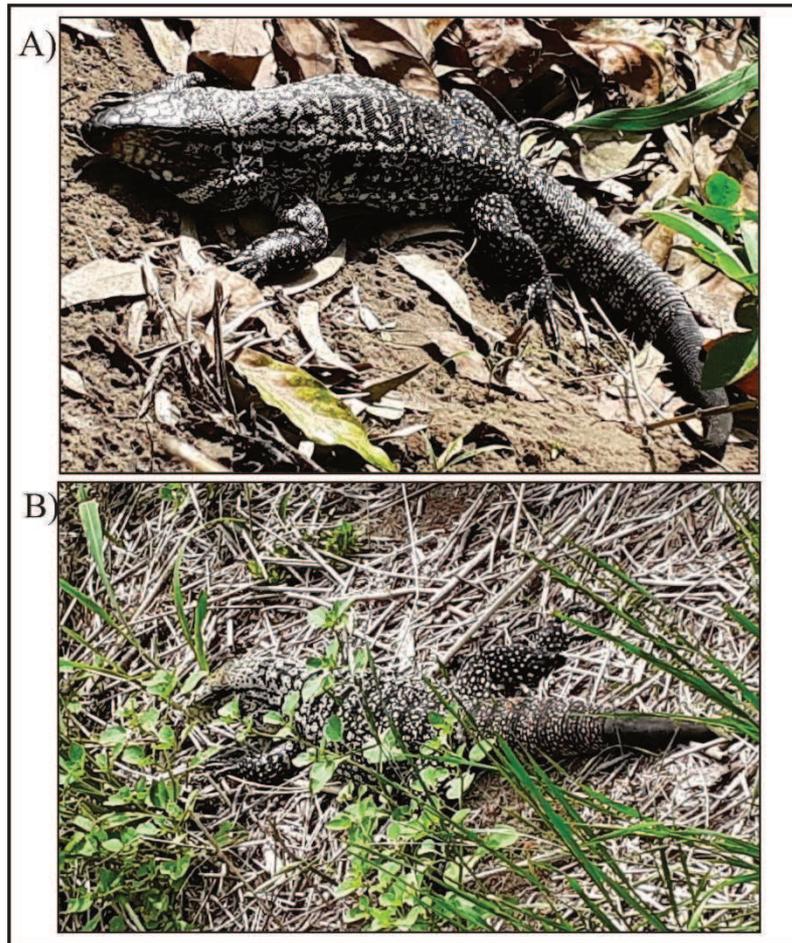
Finalmente, durante el Pleistoceno el principal factor climático que tuvo influencia en el continente fueron las glaciaciones. Los ciclos sucesivos de avance y retroceso de los glaciares produjeron una expansión y retracción marcada de los biomas áridos (sabanas, estepas) y húmedos (bosques tropicales y subtropicales) a través de dichos ciclos. Este patrón brindó oportunidades cambiantes para el desarrollo de seres vivos que vivían en estos hábitats, mientras que al mismo tiempo produjo altas tasas de extinción de especies como consecuencia de la reducción de áreas favorables [17]. Diversas hipótesis de especiación como la "hipótesis de refugio" y la "hipótesis de perturbación-vicarianza" postulan que los procesos de glaciación produjeron la expansión y retroceso de la distribución de las especies, ya sea porque estuvieran adaptadas al frío o al calor, fragmentando el hábitat y favoreciendo la divergencia entre poblaciones de una especie [28].

En suma, los estudios paleontológicos indican que las condiciones ambientales del Cretácico habrían propiciado la diversificación temprana de los reptiles escamosos. Además, el incremento de la temperatura y de la aridez que se produjeron durante el Mioceno como consecuencia del levantamiento de los Andes, afectaron de manera diferencial a estos reptiles en la Patagonia, llevando a que los teñidos, las serpientes boideas y los colúbridos retraigan su distribución hacia el norte y que los iguánidos experimenten eventos de vicarianza, lo que resultó

en una gran diversificación de estos grupos a ambos lados de la Cordillera [19]. Así, la historia evolutiva y el pulso de especiación de los lagartos tíidos reflejaría el patrón general de diversificación de los animales de América del Sur, que está relacionado con los eventos orogénicos y climáticos del pasado, como son la aparición de los Andes, las introgresiones marinas, las fluctuaciones del clima y la expansión de hábitats abiertos, dando lugar a la especialización de los organismos a los diferentes tipos de ambientes que se fueron originando a través de las eras geológicas [15][29][30].

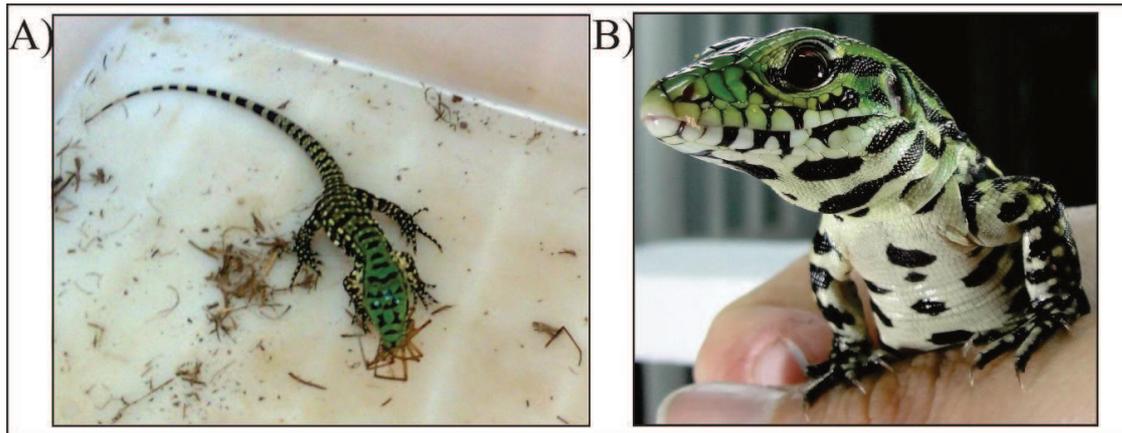
### **2.3 Características morfológicas y ecológicas del lagarto overo**

El lagarto overo es un teído de gran tamaño: los machos adultos pueden superar los 48 cm en su longitud hocico-cloaca (LHC), alcanzando 1,2 metros de largo total y pesando más de 4,5 Kg. Su cuerpo es cilíndrico y posee miembros bien desarrollados y fuertes. La cabeza tiene forma piramidal y el hocico es romo, el cuello es tan ancho como la cabeza, excepto en los machos adultos, los cuales se distinguen por poseer la cabeza más ancha como consecuencia de un mayor desarrollo de las mandíbulas [12][31]. La coloración general de los adultos es negra, marrón oscura u oliva, con manchas color marrón oliva o crema, que producen un patrón de bandas transversales a lo largo de la espalda y de los laterales, con bandas oscuras casi sin manchas, alternadas con bandas claras manchadas. Los laterales pueden ser más claros que el dorso. La región dorsal de la cabeza es mayormente marrón oliva, pero suele tener grandes manchas oscuras en las placas cefálicas o bien, hallarse las suturas de dichas placas delineadas con negro, además algunas escamas labiales presentan bandas verticales en blanco y negro. El vientre es amarillo crema con bandas oscuras cruzadas, interrumpidas o uniformes. La zona ventral de la cabeza y la región gular es blanca o crema, con grandes manchas negras ovaladas. Las extremidades son oscuras, con puntos dispersos, redondos y claros. La cola presenta anillos blancos que se ensanchan hacia el extremo, separados por áreas oscuras más anchas [31][32] (Figura 3).



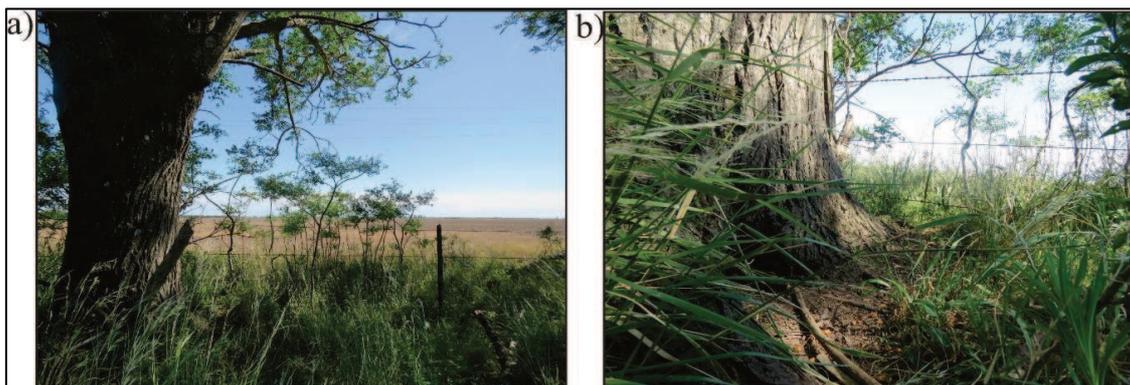
**Figura 3.** Ejemplares adultos de lagarto overo que habitan una zona con fuerte presencia antrópica en una localidad costera cercana a la ciudad de Santa Fe. A) Individuo en actividad de asolearse, puede observarse el intrincado patrón de franjas y manchas en su coloración. B) Individuo en actividad de asolearse, en este individuo en particular puede notarse cómo su coloración le otorga una gran capacidad de camuflarse en la vegetación. En ambos individuos se observa que el extremo de la cola es oscuro y sin manchas, lo que indica que la misma fue desprendida voluntariamente del cuerpo y se halla en proceso de crecimiento. Este comportamiento defensivo es normal en estos lagartos ante el ataque de predadores (obs. pers.) Fotografías: Carolina Imhoff; Lugar: Colastiné Norte, Santa Fe.

Por su parte, los neonatos (Figura 4) presentan el mismo patrón de franjas transversales y manchas, pero la diferencia con los adultos es que poseen una coloración predominantemente verde brillante en la cabeza y en el dorso durante los primeros meses de vida [5].



**Figura 4.** Ejemplares juveniles de lagarto overo. A) Se observa el cuerpo entero del animal: el patrón de franjas y bandas es similar al de los adultos, pero con un llamativo color verde brillante en el dorso. Este individuo se encuentra cazando una presa (araña). B) Individuo en el que se puede observar el área ventral de la región cefálica y parte del vientre, los cuales presentan su característico color claro con manchas negras. Fotografías: Carolina Imhoff.

En lo que refiere a aspectos ecológicos, los ejemplares de la especie están adaptados principalmente a ambientes húmedos y se los encuentra en climas subtropicales, con un régimen de precipitación de 600-1000 mm/año [22]. Habitan una variedad de ambientes que incluyen claros en bosques vírgenes, áreas abiertas naturales, bosques perturbados, cortinas de monte ubicadas entre los campos de agricultura, bordes de caminos y, si no son perseguidos, los ejemplares ocupan sitios con gran influencia humana, como corrales, alrededores de granjas e incluso zonas más urbanizadas [12][13] (Figura 5 y Figura 8-A).



**Figura 5.** Área habitada por ejemplares de lagarto overo que presenta perturbación antrópica. a) Árbol ubicado al borde de un sembradío cuyo tronco fue utilizado como nido por una hembra de lagarto overo. b) Base del árbol en donde puede observarse la entrada al nido. Fotografías: gentileza Paula Mestre; Lugar: Sa Pereira, provincia de Santa Fe.

Estos lagartos muestran hábitos alimenticios generalistas y oportunistas, son omnívoros y se los considera forrajeadores activos debido a que están constantemente en movimiento,

desplazándose grandes distancias en búsqueda de alimento mediante un aparato quimiosensorial bien desarrollado [31][33][34][35]. Dicho aparato está constituido por los órganos vomero-nasales (OVN), los cuales se ubican pareados en la base de la cavidad nasal, justo por encima del paladar, y se encuentran en la mayoría de los linajes de tetrápodos, pero están especialmente bien desarrollados en los reptiles escamosos (lagartos y serpientes). El mecanismo de estimulación vomero-nasal en dichos reptiles está mediado por el comportamiento de "sacudir la lengua", en el cual la lengua se utiliza para tomar muestras de productos químicos ambientales, provenientes del aire o de una superficie, devolviéndolos a la boca para su entrega a los OVN [36] (Figura 6). En los teñidos la lengua está altamente especializada para realizar la función quimiosensorial, tiene forma lanceolada, cubierta dorsalmente con papilas pequeñas, imbricadas, en forma de escamas, y su extremo es bífido y liso [31][37].



**Figura 6.** Ejemplar de lagarto overo en actividad de forrajeo. Se observa un individuo adulto desplazándose por el territorio y empleando su lengua bífida para captar partículas químicas del ambiente. Fotografía: Carolina Imhoff. Lugar: Colastiné Norte, Santa Fe.

El forrajeo activo es un rasgo primitivo característico de los teñidos y la dieta es consecuencia de su modo de alimentación, su tamaño corporal y la disponibilidad de presas donde habitan. Los ítems que generalmente consumen incluyen animales (vertebrados e invertebrados), huevos, hongos, carroña y partes de vegetales, como tallos, hojas, pero principalmente frutos, por lo que son considerados importantes dispersores de semillas [12][33][35][38]. Además, el lagarto overo podría considerarse una especie "clave" debido a su tamaño y nivel trófico, ya que su eliminación completa podría tener un efecto en cascada en la red alimentaria [33].

Como consecuencia de su condición de animales ectotermos, estos lagartos utilizan diferentes fuentes externas de calor tales como luz directa del sol, el aire y el sustrato (Figura 3 y Figura 7) y su comportamiento está altamente relacionado con la regulación de su temperatura corporal [34][35].



**Figura 7.** Ejemplar de lagarto overo en actividad de asolearse, utilizando como fuentes de calor el sol, el sustrato (hojas secas) y el trozo de metal que se encuentra a su lado (obs. pers.). Fotografía: Carolina Imhoff; Lugar: Colastiné Norte, Santa Fe.

Estos lagartos son típicamente activos con temperaturas ambientales elevadas, por lo que su biología térmica determina un marcado ciclo de actividad anual en las zonas de clima templado donde habitan. En las estaciones frías, su temperatura corporal se reduce debido a la disminución de la radiación solar, lo que hace que estos animales entren en un estado de “latencia”, se refugien en las madrigueras en las que hibernan, y permanezcan sin alimentarse y con actividad mínima durante la temporada invernal. En este período regulan mínimamente su temperatura corporal (la cual es similar a la temperatura del refugio) y reducen su metabolismo [34][39]. Durante la primavera y el verano (septiembre a abril), los lagartos se activan y elevan su temperatura corporal empleando fuentes externas de calor, alcanzando temperaturas máximas de 32 °C a 35 °C. Debido a su gran tamaño corporal, estos lagartos pasan un tiempo considerable asoleándose para alcanzar la temperatura ideal que les permita comenzar con las actividades que implican desplazamientos (ej. búsqueda de comida e interacciones sociales), por lo que son particularmente activos en las horas del día con mayor temperatura. Sin embargo, durante dichas acciones sus cuerpos pierden calor y su temperatura corporal disminuye, por lo que interrumpen las actividades para asolearse nuevamente. Finalmente, durante la noche se retiran a sus madrigueras [35][39].

La temperatura además influye en la reproducción del lagarto overo, la cual también es estacional e inicia a principios de la primavera, cuando la temperatura ambiente comienza a subir y los lagartos salen de su madriguera [12][35][39]. Estos animales son ovíparos y presentan una alta tasa reproductiva, pero poseen una gran mortalidad durante los primeros años, así como una relativa longevidad, ya que llegan a vivir unos 10 a 15 años en condiciones de cautiverio [12][40].

En lo que respecta al uso del territorio, Winck y col. [35], quienes estudiaron aspectos ecológicos de una población de la especie *S. merianae* en una región subtropical de Brasil,

hicieron una descripción detallada de las actividades de los ejemplares estudiados. Los autores registraron la mayor actividad de los individuos durante los meses de noviembre y diciembre, cuando las temperaturas ambientales se incrementaron (fines de primavera y principios del verano). Por ello, postularon que la dispersión de los machos de esta especie probablemente esté asociada a la búsqueda de hembras para su reproducción y a la búsqueda de territorios. A su vez, dichos autores observaron que estos lagartos tienden a concentrarse en un área específica con más recursos, como presas, refugios, mejores ambientes para su termorregulación y la presencia de compañeros reproductivos. En cuanto al área de campeo o *home-range*, es decir el área atravesada por el individuo en sus actividades normales de recolección de alimentos, apareamiento y cuidado de las crías [41], los autores comprobaron que para los machos ésta es un 28 % mayor que para las hembras, estimando el área de campeo promedio para los machos en  $6,35 \pm 9,52$  has (incluso un macho presentó un área de campeo de más de 26 has), mientras que para las hembras estimaron el área de campeo en  $0,43 \pm 0,09$  has. Winck y col. [35] creen que esto puede explicarse por el mayor tamaño corporal de los machos de *S. merianae* en relación con las hembras, y debido a que en áreas más grandes puede encontrarse un mayor número de hembras aptas para reproducirse, lo cual constataron por la presencia de varias hembras en el área de campeo del macho de mayor tamaño corporal y con mayor amplitud de dicha área. Además, los juveniles presentan un área de campeo más pequeña que los adultos, probablemente debido a su menor tamaño corporal.

Según propone Fitzgerald [12], estos lagartos no son territoriales, pero sí son jerárquicos. Los conflictos de jerarquía ocurren entre individuos de diferentes tamaños, ya sean del mismo sexo o entre machos y hembras, y por lo general los ejemplares de mayor tamaño ganan en estos conflictos. El autor postula que estos lagartos no defienden lugares o cuevas en particular, sino simplemente desplazan a otros individuos de su área. Sin embargo, Winck y col. [35] encontraron algunas evidencias que podrían indicar la existencia de territorialidad en la especie *S. merianae* y postulan que, a pesar de que los lagartos teñidos no son considerados territoriales, la población que ellos estudiaron presenta una serie de características que coincidiría con el comportamiento de defensa del territorio: en primer lugar, cuando los lagartos salen del período de letargo, emergen primero los machos de las madrigueras y más tarde las hembras (patrón de emergencia protándrico); en segundo lugar, los machos defienden una ubicación específica del área de campeo; y, en tercer lugar, existe un marcado dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras. Esto último también parecería apoyar la hipótesis de territorialidad, ya que un gran tamaño corporal en los individuos favorece la exhibición agonística y la lucha corporal. Los autores consideran que en la población que estudiaron, la defensa del área puede ser ventajosa para los ejemplares debido a la baja complejidad ambiental en donde se hallan (pastizal que fuera utilizado para el cultivo de arroz en el pasado), con solo unos pocos lugares favorables para buscar comida, asolearse y anidar. Sin embargo, estos autores consideran que se necesitan observaciones

de otras poblaciones para confirmar o refutar la idea de territorialidad dentro del género *Salvator*, teniendo en cuenta diferentes áreas con distintos grados de complejidad.

#### **2.4 Estrategias de conservación y manejo de la especie**

El desarrollo sustentable es la propuesta política, económica, social y ambiental más importante concebida en las últimas décadas, fundamentalmente porque globalizó la problemática ambiental y sus respuestas, internalizó políticamente la temática ambiental como un instrumento de planificación de los gobiernos, y demostró que la degradación social y ambiental se producen de manera conjunta [42]. América Latina se caracteriza por una excepcional biodiversidad, y la cría de ciertas especies autóctonas podría resultar en un doble beneficio: para la especie y para la economía regional [43]. Por lo tanto, la conservación de la especie *S. merianae* es fundamental, tanto desde el punto de vista biológico, como para las economías regionales [4], ya que las iguanas del género *Salvator* han sido tradicionalmente cazadas por los pueblos indígenas y criollos de América del Sur, quienes utilizan su carne para alimentación y su grasa para fines medicinales, mientras que el cuero es vendido para la confección de una gran variedad de productos, en su mayoría relacionados con la industria del calzado y marroquinería (zapatos, bolsos, carteras). En décadas pasadas, esto significaba una importante fuente de ingresos y, a pesar de la disminución reciente en la demanda comercial, la captura de iguanas actualmente sigue siendo una de las pocas alternativas económicas para algunos pobladores [14][44].

La presión de caza que han sufrido históricamente tanto el lagarto overo como el lagarto colorado ha dado lugar a que, desde el año 1977, ambas especies fueran incluidas en el Apéndice II de la Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), y consideradas dentro de la categoría de “comercio significativo”. La CITES prohíbe todo comercio relacionado con las especies en peligro incluidas en su apéndice I, y limita y controla el comercio relacionado con las especies que podrían llegar a estar en peligro, incluidas en el apéndice II [4][14][44]. Además, según la Lista Roja de las especies de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), *S. merianae* fue considerada dentro de la categoría de “Preocupación menor” (LC: por la sigla del inglés *Least Concern*) [11]. Se incluyen en esta categoría *taxa* abundantes y de amplia distribución, los cuales, luego de ser evaluados, no cumplen los criterios que definen las categorías de En Peligro Crítico, En Peligro, Vulnerable o Casi Amenazado. De todos modos, esta evaluación puede estar desactualizada ya que fue realizada en el año 2016.

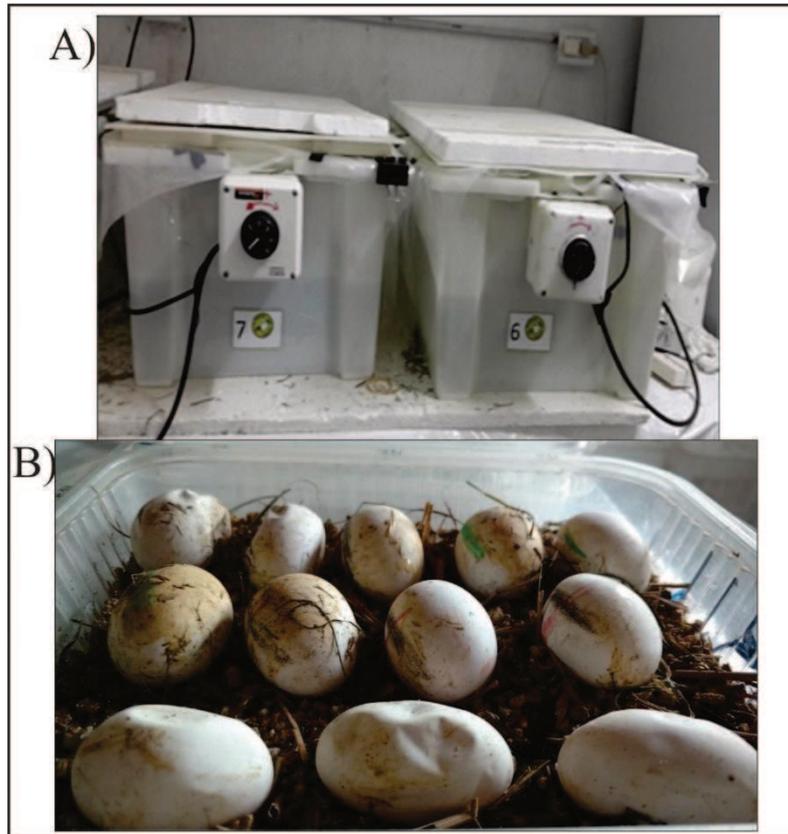
En Argentina, la legislación que regula el comercio y aprovechamiento del género *Salvator* es de carácter general en la mayoría de las provincias. El Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible de la Nación es el responsable de la normativa general, a la que adhieren gran parte de las provincias y es ajustada a las condiciones particulares de cada una de ellas, ya que en algunas provincias la legislación es más específica fijando la temporada de caza, tamaño mínimo de los ejemplares y requisitos a reunir por los cazadores. Dicho Ministerio también es

responsable de establecer el volumen de cueros a exportar por año, fijar los cupos para cada provincia, el marco regulatorio y documentación a cumplimentar por los exportadores [4][14]. El Proyecto *Tupinambis* del Programa Nacional de Manejo y Uso Sustentable de Especies Silvestres es una herramienta fundamental para el aprovechamiento racional de *S. merianae* [4]. Dicho Proyecto comenzó a desarrollarse en 1987 con el objeto de describir la biología y ecología de la especie y formular planes para su manejo racional. El proyecto fue elaborado por TRAFFIC-USA/WWF, CITES, y la Cámara de Industriales Curtidores de Reptiles de Argentina (CICuR) [45] y en ese marco, desde el año 1994 se han realizado muestreos periódicos para monitorear el estado poblacional de la especie en cada temporada anual de caza en las provincias de Formosa, Chaco, Salta, Santiago del Estero, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santa Fe y Jujuy [4][14].

En lo que respecta particularmente a la Provincia de Santa Fe, en el año 1998 se habilitó por primera vez la cría de estos lagartos en cautiverio, cuya normativa se encuentra regulada por la Resolución N° 0074/98. Por este motivo, desde el año 2008, en la Estación Zoológica Experimental del Ministerio de Producción de la Provincia de Santa Fe, se lleva a cabo el Proyecto de Ranqueo de la especie, denominado “Proyecto Iguana”, el cual funciona en las instalaciones del Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL/MMA-MUPCN) y consiste en la cosecha de huevos de lagarto overo de la naturaleza (Figura 8) para su posterior incubación (Figura 9) bajo condiciones controladas de temperatura (29 °C - 32 °C) y humedad (aproximadamente 20%) [46].

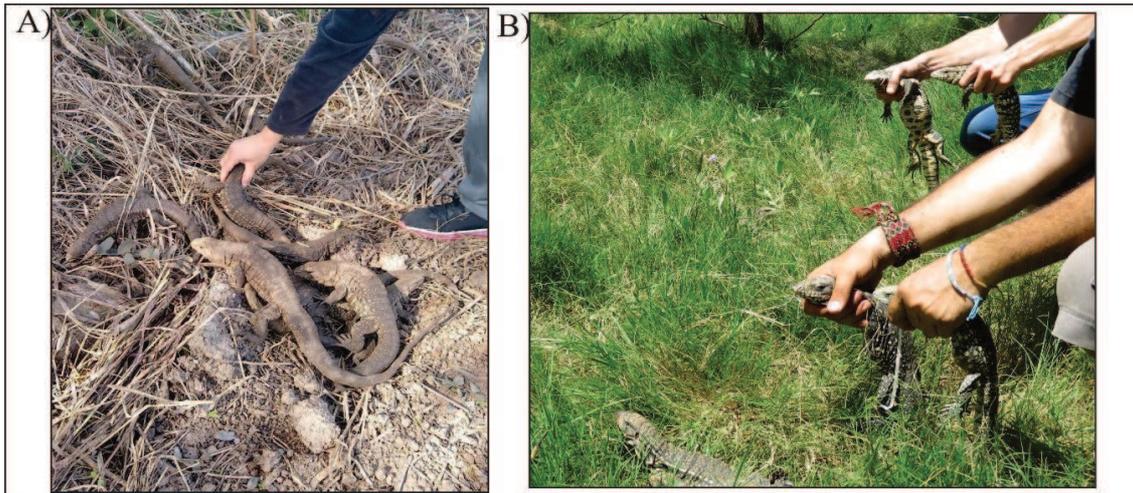


**Figura 8.** Cosecha de huevos de lagarto overo de la naturaleza para su posterior incubación en condiciones artificiales. A) Localización de un nido en un área lindante a un sembradío. B) Marcaje de los huevos en el momento de la cosecha para mantener la posición correcta de los mismos durante el traslado y la incubación. Fotos: gentileza Gisela Schaumburg; Lugar: Sa Pereira, provincia de Santa Fe.



**Figura 9.** Incubación artificial de los huevos recolectados en la naturaleza A) Incubadoras que permiten controlar las condiciones de humedad y temperatura. B) Bandejas con base de vermiculita en las cuales se colocan los huevos para su incubación. Foto: gentileza Paula Mestre y Pablo Siroski.

Una vez nacidos, los neonatos son mantenidos en recintos de cría hasta que alcanzan un tamaño apropiado para ser liberados en la naturaleza (Figura 10), destinando un porcentaje a la comercialización como mascotas y otro pequeño porcentaje para trabajos de investigación científica [46].



**Figura 10.** A y B) Liberación de ejemplares de lagarto overo en la naturaleza. Los individuos se liberan en el mismo sitio del cual fueron cosechados los nidos a los que pertenecen. Fotos: gentileza Paula Mestre y Pablo Siroski. Lugar: Sa Pereira, provincia de Santa Fe.

El método de rancheo implementado por el Proyecto Iguana permite mantener poblaciones viables de la especie que se está manejando, ya que el mayor índice de mortalidad ocurre durante el período de incubación de los huevos en los nidos, o durante las primeras etapas de vida de los individuos, como consecuencia de la predación y de las condiciones adversas del ambiente natural. Los adultos de lagarto overo sólo se ven amenazados por grandes mamíferos y aves de presa, mientras que los juveniles, debido a su tamaño, se hallan amenazados por un mayor número de predadores, tales como otros grandes lagartos, serpientes, aves y mamíferos [47]. Un estudio preliminar realizado entre diciembre de 2005 y enero de 2006 por miembros de la Estación Zoológica Experimental, previamente a la implementación del Proyecto Iguana, determinó que, en la naturaleza, el porcentaje de huevos que eclosionan no superan el 40%, a lo que se debe sumar la gran mortandad, antes mencionada, de individuos con menos de un año de edad, por lo que es probable que sólo lleguen a cumplir el año aproximadamente un 10% de los individuos nacidos en el medio natural en cada temporada, mientras que, para los huevos colectados e incubados en las instalaciones de la Estación Zoológica Experimental, el éxito de eclosión fue mayor al 80% (Siroski, com. pers.).

Otra ventaja del método de rancheo radica en el beneficio generado para los pobladores locales que colaboran con el Proyecto Iguana, ya que, a través de un incentivo económico, ellos se involucran en las diferentes tareas: identificación de nidos, recolección de huevos, monitoreo de poblaciones naturales, y liberación de animales en sus entornos naturales de origen. Así, el desarrollo de este programa representa tanto un aporte importante a la economía regional, como también un impacto positivo en la conciencia y el compromiso de la población local en lo que respecta a la preservación de los recursos naturales y protección del ecosistema que los contiene [47].

Debido a la importancia económica y social de los lagartos del género *Salvator* y *Tupinambis* y de su alta tasa de cosecha desde 1980, se han ido incrementando paulatinamente estudios que examinan la variación genética y morfológica de sus especies [2][3][6][10][21][48]. Sin embargo, la sistemática de estos géneros presenta conflictos, que causan problemas para los organismos de gestión a cargo del monitoreo del comercio nacional e internacional de estos animales y de sus productos. Es probable que especies del género *Salvator* permanezcan sin describir y este hecho, sumado a la falta de consistencia en las metodologías de estudios taxonómicos y genéticos utilizadas, plantea impedimentos para el manejo y conservación de dichas especies a largo plazo. La caracterización de la variación geográfica y de los límites entre las especies es necesaria para cuantificar efectivamente el comercio y hacer cumplir las alcúotas de cosecha [2][3][6].

## **2.5 Importancia de los estudios moleculares y morfológicos en lagartos teídos**

El creciente interés en la conservación de la biodiversidad motiva el desarrollo de estudios multidisciplinarios que pretenden realizar una descripción detallada de la fauna, ya que una mejor comprensión de la sistemática, así como de los mecanismos históricos actuantes en la diferenciación de los grupos, puede proporcionar información crítica para la conservación y manejo de la biodiversidad y representan un ejemplo de integración de diferentes abordajes como citogenética, morfología, biología molecular, y ecología, lo cual resulta imprescindible para elaborar programas de conservación eficientes [1].

Diversos estudios moleculares que involucran la secuenciación de genes nucleares y mitocondriales, así como datos obtenidos a partir del análisis de microsatélites, han sido ampliamente utilizados durante las últimas décadas para estudiar a las especies de la familia Teiidae, revelándose como herramientas útiles en trabajos ecológicos y evolutivos, ya que proporcionan información importante acerca de la diversidad genética, estructura de poblaciones, flujo génico, sistemas de apareamiento, estudios de paternidad, filogeografía, e hibridación [1][3][6][10][48][49][50]. Sin embargo, dichos análisis moleculares, juntamente con los citogenéticos y morfológicos y las recientes descripciones de nuevas especies y de especies crípticas en la familia, apuntan a una necesidad urgente de estudios multidisciplinarios más amplios que caractericen en profundidad la gran diversidad de los Teiidae [1].

La clasificación de los lagartos teídos ha sido controvertida a lo largo del tiempo debido principalmente a no contar con muestreos completos y a la discordancia entre los caracteres (morfológicos, citogenéticos, moleculares, ADN, osteológicos, etc.) empleados por diferentes investigadores para reconstruir las relaciones filogenéticas entre las especies, los géneros e inclusive las subfamilias [2]. Para ejemplificar esto cabe mencionar que algunos autores, en base a caracteres morfológicos, propusieron incluir otra subfamilia (*Callopiinae*) a las ya existentes *Teiinae* y *Tupinambinae*, dentro de la Familia *Teiidae* [5], mientras que otros autores, en base a análisis moleculares de última tecnología, propusieron, a su vez, que *Callopietes* sea incluido

como un género dentro de la subfamilia Tupinambinae [2]. A nivel de género ocurren conflictos similares: análisis morfológicos y moleculares recientes dieron lugar a que sean restablecidos los nombres de tres géneros que eran considerados sinónimos de otros ya existentes, y además se crearon nuevos géneros. Así, gracias a estos nuevos estudios y reordenamientos taxonómicos se logró resolver la ausencia de monofilia en géneros históricamente mal definidos filogenéticamente [2][5][51]. En este sentido, los géneros *Salvator* y *Tupinambis* no son la excepción, ya que, como se mencionó al principio de la presente Introducción, hasta hace unos pocos años todas las especies pertenecientes a dichos géneros estaban incluidas en el género *Tupinambis*, pero estudios morfológicos, corroborados a su vez a través de estudios moleculares más recientes, determinaron que dicho género era en realidad polifilético [2][3][5][6].

Una característica que agrega aún más inconvenientes para la correcta clasificación de especies dentro de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* es la gran similitud morfológica entre los ejemplares pertenecientes a ellas. Desde hace aproximadamente cincuenta años se ha hecho uso de la taxonomía *alpha* para describirlas. Este tipo de taxonomía descubre, describe y nombra especies principalmente a partir de caracteres morfológicos, con el inconveniente de que, por lo general, los científicos disponen de un escaso número de individuos para caracterizarlos y, en ocasiones, llegan a describir nuevas especies sin realizar una correcta comparación con el resto de los grupos [52][53]. Por lo tanto, el número de especies reconocidas para este grupo de lagartos ha ido variando a través del tiempo. Harvey y col. [5] describen esto detalladamente: Peters y Donoso-Barros [54] reconocieron la existencia de cuatro especies de *Tupinambis* (*T. duseni*, *T. nigropunctatus*, *T. rufescens* y *T. teguixin*) que luego fueron reducidas a dos por Presch [32] (*Tupinambis rufescens* y *T. teguixin*). Posteriormente Avila-Pires [31] en desacuerdo con los resultados de Presch [32], reconoció las cuatro especies enumeradas por Peters y Donoso-Barros [54], y redescubrió a *T. merianae*, a través de una cuidadosa revisión de la nomenclatura, comparaciones morfológicas detalladas y designación de varios lectotipos. Posteriormente fueron descritas nuevas especies, lo cual generó nuevos conflictos taxonómicos [31][55][56][57], pero no fue hasta el inicio de estudios combinados de análisis moleculares y morfológicos que dichos conflictos comenzaron a ser develados [3][58].

Incluso en trabajos recientes, queda en evidencia que la gran diversidad de estos lagartos continúa sin ser adecuadamente estudiada. Un claro ejemplo de esto es el trabajo realizado por Murphy y col. [6], quienes en base a estudios moleculares y morfológicos demostraron que la especie *T. teguixin* incluye a un grupo de al menos cuatro especies, dos de ellas conviviendo en simpatria. Los autores mencionan que el descubrimiento de especies crípticas no debería ser inesperado, y resaltan el hecho de que estos lagartos son ampliamente utilizados por los humanos y han sido objeto de análisis filogenéticos, ecológicos, morfológicos y fisiológicos, dada su abundancia, tamaño y disponibilidad en las colecciones de museos y el comercio de mascotas, sin contar con estudios sistemáticos profundos. A los inconvenientes remarcados por estos autores,

se le agrega el hecho de que existen procesos, muchas veces ignorados, entre especies cercanamente emparentadas y/o crípticas, como es la ocurrencia de hibridación, con el agravante de que muchos híbridos son casi imposibles de distinguir morfológicamente de las especies parentales [59]. En este punto, resulta de suma relevancia mencionar que existen antecedentes de hibridación entre especies del género *Salvator*, particularmente entre *S. merianae* y *S. rufescens*. Dicho proceso ocurre en la zona de simpatria entre ambas especies, en la región central de Argentina y solo pudo ser detectado mediante estudios moleculares [10][48], lo cual deja en evidencia la necesidad de abordar el estudio de estos lagartos en profundidad, por medio de la integración de las herramientas moleculares y morfológicas que se han desarrollado en los últimos años.

Por lo antes expuesto, se considera muy importante complementar los análisis genéticos con estudios morfológicos en el desarrollo de estudios genético-poblacionales [60][61][62]. Una de las opciones más novedosas es la metodología propuesta por la morfometría geométrica, la cual ha logrado objetivar la evaluación cuantitativa y cualitativa de los cambios morfológicos a través de la recuperación de la forma en estudio [63][64]. Esto es posible gracias a la aplicación de técnicas biométricas, instrumentos y programas computacionales, que permiten la captura y análisis de datos en forma de matrices que representan la geometría de un espécimen y no se limitan a la obtención de datos lineales como medidas de alto o ancho [65].

El uso de la morfometría geométrica para estudiar la variación fenotípica en reptiles ha aumentado notablemente durante los últimos años, ya que esta herramienta proporciona un marco estadístico sólido para estudiar la forma de los organismos preservando las propiedades geométricas de las estructuras analizadas, mejorando así la comprensión de los factores ecológicos e históricos que explican los patrones de variación morfológica. Esto se debe a que la forma es multidimensional, por lo que contiene abundante información respecto a los procesos ecológicos y evolutivos responsables de la diversidad morfológica observada [66][67].

Los estudios que utilizan métodos de morfometría geométrica realizados hasta el momento en reptiles, tienden en su mayoría a estudiar las relaciones alométricas, es decir las relaciones entre el tamaño y la forma de los organismos, y cómo se comportan dichas trayectorias alométricas entre *taxa* cercanos. También, en reptiles, ha sido objeto de estudio el análisis del dimorfismo sexual, así como la detección de variaciones adaptativas en los patrones morfológicos y la investigación de sus causas [66]. Además, algunos trabajos han incursionado en la integración de la morfometría geométrica y la genética cuantitativa a través del estudio de la heredabilidad de la forma [61][62][68][69][70]. La heredabilidad hace referencia a la contribución de la varianza genética heredable en la varianza fenotípica total y se la considera un parámetro crítico ya que controla la capacidad de un fenotipo para responder a la selección [63] y es además una herramienta de gran valor para la optimización de programas de mejoramiento animal con fines comerciales [60].

A su vez, en un enfoque integrador, los métodos de morfometría geométrica pueden usarse junto con otras herramientas, incluidos los análisis morfométricos tradicionales o los datos moleculares, ya que permiten registrar diferencias que a menudo son percibidas por el taxónomo pero son difíciles de documentar. Sin el uso de métodos de morfometría geométrica, las explicaciones para las diferentes formas de los integrantes de *taxa* o poblaciones pueden no ser apropiadas debido a la subjetividad que presenta el empleo de otros métodos. Sin embargo, mediante la aplicación de métodos morfométricos geométricos, estas diferencias pueden ilustrarse y registrarse a través de las cuadrículas de deformación, someterlas a análisis multivariados, expresarlas gráficamente y, además, permiten realizar comparaciones [71]. Por este motivo, en los últimos años se ha acrecentado el desarrollo de trabajos que emplean la morfometría geométrica para realizar clasificaciones taxonómicas y para detectar especies crípticas simpátricas e híbridos, ya sea como una herramienta complementaria de la morfometría tradicional, de la información molecular o de ambas [71][72][73][74][75].

Particularmente en la especie *Salvator merianae*, los trabajos empleando morfometría geométrica realizados hasta el momento involucran el análisis de la región cefálica, más específicamente del cráneo de los individuos. El primer antecedente registrado fue un estudio realizado por Monteiro y Abe [76], quienes analizaron los procesos morfogenéticos actuando sobre el cráneo de estos lagartos. Los autores encontraron que los cambios ontogénicos ocurren en regiones particulares que se ven afectadas por diferentes factores genéticos o epigenéticos. El cambio de forma observado implica un ensanchamiento de la región anterior del cráneo, un estiramiento y estrechamiento de la cara media, un estrechamiento de la caja cerebral, una reducción orbital y un alargamiento de la región temporal (origen de los músculos aductores de la mandíbula). Los autores concluyen que los patrones de crecimiento conducen a una mayor robustez del cráneo (particularmente en la región anterior) y a una reducción de la cinesis craneal y que estos cambios, junto con la variación ontogénica de la dentición, contribuyen a las modificaciones observadas en la dieta de estos animales a lo largo de su vida, ya que cambia de ser carnívora en los juveniles a ser omnívora en los adultos.

En un trabajo más reciente, Fabre y col. [77] utilizaron morfometría geométrica para cuantificar la forma del cráneo y de la mandíbula del lagarto overo y probar, entre otras cosas, si dichas estructuras covarían entre ellas y si covarían además con la fuerza de la mordida. Los autores encontraron covariación entre la fuerza de la mordida y la mandíbula, y entre la fuerza de mordida y el cráneo en vista dorsal y ventral, proponiendo que la mandíbula y el lado dorsal del cráneo poseerían un papel importante en la fuerza ejercida durante la alimentación, además de proporcionar sitios de inserción muscular. A su vez, los autores hallaron diferencias entre los sexos ya que, para los machos, encontraron una fuerte covariación entre las regiones dorsal y ventral del cráneo y la mandíbula, mientras que en las hembras solo la covariación entre la mandíbula y el lado ventral del cráneo fue significativa. Esto se explica por el hecho de que existe

una fuerte selección entre los fenotipos de los machos hacia una mayor fuerza de mordida como resultado de su comportamiento agresivo en la época de apareamiento, lo cual según los autores, aporta más evidencia del papel importante que ejercen las fuerzas de mordida y musculares en general, en la conducción de la covariación entre las estructuras que analizaron.

Finalmente, Fabre y col. [78] realizaron un análisis del dimorfismo sexual en la forma del cráneo y mandíbula de individuos de lagarto overo, empleando tanto morfometría geométrica como morfometría tradicional, con el fin de determinar si ambas técnicas son igualmente eficaces para describir la variación de los rasgos funcionales, particularmente en lo que respecta a la musculatura de la mandíbula que genera la fuerza de la mordida. Los autores encontraron que ambas técnicas resultaron adecuadas para detectar diferencias intersexuales en la mandíbula, sin embargo, con la técnica de morfometría geométrica se obtuvieron mejores predicciones del desempeño de dicha forma con relación a la fuerza de mordida. A su vez, en lo que respecta a la forma del cráneo, las medidas lineales tradicionales resultaron descriptores bastante pobres comparados con los del enfoque morfométrico geométrico, el cual proporciona una mejor representación de la forma ya que incluye más variables analíticas con respecto a los métodos lineales. Los autores además exponen que los enfoques morfométricos geométricos resaltaron claramente las diferencias entre los sexos en zonas que incluían áreas de inserción muscular, lo que sugiere que la selección que causa divergencia entre los sexos puede actuar sobre rasgos funcionales como la fuerza de mordida. Además, establecieron que esta técnica permite una discriminación entre los sexos incluso a una edad relativamente joven de los individuos. Por lo tanto, los autores concluyen que los enfoques morfométricos geométricos son ideales para explorar la variación de la forma craneal y mandibular entre los sexos, al menos entre los lagartos, además de detectar variaciones en la forma relacionadas con rasgos subyacentes funcionalmente relevantes, como la fuerza de mordida.

## **2.6 Temática a desarrollar y organización de la tesis**

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados, el presente trabajo de investigación aborda estudios genético-poblacionales y morfológicos de la especie *S. merianae* la cual, a pesar de su amplia distribución geográfica y notorio interés comercial, aún permanece escasamente estudiada en Argentina. Para la realización de los estudios antes mencionados se emplearon marcadores moleculares (microsatélites y mitocondrial) para estudiar la variabilidad genética y la estructura poblacional en los sitios muestreados, así como también para analizar el modo de apareamiento de la especie. Además, se utilizan herramientas de morfometría geométrica para el análisis de la forma de la región cefálica en individuos vivos. El trabajo se desarrolla en base a la hipótesis de que las poblaciones argentinas de *S. merianae*, en su distribución más austral, presentarán alta variabilidad genética y fenotípica asociada a su estructuración geográfica.

Cabe mencionar que la presente Tesis se encuentra dividida en capítulos organizados de manera tal que permitan una mejor comprensión de las diferentes temáticas abordadas, cada uno

de los cuales consta de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Conclusiones. En el capítulo I se describen y caracterizan los marcadores moleculares empleados, así como también las diferentes etapas que involucraron su optimización. En los capítulos II y III se desarrollan los análisis genéticos, los cuales fueron llevados a cabo mediante el empleo de muestras de lagarto overo provenientes de los sitios seleccionados, utilizando para ello los marcadores moleculares optimizados. En el capítulo IV se desarrolla el estudio del sistema de apareamiento de la especie mediante el empleo de los marcadores microsátélites. El capítulo V aborda el análisis de la forma de la región cefálica de juveniles de lagarto overo mediante morfometría geométrica. Finalmente, se incluye una Conclusión general acerca de los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo de investigación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GENERALES**

- Analizar la estructura y variabilidad genética y fenotípica existente en poblaciones silvestres de *Salvator merianae* de nuestro país.
- Caracterizar el sistema de apareamiento de esta especie autóctona como aporte al conocimiento de su biología reproductiva.
- Estimar valores de heredabilidad a partir del análisis de rasgos morfológicos cuantitativos con el fin de seleccionar caracteres de interés para su mejoramiento en programas de uso sustentable.
- Transferir la información obtenida a los planes de manejo y conservación que incluyen a esta especie con el objetivo de evaluar y optimizar las estrategias de uso sustentable.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la variabilidad y estructura genética y fenotípica dentro y entre poblaciones argentinas de *S. merianae*, mediante el estudio de marcadores moleculares (microsatélites, ADN mitocondrial) y rasgos morfológicos.
- Caracterizar el sistema de apareamiento de *S. merianae* a través del uso de marcadores microsatélites, con el fin de determinar la presencia/ausencia de multipaternidad en los grupos familiares analizados.
- Estudiar asociaciones entre el tamaño y forma de los ejemplares de *S. merianae* en relación con las variables ambientales y ecológicas del lugar de origen de la población, mediante el empleo de las nuevas herramientas de morfometría geométrica.
- Estimar valores de heredabilidad a partir del tamaño y forma de los ejemplares empleando herramientas de morfometría geométrica.

## **4. CAPÍTULO I: MARCADORES MOLECULARES**

### **I. INTRODUCCIÓN**

#### **I.I Marcadores moleculares y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction: PCR*)**

Un marcador molecular es cualquier molécula de proteína, ARN o ADN, de tamaño o peso molecular conocido, que sirve para estudiar comparativamente diferentes individuos. Los marcadores se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias, en pequeñas secuencias, de las moléculas entre los individuos. Proveen información sobre las variaciones genéticas en un *locus* dado, por lo que son adecuados para distinguir genotipos [79][80].

Los marcadores moleculares permiten, entre otras cosas, cuantificar la diversidad genética, rastrear los movimientos de los individuos, medir niveles de endogamia, identificar restos de individuos, caracterizar nuevas especies e indagar en los patrones históricos de su dispersión [81]. Recientemente, las metodologías genómicas cada vez más sofisticadas han brindado una visión notable del funcionamiento de diferentes genes y de la manera en que las adaptaciones evolutivas (o la falta de tales adaptaciones) pueden determinar si un organismo podrá sobrevivir a un entorno cambiante [82]. Por lo tanto, los marcadores de ADN son herramientas ampliamente utilizadas tanto en investigación básica (por ejemplo, análisis filogenéticos y búsqueda de genes) como en la aplicada (por ejemplo en pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos) [83].

La base teórica de los marcadores moleculares radica en que las regiones flanqueantes (secuencias de ADN adyacentes a un *locus*) generalmente se conservan en individuos de la misma especie y, a veces, de diferentes especies, por lo que se pueden diseñar oligonucleótidos o cebadores que hibriden en dicha región y guíen la amplificación del *locus* durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: por las siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*) [84]. La técnica de PCR permite amplificar selectivamente una región particular del genoma en estudio a partir del ADN aislado. Mediante la utilización de uno o un par de oligonucleótidos (tramos cortos de ADN), se amplifica repetidamente una región objetivo hasta que haya suficientes copias para permitir su posterior manipulación y caracterización [82]. En una reacción típica de PCR cada ciclo se repite 30 veces mediante la utilización de termocicladores computarizados. Como en cada ciclo de la reacción se generan dos cadenas hijas a partir de una sola cadena, el número de secuencias aumenta exponencialmente a lo largo de la reacción obteniéndose así billones de copias de la secuencia objetivo [82].

#### **I.II Tipos de marcadores moleculares**

Una consideración muy importante a tener en cuenta en la aplicación de la técnica de PCR es la secuencia de los oligonucleótidos o cebadores que son usados para la amplificación, que se pueden clasificar en universales, y específicos. Los primeros pueden amplificar la misma región de ADN en una variedad de especies, mientras que los segundos amplifican secuencias blanco de

una sola especie o de unas pocas especies cercanamente relacionadas [82]. En la presente tesis se utilizaron, como cebadores universales, un par de oligonucleótidos que amplifican parte de la secuencia del gen mitocondrial NADH-deshidrogenasa subunidad 4 (ND4) y, como cebadores específicos, oligonucleótidos diseñados particularmente para la especie *Salvator merianae* que amplifican regiones microsátélites (*Simple Sequence Repeats: SSRs*).

### **I.II.I Secuencias de ADN: Marcadores mitocondriales**

La determinación de la secuencia para una región genómica dada es el único método que identifica las diferencias exactas en pares de bases entre individuos. Como resultado, la secuenciación permite inferir las relaciones evolutivas entre alelos alternativos: cuanto mayor sea el número de alelos compartidos entre un par de individuos, más estrechamente relacionados están entre sí genéticamente. Cabe mencionar que también pueden existir alelos compartidos por azar, es decir mutaciones que produzcan modificaciones intermedias en los nucleótidos como las que ocurren cuando (por mencionar un caso), una A cambia a C y luego a A nuevamente [82].

El ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido la fuente de datos en un gran número de estudios ecológicos basados en secuencias. El predominio en el empleo de marcadores mitocondriales, radica en las propiedades intrínsecas de dicho genoma [82]:

- En la mayoría de los animales, el ADNmt se hereda por vía materna, es decir que se transmite de las madres a sus descendientes.
- Su pequeño tamaño, junto con el arreglo conservado de los genes, da lugar a que muchos pares de cebadores universales amplifiquen regiones del genoma mitocondrial en una amplia variedad de vertebrados e invertebrados. Esto significa que, a menudo, se pueden obtener datos sin ningún conocimiento *a priori* sobre la secuencia de ADNmt de una especie en particular.
- Aunque el arreglo de los genes es conservado, la tasa de mutación es relativamente alta en algunos genes, lo que significa que el ADNmt generalmente muestra niveles relativamente altos de polimorfismo y, por lo tanto, detectará múltiples linajes genéticos dentro y entre las poblaciones.
- Carece de recombinación genética, lo que significa que la descendencia tendrá (salvo que existan mutaciones) exactamente el mismo genoma mitocondrial que su madre. Como resultado, el ADNmt en un individuo es un haplotipo que recibió de su madre. Esta herencia clonal efectiva permite que los linajes individuales se puedan rastrear en el tiempo y en el espacio con relativa facilidad.
- Debido a que el ADNmt es haploide y heredado de modo uniparental, su tamaño efectivo poblacional es cuatro veces menor comparado con el del ADN nuclear. Debido a esto, el ADNmt es relativamente sensible a eventos demográficos como cuellos de botella. Incluso si la población se recupera rápidamente de una reducción numérica drástica, poseerá pocos haplotipos mitocondriales supervivientes en comparación con los genotipos nucleares, por lo cual el ADNmt permite inferir procesos demográficos ocurridos en el pasado.

### **I.II.II Microsatélites: Marcadores nucleares**

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN constituidos por 2 a 6 pares de bases (pb), que se repiten *en tándem*, en forma aleatoria en el genoma de los seres vivos y se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma nuclear [85]. Como consecuencia de sus elevadas tasas de mutación suelen ser altamente polimórficos, y los diferentes individuos analizados en una población suelen exhibir variaciones que se manifiestan como diferencias en el número de las repeticiones en una región microsatélite [86]. Los microsatélites mutan muy rápidamente, y esas altas tasas de mutación dan como resultado múltiples alelos en cada *locus*. Este alto nivel de polimorfismo los hace adecuados para inferir eventos genéticos poblacionales relativamente recientes [82]. Además, este elevado polimorfismo, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados mediante una serie de estos marcadores, compartan un genotipo idéntico [85].

Las características de los microsatélites, como su herencia Mendeliana, su naturaleza codominante (detectan heterocigotas) y su alto nivel de polimorfismo, los convierten en herramientas adecuadas para el estudio de estructura poblacional y los hace apropiados para detectar variaciones genéticas entre especies cercanamente relacionadas. También son útiles en los estudios de paternidad, mapeo de genomas y para resolver ambigüedades taxonómicas. Asimismo, los microsatélites pueden ser empleados eficazmente para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones, siendo esto de gran utilidad en la evaluación global de la diversidad (dentro y entre poblaciones). Por lo tanto, se considera que los microsatélites proveen información esencial para formular estrategias de conservación y manejo de especies [85][87].

En base a las características antes descritas de los marcadores nucleares y mitocondriales, resulta adecuado el uso combinado de ambos. Los linajes mitocondriales pueden identificarse de una manera mucho más directa que los linajes nucleares, ya que, en las especies que se reproducen sexualmente, el ADN nuclear experimenta recombinación [82]. A su vez, los marcadores microsatélites (ADN nuclear), con herencia biparental, altas tasas de mutación y altos niveles de polimorfismo, son adecuados para inferir, como ya se mencionó antes, eventos genético-poblacionales relativamente recientes [82]. En conclusión, ambos tipos de marcadores son complementarios en términos de la información que proporcionan (ancestral y reciente) y su uso combinado produce resultados muy sólidos.

### **I.III Antecedentes en el uso de marcadores moleculares para la especie *Salvator merianae***

El estudio realizado por Fitzgerald y col. [3], mencionado en la Introducción general, es el primer antecedente de análisis molecular publicado para especies de los géneros *Tupinambis* y *Salvator*. En su trabajo, los autores realizaron un análisis filogenético, incluyendo cinco especies, basado en secuencias de genes mitocondriales (Cit b y ND4) y relacionaron esos datos genéticos con datos morfológicos previamente usados para identificar los *taxa*. Los autores hallaron una

considerable variación genética dentro de las especies estudiadas, probablemente asociada con su estructuración geográfica y, además, encontraron los ya mencionados clados “norte o amazónico” y “sur”. Según los autores estos clados serían indicio de una antigua división dentro del género. Cabe mencionar que a este mismo resultado llegaron Murphy y col. [6], quienes elaboraron un árbol filogenético con diferentes especies de la subfamilia Tupinambinae mediante el análisis de tres genes mitocondriales (12S, 16S y ND4). Para ello emplearon muestras provenientes de museos que fueron amplificadas con dichos marcadores, así como secuencias obtenidas de *GenBank*. El árbol resultante muestra dos clados robustos; un clado incluye a las especies del actual género *Salvator* y el otro clado incluye a las especies del género *Tupinambis*, es decir, coincidentes con los clados propuestos por Fitzgerald y col. [3]. Además, como se mencionó en la Introducción General, Murphy y col. [6] hallaron nuevas especies en un conjunto de individuos que históricamente fueron agrupados dentro de la única especie *T. teguixin*.

En estudios más recientes, Cabaña y col. [48], en base al marcador mitocondrial ND4 y al nuclear ACA4, describieron la presencia de hibridación entre *T. merianae* (= *S. merianae*; Harvey y col. [5]) y *T. rufescens* (= *S. rufescens*; Harvey y col. [5]) en una zona de contacto situada en el extremo sur del rango de distribución de ambas especies, que corresponde al ecotono ubicado entre el Chaco Seco y el Espinal, en la Región Central de Argentina (Provincia de Córdoba). En un trabajo posterior, Cabaña y col., [10], emplearon los mismos marcadores para analizar la estructura genética de *S. merianae* y *S. rufescens* dentro de un marco de análisis de nicho climático, con el fin de comprender los principales factores que contribuyen a la variación de dichas especies y a la estabilidad de la zona híbrida en la provincia de Córdoba, hallando que, particularmente en *S. merianae*, tanto los factores climáticos como genéticos contribuyen a la variación de la especie.

Por otro lado, el trabajo de Wood y col. [88] es el único antecedente en el desarrollo de marcadores microsatélites específicos para *S. merianae*, en el cual los autores caracterizaron 14 marcadores microsatélites para realizar estudios genético-poblacionales. En dicho trabajo mencionan que en el año 2006 se documentó la presencia de poblaciones de *S. merianae* en algunas regiones de Estados Unidos; la especie se adaptó con tanto éxito a los nuevos ambientes que actualmente es considerada invasiva en dichas regiones. Por tal motivo, los autores desarrollaron los marcadores mencionados con el objetivo de estudiar las poblaciones de *S. merianae* y aportar información para los planes de manejo. En un trabajo posterior, Wood y col. [89], utilizaron los mismos marcadores para estudiar dos poblaciones de *S. merianae* localizadas en Florida. Los resultados indicaron que ambas se encontraban en etapas tempranas del proceso de invasión y que no se hallaban en expansión, además de que existía un alto grado de diferenciación poblacional. Los análisis de datos mostraron una baja diversidad genética en ambas poblaciones y una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el presente capítulo se describirán las técnicas empleadas para el desarrollo de nuevos marcadores microsatélites específicos para *S. merianae*, así como los procedimientos llevados a cabo para su optimización y amplificación. Estos marcadores se debieron desarrollar debido a que en la etapa inicial del presente trabajo de Tesis aún no habían sido publicados los cebadores específicos para amplificar microsatélites en *S. merianae*. Además, se describen los ajustes realizados para el empleo de los marcadores diseñados por Wood y col. [88], utilizados en una etapa posterior. También se detallará el procedimiento para la optimización y amplificación del marcador mitocondrial ND4. Todos los marcadores antes mencionados, una vez optimizados, fueron utilizados en estudios genético-poblacionales del lagarto overo en el extremo sur de su distribución.

## **II OBJETIVOS DEL CAPÍTULO I:**

- Obtener ADN a partir de diferentes tejidos de ejemplares de la especie *S. merianae*.
- Desarrollar nuevos marcadores microsatélites específicos para *S. merianae*.
- Llevar a cabo la optimización para la amplificación de marcadores microsatélites específicos para *S. merianae* desarrollados por otros investigadores.
- Ajustar las condiciones de amplificación del marcador mitocondrial ND4.

## **III MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.I Colección de muestras y obtención de ADN**

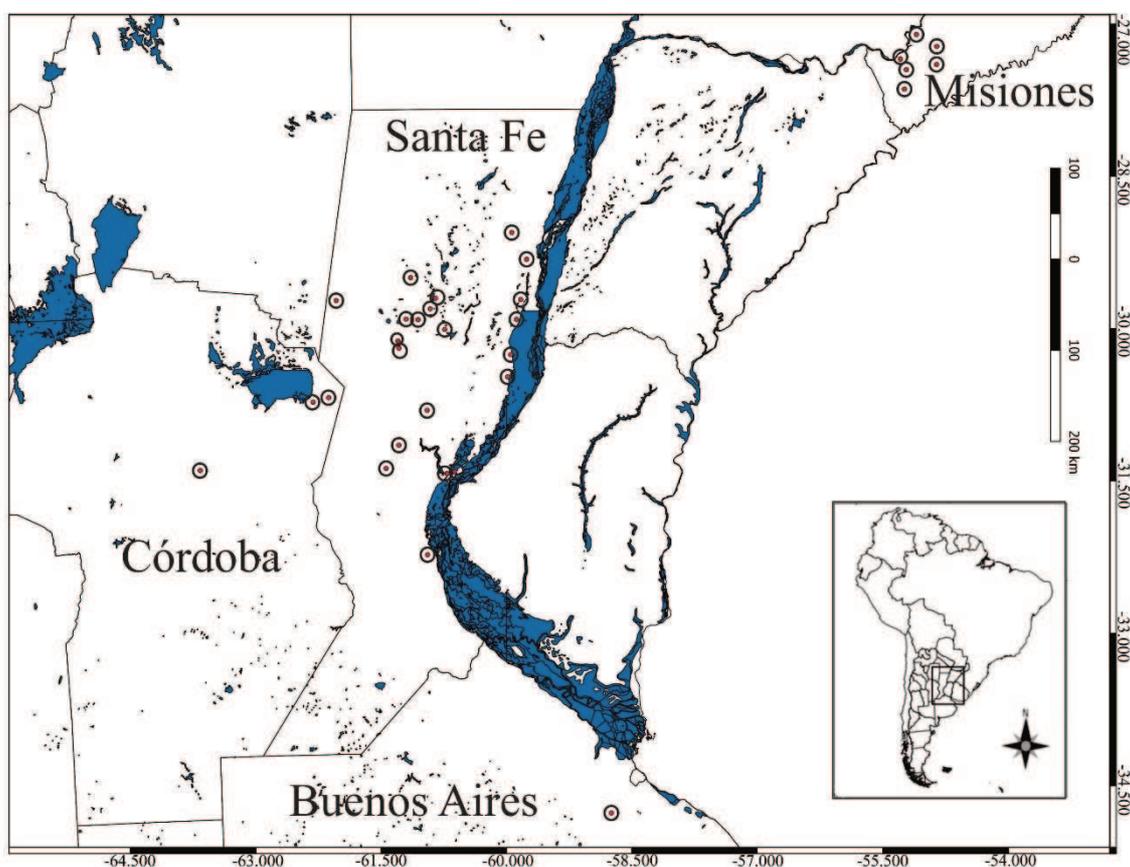
Se obtuvieron muestras de individuos provenientes de las provincias argentinas de Santa Fe, Córdoba, Misiones y Buenos Aires (Figura 11). La información detallada de los individuos muestreados se encuentra incluida en ANEXO A, cabe mencionar que en dicho ANEXO se incorporó toda la información recabada de los individuos en estudio, pero en lo que respecta al sexo de tales individuos, el mismo solo pudo determinarse en un pequeño número de adultos y en los juveniles aún no existe una metodología confiable que permita dicha determinación. Las muestras de la provincia de Santa Fe fueron obtenidas a partir de restos de individuos muertos hallados en diferentes rutas y de muestras de sangre extraídas a individuos nacidos a partir de nidos recolectados en la naturaleza en el marco del Proyecto Iguana (PI - Secretaría de Estado para el Medio Ambiente y el Desarrollo Sostenible de la Provincia de Santa Fe. Resolución Número 0031 / 07). Las muestras de tejidos provenientes de las otras provincias fueron gentilmente cedidas por los responsables de las siguientes colecciones biológicas y criadero:

- Provincia de Misiones: Laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución, Instituto de Diversidad y Ecología Animal-Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-UNC. Las capturas científicas fueron autorizadas por la Agencia de Medio ambiente y Agua de la provincia de Córdoba y la investigación fue aprobada por el comité de ética del Instituto de Diversidad y

Ecología Animal (IDEA, CONICET-UNC; número de resolución: 6/2018). Las muestras cedidas provienen de individuos que se hallaban en estado silvestre.

- Provincia de Córdoba: Colección Científica del Laboratorio de Genética Evolutiva-Facultad de Cs. Exactas, Químicas y Naturales-UNaM. Todos los permisos fueron otorgados por el Ministerio de Ecología y RNR de la provincia de Misiones (Disposición: 072, Expediente: 9910-0006/13; Disposición: 022, Expediente: 9910-00100/15). Las muestras cedidas provienen de individuos que se hallaban en estado silvestre.

- Provincia de Buenos Aires: Cañuelas *Breeding Center*: criadero de la especie que funciona en la provincia de Buenos Aires. Los individuos seleccionados para la reproducción son colectados de la naturaleza en la localidad de Cañuelas. Las muestras cedidas provienen de individuos que se hallaban en estado silvestre.



**Figura 11.** Localización de los sitios de origen de las muestras analizadas en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Misiones y Buenos Aires. Cada punto rojo representa un sitio muestreado, las elipses negras que rodean dichos puntos fueron adicionadas a fines de facilitar la visualización de los sitios en el mapa.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena caudal utilizando el método de Olson y col. [90] y se almacenaron diluidas en proporción 1:10 en un *buffer* de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM EDTA pH 8; 10 mM NaCl; 1% SDS (p/v)) que permite su conservación

a temperatura ambiente [91]. Para la extracción de ADN se aplicó el método de Murray y Thompson [92] modificado por este grupo de trabajo [93], el cual consta de los siguientes pasos:

- Colocar en un tubo de 1,5 ml tipo eppendorf, 100  $\mu$ l de la solución de sangre conservada a temperatura ambiente en *buffer* de lisis. Agregar 600  $\mu$ l de una solución de digestión (2 % (p/-v) CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,2 % (p/-v) 2-Mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 200 mM Tris-HCl pH 7,5). Homogeneizar e incubar en baño termostatzado a 60°C durante 4 horas. Cada 30 minutos homogeneizar la muestra para una mejor digestión.
- A la muestra digerida se le agregan 700  $\mu$ l de cloroformo, se homogeniza y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos.
- El sobrenadante se trasvasa a un tubo nuevo estéril y se agrega igual volumen de cloroformo. Se homogeniza y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos.
- Se repite el paso anterior una vez más.
- En un nuevo tubo estéril, al sobrenadante del paso anterior se le agregan 500  $\mu$ l de alcohol isopropílico. Se homogeniza y se lleva a -20°C por 15 minutos (pueden ser 2 horas para recuperar mayor cantidad de ADN). Luego se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos.
- Posteriormente se descarta el alcohol y se llevan los tubos a estufa de secado durante unos 20 minutos para eliminar el exceso de alcohol.
- El *pellet* resultante es resuspendido en 200  $\mu$ l de agua bidestilada estéril, que se deja reposar dos horas a temperatura ambiente para que el ADN se rehidrate y luego se almacena a -20°C hasta su utilización.

Las otras muestras de tejidos obtenidas (falanges, piel y músculo) se almacenaron en alcohol 96° y luego se obtuvo el ADN mediante el método de extracción salina [94], que consiste en:

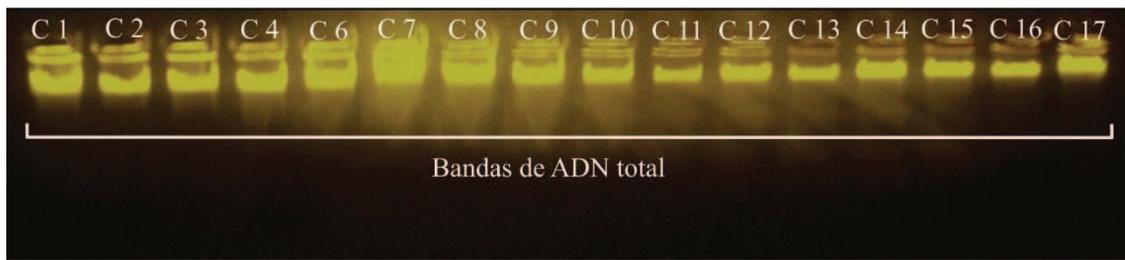
- Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un eppendorf de 1,5  $\mu$ l.
- Enjuagar brevemente con agua destilada.
- Agregar 500  $\mu$ l de *buffer* de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% de SDS y 50 mM de ClNa) y 5 a 15  $\mu$ l de proteinasa K (dependiendo de la resistencia del tejido).
- Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 horas hasta que el tejido se haya digerido.
- Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos.
- Trasvasar 500  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo limpio evitando arrastrar la fracción sólida del fondo.
- Agregar 300  $\mu$ l de ClNa 5M, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 minutos.
- Trasvasar 500-600  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a -20°C o el doble de volumen de etanol absoluto a -20°C. Agitar levemente primero, luego mezclar completamente.
- Para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20°C por 2 horas o toda la noche.

- Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos. Descartar todo el líquido sobrenadante.
- Lavar breve y cuidadosamente con unos 750  $\mu$ l de etanol 70°.
- Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
- Resuspender en 100  $\mu$ l de TE 1X o agua bidestilada estéril.
- Guardar a -20°C hasta su utilización.

### **III.II Visualización de ADN mediante la técnica de electroforesis**

Una de las metodologías más ampliamente utilizadas para el estudio de las macromoléculas es la electroforesis, en la cual las macromoléculas en solución se movilizan en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. Los geles para electroforesis pueden realizarse con agarosa o acrilamida. Ambos tipos de geles poseen poros a través de los cuales los fragmentos de ADN son obligados a pasar mediante el impulso de la corriente eléctrica hacia el polo positivo. Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de poros, mientras que los más grandes se irán retrasando. La diferencia entre un gel de agarosa y uno de acrilamida radica en el nivel de resolución, los geles de agarosa presentan poros más grandes, por lo que su nivel de resolución es menor al de los geles de acrilamida, los cuales permiten separar moléculas de ADN que se diferencien por unos pocos pares de bases [84][95].

Para la visualización del ADN obtenido luego de la extracción, se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8% en *buffer* TBE 0,5X (Tris – Ácido Bórico – EDTA) a 100V durante 15 minutos. Durante la preparación de cada gel de agarosa, se le adicionaron 7  $\mu$ l del colorante GelGreen®, el cual se une a las moléculas de ADN y puede observarse cuando es iluminado mediante luz “oscura”, para lo cual se utilizó un transiluminador (Dark Reader®) que permitió analizar la calidad e intensidad de las bandas del ADN obtenido (Figura 12). En función de la intensidad de cada banda se realizó la cuantificación de la concentración de ADN obtenida en cada una de las muestras en relación a un marcador de concentración (K 562 -Promega®) y, en base a esta cuantificación, cuando fue necesario se llevó a cabo la dilución del ADN en agua bidestilada estéril.



**Figura 12.** Gel de agarosa al 0,8 % teñido con GelGreen® que muestra las bandas correspondientes al ADN. Las calles que presentan mayor intensidad de bandas (calles 6, 7 y 8) corresponden a muestras en las que se obtuvo mayor concentración de ADN luego de la extracción.

### III.III Desarrollo de nuevos marcadores microsatélites específicos para *S. merianae*

Un segmento de ADN que se encuentra adyacente a un *locus* se denomina región flanqueante. Debido a que las secuencias de las regiones flanqueantes generalmente se conservan en individuos de la misma especie y, a veces, de diferentes especies, se pueden diseñar oligonucleótidos o cebadores que se acoplen a dicha región y guíen la amplificación del *locus* durante la PCR [84].

En el presente trabajo, para el desarrollo de nuevos marcadores microsatélites se solicitó la secuenciación parcial del genoma de la especie como servicio al Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR-CONICET-BIOCERES, [www.indear.com](http://www.indear.com)). Ésta fue realizada empleando un secuenciador 454 (ROCHE®), utilizando la técnica de pirosecuenciación.

A partir de dicha secuenciación parcial, se obtuvieron *contigs*, es decir, secuencias consenso que se componen de varias secuencias superpuestas [82]. Mediante el análisis bioinformático de los *contigs*, se detectaron 33 regiones microsatélites, empleando el programa en línea Websat [96], los cuales consistieron en secuencias repetidas de dí, tri y tetranucleótidos. A su vez, los cebadores complementarios a las regiones flanqueantes de los microsatélites hallados se diseñaron mediante el programa Primer 3 [97].

Una vez diseñados los cebadores, se empleó el programa PrimerSelect (Lasergene®, DNASTAR Inc versión 6.2), que presenta una variedad de herramientas para la selección de los mismos. Mediante dicho programa se evaluó la presencia de dímeros y bucles (*hairpins*) formados por complementariedad entre ambos cebadores y en las secuencias de cada uno de ellos individualmente. Este análisis es necesario porque, al momento del diseño de cebadores, se busca evitar la formación de las estructuras secundarias antes mencionadas, ya que su presencia disminuye la eficiencia de amplificación de los cebadores durante la PCR. Mediante estos análisis se seleccionaron doce pares de oligonucleótidos para la posterior etapa de optimización (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los doce marcadores microsatélites seleccionados. Se describe el nombre de cada uno, la secuencia de los cebadores en dirección 5' a 3', el motivo de la repetición de la región microsatélite a amplificar y el tamaño molecular estimado del fragmento blanco.

<i>Locus</i>	Secuencia del cebador (5'-3')	Motivo de la repetición	Tamaño molecular aproximado (pb)
Smer159	F- GGGATGGTCTTCCTCATGTCTA R- AATAACCTTGTAAGCCGCTTTG	GGA	400
Smer23	F- GACACACGGCAATTTATCAAGA R- CCAAATAGACCGAAGACTCTCTG	GT	400
Smer157	F- GCAGCCTTCTCAGTGTCCTA R- GGTTAGCGTGTCAGACTCTTATCT	GGA	400
Smer01	F- TCTGGATGAGGGAGTTGAGG R- GCGATCTGGACTCTATGCTTCT	AG	350
Smer04	F- TGGAGAAGACTACAGATGGTGAGA R- GGATAGGTAGTTTGGCATTG	TC	200
Smer240	F- CTTTATGGGTGCCAAATGTGTA R- TGTAACCTGCCCTGAGACCT	TTTA	180
Smer211	F- GCAGTGGACTAGCAGGTCTG R- GGCTTGAGTGTGTTGCGTTT	TA	350
Smer55	F- GCTCTGTGGTTGGAGGAGGAG R- CCAAACAGGCGCAGTTTATT	AG	180
Smer77	F- AGATGTGGCCCTCCTGGTTA R- GGCTTCAGCATTCCAGTTAATC	TGT	350
Smer629	F- ACCTAGTACCCATGTCATCATTGG R- CGCACAAACACACACGTACC	GT	100
Smer146	F- GGATCATGCTGCAATGGAATT R- TCTCCTGATGTGCCATATCTCTT	TA	250
Smer674	F- CCCACACAAGTAATAAGGGATGTG R- ATGTTGCAGATCGATCTATCTATCT	GGAT	100

Durante la etapa de optimización de estos marcadores para su uso en PCR, en una primera instancia se intentó amplificar las muestras con la técnica de PCR convencional, pero debido a la dificultad encontrada en cuanto a la obtención de productos inespecíficos, se procedió al empleo de la técnica de *Touchdown* PCR (TD-PCR). Esta técnica fue desarrollada para evitar la unión defectuosa de los cebadores y el principio clave en dicha técnica es emplear, en la reacción de PCR, diferentes temperaturas de *annealing* que van decreciendo, comenzando con una temperatura por encima de la temperatura de *melting* ( $T_m$ : temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ADN son monocatenarias y la otra mitad bicatenarias) y luego utilizando temperaturas de *annealing* más bajas en forma gradual. Este enfoque explota la naturaleza exponencial de la PCR, donde las primeras etapas de *annealing* y amplificación son las más críticas para producir el producto deseado [98]. Entonces, la técnica de TD-PCR consta de dos fases: la fase 1 consiste en un programa de ciclado de unos 10 a 15 ciclos que comienza con una temperatura de *annealing* por encima de la  $T_m$  del cebador que está siendo utilizado, cambiando luego a un gradiente de temperaturas más bajas en el transcurso de los ciclos sucesivos, mientras

que la fase 2 es una etapa de amplificación típica de 20 o 25 ciclos que utiliza la temperatura final de *annealing* alcanzada en la fase 1 [98].

Para el ciclado se utilizó el protocolo de TD-PCR propuesto por Crawford y col. [99] con algunas modificaciones (Tabla 2). En cada reacción de PCR, la mezcla de PCR estuvo constituida por: *buffer* PCR 1X (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mezcla de dNTPs 0,25 mM, 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (PB-L®), entre 0,24 a 0,28 nanomoles de cada cebador (*forward* y *reverse*), y 1 a 1,5 µl de ADN (50 ng/µl). El volumen final de la reacción fue de 20 µl. Es importante mencionar que por cada conjunto de muestras amplificado también se empleó un control negativo, que consistió en un tubo eppendorf conteniendo la mezcla de PCR sin ADN, con el objetivo de comprobar que no existiera contaminación con ADN foráneo en los reactivos y/o materiales durante el desarrollo de la técnica. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador en gradiente de 96 pocillos para programar las condiciones de ciclado requeridas (*PCR GeneMate Series B960*®).

**Tabla 2.** Características del ciclado de la TD-PCR modificada a partir de Crawford y col. [99]. Se detalla la etapa de cada ciclo, la temperatura de cada una de las etapas y el tiempo requerido por cada una de ellas.

Número de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de cada etapa
	Desnaturalización inicial	94	4 minutos
5	Desnaturalización	94	20 segundos
	<i>Annealing</i>	La temperatura más alta según el cebador	30 segundos
	Extensión	72	1 minuto
21 (gradiente de temperatura)	Desnaturalización	94	30 segundos
	<i>Annealing</i>	A la temperatura más alta se le restan 0,5°C en cada ciclo	30 segundos
	Extensión	72	1 minuto
10	Desnaturalización	94	30 segundos
	<i>Annealing</i>	La temperatura más baja alcanzada luego del gradiente	30 segundos
	Extensión	72	1 minuto
	Extensión final	72	10 minutos

### III.IV Optimización de marcadores microsatélites específicos para *S. merianae* desarrollados por otros autores

Además de los marcadores desarrollados en el laboratorio, se decidió ampliar el conjunto de marcadores a analizar mediante la utilización de cebadores desarrollados para la especie *S. merianae* por Wood y col. [88]. Para ello se procedió a elegir los mejores marcadores en lo que respecta a evitar la formación de dímeros y bucles en sus cebadores, mediante el programa PrimerSelect v6.2.

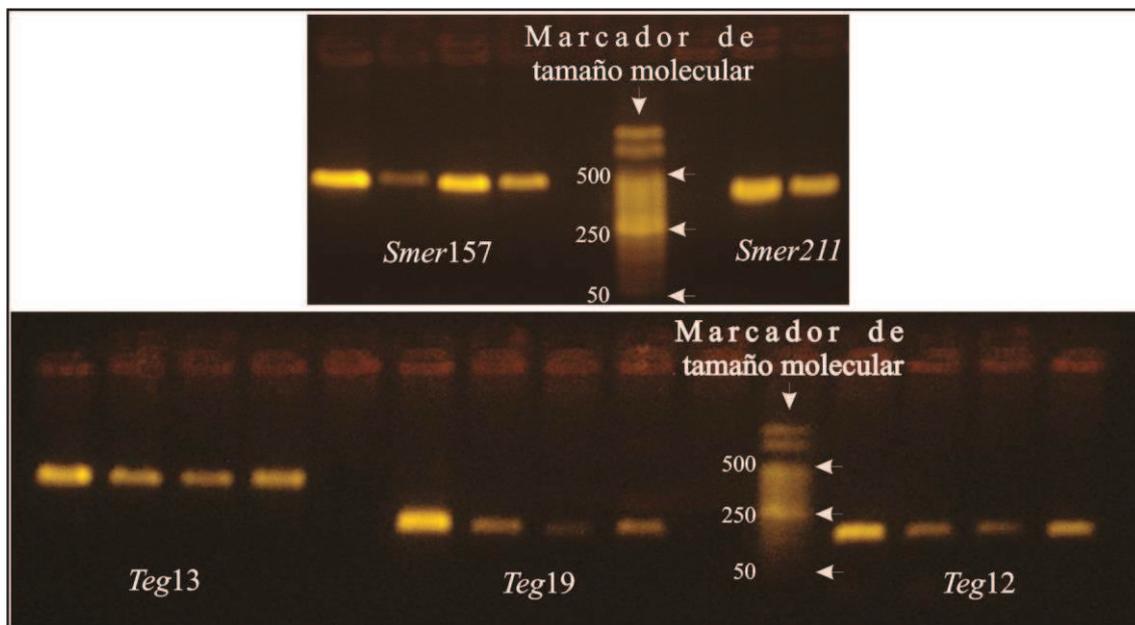
Una vez seleccionados por sus mejores características, ocho cebadores considerados apropiados (Tabla 3) fueron empleados en la amplificación de muestras. Cabe mencionar que, a pesar de que Wood y col. [88] emplearon TD-PCR en la amplificación con sus marcadores, en el presente trabajo la amplificación resultó más eficiente a través de una PCR convencional, la cual consistió en: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos que implican desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* cuya temperatura varió según el marcador utilizado y con una duración de 30 segundos, extensión a 72°C por 40 segundos y una extensión final a 72°C por 15 minutos. Para las reacciones de PCR se utilizó la misma solución madre previamente descrita y se emplearon termocicladores en gradiente de 96 pocillos (Marcas Bioer Life Express® y PCR GeneMate Series B960®).

**Tabla 3.** Características de los ocho marcadores microsatélites desarrollados por Wood y col. [88] seleccionados. Se describe el nombre de cada uno, la secuencia de los cebadores en dirección 5´a 3´, el motivo de la repetición de la región microsatélite y el tamaño molecular estimado del fragmento a amplificar en pares de bases.

<i>Locus</i>	Secuencia de cebadores (5´-3´)	Motivo de la repetición	Tamaño molecular aproximado (pb)
<i>Teg7</i>	F- CAGCATCCATGAGACTTGCG R- GGATGCAGCTTATAACCAGCC	AC	400
<i>Teg10</i>	F- GAGGGCAGCAAGGTTGAAG R- GCACAGGCTGAACTCGTTG	AC	300
<i>Teg12</i>	F- AGGTGCAACGCTGGAAATG R- GTCGCCTGCGCTTTCTATG	AC	150
<i>Teg13</i>	F- ATGGCCTTCCTCCCAACTC R- GCACAGCGGTAATCCAAGC	GTT	420
<i>Teg14</i>	F- CCCTCCACGGTTTCAGAGG R- AGGAGAACTGGGCATGCTG	AGC	200
<i>Teg17</i>	F- ACCACGACAAGGGAATCGG R- GACTTGTGCCAGGATGCAG	ATCT	340
<i>Teg19</i>	F- CTCTGTGTGGGCATTGCAG R- ACCCACCCTGAAACCTTCG	ATTT	350
<i>Teg20</i>	F- AGATCCCTCAGTCTCATGTGG R- TCTGAGAGCCTTCTGGCTG	CATT	130

### III.V Visualización de los productos de PCR mediante la técnica de electroforesis

Los productos de PCR obtenidos fueron primero evaluados en geles de agarosa al 2% para confirmar que las bandas obtenidas presentaran el tamaño molecular adecuado, mediante la comparación de las mismas con un marcador de tamaño molecular de 50 pb (Invitrogen®) (Figura 13).

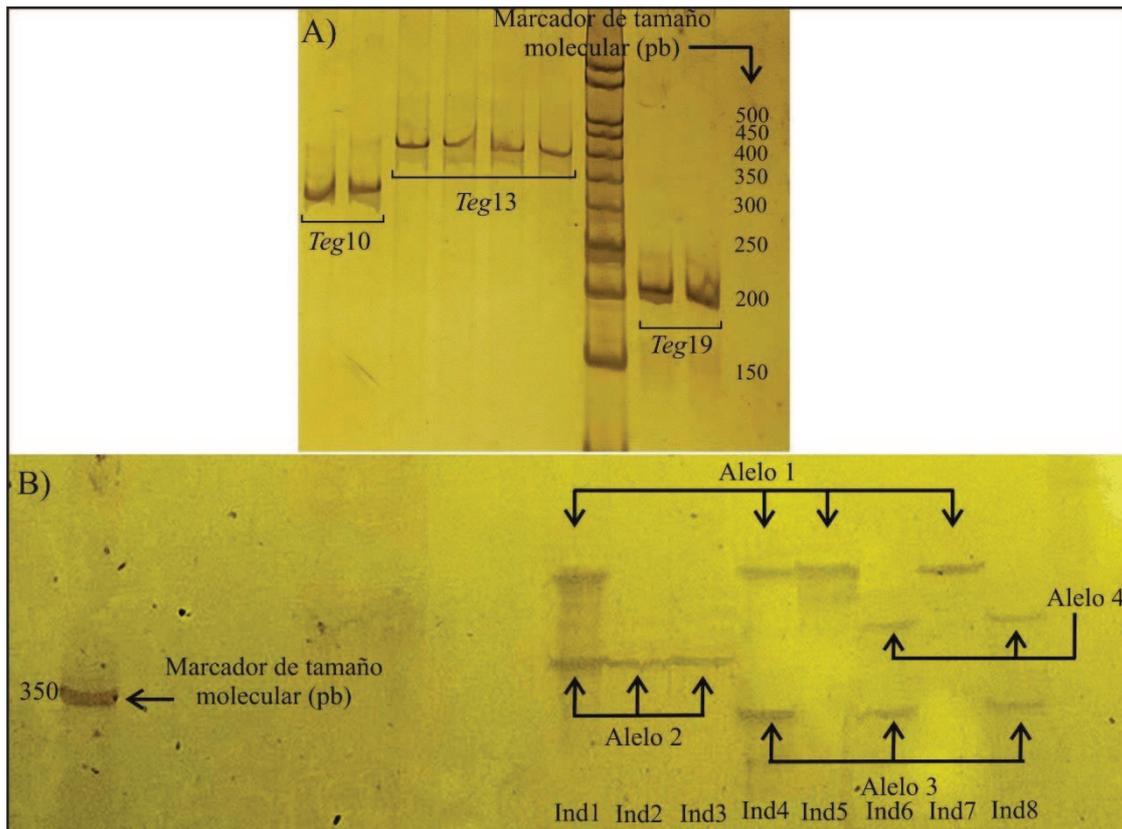


**Figura 13.** Geles de agarosa al 2 % teñidos con GelGreen® que muestran las bandas correspondientes a los productos amplificados. Se observa la migración diferencial de las bandas dependiendo del tamaño molecular del marcador microsatélite utilizado en la amplificación. En las calles donde no se observan bandas fue sembrado el control negativo.

Luego de este paso, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida para aumentar el nivel de resolución del análisis y así poder determinar la presencia o ausencia de polimorfismo en las muestras amplificadas con los marcadores analizados. En un principio se realizaron corridas electroforéticas de los productos de PCR en geles de poliacrilamida de una concentración del 6%, en *buffer* TBE al 1X y a 150V durante aproximadamente 1 hora, usando un marcador de tamaño molecular de 50 pb (Invitrogen®). Los geles fueron luego teñidos en solución de nitrato de plata para el revelado de las bandas amplificadas [100] y fotografiados con cámara digital marca Olympus C-5000, con una resolución de 5.0 Mega pixels, usando el modo macro. Estos geles permitieron corroborar con más precisión el tamaño molecular del producto amplificado y, además visualizar la especificidad de los productos obtenidos, ya que, si luego del revelado se observaba una sola banda bien definida en el gel, del tamaño adecuado, se podía deducir que las condiciones de amplificación empleadas eran las óptimas (Figura 14-A).

Sin embargo, para la visualización de polimorfismo en las muestras se requirió una mayor resolución de los geles a emplear, por lo que se elaboraron geles de poliacrilamida al 10%, y las

corridas se realizaron en *buffer* TBE al 0,5X y a 2200V durante aproximadamente 3 horas y 30 minutos empleando un marcador de tamaño molecular de 10 pb (Invitrogen®). Los geles también fueron teñidos con nitrato de plata y fotografiados con cámara digital marca Olympus C-5000, con una resolución de 5.0 Mega pixels, usando el modo macro. La edición y análisis de las fotografías (conteo de alelos) se llevó a cabo mediante el empleo del programa Corel PHOTOPAINT® versión 12.0 (© 2003 Corel Corporation). El tamaño de los alelos fue determinado mediante la comparación de las bandas amplificadas con el marcador de tamaño molecular incluido en cada corrida (Figura 14-B).



**Figura 14.** A) Fragmento de un gel de poliacrilamida al 6% en donde se observa la especificidad del producto amplificado y el tamaño molecular de las bandas correspondientes a los marcadores Teg10, Teg13 y Teg19. B) Fragmento de un gel de poliacrilamida al 10% en donde se observan las bandas correspondientes a los alelos para el marcador Teg14. En este caso se hallaron 4 alelos en las 8 muestras analizadas, presentando los individuos 1, 4, 6 y 8, genotipo heterocigota y los individuos 2, 3 y 5, genotipo homocigota.

### III.VI Marcaje con fluorescencia de los marcadores microsatélites y genotipificación

Una vez que se determinó cuáles marcadores presentaban mayor especificidad al momento de la amplificación y que a la vez mostraban polimorfismo en las muestras analizadas (ver Tabla 4 en la sección Resultados y Conclusiones), se procedió a la modificación por fluorescencia de los cebadores *forward* de dichos marcadores. El marcado de los cebadores con tintes fluorescentes permite que el secuenciador automático detecte bandas mediante un láser que

escanea el gel donde se siembran los productos de PCR. Luego el programa del secuenciador convierte el patrón de bandas en un gráfico con picos, cuya posición a lo largo del eje X corresponde al tamaño del producto de PCR medido en pares de bases y su altura/intensidad corresponde a la concentración del producto [84].

Para la asignación de colores de los fluoróforos a cada cebador a marcar, se empleó el programa Multiplex Manager versión 1.2 [101], que diseña combinaciones eficientes de marcadores genéticos para PCRs múltiples. El objetivo de este análisis fue poder enviar a secuenciar los productos de diferentes marcadores de una muestra en un mismo pocillo en la placa de secuenciación. Uno de los elementos cruciales para diferenciar productos de PCR provenientes del uso de diferentes cebadores que posean el mismo rango de tamaño de alelos, es utilizar el marcaje de cebadores con fluorescencia, y Multiplex Manager tiene la capacidad de asignar a los marcadores un color diferente si su rango de tamaño de alelos se superpone [101]. Los fluorocromos empleados para el marcado de los cebadores fueron PET (rojo), HEX (verde), FAM (azul) y TAMRA (amarillo), mientras que para el marcador de tamaño molecular se empleó el fluorocromo Orange (naranja).

Luego los cebadores marcados fueron a su vez sometidos a las diferentes etapas de optimización para su uso en PCR previamente descritas, y los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida para corroborar que las condiciones de amplificación no se hayan modificado. Si esto ocurría se ajustaban nuevamente las características de la amplificación en cuanto a temperaturas de *annealing*.

Finalizada esta segunda etapa de optimización y establecidas las condiciones definitivas de amplificación para cada cebador, se envió un pequeño *set* de muestras amplificadas a la empresa Macrogen Inc. de Corea del Sur, la cual realizó el servicio de secuenciación mediante un secuenciador automático ABI 3730 (*Applied Biosystems*®). Una vez recibidos los resultados, se llevó a cabo la genotipificación de dichas muestras mediante el empleo del programa Peak Scanner® versión 1.0 (*Applied Biosystems*), que permite asignar tamaños moleculares a las regiones amplificadas, todo esto con el objetivo de corroborar la correcta amplificación de los fragmentos obtenidos mediante el uso de cada uno de los marcadores microsatélites.

### **III.VII Optimización del marcador de ADN mitocondrial**

Las secuencias de los cebadores para amplificar el gen ND4 en las muestras de *S. merianae* fueron obtenidas a partir del trabajo de Forstner y col. [102]: ND4-5`TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC 3` (*forward*) y LEU-5`TA CTT TTA CTT GGA TTT GCA CCA 3` (*reverse*). Estos oligonucleótidos amplifican la parte final del gen NADH-deshidrogenasa subunidad 4, las secuencias completas de los genes ARNt-His y ARNt-Ser y una secuencia parcial (inicial) del gen ARNt-Leu (Figura 15).



pertenecientes al género *Salvator* depositadas en GenBank, base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando para ello el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul y col. [106]). También se realizó la traducción de dichas secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos y se llevó a cabo la alineación con secuencias proteicas depositadas en la misma base de datos mediante el programa BLAST. Esto último se llevó a cabo también para confirmar que se estaba trabajando con la secuencia del gen codificante objetivo.

## **IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

### **IV.I Resultados**

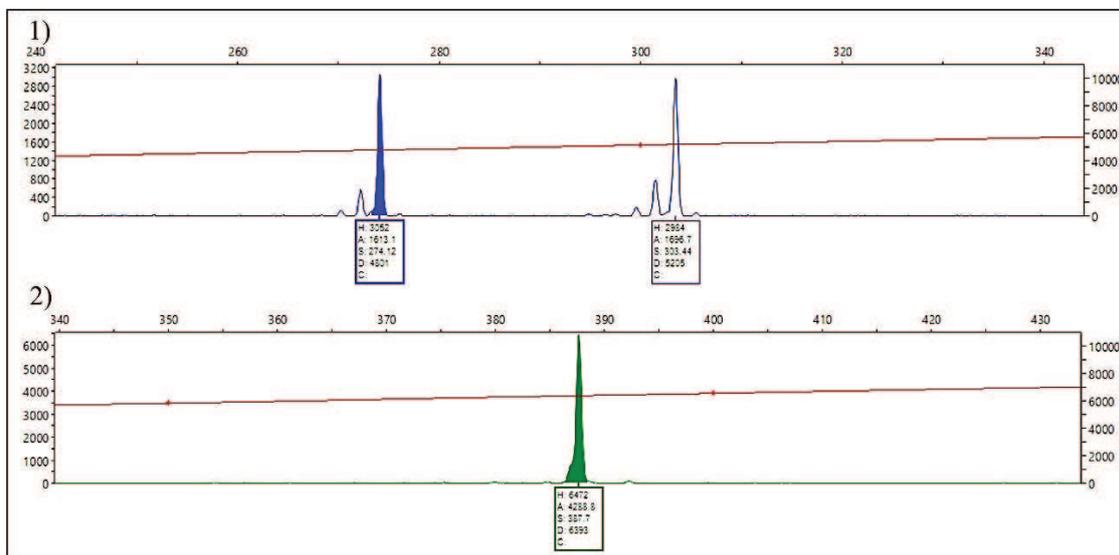
#### **IV.I.I Marcadores microsatélites**

Se decidió utilizar cuatro de los marcadores desarrollados en nuestro laboratorio. El primer criterio para la selección de estos marcadores fue su polimorfismo: un marcador fue considerado polimórfico cuando presentó dos o más alelos en los individuos analizados. El segundo criterio para la selección de los marcadores fue su factibilidad de amplificación, ya que para algunos de los marcadores utilizados no se lograron eliminar los productos inespecíficos luego de la amplificación, por lo que dichos marcadores fueron descartados de los análisis. Empleando estos criterios ocho de los doce marcadores desarrollados en la presente Tesis fueron descartados por ser monomórficos, por poseer producto inespecífico o por presentar ambas características. Por otro lado, entre los ocho marcadores desarrollados por Wood y col. [88], uno de ellos resultó monomórfico y otro no se logró optimizar. Por lo tanto, se obtuvo un conjunto final de diez marcadores que presentaron variación en cuanto a la temperatura de *annealing*, rango de alelos detectados y en el tipo de técnica de PCR apropiada para la correcta amplificación de las muestras (Tabla 4). Además, la elección de los fluorocromos para cada uno de los marcadores permitió el análisis, en un solo pocillo de la placa de genotipificación, de entre cuatro y seis cebadores, agilizando tiempos y reduciendo el costo del análisis de las muestras.

**Tabla 4.** Marcadores microsatélites seleccionados luego de su optimización. Se describe el nombre de cada marcador, la secuencia en dirección 5´ a 3´ de los cebadores, el motivo de la repetición de la región microsatélite, la temperatura de *annealing* en °C para cada uno, el rango de tamaño molecular hallado en las muestras analizadas, el fluorocromo con el que se marcó al cebador *forward*, el tipo de técnica de PCR adecuado para la correcta amplificación del fragmento de interés y el autor que desarrolló cada marcador.

<i>Locus</i>	Secuencia del cebador (5'-3')	Motivo de la repetición	Tº de <i>annealing</i> (°C)	Rango de alelos	Fluorocromo (color)	Técnica de PCR	Autor
<i>Smer23</i>	F-GACACACGGCAATTTATCAAGA R-CAAATAGACCGAAGACTCTCTG	GT	62	400-418	PET (rojo)	Convencional	Imhoff y col. [105]
<i>Smer157</i>	F- GCAGCCTTCTCAGTGTCCTA R-GTTAGCGTGTGACTCTTATCT	GGA	64	398-449	HEX (verde)	TD-PCR	Imhoff y col. [105]
<i>Smer159</i>	F- GGGATGGTCTTCCTCATGTCTA R- AATAACCTTGTAAGCCGCTTTG	GGA	52	384-456	FAM (azul)	TD-PCR	Imhoff y col. [105]
<i>Smer240</i>	F- CTTTATGGGTGCCAAATGTGTA R- TGTAACCTGCCCTGAGACCT	TTTA	64	164-112	HEX (verde)	TD-PCR	Imhoff y col. [105]
<i>Teg7</i>	F- CAGCATCCATGAGACTTGCG R- GGATGCAGCTTATAACCAGCC	AC	54	205-227	TAMRA (amarillo)	Convencional	Wood y col. [88]
<i>Teg10</i>	F- GAGGGCAGCAAGGTTGAAG R- GCACAGGCTGAACTCGTTG	AC	59	272-306	FAM (azul)	Convencional	Wood y col. [88]
<i>Teg13</i>	F- ATGGCCTTCCTCCCAACTC R- GCACAGCGGTAATCCAAGC	GTT	57	383-419	HEX (verde)	Convencional	Wood y col. [88]
<i>Teg14</i>	F- CCCTCCACGGTTTCAGAGG R- AGGAGAACTGGGCATGCTG	AGC	54	292-319	TAMRA (amarillo)	Convencional	Wood y col. [88]
<i>Teg19</i>	F- CTCTGTGTGGGCATTGCAG R- ACCCACCCTGAAACCTTCG	ATTT	63	184-208	HEX (verde)	Convencional	Wood y col. [88]
<i>Teg20</i>	F- AGATCCCTCAGTCTCATGTGG R- TCTGAGAGCCTTCTGGCTG	CATT	54	142-158	FAM (azul)	Convencional	Wood y col. [88]

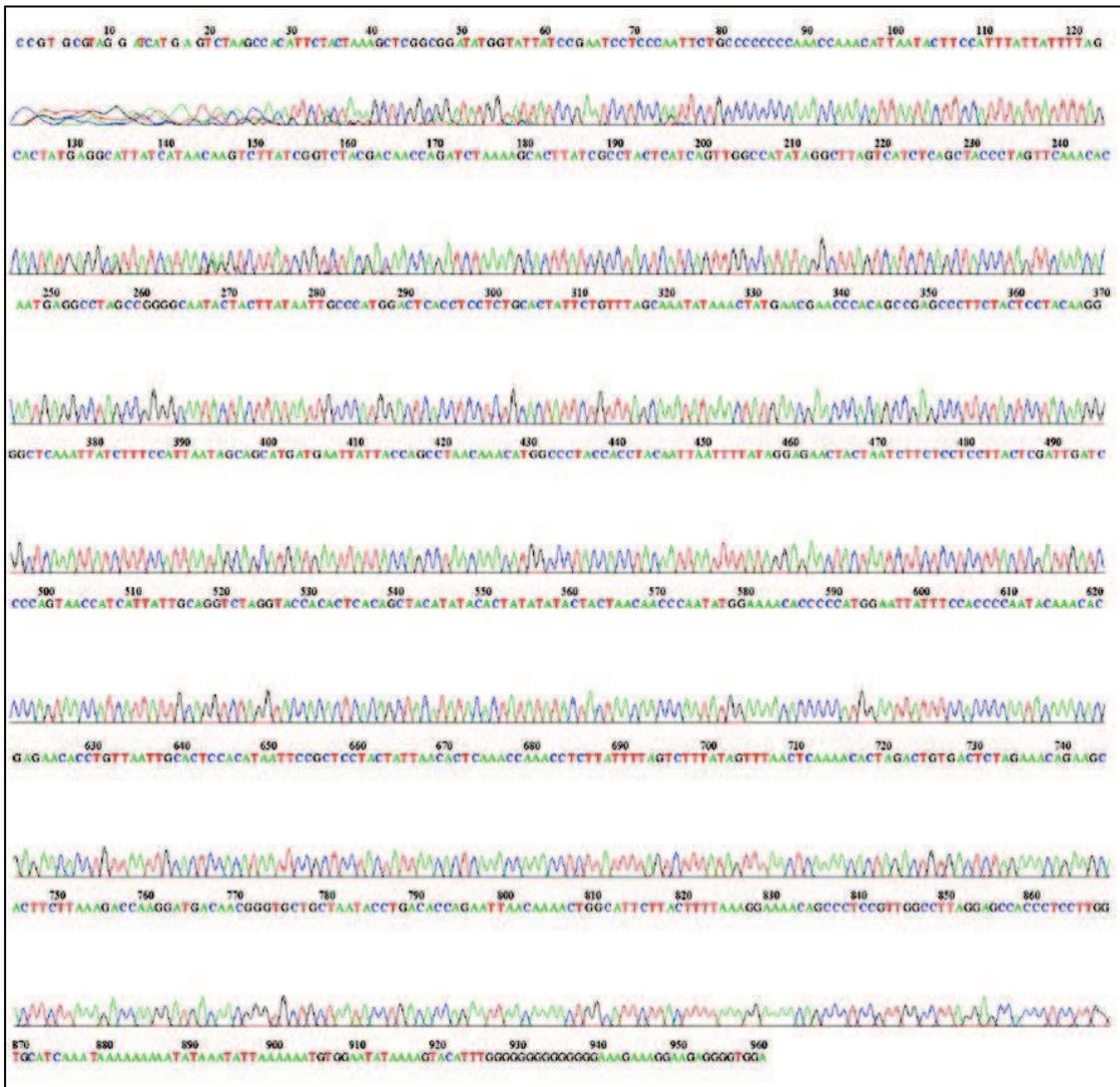
Los marcadores seleccionados mostraron una correcta definición de los alelos. A modo de ejemplo, en la Figura 16 puede verse el diagrama resultante del análisis con el programa Peak Scanner de una muestra amplificada con dos de los marcadores utilizados: se observan los picos correspondientes a los alelos, el tamaño molecular de los mismos (eje X) y la intensidad de la señal (eje Y).



**Figura 16.** Diagrama obtenido empleando el programa Peak Scanner. 1) El fluorocromo color azul pertenece al marcador *Teg10*, se puede observar que el genotipo del individuo analizado es heterocigota y que los tamaños moleculares de los alelos son de 274 y 304 pb. 2) El fluorocromo color verde pertenece al marcador *Teg13*, en este caso el genotipo del individuo es homocigota, con un único alelo de 386 pb.

#### IV.I.II Marcador mitocondrial

En lo que respecta al marcador mitocondrial del gen ND4, se obtuvieron 93 secuencias de buena calidad, cuyos extremos (aproximadamente 150 pb) fueron eliminados por presentar baja calidad de secuenciación, obteniendo así fragmentos de un tamaño final de 811 pb. A modo de ejemplo, en la Figura 17 puede observarse el electroferograma resultante de la secuenciación de una muestra de lagarto overo. El cromatograma o electroferograma es un archivo generado por el secuenciador automático en el cual se observa una serie de picos de distintos colores, cada uno de los cuales corresponde a un tipo de nucleótido de ADN diferente, permitiendo de esta manera deducir la secuencia analizada y analizar la calidad de la misma en base a la altura y definición de los picos obtenidos.



**Figura 17.** Cromatograma obtenido a partir de la secuenciación automática de una muestra de lagarto overo amplificada con el marcador ND4. Pueden observarse los picos de diferentes colores correspondientes a cada uno de los nucleótidos de ADN, y la baja calidad de los mismos en los extremos de la secuencia, por lo cual estos fragmentos fueron luego eliminados.

El análisis mediante BLAST de las secuencias pertenecientes a *S. merianae* traducidas a proteínas, dio como resultado que la secuencia analizada corresponde a un fragmento del gen que codifica para la subunidad 4 de la enzima *NADH-deshidrogenasa*, con un porcentaje de identidad superior al 90% con respecto a las especies *S. merianae* y *S. rufescens*.

Luego, a través del alineamiento con BLAST de las secuencias de aminoácidos pudo observarse una clara diferenciación entre los grupos de secuencias: 49 secuencias correspondieron, con un valor del 99% de identidad, a la especie *S. merianae*. A su vez, tres secuencias, obtenidas a partir de individuos fenotípicamente clasificados como lagarto overo, correspondieron en un 99% de identidad a *S. rufescens*, dos de estas últimas provenientes de muestras de individuos de la Provincia de Córdoba y una de un individuo de la zona centro de la

provincia de Santa Fe. Es muy probable que este hecho sea resultado de un evento de hibridación introgresiva, por lo tanto, dichas secuencias no fueron utilizadas en los análisis posteriores, ya que no pertenecen a *S. merianae* (en el ANEXO B puede observarse la agrupación de dichas secuencias junto con otras secuencias obtenidas de GenBank pertenecientes al gen ND4 de *S. rufescens*).

Por otro lado, y sorprendentemente, para 41 secuencias el alineamiento en BLAST indicó que poseen un 81% de identidad con *S. merianae* y *S. rufescens*, y sus secuencias se diferencian notablemente de las de ambas especies del género *Salvator*. Es importante tener en cuenta que las muestras correspondientes a dichas secuencias “incógnita”, fueron colectadas a partir de individuos provenientes de la provincia de Santa Fe y de Buenos Aires y que fueron clasificados fenotípicamente como *S. merianae*. Por otro lado, la traducción a proteínas de dichas secuencias también indicó que pertenecen a un fragmento del gen ND4, con un porcentaje de identidad de entre 82 y 84% con secuencias de proteínas pertenecientes a las especies *S. merianae*, *S. rufescens*, *T. teguixin* y *T. quadrilineatus*. Cabe mencionar que, por cuestión de practicidad y en base al desconocimiento del estatus del grupo de secuencias antes mencionado, se decidió denominar a dichas secuencias incógnita como “*Salvator sp.*”.

#### **IV.II Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que la metodología empleada para el procesamiento y obtención de ADN a partir de muestras de sangre y otros tejidos (falanges, piel y músculo), resultó adecuada para la especie objeto de estudio ya que se lograron obtener concentraciones adecuadas de ADN.

A su vez, los marcadores moleculares nucleares desarrollados en el laboratorio y los obtenidos a partir del trabajo de Wood y col. [88], además del marcador mitocondrial ND4, fueron exitosamente optimizados, por lo que se consideran herramientas adecuadas y útiles para el análisis de las muestras de lagarto overo.

A partir de los resultados antes expuestos se considera que los objetivos propuestos en este Capítulo fueron alcanzados.

## 5. CAPÍTULO II: ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y GENÉTICO-POBLACIONAL EMPLEANDO EL MARCADOR MITOCONDRIAL

### I INTRODUCCIÓN

#### I.I Análisis filogenético

Una de las concepciones fundamentales de la biología es que los seres vivos contemporáneos están conectados genéticamente entre sí y que descienden de ancestros comunes más o menos alejados en el tiempo. Por lo tanto, el propósito de la reconstrucción filogenética es tratar de inferir las relaciones de parentesco o de ancestría-descendencia de un conjunto de unidades taxonómicas operativas (OTUs, por sus siglas en inglés: *Operational Taxonomic Units*; término que representa diferentes tipos de *taxa* comparables, por ejemplo, una familia de organismos, individuos o cepas de virus de una sola especie o de diferentes especies [108][109]).

Una filogenia generalmente se representa con la figura de un “árbol” que contiene nodos conectados por ramas. Cada rama representa la persistencia de un linaje genético a través del tiempo y cada nodo constituye el nacimiento de un nuevo linaje. Si el árbol representa la relación entre un grupo de especies, entonces los nodos constituyen eventos de especiación. En el caso de un árbol génico elaborado a partir de la información de secuencias muestreadas en una población, los nodos representan eventos de aparición de mutaciones en individuos que son ancestrales a la muestra de interés [110].

Existen diferentes métodos para reconstruir una filogenia a partir de datos genéticos:

- Métodos de Distancia: se basan en las medidas de diferentes caracteres evolutivos obtenidas en los *taxa*, y las diferencias que existan en dichas medidas entre todos los pares de *taxa*. Estas medidas de distancia se pueden calcular a partir del número de diferencias de nucleótidos si se trata de secuencias de ADN, o en estimaciones basadas en datos de frecuencia de alelos si se trata de aloenzimas o microsatélites. El objetivo es construir un árbol que refleje con precisión la cantidad de cambios genéticos que se han producido entre los pares de *taxa*. Las longitudes de las ramas reflejan la distancia evolutiva entre dos puntos en un árbol y en las ramas que se ubican de manera adyacente se encuentran aquellos linajes que se han diferenciado más recientemente de un ancestro común [82].

- Método de Máxima Parsimonia: tiene como objetivo encontrar la topología del árbol para un conjunto de secuencias alineadas, que se pueda explicar con el menor número de cambios (sustituciones nucleotídicas) posibles entre dichas secuencias. Para una topología particular, el algoritmo deduce para cada posición (nucleótido) de la secuencia el número mínimo de cambios requeridos a lo largo de sus ramas para explicar los estados observados en los nodos terminales. Cuando se ha evaluado un número razonable de topologías, el árbol que requiere el número mínimo de cambios se selecciona como el árbol de máxima parsimonia [109].

Los siguientes dos métodos para reconstruir filogenias que se describen a continuación, tienen en cuenta, además del árbol más probable, los **modelos de sustitución**. Estos modelos

describen cómo están ocurriendo los procesos de evolución molecular: son métodos de corrección de distancias, utilizados para convertir las distancias observadas en medidas de distancia evolutiva verdadera, ya que las distancias observadas pueden subestimar la verdadera magnitud del cambio evolutivo, debido a que, por ejemplo, en un determinado sitio pueden haber ocurrido múltiples eventos mutacionales que no están siendo percibidos [108][111]. La idea fundamental de los modelos de sustitución es que ciertas sustituciones pueden ser más frecuentes que otras. En el caso del ADN, las transiciones (cambio de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina) son más frecuentes que las transversiones (cambio de una purina por una pirimidina) porque implican menor costo energético [108].

Los dos métodos que consideran los modelos de sustitución son:

- Método de Máxima Verosimilitud: Tiene en cuenta no sólo al árbol filogenético que tenga la mayor probabilidad de producir las secuencias observadas, sino también un modelo de evolución apropiado para los datos y que describa la probabilidad relativa de eventos que pueden ser invisibles a lo largo de una rama [111]. La probabilidad de observar los datos cambiará dependiendo de los valores que tomen los parámetros del modelo, por lo tanto, se trata de escoger el valor de un parámetro que maximice la probabilidad de observar los datos actuales de los caracteres en estudio [108].

- Métodos Bayesianos: En este caso, la hipótesis óptima es la que maximiza la probabilidad *a posteriori*. La probabilidad *a posteriori* de una hipótesis es proporcional a la verosimilitud multiplicada por la probabilidad previa (*prior probability* o *prior*) de esa hipótesis. Las probabilidades previas de diferentes hipótesis representan las suposiciones de los científicos antes de haber analizado los datos, dichas *priors* derivan de información previa obtenida a partir de conocimientos generales o de experimentos anteriores [111]. Entonces, la inferencia bayesiana utiliza algoritmos (generalmente los algoritmos del método de Monte Carlo con cadenas de Markov -MCMC por sus siglas en inglés), junto con los datos (por ejemplo una matriz de secuencias) y el modelo de evolución, generando así una distribución *a posteriori* para un parámetro, basada en el *prior* que se estableció para ese parámetro, buscando de este modo maximizar la probabilidad *a posteriori* de los árboles, es decir la probabilidad de que un árbol dado sea el que describe correctamente la historia de las muestras que se están estudiando [82]. Las ventajas del método bayesiano radican en que permite saber cuáles son los clados mejor soportados estadísticamente, y además posibilita el uso de complejos modelos evolutivos que incluyen datos de secuencias moleculares, datos de patrones obtenidos con enzimas de restricción y datos morfológicos.

Los MCMC son algoritmos de simulación estocástica a través de los cuales se cambian valores en los parámetros y se estima la probabilidad *a posteriori* de los árboles muestreados del espacio de todos los modelos posibles. Las cadenas parten de un estado al azar (árbol al azar) y se van proponiendo nuevos estados, es decir, árboles con diferentes características topológicas o

con nuevos valores de parámetros del modelo evolutivo. En cada paso o generación el cambio propuesto se acepta o rechaza en función del valor de la razón entre las probabilidades *a posteriori* de los estados actual y anterior. Luego de unas fases de “calentamiento” (*burnin*), que se descartan debido a que en ellas la probabilidad *a posteriori* de los árboles es baja como resultado de las combinaciones de características aleatorias, se llega a una fase estacionaria de convergencia donde los árboles muestreados tienen una probabilidad *a posteriori* elevada. Finalmente, estos árboles son resumidos y promediados en un árbol consenso definitivo [109][112].

Los métodos bayesianos y los de máxima verosimilitud son similares en el sentido de que ambos requieren plantear un modelo explícito de cambio de caracteres y en que los árboles más probables son aquellos que son consistentes tanto con ese modelo como con los datos del alineamiento. Además, otra característica importante de ambos modelos es que son robustos estadísticamente [108].

Las filogenias son herramientas extremadamente útiles, no sólo para establecer relaciones genealógicas entre un grupo de organismos o partes de ellos (por ejemplo, genes), sino que también se aplican en una gran variedad de investigaciones [113]. Por ejemplo, se utilizan para determinar la edad y la tasa de diversificación de los *taxa* para comprender la historia evolutiva de las familias de genes, permiten encontrar la huella filogenética (método que permite hallar regiones altamente conservadas de importancia evolutiva), en epidemiología son útiles para rastrear el origen y la transmisión de enfermedades infecciosas, o para estudiar la co-evolución de huéspedes y parásitos [114][115]. Además, la filogenética molecular se ha convertido en una herramienta indispensable para la comparación de genomas [110].

### **I.II Teoría de la Coalescencia**

En genética de poblaciones, el desarrollo de la **teoría coalescente** y la disponibilidad generalizada de secuencias de genes para múltiples individuos de la misma especie han impulsado el desarrollo de métodos de inferencia basados en genealogías, que han revolucionado la genética de poblaciones computacional moderna [110].

La Coalescencia se basa en una teoría matemática elaborada para describir la genealogía de genes selectivamente neutros analizando hacia atrás en el tiempo [82]. Para una población de tamaño constante, nuevos alelos surgen continuamente a través de mutaciones, y otros se extinguen a lo largo de generaciones sucesivas (asumiendo neutralidad). Por lo tanto, los alelos de un gen existentes en una población se derivan de (o coalescen hacia) un único alelo ancestral común que existió en algún momento en el pasado [116]. Al observar hacia atrás en el tiempo, los haplotipos de ADNmt o las variantes de cualquier gen nuclear, coalescen hacia el ancestro común más reciente (TMRCA por sus siglas en inglés: "*Time to the Most Recent Common Ancestor*"), es decir que se puede identificar el TMRCA utilizando la teoría de coalescencia [117].

La teoría de la coalescencia proporciona un marco temporal para estudiar los efectos de los procesos evolutivos a nivel de la población, los cuales ocurrirían en el tiempo transcurrido

hasta la ascendencia común de los alelos. Las inferencias de eventos pasados son posibles porque la mayoría de las mutaciones surgen en un punto en el tiempo y el espacio, y la propagación de cada nueva mutación (alelo) estará influenciada por los patrones de dispersión de los individuos, el tamaño de la población, la selección natural y otros procesos que pueden deducirse de las distribuciones contemporáneas de dichas mutaciones [82][116].

### **I.III Análisis de dinámicas poblacionales a través del tiempo**

Como se mencionó previamente, el avance en los análisis informáticos y el desarrollo de la teoría de la coalescencia, permitieron grandes progresos en el campo de la genética de poblaciones y de la ecología molecular. Un claro ejemplo de esto es el desarrollo de métodos que permiten descifrar las historias demográficas de las poblaciones, las cuales dejan “señales” en los genomas de los representantes modernos de dichas poblaciones. Por ello, reconstruir la historia demográfica de una población permite obtener información útil sobre diversos procesos evolutivos y genéticos, como por ejemplo comprobar las correlaciones entre eventos demográficos y paleoclimáticos, examinar los factores que condujeron las dinámicas poblacionales pasadas, o rastrear la transmisión y propagación de un virus [118].

Existen diversos métodos para estimar dinámicas de poblaciones a partir de un conjunto de datos de secuencias de nucleótidos, entre los que se destacan los métodos de **gráficos de líneas de cielo** ("*Skyline plots*"), los cuales se basan fundamentalmente en la teoría coalescente. En este marco, los linajes se remontan hacia atrás en el tiempo a partir de una muestra de secuencias, mostrando pares de linajes que se unen aleatoriamente hasta conectarse con un único ancestro común. La genealogía de cualquier *locus* dado representa entonces el desarrollo de este proceso estocástico, cuyas condiciones están determinadas por la historia de la población y la selección natural, entre otros factores. Por lo tanto, la reconstrucción de la historia demográfica implica estimar la genealogía e inferir el tamaño efectivo de la población en diferentes puntos a lo largo de la escala de tiempo genealógica, entendiendo por tamaño efectivo de la población al número de individuos que contribuyen con descendencia a la generación siguiente, el cual, por lo general, es menor que el tamaño de la población censada [118].

Otros métodos para realizar análisis demográficos poblacionales se basan en "**La teoría neutral de la evolución**", según la cual la mayor parte del cambio en las secuencias no es adaptativo, sino que la probabilidad de reemplazo de un nucleótido por otro en una secuencia solo depende de la tasa de mutación, por lo que la selección jugaría un papel minoritario y reservado a la eliminación de las variantes deletéreas [119]. Esta teoría postula que la población se encuentra en equilibrio entre los procesos de mutación y deriva genética, es decir, las mutaciones introducen nuevos alelos en la población y la deriva genética determina si un alelo neutral será perdido o fijado. En promedio, cada nuevo alelo ganado por mutación se equilibra con un alelo existente, y hay un balance entre mutación y deriva [120]. Se han desarrollado diferentes pruebas estadísticas

que miden la significancia de los resultados obtenidos en relación con la hipótesis nula de neutralidad, por lo que son comúnmente denominadas **pruebas de neutralidad**.

#### **I.IV Redes de haplotipos**

La teoría de la coalescencia también es relevante para el desarrollo de otros métodos de reconstrucción filogenética. A diferencia de los árboles bifurcados tradicionales, estos métodos permiten representar relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados en los que un solo haplotipo puede dar lugar a muchos haplotipos, creando así lo que se conoce más comúnmente como una red [82]. Una red de haplotipos es un gráfico que permite visualizar las relaciones genéticas entre los haplotipos, sus frecuencias, los pasos mutacionales que los separan y los haplotipos faltantes o no muestreados [121]. Esto último ocurre porque los alelos existentes a menudo están separados por más de un paso mutacional, y, por lo tanto, la red típicamente contiene varios alelos intermedios inferidos por los programas empleados, que representan a los antes mencionados haplotipos faltantes o no muestreados [116].

En las redes, los haplotipos son representados como circunferencias con tamaños proporcionales a sus frecuencias en la población y las conexiones entre haplotipos representan a los eventos coalescentes [121]. A partir de los principios de la teoría de la coalescencia, se pueden realizar las siguientes predicciones acerca de las redes de haplotipos [82]:

- Los haplotipos de mayor frecuencia y con múltiples conexiones son probablemente los más antiguos.
- Dentro de la red, los haplotipos más antiguos son interiores, mientras que los más nuevos tienen más probabilidades de ser periféricos.
- Se espera que los haplotipos más antiguos muestren una distribución geográfica amplia porque sus portadores han tenido un tiempo relativamente largo para dispersarse.
- Es probable que los haplotipos con una sola conexión (*singletons*) estén conectados a haplotipos de la misma población porque han evolucionado recientemente y es posible que sus portadores no hayan tenido tiempo para dispersarse.

En cuanto a su utilidad, las redes de haplotipos, además de inferir las relaciones genealógicas entre alelos, permiten investigar el nivel de flujo génico, el grado de estructuración genética, la asociación geográfica e incluso dar información acerca del pasado demográfico de la población, ya que la selección, la fluctuación en el tamaño poblacional, la deriva genética y el aislamiento, afectan las relaciones genealógicas y geográficas de los haplotipos, afectando de este modo las redes de haplotipos generadas [121].

#### **I.V Reloj Molecular y estimación de los tiempos de divergencia**

Durante la década de 1960, se descubrió que la distancia genética entre dos secuencias que codifican para producir la misma proteína, pero aislada a partir de ejemplares de dos especies diferentes, parecía aumentar linealmente con el tiempo de divergencia entre dichas especies. Dado

que varias proteínas mostraron un comportamiento similar, se planteó la hipótesis de que la tasa de evolución de cualquier proteína dada es constante a lo largo del tiempo. Esta hipótesis implica la existencia de un tipo de “reloj” molecular que funciona más rápido o más lentamente en diferentes genes, pero a una tasa más o menos constante para cualquier gen estudiado entre diferentes linajes filogenéticos. La gran ventaja de este descubrimiento es que, si existe un reloj molecular y se puede calcular la tasa de evolución de un gen, entonces esta información se puede usar para datar el tiempo de divergencia desconocido entre dos especies simplemente comparando sus secuencias de ADN o proteínas [122]. Es decir, se considera que las secuencias más parecidas entre sí han divergido más recientemente, mientras que las secuencias que son más diferentes han sido evolutivamente independientes durante un período de tiempo más largo [82].

El análisis del reloj molecular y la datación del tiempo de divergencia están estrechamente asociados. La calibración de un reloj molecular a una escala de tiempo absoluta conduce directamente a las edades de divergencia entre los linajes en el árbol estudiado [123]. Dicha calibración se basa en la fecha aproximada en que dos linajes genéticos divergieron, fecha que idealmente debería obtenerse mediante información independiente de la molecular, por ejemplo, del registro fósil o de un evento geológico conocido (como por ejemplo el surgimiento de una isla). Los registros fósiles se pueden usar de varias maneras para calibrar los tiempos de divergencia. El método más simple es la calibración de nodos fósiles, por lo que el fósil se asocia con un clado para delimitar su tiempo de origen [124].

Para calcular el valor de divergencia entre secuencias, se hace una división entre la cantidad de divergencia que ha ocurrido y el tiempo probable desde que divergieron, con lo que se obtiene una estimación de la tasa a la que ha ocurrido la evolución molecular. Por ejemplo, se sabe que un evento geológico ocurrido hace un millón de años pudo haber originado la divergencia entre dos secuencias de 500 pb que difieren en un número de 20 pb, por lo tanto, el porcentaje de sitios variables entre ellas es de 4% ( $20/500=0,04$ ). La conclusión en este caso es que mediante la calibración del reloj molecular se obtiene una tasa de evolución molecular de 4% de divergencia por millón de años. Debe considerarse que la situación ideal es la utilización de un reloj molecular calibrado para el grupo taxonómico y la región génica bajo estudio, ya que las diferentes regiones y genes presentan variadas tasas de evolución, las cuales a su vez pueden variar entre los diversos grupos taxonómicos [82].

En conclusión, al asumir un reloj molecular la reconstrucción filogenética puede ser mucho más precisa. Además, el reloj molecular no es solo una herramienta para estimar fechas históricas y tasas de evolución, también proporciona una descripción formal del proceso de sustitución, que es fundamental para la comprensión de los procesos evolutivos en los organismos [122].

## **I.VI Variabilidad genética y estructura poblacional**

La variabilidad genética puede definirse como la "capacidad genética para variar" y, por lo tanto, como la capacidad para responder a variaciones ambientales o a procesos evolutivos [125]. Es uno de los atributos más importantes de cualquier población ya que el entorno cambia constantemente, y la diversidad genética es necesaria para que las poblaciones evolucionen y se adapten a las nuevas situaciones. Además, la baja diversidad genética generalmente conduce a un aumento de la probabilidad de identidad por descendencia, es decir, la probabilidad de que dos o más alelos en un individuo de la descendencia sean idénticos por ser copias idénticas del mismo alelo ancestral como consecuencia del parentesco genético de sus padres, lo que puede reducir la aptitud de los individuos y consecuentemente, la aptitud media de las poblaciones. Por lo tanto, la evaluación de la diversidad genética es fundamental para estudios de genética de poblaciones y tiene aplicaciones extremadamente importantes en la conservación, la biología evolutiva y la ecología de los ecosistemas [82][126].

La existencia de niveles altos de variabilidad se considera saludable para las poblaciones ya que estos confieren la capacidad de responder a amenazas como enfermedades, ataques de parásitos y depredadores, y cambios ambientales. A la inversa, se considera que bajos niveles de variabilidad limitan la capacidad de una especie para responder a estas amenazas. La diversidad genética puede aumentar gracias a la mutación o mediante el ingreso de genes desde una población vecina. Por otro lado, la pérdida de diversidad ocurre en forma pasiva a través de la deriva genética o activamente a través de la selección natural [127].

La estructura genética de las poblaciones hace referencia a la presencia de diferenciación genética entre subpoblaciones dentro de la población global de una especie, donde algunos individuos son más similares genéticamente entre sí con respecto a otros [128]. Una población altamente estructurada genéticamente es aquella en la cual se detectan grandes diferencias en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones; mientras que, en una población con escasa estructura genética las subpoblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias entre sus frecuencias alélicas. Si las subpoblaciones son muy distintas genéticamente (elevada estructura genética), es un indicio de que los tamaños de las mismas han sido pequeños (o sea que ha habido efectos intensos de la deriva genética) y/o que ha existido escaso flujo génico entre estas subpoblaciones por mucho tiempo [129]. Varios enfoques diferentes han sido usados para cuantificar la diferenciación entre subdivisiones de una población y el método más utilizado se basa en estimar los estadísticos  $F$ , desarrollados por Wright [130], los cuales emplean los valores de heterocigosis para describir la partición de la variación genética dentro y entre las poblaciones [82][131].

## **I.VII Pseudogenes o *numts***

Los pseudogenes no funcionales son elementos genéticos heredables que muestran secuencias similares a las de los genes funcionales. Corresponden a secuencias homólogas que

surgen de genes actual o evolutivamente activos que han perdido su capacidad para funcionar como una unidad transcripcional. Las características más comunes de estos pseudogenes son la presencia de codones *stop* prematuros, *indels* y cambios en el marco de lectura de la secuencia, todo lo cual detiene su traducción en un producto proteico funcional. El problema radica en que, si son considerados genes funcionales, pueden llegar a alterar los resultados de estudios científicos [132][133]. En el caso particular de las mitocondrias, los procesos básicos de replicación y expresión del pequeño conjunto de genes presentes, requieren la importación de productos genéticos adicionales que están codificados en el núcleo, ya que su genoma compacto es resultado de una gradual transferencia de información genética desde esta organela al núcleo [134]. Este proceso derivó en que genes funcionalmente activos en la mitocondria se encuentren también en el núcleo, pero en forma no funcional como resultado de mutaciones, por lo que se los denomina pseudogenes o *numts* (*nuclear sequences of mitochondrial origin*) [132].

Cuando existen dudas con respecto al estatus de las secuencias obtenidas, uno de los métodos para detectar pseudogenes se lleva a cabo mediante el cálculo de la relación entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo ( $Ka/Ks$ ) [135]. Esta técnica radica en el hecho de que, al realizar el alineamiento entre secuencias del mismo gen de dos o más especies, normalmente habrá diferencias entre dichas secuencias. Algunas conducirán a diferencias en los aminoácidos de la proteína codificada (cambios no sinónimos) y otros no implican cambios (cambios sinónimos o silenciosos). Por lo tanto, la comparación entre las proporciones de cada tipo de cambio da una medida de la cantidad de cambio entre las secuencias y de la presencia o ausencia de selección [136].

Si un gen no se encuentra bajo influencia de la selección significa que se encuentra evolucionando de manera neutral y solo el azar determina si una nueva mutación pasa de ser rara a ser más frecuente. En este caso, la probabilidad de que una mutación no sinónima se fije es la misma que la de una mutación sinónima. Entonces el número de cambios no sinónimos en cada posible sitio no sinónimo es el mismo que el número de cambios sinónimos por sitio sinónimo; es decir,  $Ka/Ks = 1$ . Así, la ausencia de fuerzas selectivas en una secuencia es indicio de que el gen analizado sería un pseudogen funcionalmente inactivo sobre el cual no actúan las fuerzas de selección, aunque cabe mencionar que, también podría tratarse de un gen de evolución neutral [135][136].

Por otro lado, las desviaciones de  $Ka/Ks$  con respecto a 1 brindan información acerca de las fuerzas selectivas que actúan sobre la proteína. Lo que normalmente se encuentra es que  $Ka$  es mucho menor que  $Ks$  ( $Ka/Ks < 1$ ), esto ocurre ya sea gracias a los mecanismos de reparación del ADN o, porque la mayoría de las veces, la selección purificadora elimina las mutaciones deletéreas, manteniendo la proteína funcional a lo largo del tiempo. Esto lleva a que las mutaciones no sinónimas que modifican una proteína sean mucho menos probables que las

mutaciones sinónimas que tienen lugar en la tercera posición de los codones. Así, una secuencia funcional tenderá a presentar  $Ka < Ks$  [135][136]. Por su parte, cuando  $Ka$  es mayor a  $Ks$  ( $Ka/Ks > 1$ ), existe fuerte evidencia de que la selección ha actuado para modificar la proteína (selección positiva) [136].

En el presente capítulo, se presentan las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de los ejemplares de lagarto overo muestreados en Argentina, así como la filogenia y tiempos de divergencia entre dichas secuencias en combinación con secuencias obtenidas de GenBank, de individuos pertenecientes a otras especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* originarias de diferentes sitios de Sudamérica. Además, se muestran los resultados del análisis de variabilidad genética y estructura poblacional, en base al marcador ND4, en poblaciones del lagarto overo ubicadas en la región sur de su distribución. Por otra parte, también se presenta la dinámica poblacional pasada de las poblaciones muestreadas y se contrastan hipótesis referidas al origen de las especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis*. A su vez, se realizan los análisis correspondientes para detectar presencia/ausencia de selección en las secuencias amplificadas.

## **II OBJETIVOS DEL CAPÍTULO II**

- Obtener secuencias de buena calidad, mediante el marcador mitocondrial para el gen ND4, a partir de muestras de lagarto overo.
- Analizar filogenéticamente los haplotipos pertenecientes a los individuos muestreados en Argentina, mediante el gen ND4.
- Realizar, en base a un reloj molecular del marcador ND4, una filogenia calibrada para estimar tiempos de divergencia entre especies pertenecientes a los géneros *Salvator* y *Tupinambis*.
- Estimar parámetros de variabilidad y estructura genética en poblaciones argentinas del lagarto overo, teniendo en cuenta el grado de divergencia, mediante el análisis del marcador mitocondrial.
- Determinar dinámicas poblacionales pasadas a partir de los datos del ADN mitocondrial.

## **III MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.I Detalles del muestreo de individuos amplificados con el marcador de ADN mitocondrial**

Como se mencionó en el Capítulo I, se amplificaron 93 muestras de lagarto overo provenientes de cada una de las provincias incluidas en el estudio. La información detallada de los individuos muestreados se encuentra en el ANEXO A. Cabe mencionar que, particularmente en la Provincia de Santa Fe, además de las muestras colectadas a partir de individuos hallados

mueritos en las rutas, se contó con nidadas completas, que fueron incubadas en el marco del Proyecto Iguana. A partir de ellas fueron seleccionadas para el muestreo 10 nidadas provenientes de diferentes localidades: Romang (1 nido), San Cristóbal (1 nido), Alejandra (1 nido), Reconquista (1 nido), Salado (1 nido) y Sa Pereira (5 nidos), contando además con muestras de sangre de las 5 hembras que estaban al cuidado de los nidos de la localidad de Sa Pereira. Cabe mencionar que en esta última localidad se muestreó un número mayor de nidos debido a la gran abundancia de los mismos en el sitio y a la posibilidad de obtener muestras de las hembras adultas para llevar a cabo el análisis de parentesco descrito en el Capítulo V. En todos los nidos muestreados en la provincia de Santa Fe fueron analizados únicamente entre 1 a 3 individuos con el marcador mitocondrial del gen ND4, evitando de este modo el exceso de muestreo de los datos, producto de las características que tiene el ADN mitocondrial: herencia uniparental y carencia de recombinación. Los datos de los individuos cuyas muestras fueron amplificadas con el marcador mitocondrial se encuentran incluidos en el ANEXO A.

### **III.II. Análisis filogenético realizado a partir del marcador ND4**

#### **III.II.I Selección del modelo de sustitución nucleotídica**

El primer paso para estimar las relaciones filogenéticas entre organismos es obtener el modelo de sustitución nucleotídica (o modelo evolutivo) que mejor se ajusta al conjunto de datos de las secuencias analizadas [137]. Los modelos de sustitución de nucleótidos permiten el cálculo de las probabilidades de cambio entre nucleótidos a lo largo de las ramas de un árbol filogenético, por lo tanto, el uso de un modelo de sustitución particular puede modificar el resultado del análisis filogenético y la selección de dichos modelos se ha convertido en un paso esencial para la estimación de las filogenias a partir de alineamientos de secuencias de ADN [138].

Existen varios programas para la selección estadística de modelos de sustitución de nucleótidos, uno de los más usados es el programa JModelTest v.2.1.7 [139], el cual proporciona un rango de modelos, seleccionados a partir de diferentes criterios basados en información estadística, como el "Criterio de información de Akaike" (AIC), el "Criterio de información Bayesiano" (BIC), o un enfoque "fundado en la teoría de decisiones" (DT) y asigna una puntuación a cada modelo en el conjunto de modelos candidatos [138].

Por lo tanto, en el presente trabajo se empleó el programa JModelTest v.2.1.7 [139] para obtener el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a los datos de las secuencias aquí analizadas con el marcador mitocondrial ND4, empleando para ello los criterios de información de Akaike y Bayesiano.

#### **III.II.II Elaboración del árbol génico empleando las secuencias de lagarto overo analizadas**

El siguiente paso implica la construcción de un árbol génico, es decir un diagrama que describa el patrón de ancestría entre secuencias homólogas de ADN de diferentes individuos de una población o de una especie, donde las ramas de diferentes longitudes expresan la cantidad de

cambio evolutivo (número de pasos mutacionales o número de sustituciones). Por lo tanto, los árboles génicos representan la historia evolutiva de un gen o de una secuencia en particular [109][117].

El árbol génico se construyó mediante inferencia bayesiana empleando MrBayes 3.2 [140], un programa que emplea los algoritmos de Monte Carlo con cadena de Markov (MCMC). Se ingresó al programa el modelo de sustitución obtenido previamente con el JModelTest: Hasegawa-Kishino-Yano [141] con sitios invariables (HKY+I); y se llevaron a cabo dos corridas de cuatro cadenas cada una, ejecutadas durante sesenta millones de generaciones y muestreadas cada mil generaciones, obteniéndose de esta manera un total de 60000 árboles, de los cuales fue descartado un 25% (los primeros 15000 árboles) por estar considerados dentro de la etapa de calentamiento o *burnin*. El resto de los árboles fueron resumidos y combinados para obtener un árbol consenso de la filogenia con máxima probabilidad *a posteriori*. El árbol resultante fue visualizado y editado empleando FigTree versión 1.4.2 [142], un programa diseñado como un visor gráfico de árboles filogenéticos y para producir figuras para su publicación.

En los árboles filogenéticos se emplean grupos externos al conjunto de secuencias bajo estudio, los cuales permiten “enraizar” el árbol. Mediante los árboles enraizados se pueden definir las relaciones ancestro-descendiente ya que contienen un nodo del cual descienden todos los demás y tienen una direccionalidad que corresponde al tiempo evolutivo, por lo tanto, el nodo que está más cerca del nodo raíz, es ancestro del que está más cerca del extremo opuesto del árbol [108]. Por otro lado, un árbol no enraizado solo coloca los *taxa* individuales entre sí sin indicar la dirección del proceso evolutivo, sin ningún dato respecto a qué nodo representa el antepasado de todas las unidades taxonómicas operativas (OTUs) [109].

En el árbol elaborado empleando el programa MrBayes, se utilizó como grupo externo una secuencia obtenida de GenBank de la especie *Cnemidophorus vanzoi* (familia Teiidae, subfamilia Teiinae, Baskin y Williams [143]). La misma posee la secuencia del gen ND4, las secuencias de los genes ARNt-His y ARNt-Ser y una secuencia parcial del gen ARNt-Leu (Número de acceso: DQ168991.1; Funk y Fa [144]).

### **III.II.III Elaboración del mapa de la zona de muestreo mostrando los haplogrupos hallados**

Para la elaboración del mapa se utilizó la herramienta en línea PhyloGeoViz (Tsai [145] -[www.phylogeoviz.org](http://www.phylogeoviz.org)), una aplicación web que grafica cualquier tipo de datos de frecuencia estadística junto con un componente geográfico, y fue diseñado para crear visualizaciones geográficas de datos de haplotipos de ADN. Estas visualizaciones muestran las distribuciones espaciales de los haplotipos, la frecuencia de cada haplotipo en las poblaciones y el número de muestras incluidas por población. Además, se empleó el programa Qgis 2.14.3 [146], un Sistema de Información Geográfica (SIG) que analiza datos en numerosos formatos y funcionalidades: datos de vectores, datos ráster y bases de datos; con el fin de visualizar, gestionar, editar y analizar

dichos datos, así como diseñar mapas imprimibles. Mediante el uso de este programa se elaboró un mapa con las secuencias analizadas, donde las secuencias fueron clasificadas y coloreadas según el haplogrupo al que pertenecen.

#### **III.II.IV Análisis de variabilidad y estructura genética a partir de los datos obtenidos con el marcador mitocondrial**

El análisis de los polimorfismos en secuencias de ADN puede proporcionar información sobre la importancia evolutiva de los mismos y sobre los factores selectivos y demográficos que actúan sobre las poblaciones y las especies. El análisis comparativo de la variación entre especies es un enfoque eficaz para comprender los procesos evolutivos. La secuenciación de ADN de alto rendimiento y las metodologías de detección de polimorfismos están generando una gran cantidad de datos de secuencias de ADN de alta calidad, lo cual ha estimulado el desarrollo de métodos bioinformáticos y analíticos para el manejo, análisis e interpretación de la información de dichos polimorfismos [147].

Para desarrollar el análisis de diversidad genética basado en el polimorfismo de ADN de las secuencias obtenidas para el gen ND4 se utilizó el programa DnaSP (*DNA Sequence Polymorphism*) versión 5.10 [148]. Este programa calcula estadísticos genético-poblacionales que describen el nivel y los patrones del polimorfismo del ADN dentro y entre las poblaciones y además realiza simulaciones basadas en pruebas coalescentes [147][148]. Los estadísticos calculados con el programa DnaSP fueron los siguientes: Número de haplotipos ( $h$ ); Número de sitios polimórficos; Diversidad de haplotipos ( $Hd$  - probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar sean diferentes); Diversidad nucleotídica ( $\pi$ - medida como el número medio de diferencias de nucleótidos por sitio entre pares de secuencias) y el Número promedio de diferencias de nucleótidos ( $k$ ).

Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), en el cual la información sobre la divergencia de haplotipos de ADN se incorpora en un análisis de formato de varianza derivado de una matriz de distancias cuadradas entre todos los pares de haplotipos y produce estimaciones de los componentes de varianza. El AMOVA además genera el estadístico  $\Phi_{ST}$ , que proporciona una estimación de la diferenciación genética entre subpoblaciones y es análogo al estadístico  $F_{ST}$  [149]. La descripción del estadístico  $F_{ST}$  se incluye en el Capítulo III.

Para estudiar los componentes de la variación debido a las diferencias entre y dentro de los haplogrupos y también dentro de las poblaciones (se consideró cada provincia muestreada como una población) se empleó el programa Arlequin [150]. Este programa proporciona un conjunto amplio de métodos básicos y pruebas estadísticas, con el fin de extraer información sobre las características genéticas y demográficas de una colección de muestras de una población. Para evaluar la significancia de los agrupamientos se realizaron 10000 permutaciones que permiten calcular los estadísticos  $p$  con el fin de contrastar la hipótesis nula que establece la no existencia de estructura poblacional.

### III.II.V Elaboración de la red de haplotipos

Para la construcción de la red de haplotipos, la cual permitió el estudio de las relaciones genealógicas entre las secuencias analizadas del gen ND4, se utilizó el programa Network 5.0 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). Mediante el algoritmo de red de uniones promediadas (MJ, por sus siglas en inglés: *Median Joining*), este algoritmo permite construir redes a partir de datos de poblaciones, combinando características del algoritmo de Kruskal para encontrar árboles de expansión mínima, los cuales favorecen conexiones cortas sin crear ningún ciclo ni inferir nodos adicionales, de modo que la longitud total de la red sea mínima. A su vez, el algoritmo MJ también utiliza características del algoritmo de máxima parsimonia, que secuencialmente agrega nuevos vértices llamados "vectores medios", que pueden interpretarse biológicamente como posibles secuencias existentes no muestreadas o secuencias ancestrales extintas [151]. Cabe destacar que en la construcción de la red de haplotipos se realizó una clasificación por provincia muestreada y que también se utilizó como grupo externo la secuencia correspondiente a la especie *Cnemidophorus vanzoi*.

### III.III Prueba de hipótesis para detectar presencia/ausencia de fuerzas de selección en las secuencias obtenidas

En esta sección se procedió a llevar a cabo una serie de análisis que permiten detectar presencia/ausencia de selección en las secuencias bajo estudio, esto se realizó debido al hallazgo de un número de 41 secuencias, aquí denominadas a fines prácticos como *Salvator sp.*, que poseen sólo un 81% de identidad con *S. merianae* y *S. rufescens* y se diferencian notablemente de las de ambas especies del género *Salvator*. Por este motivo, se llevaron a cabo una serie de pruebas con el objetivo de interpretar los resultados antes mencionados, en base a la hipótesis de que dichas secuencias podrían tratarse pseudogenes no funcionales.

Se realizaron análisis descriptivos de las sustituciones sinónimas y no sinónimas para rastrear evidencia de selección en las secuencias obtenidas. Para ello se empleó el programa DNAsp versión 5.10 [148], el cual permite llevar a cabo análisis exhaustivos del polimorfismo de ADN en múltiples y grandes archivos de datos [147][148]. El programa genera una tabla en la que aparecen comparadas de a pares las secuencias del alineamiento, dando lugar a una serie de resultados que permiten el cálculo posterior de la relación Ka/Ks en cada par de comparaciones [135].

Se llevaron a cabo dos análisis descriptivos para la secuencia del gen ND4. En primer lugar, se analizó una secuencia amplificada en este trabajo, que presentó alta similitud con *S. merianae* (a la que denominamos *S. merianae*) adicionando una secuencia de cada una de las siguientes especies: *S. rufescens*, *S. duseni*, *T. quadrilineatus*, *T. teguixin* y *T. longilineus*, obtenidas de GenBank, en este caso el fragmento analizado fue de 347 pb, ya que la mayoría de las secuencias del gen de las especies antes mencionadas presenta dicha longitud. Por lo tanto, la secuencia de 811 pb obtenida en el presente trabajo fue alineada con las secuencias de dichas

especies y luego cortada. En un segundo alineamiento, se incluyó a ese lote de secuencias una secuencia obtenida con menor índice de similitud respecto de las especies del género *Salvator* (a la que denominamos *Salvator sp.*). Los alineamientos obtenidos pueden consultarse en el ANEXO C.

El segundo análisis descriptivo fue llevado a cabo empleando el fragmento completo de 811 pb de una secuencia de *Salvator sp.*, y una secuencia de *S. merianae* (ambas obtenidas en este estudio), junto a una secuencia de *S. rufescens* descargada desde Genbank (Tabla 5), por ser ésta la única especie en la base de datos cuyo fragmento del gen ND4 posee aproximadamente la misma longitud que las secuencias obtenidas en el presente trabajo (ANEXO C).

Luego se realizó un test estadístico empleando el programa Mega 7.0 para corroborar los resultados obtenidos en los análisis descriptivos. Para ello se llevó a cabo en primer lugar un test Z de selección, el cual se basa en el estadístico Ks-Ka, tomando como hipótesis nula (H0) la presencia de neutralidad (ausencia de selección):  $Ka=Ks$ , y como hipótesis alternativa (HA) la presencia de algún tipo de selección:  $Ka \neq Ks$ , con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  y comparando las secuencias por pares. La varianza de este estadístico fue calculada mediante el método Bootstrap empleando 10000 réplicas y los análisis fueron realizados siguiendo el modelo de sustitución Nei-Gojobori [135][152]. Las hipótesis antes descritas implican que se rechaza H0 en las comparaciones de a pares de secuencias en las que el test resulta significativo al 5% (valor  $p < 0.05$ ), lo que permite aceptar H1 al no tener pruebas de lo contrario [135]. Si se da este último el caso, se deben realizar otros análisis estadísticos para determinar el tipo de selección que está actuando, para ello se debe llevar a cabo un test Z de selección purificadora (H0:  $Ka=Ks$ ; HA:  $Ka < Ks$ ) y un test Z de selección positiva (H0:  $Ka=Ks$ ; HA:  $Ka > Ks$ ). Estos análisis fueron realizados para los dos conjuntos de secuencias antes mencionados. Por un lado se analizó un fragmento de 347 pb de *Salvator sp.*, *S. merianae*, *S. rufescens*, *S. duseni*, *T. quadrilineatus*, *T. teguixin* y *T. longilineus*; y por el otro lado, el fragmento completo de 811 pb de *Salvator sp.*, *S. merianae* y *S. rufescens*.

Como información adicional, se realizó el cálculo de distancias genéticas con los datos del fragmento de 347 pb del gen ND4, incluyendo en este análisis las seis secuencias pertenecientes a las diferentes especies antes analizadas y una secuencia correspondiente a *Salvator sp.* Para la elaboración de la matriz de distancias genéticas se utilizó el programa Mega 7.0. Se empleó el método Jukes-Cantor [153], el cual asume frecuencias iguales para las cuatro bases nucleotídicas y las mismas probabilidades de cambio para dichas bases. A su vez, se empleó el modelo de dos parámetros de Kimura [154], el cual otorga diferentes probabilidades de cambio a los nucleótidos, ya que la probabilidad de que se produzca una transición es generalmente mayor a la probabilidad de que se produzca una transversión.

### **III.III.VI Estimación de los tiempos de divergencia para especies de *Salvator* y *Tupinambis***

#### **III.III.VI.I Primera estimación realizada**

En una primera instancia se estimó el tiempo al ancestro común más cercano (TMRCA) para especies pertenecientes a los géneros *Tupinambis* y *Salvator*. Para ello se emplearon los haplotipos únicos presentes en las secuencias mitocondriales bajo estudio y también 25 secuencias depositadas en GenBank pertenecientes a otras cuatro especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* (Tabla 5). Además, como grupo externo (*outgroup*) se empleó una secuencia del gen ND4 para la especie *Cnemidophorus vanzoi* que pertenece a la subfamilia Teiinae y una secuencia de la especie *Callopistes maculatus* (familia Teiidae, Gravenhorst [155]) la cual, aunque posee un estatus taxonómico aún no muy bien definido [2], se considera cercana a la subfamilia Tupinambinae.

**Tabla 5.** Información de las secuencias utilizadas para la estimación de los tiempos de divergencia entre clados: Clave de identificación de cada espécimen; Número de acceso en GenBank; Longitud de cada una de las secuencias en pares de bases y Autores de las publicaciones relacionadas con cada una de las secuencias del gen mitocondrial ND4 de las especies empleadas en los análisis.

Especie	Identificación del espécimen	Número de acceso en GenBank	Longitud de la secuencia (pb)	Autores
<i>Cnemidophorus vanzoi</i> (outgroup)	Co141	DQ168991.1	814	Funk y Fa [144]
<i>Callopistes maculatus</i> (outgroup)	Az0374	AB176924.1	813	Kumazawa y col. [156]
<i>Salvator rufescens</i>	R590	KF034088.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R598	KF034089.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R606	KF034090.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R744	KF034091.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R741	KF034093.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator duseni</i>	USNMField 166777	AF151208.1	375	Fitzgerald y col. [3]
<i>Salvator duseni</i>	USNMField 166766	AF151199.1	375	Fitzgerald y col. [3]
<i>Salvator duseni</i>	USNMField 166778	AF151198.1	375	Fitzgerald y col. [3]
<i>Salvator duseni</i>	CHUNB12503	KU894566.1	432	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis teguixin</i>	CHUNB00485	KU894575.1	657	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis teguixin</i>	CHUNB52140	KU894574.1	657	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis teguixin</i>	CHUNB10757	KU894573.1	657	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis teguixin</i>	CHUNB00476	KU894572.1	501	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis teguixin</i>	RN102	KM259825.1	375	Ripoll y col. [157]
<i>Tupinambis teguixin</i>	RN101	KM259824.1	375	Ripoll y col. [157]
<i>Tupinambis teguixin</i>	RN100	KM259823.1	375	Ripoll y col. [157]
<i>Tupinambis teguixin</i>	RN099	KM259822.1	375	Ripoll y col. [157]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	-	AF420912.1	623	Pellegrino y col. [158]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	LG1132	KC621501.1	666	Noonan y col. [159]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	CHUNB37470	KU894571.1	657	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	CHUNB14010	KU894570.1	462	Murphy y col. [6]
<i>Tupinambis longilineus</i>	LSUMNS H-4136	AF151204.1	375	Fitzgerald y col. [3]
<i>Tupinambis longilineus</i>	LSUMNS H-4135	AF151203.1	375	Fitzgerald y col. [3]

Para realizar este análisis se utilizó el programa "*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*" (BEAST) versión 1.8 [160], que implementa los algoritmos del método de Monte Carlo con cadenas de Markov (MCMC) para producir inferencias filogenéticas bayesianas, datación de los tiempos de divergencia, análisis coalescente, filogeográficos y análisis evolutivos moleculares. Este paquete incluye un programa de interfaz gráfica denominada "*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*" (BEAUti) [160] empleado para configurar los parámetros del modelo a utilizar en BEAST. Para la determinación del modelo de sustitución de nucleótidos más apropiado para las secuencias analizadas, que resultó ser HKY+I, se emplearon los criterios AIC y BIC mediante el programa JModelTest 2.1.7 [139]. Luego, para estimar el reloj molecular se utilizó un modelo relajado con distribución log-normal no correlacionado. Este modelo permite que la tasa de evolución molecular varíe entre linajes [123]. Como *prior* (información previa que se incorpora al análisis) de especiación se empleó el modelo *Yule*, el cual es un modelo simple de especiación que generalmente es más apropiado cuando se consideran secuencias de diferentes especies [123].

En lo que respecta a la tasa de sustitución para la región del gen ND4, no existe bibliografía que indique la tasa específica para *S. merianae*, por lo cual se decidió utilizar un promedio entre dos tasas que fueron consideradas relevantes: por un lado, la tasa de sustitución global del gen ND4 para lagartos y serpientes, calculada por Eo y De Woody [161], cuyo valor es de  $1,025 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año. Por otro lado, también se consideró la tasa de sustitución del gen ND2 para *Ameiva ameiva* por ser una especie perteneciente a la familia Teiidae (Subfamilia Teiinae), en este caso el valor calculado por Gifford y Larson [162] fue de  $1,334 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año. Por lo tanto, se decidió utilizar un valor medio entre ambas tasas antes mencionadas:  $1,21 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año, en una distribución normal con desviación estándar de  $1,5 \times 10^{-9}$  obteniendo así un rango para el cálculo de la tasa que varía desde aproximadamente  $1$  a  $1,5 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año.

En cuanto a la calibración de los tiempos de divergencia, se tomó como referencia el registro del fósil más antiguo hallado para el género *Tupinambis*, con una datación de 20 MA [22]. Además, también se consideró la hipótesis que postula que la diversificación de las especies del género *Tupinambis* se debió a sucesivas introgresiones marinas que dividieron a Sudamérica en dos regiones hace unos 17 a 10 MA durante el Mioceno medio-tardío [23]. Teniendo en cuenta estas referencias, se estimó el TMRCA mediante una distribución normal con media de 15 MA y desviación estándar de 5 MA, obteniendo de este modo un intervalo posible para el TMRCA de entre 20 y 10 MA, es decir, un intervalo de tiempo que inicia en la datación del fósil más antiguo y termina al finalizar el período de las introgresiones marinas.

Luego de establecidos todos los *priors* en BEAUti, se realizaron cinco corridas independientes en el programa BEAST, cada una con un total de 40 millones de iteraciones, muestreadas cada 4 mil generaciones. Una vez finalizada cada una de las corridas, se corroboró

la correcta convergencia de todos los parámetros mediante Tracer [163]. Este programa se utiliza para explorar los archivos de salida de BEAST (y otros programas MCMC Bayesianos), ya que resume las distribuciones de parámetros continuos y proporciona información de diagnóstico gráfica y cuantitativamente. Lo que se debe observar es que todos los tamaños de muestra efectivos sean superiores a 200, si se alcanza este valor significa que los parámetros convergieron [123]. Tracer también determina el *burnin* que debe ser descartado, el cual fue el 10% inicial de las corridas. Luego, las estimaciones (archivos log) y los árboles obtenidos (archivos tree) fueron combinados mediante la herramienta LogCombiner versión 1.8.2 [160], incluida dentro del paquete de programa del BEAST. Finalmente, mediante el programa TreeAnnotator, herramienta empleada para crear un árbol resumen a partir de conjuntos de árboles, incluida también dentro del paquete BEAST, se calculó el árbol de máxima verosimilitud de clados. El árbol fue luego visualizado y editado mediante el programa Figtree [142].

### **III.III.VI.II Segunda estimación realizada**

Se decidió realizar una segunda estimación de los tiempos de divergencia, pero eliminando del análisis aquellas secuencias obtenidas de GenBank que pudieran generar algún tipo de incertidumbre en los resultados a causa de su longitud, ya que varias de ellas poseían aproximadamente la mitad de la longitud en relación con las obtenidas en el presente trabajo (Tabla 5). Además, con el mismo objetivo de aumentar la resolución del árbol resultante de la segunda estimación, se decidió emplear una sola especie representante del clado norte (*T. quadrilineatus*). Así, en este segundo análisis fueron omitidas 16 secuencias del total de 25 secuencias que habían sido empleadas en el análisis previo. También se decidió utilizar *priors* en las corridas que generen menor variación en los datos, como lo es la elección de una única tasa de sustitución obtenida de la bibliografía para la estimación, y la calibración de los tiempos de divergencia a partir de un único valor. La metodología de esta segunda estimación se detalla a continuación.

La segunda estimación de los tiempos de divergencia se realizó empleando BEAST 1.8 y BEAUti [160]. Para producir esta estimación se emplearon los haplotipos únicos hallados en este estudio, y en lo que respecta a las secuencias obtenidas de GenBank se utilizaron las 5 secuencias correspondientes a *S. rufescens* y, para representar al género *Tupinambis* se incluyeron 3 secuencias pertenecientes a la especie *T. quadrilineatus*. Como grupo externo se decidió utilizar únicamente a la especie *Cnemidophorus vanzoi* (Tabla 6). Mediante el programa JModelTest 2.1.7 [139] y, a través de la implementación de los criterios AIC y BIC, se calculó el modelo que mejor se ajusta a los datos, el cual resultó ser HKY+G. En cuanto al método de estimación del reloj molecular, se utilizó un modelo relajado con distribución log-normal no correlacionado y el modelo *Yule* como *prior* de especiación [123].

**Tabla 6.** Información de las secuencias empleadas para la segunda estimación de los tiempos de divergencia entre clados: Clave de identificación de cada espécimen; Número de acceso en GenBank; Longitud de cada una de las secuencias en pares de bases y Autores de las publicaciones relacionadas con cada una de las secuencias del gen mitocondrial ND4 de las especies empleadas en los análisis.

Especie	Identificación del espécimen	Número de acceso en GenBank	Longitud de la secuencia (pb)	Autores
<i>Cnemidophorus vanzoi</i> (outgroup)	Co141	DQ168991.1	814	Funk y Fa [144]
<i>Salvator rufescens</i>	R590	KF034088.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R598	KF034089.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R606	KF034090.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R744	KF034091.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Salvator rufescens</i>	R741	KF034093.1	807	Cabaña y col. [48]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	-	AF420912.1	623	Pellegrino y col. [158]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	LG1132	KC621501.1	666	Noonan y col. [159]
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	CHUNB37470	KU894571.1	657	Murphy y col. [6]

Para la estimación de la tasa de sustitución nucleotídica en el conjunto de las secuencias analizadas, se consideró únicamente la tasa para reptiles saurópsidos calculada por Eo y De Woody [161] ( $1,025 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año) debido a que corresponde particularmente al gen ND4. Entonces, para estimar la tasa de sustitución nucleotídica se tomó como valor medio la tasa antes mencionada, en una distribución normal con desviación estándar del 10%. Por otro lado, para llevar a cabo la calibración de los tiempos de divergencia se tomó como referencia únicamente el registro fósil más antiguo encontrado para el género *Tupinambis* datado por Brizuela y Albino [22]. Por lo tanto, se estimó el TMRCA mediante una distribución normal, con media de 20 MA y desviación estándar del 10%.

Se realizaron cinco corridas independientes, cada una de las cuales consistió en 100 millones de iteraciones muestreadas cada 10000 generaciones. Se evaluó la convergencia y se calculó el *burnin* a descartar (10%) mediante el programa Tracer [163]. Los archivos resultantes fueron combinados mediante LogCombiner versión 1.8.2 [160] y el árbol de máxima verosimilitud de clados fue calculado y visualizado mediante TreeAnnotator [160] y Figtree [142].

#### III.IV Análisis de dinámicas poblacionales a través del tiempo

El método empleado para analizar la dinámica poblacional a partir de las secuencias obtenidas con el marcador del gen ND4, es el de "gráficas de líneas de cielo bayesianas" o BSP (por las siglas del inglés: "*Bayesian skyline plot*"), el cual utiliza procedimientos estándar de

muestreo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar la distribución *a posteriori* del tamaño efectivo de la población a través del tiempo directamente a partir de una muestra de secuencias de genes, dado cualquier modelo de sustitución de nucleótidos específico [164]. A través de este método se obtiene un gráfico cuyo eje X expresa años y el eje Y representa al tamaño poblacional, el cual es igual a  $N_e * \tau$ , es decir el producto entre el tamaño efectivo poblacional y la longitud del tiempo generacional del organismo estudiado [164]. Se entiende por tiempo generacional al promedio de edad en que una cohorte de individuos produce descendencia [165]. Para los lagartos del género *Salvator* hasta el momento no existe un cálculo exacto del tiempo generacional, pero se ha documentado que las hembras alcanzan la madurez sexual a la edad de cuatro años [45], por lo que se asumió entonces un tiempo generacional de cuatro años para el lagarto overo. En base a esto, el tamaño efectivo poblacional fue calculado de la siguiente manera:

$$N_e = \text{tamaño poblacional obtenido con BSP} / (\text{dividido}) \tau \text{ (tiempo generacional)}$$

En este punto, cabe recordar lo mencionado en el Capítulo I en cuanto al hallazgo de dos conjuntos diferentes en las secuencias amplificadas: 49 individuos que correspondieron a *S. merianae* y 41 individuos que poseían secuencias muy diferentes, grupo al que denominamos "*Salvator sp.*", por lo que, en base a dichos resultados, se decidió llevar a cabo un BSP para cada uno de estos grupos. Para realizar dichos análisis se emplearon los programas BEAST 1.8.2, BEAUti [160] y Tracer [163]. El modelo de sustitución de nucleótidos para las secuencias analizadas (HKY+I) fue determinado utilizando AIC y BIC empleando el programa JModelTest 2.1.7 [139]. En cuanto a la tasa de sustitución de nucleótidos, se utilizó el valor obtenido por Eo y De Woody [161] para reptiles saurópsidos calculado para el gen ND4, pero en este caso se hizo una corrección de la tasa, ya que ha sido demostrado que la tasa de sustitución varía a lo largo del tiempo por efecto de la selección, lo cual puede sobreestimar el  $N_e$  en análisis poblacionales actuales [166][167], por lo tanto se decidió emplear como media la tasa de sustitución corregida en un orden de magnitud para evitar dicho sesgo ( $1,025 \times 10^{-7}$  sustituciones por sitio/año), en una distribución normal y con desviación estándar del 10%, obteniendo así un rango para el cálculo de la tasa que varía desde aproximadamente  $8 \times 10^{-9}$  a  $1,3 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio/año. En primer lugar, se ejecutó el análisis en el programa BEAST empleando el Tree prior *Coalescent Bayesian Skyline* y para el reloj molecular se utilizó un modelo relajado con distribución log-normal no correlacionado. Con el conjunto de secuencias clasificadas como *S. merianae*, se corrieron 10 millones de generaciones, muestreadas cada 1000 generaciones y se descartó el 10% inicial de las mismas como *burnin*. Luego se realizó el análisis con el conjunto de secuencias clasificadas como *Salvator sp.*, se corrieron 20 millones de generaciones muestreadas cada 2000 y se descartó el 10% inicial de las generaciones como *burnin*. Posteriormente, se corroboró la correcta convergencia de todos los parámetros mediante Tracer y, usando este mismo programa, se realizó el análisis de dinámica poblacional mediante la opción "*Bayesian skyline*"

*reconstruction*", la cual da como resultado un gráfico en el que se observa la dinámica poblacional a través del tiempo.

Por su parte, para llevar a cabo las pruebas de neutralidad se empleó el estadístico  $D$  de Tajima [168], que compara el número de sitios segregantes ( $S$ ) entre las secuencias y el número promedio de diferencias de nucleótidos estimadas a partir de la comparación por pares ( $\pi$ ). Si se obtienen desviaciones significativas de cero indican que la población no se halla en equilibrio neutral. En este sentido, el hallazgo de valores positivos podría dar cuenta de que algunos alelos se hallan bajo algún tipo de selección positiva que incrementa su variación, o un mecanismo de ventaja de los heterocigotas, o cuellos de botella recientes. En cambio, valores negativos indicarían la presencia de mutaciones deletéreas con selección negativa o que la población habría sufrido una expansión poblacional reciente [131][168]. Adicionalmente se utilizó el estadístico  $F_s$  de Fu [169], que compara el número de haplotipos observados con el número de haplotipos esperados en una muestra al azar, y es un estadístico más sensible a la expansión demográfica. Si se obtienen valores positivos de este índice, esto indica un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente, o un efecto de sobredominancia. En cambio, valores negativos de  $F_s$  indican un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o por el efecto de la selección purificadora [170].

Además, se llevó a cabo la prueba de diferencias pareadas (*Mismatch distribution*) que se basa en la teoría de la coalescencia, y analiza la distribución de las diferencias de nucleótidos entre haplotipos. En poblaciones en equilibrio HW, las curvas teóricas que grafican dicha distribución están libres de ondas, sin embargo, las simulaciones computacionales de tales poblaciones generan distribuciones empíricas con muchos picos (multimodales), con escasa semejanza con la teoría. Por otro lado, cuando la población no está en equilibrio, las distribuciones empíricas simuladas suelen mostrar ondas muy similares a las predichas por la teoría y las poblaciones que han experimentado una reciente expansión demográfica presentan una distribución unimodal [171]. Además, para poner a prueba si las distribuciones se ajustan a lo esperado en una población en expansión se calculó el índice  $r$  de *raggedness* [172], que cuantifica la "suavidad" observada de la distribución de las diferencias pareadas, donde, valores no significativos de  $r$  indican que las poblaciones se encuentran en expansión.

Tanto las pruebas de neutralidad como las pruebas de diferencias pareadas se llevaron a cabo mediante el programa DNAsp versión 5.10, determinándose su significancia mediante simulación coalescente de 1000 réplicas.

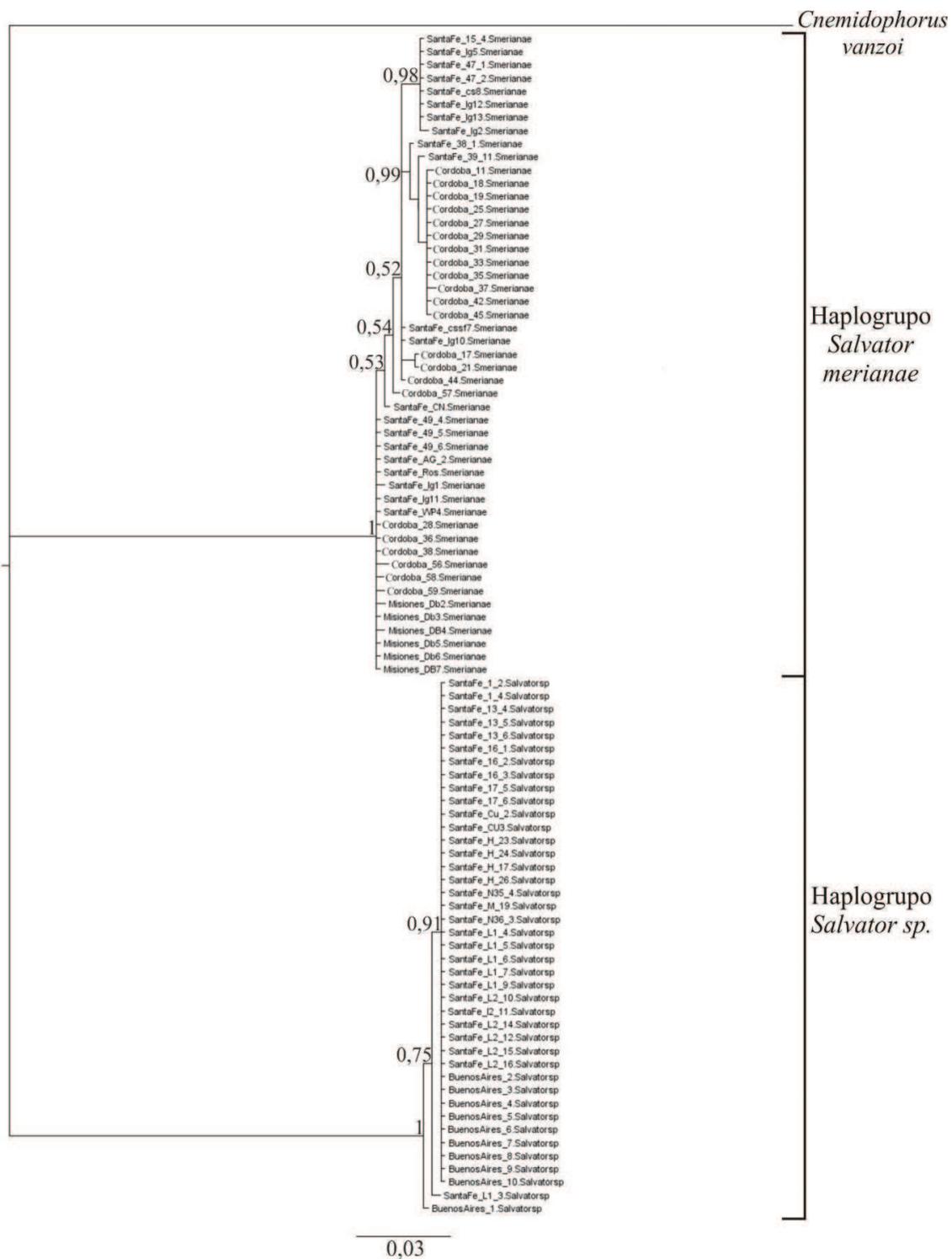
## **IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

### **IV.I Resultados**

#### **IV.I.I Análisis filogenético realizado a partir del marcador ND4**

##### **IV.I.I.I Árbol génico constituido por las secuencias mitocondriales de lagarto overo**

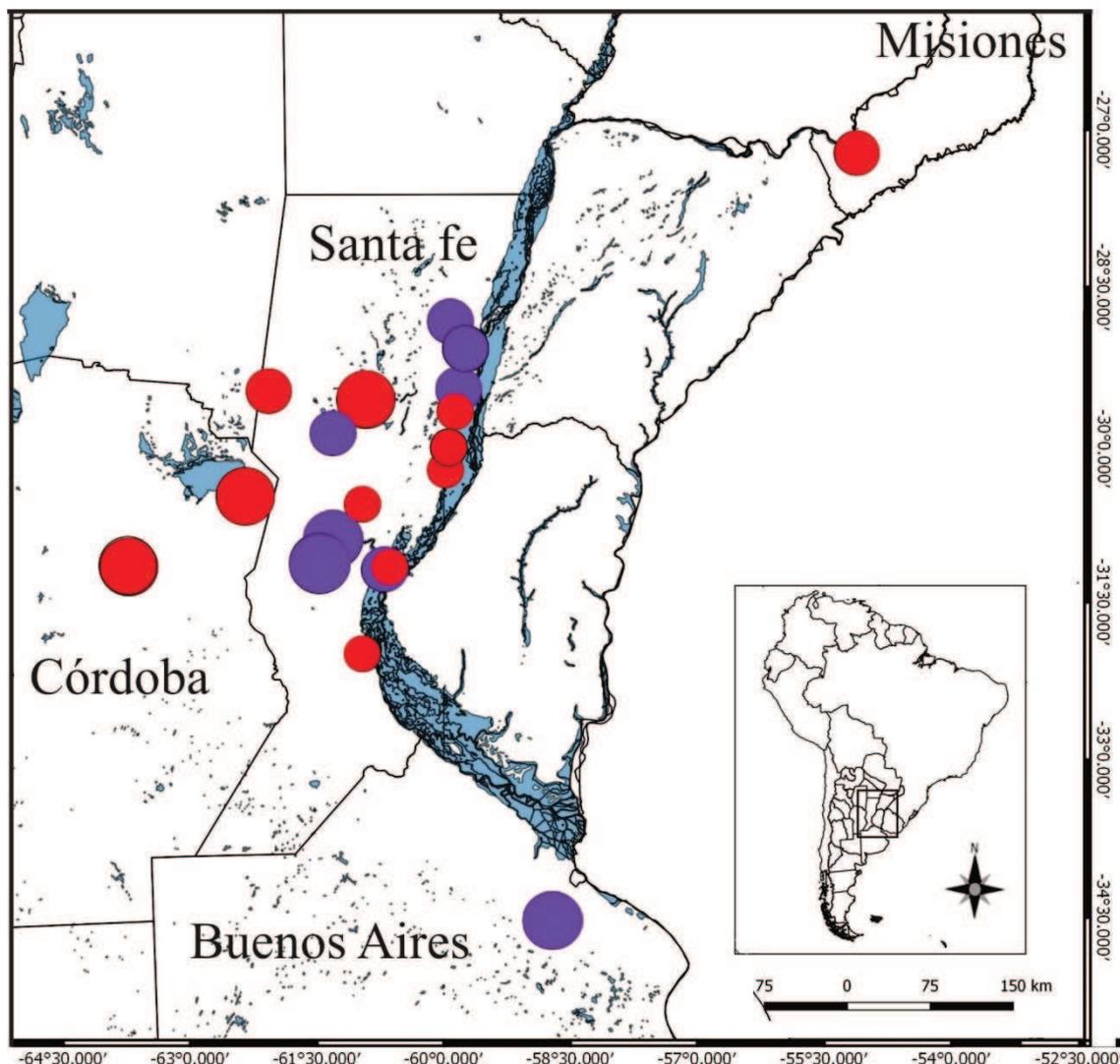
El árbol génico obtenido a partir de las 90 secuencias finales, luego de descartar las tres correspondientes a *S. rufescens* (ver Capítulo I), muestra la existencia de dos clados bien diferenciados y robustos estadísticamente (Figura 18). Por un lado, se observa el clado que fue denominado "haplogrupo *S. merianae*", el cual está constituido por secuencias correspondientes a la especie *S. merianae* ya que, como se mencionó previamente, presentan un 99% de identidad con respecto a las secuencias de dicha especie depositadas en GenBank. Por otro lado, puede observarse en el árbol un clado que fue denominado "haplogrupo *Salvator sp.*", cuyas secuencias se diferencian de *S. merianae*. En la Tabla del ANEXO A se detalla la clasificación, según el clado de pertenencia, de los individuos analizados con el marcador mitocondrial (columna "Clado"). Cabe mencionar que, en varios nidos (Ej: Nido 1 muestrado en el sitio Alejandra, Nido 39 muestrado en Costa del Salado, etc.), el clado de todos los individuos fue inferido a partir de uno a tres individuos analizados con el marcador mitocondrial, o partir de la madre correspondiente (resaltados en color gris en el ANEXO A), ya que la herencia sin recombinación del ADNmt lleva a suponer que todos los individuos pertenecientes a una misma familia poseen el mismo haplotipo. Por este motivo el número de individuos clasificados en la Tabla en base al haplogrupo, supera el número de individuos analizados con el marcador mitocondrial.



**Figura 18.** Árbol génico obtenido mediante inferencia bayesiana para las 90 secuencias analizadas de lagarto overo. Como grupo externo se empleó una secuencia de *Cnemidophorus vanzoi*. Los números en los nodos corresponden a las probabilidades posteriores bayesianas. La barra de escala representa el número de sustituciones / sitios.

#### IV.I.I.II Mapa de la zona de muestreo mostrando los haplogrupos hallados

En el mapa que representa la ubicación geográfica y las frecuencias de los individuos que corresponden a los dos clados hallados, se puede observar la existencia de estos clados en simpatria en una amplia área geográfica, particularmente en la provincia de Santa Fe (Figura 19).



**Figura 19.** Mapa que representa los dos haplogrupos hallados en los sitios de muestreo. Los círculos rojos pertenecen al haplogrupo *S. merianae*; los círculos violetas pertenecen al haplogrupo *Salvator sp.*. El tamaño de los círculos representa la frecuencia de los individuos pertenecientes a cada haplogrupo en cada uno de los sitios muestreados. Los individuos analizados pertenecen exclusivamente a poblaciones silvestres.

#### IV.I.I.III Variabilidad genética obtenida mediante el marcador mitocondrial

Como resultado del análisis de la variabilidad genética, se observó que las 90 secuencias del marcador ND4 analizadas se hallan agrupadas en 23 haplotipos que presentan un total de 157 sitios variables: 20 haplotipos corresponden al haplogrupo *S. merianae* y 3 haplotipos corresponden al haplogrupo *Salvator sp.*. Además, se encontró que el número promedio de diferencias de nucleótidos ( $k$ ) entre ambos haplogrupos es alto: 148,331. Los índices de diversidad para cada uno de los haplogrupos se hallan resumidos en la Tabla 7, puede observarse que la

diversidad genética dentro del haplogrupo *S. merianae* es mucho mayor que en el haplogrupo *Salvator sp.*

**Tabla 7.** Índices de diversidad del gen ND4 para los dos clados encontrados. Número de haplotipos (*h*), diversidad haplotídica (*Hd*), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y número promedio de diferencias nucleotídicas (*k*).

Clado	Número de secuencias	<i>h</i>	Número de sitios polimórficos	<i>Hd</i>	$\pi$	<i>k</i>
Haplogrupo <i>S. merianae</i>	49	20	17	0,91071	0,00517	4,15136
Haplogrupo <i>Salvator sp.</i>	41	3	3	0,09634	0,00024	0,19268

Por su parte, el Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado con los datos del ADNmt, indicó que el mayor porcentaje de variación se debe principalmente a diferencias entre los haplogrupos (98,14%) y que la diferenciación genética global es alta ( $\phi_{ST}= 0,99$ ) (Tabla 8).

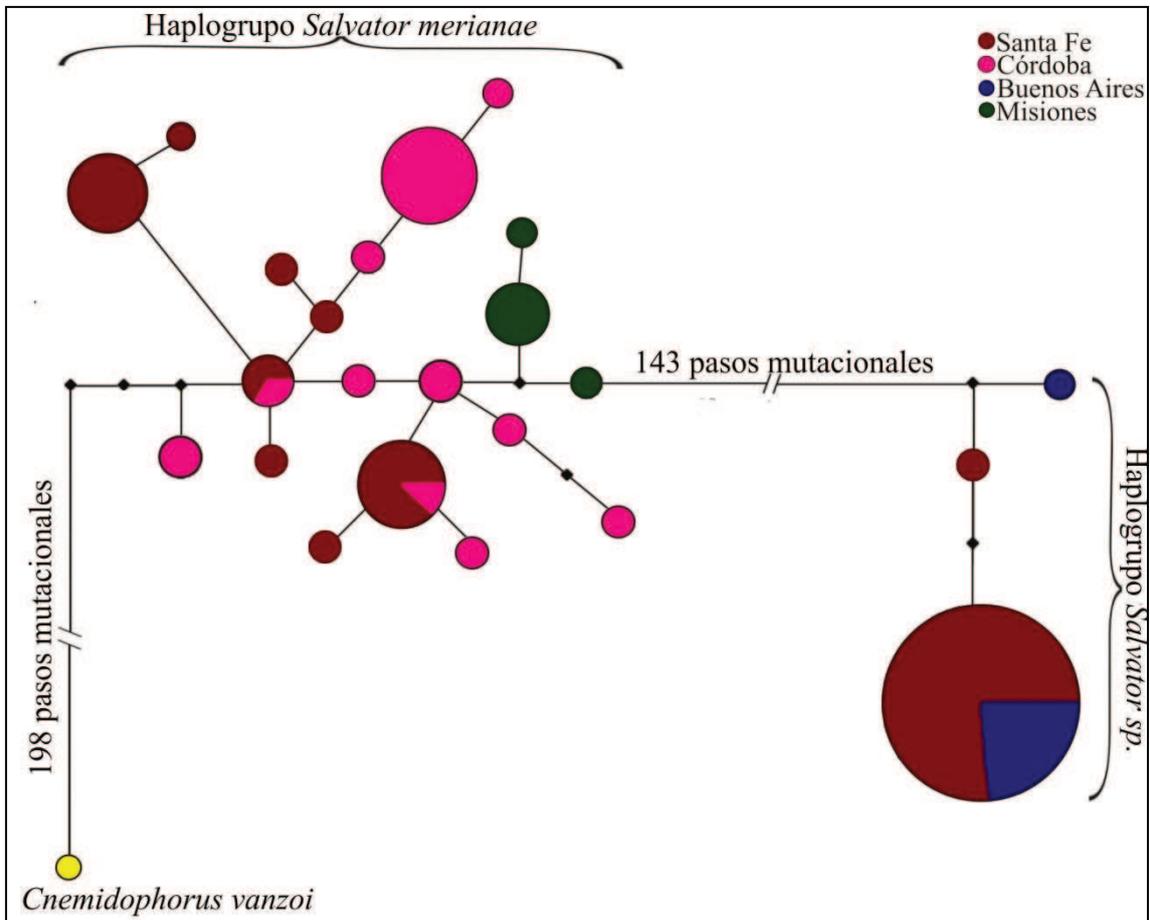
**Tabla 8.** Resumen de los resultados del Análisis de varianza molecular para las 90 secuencias de ADNmt utilizadas. gl: grados de libertad. Índice de diferenciación genética  $\phi_{ST}= 0,98858$ . Prueba de significancia para 10000 permutaciones. Valor  $p < 0,0001$ .

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre haplogrupos	1	3442,169	76,79389Va	98,14
Entre poblaciones dentro de los haplogrupos	3	27,532	0,55834Vb	0,71
Dentro de las poblaciones	85	75,954	0,89358Vc	1,14
Total	89	3545,656	78,24581	100

#### IV.I.I.IV Red de haplotipos para las secuencias de lagarto overo analizadas

En la red elaborada mediante el algoritmo *Median Joining* empleando los 23 haplotipos encontrados y una secuencia de *C. vanzoi* como grupo externo (Figura 20), se puede ver claramente que los dos clados encontrados previamente en el árbol génico están separados por 143 pasos mutacionales. En el haplogrupo *S. merianae* se observan haplotipos exclusivos para cada una de las provincias y también haplotipos compartidos, particularmente entre las provincias de Santa Fe y Córdoba, lo que pone en evidencia un alto flujo génico entre los ejemplares de lagarto overo de ambas provincias. En lo que respecta a la Provincia de Misiones, los haplotipos correspondientes a dicha provincia se separan del resto y se conectan a través de un vector medio, los cuales, como fue mencionado en la sección Materiales y Métodos, son inferidos por el programa y se interpretan como secuencias no muestreadas. Por otro lado, en el haplogrupo

*Salvator sp.*, un haplotipo en particular posee una frecuencia muy alta (39 individuos) y se halla presente en ejemplares de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe.



**Figura 20.** Red de haplotipos elaborada con las 90 secuencias de lagarto overo (23 haplotipos en total) correspondientes al gen ND4 y empleando, como grupo externo, una secuencia de *Cnemidophorus vanzoi*. Las áreas circulares corresponden a las frecuencias de los haplotipos. Los colores de los círculos corresponden al origen geográfico de las secuencias. Santa Fe: marrón; Córdoba: rosado; Buenos Aires: azul; Misiones: verde. Los círculos negros corresponden a los vectores medios.

#### IV.I.II Prueba de hipótesis para detectar presencia/ausencia de fuerzas de selección en las secuencias obtenidas

Los resultados de los alineamientos de la secuencia de aminoácidos traducida a partir de las secuencias de nucleótidos del gen ND4, correspondientes a un fragmento de 347 pb fueron los siguientes: en el caso del análisis de *S. merianae* (ID: 1), *S. rufescens* (ID:2), *S. duseni* (ID: 3), *T. quadrilineatus* (ID: 4), *T. teguixin* (ID:5) y *T. longilineus* (ID:6), se obtuvo un total de 115 aminoácidos y sólo en 8 de ellos se produjo variación de los mismos en el conjunto de las 6 secuencias (ANEXO C- Sección A). En el caso del mismo lote de secuencias con la adición de una secuencia de *Salvator sp.* se obtuvo un total de 115 aminoácidos y en 16 de ellos se produjo variación de los mismos en el conjunto de las 7 secuencias (ver ANEXO C- Sección B).

A partir del análisis descriptivo de las sustituciones sinónimas y no sinónimas para el conjunto de secuencias de 347 pb, realizado mediante el programa DNAsp, se obtuvo una tabla en donde se observan las comparaciones de pares de secuencias (Tabla 9).

**Tabla 9.** Resultados de la comparación de a pares de las secuencias de un fragmento de 347 pb del gen ND4. Ks: Número de sustituciones sinónimas o silenciosas por sitio sinónimo o silencioso; Ka: número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo; Ka/Ks: relación entre ambas sustituciones [135].

Secuencia 1	Secuencia 2	Ks	Ka	Ka/Ks
<i>Salvator sp</i>	<i>S. rufescens</i>	0,6725	0,0763	0,1135
<i>Salvator sp</i>	<i>S. merianae</i>	0,7313	0,0806	0,1176
<i>Salvator sp</i>	<i>T. duseni</i>	0,6725	0,0763	0,1135
<i>Salvator sp</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	0,9887	0,0668	0,0676
<i>Salvator sp</i>	<i>T. teguixin</i>	0,8346	0,0559	0,0670
<i>Salvator sp</i>	<i>T. longilineus</i>	0,7380	0,0734	0,0995

A los fines de simplificar los resultados solo se transcribieron las comparaciones de a pares de la secuencia de *Salvator sp.* con las secuencias de las otras especies. En la Tabla 9 puede observarse que todas las comparaciones presentan una relación  $Ka/Ks < 1$ , indicando que el número de sustituciones no sinónimas es menor que el de sustituciones sinónimas, por lo que dichos pares de secuencias probablemente se hallan sometidas a selección purificadora. Como información adicional, en el ANEXO C se agregó una Tabla en la cual se detallan las comparaciones de a pares de todas las especies, excluyendo las secuencias denominadas “*Salvator sp.*” (ANEXO C- Sección C).

Un resultado similar se obtuvo al realizar el análisis descriptivo de las sustituciones sinónimas y no sinónimas empleando las secuencias correspondientes al fragmento completo de 811 pb (Tabla 10). A partir de la traducción de dicho fragmento a proteína se obtuvo un total de 269 aminoácidos y en 37 de ellos se produjo variación de los mismos en el conjunto de las 3 secuencias (ANEXO C- Sección D). Como información adicional, se realizó el alineamiento de aminoácidos únicamente de *S. merianae* y *S. rufescens*, en este caso fueron solo 4 los sitios en los que se produjo variación (ANEXO C- Sección E).

**Tabla 10.** Resultados de la comparación de a pares de las secuencias del fragmento de 811 pb del gen ND4.

Secuencia 1	Secuencia 2	Ks	Ka	Ka/Ks
<i>S. rufescens</i>	<i>Salvator sp.</i>	0,6712	0,0842	0,1254
<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	0,2639	0,0140	0,0531
<i>Salvator sp.</i>	<i>S. merianae</i>	0,7132	0,0879	0,1232

En la Tabla 10, al ser comparadas solo tres secuencias, se transcribieron todas las comparaciones de a pares realizadas por el programa DNAsp. También en dicha Tabla puede observarse que todas las comparaciones presentan una relación  $Ka/Ks < 1$ , indicando que el

número de sustituciones no sinónimas es menor que el de sustituciones sinónimas, por lo que dichos pares de secuencias probablemente se hallan sometidas a selección purificadora.

A su vez, los test estadísticos realizados empleando el programa Mega corroboraron los resultados anteriores. El análisis del conjunto de siete secuencias para el fragmento de 347 pb, cuando se puso a prueba el test Z de neutralidad ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a \neq K_s$ ) dio como resultado que las comparaciones de a pares entre *Salvator sp.* y el resto de las secuencias fueron estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) (Tabla 11), existiendo una única comparación no significativa, la realizada entre *S. rufescens* y *S. duseni*.

**Tabla 11.** Resultados del Test Z de neutralidad ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a \neq K_s$ ) para secuencias de un fragmento de 347 pb del gen ND4, correspondientes a seis especies y adicionando la secuencia de *Salvator sp.* Por debajo de la diagonal se indican las probabilidades de rechazar la hipótesis nula de neutralidad (valores  $p$ ). Por encima de la diagonal se ubican los valores del test estadístico ( $K_s-K_a$ ).

	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	<i>S. duseni</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. teguixin</i>	<i>T. longilineus</i>
<i>Salvator sp.</i>		-8,472	-8,233	-8,472	-10,088	-9,161	-8,677
<i>S. rufescens</i>	0,000*		-6,472	0,000	-9,396	-12,171	-9,481
<i>S. merianae</i>	0,000*	0,000*		-6,472	-9,838	-11,618	-9,588
<i>S. duseni</i>	0,000*	1,000	0,000		-9,396	-12,171	-9,481
<i>T. quadrilineatus</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		-8,119	-5,250
<i>T. teguixin</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		-8,013
<i>T. longilineus</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Estos resultados indican, en base a los valores  $p$ , que resultaron significativos en la mayoría de las comparaciones, que para este lote de datos se rechaza la hipótesis nula de neutralidad y se acepta la hipótesis alternativa de que existe algún tipo de selección operando en las secuencias comparadas.

En base a los resultados anteriores, se llevó a cabo el test Z de selección purificadora ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a < K_s$ ) para el mismo conjunto de datos y se obtuvieron valores estadísticamente significativos para todas las comparaciones de a pares entre *Salvator sp.* y el resto de las secuencias (valor  $p < 0,05$ ) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Resultados del Test Z de selección purificadora ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a < K_s$ ) para secuencias de un fragmento de 347 pb del gen ND4, correspondientes a seis especies y adicionando la secuencia de *Salvator sp.* Por debajo de la diagonal se indican las probabilidades de rechazar la hipótesis nula de neutralidad (valores  $p$ ). Por arriba de la diagonal se ubican los valores del test estadístico ( $K_s-K_a$ ).

	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	<i>S. duseni</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. teguixin</i>	<i>T. longilineus</i>
<i>Salvator sp.</i>		8,472	8,233	8,472	10,088	9,161	8,677
<i>S. rufescens</i>	0,000*		6,472	0,000	9,396	12,171	9,481
<i>S. merianae</i>	0,000*	0,000*		6,472	9,838	11,618	9,588
<i>S. duseni</i>	0,000*	1,000	0,000*		9,396	12,171	9,481
<i>T. quadrilineatus</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		8,119	5,250
<i>T. teguixin</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*		8,013
<i>T. longilineus</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Nuevamente, el único par de comparaciones que no resultó significativo en este test fue el de *S. rufescens* y *S. duseni*. Estos resultados indican, en base a los valores  $p$ , que resultaron significativos en la mayoría de las comparaciones, que se rechaza la hipótesis nula de neutralidad y se acepta la hipótesis alternativa de que existe selección purificadora actuando en las secuencias analizadas.

Luego, el test Z de neutralidad ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a \neq K_s$ ) para el conjunto de secuencias correspondientes al fragmento completo amplificado de 811 pb, incluyendo secuencias pertenecientes a *Salvator sp.*, *S. merianae* y *S. rufescens*, dio como resultado que todas las comparaciones de a pares fueron estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Resultados del Test Z de neutralidad ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a \neq K_s$ ) para secuencias de un fragmento de 811 pb del gen ND4, correspondientes a *Salvator sp.*, *S. merianae* y *S. rufescens*. Por debajo de la diagonal se indican las probabilidades de rechazar la hipótesis nula de neutralidad (valores  $p$ ). Por encima de la diagonal se ubican los valores del test estadístico ( $K_s-K_a$ ).

	<i>S. rufescens</i>	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. merianae</i>
<i>S. rufescens</i>			
<i>Salvator sp.</i>	0,000*	-10,885	-7,655
<i>S. merianae</i>	0,000*	0,000*	-10,960

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Estos resultados indican, en base a los valores  $p$  obtenidos, que resultaron significantes, que se rechaza la hipótesis nula de neutralidad y se acepta la hipótesis alternativa de que existe algún tipo de selección en las secuencias comparadas.

En base a los resultados anteriores, se llevó a cabo el test Z de selección purificadora ( $H_0: K_a=K_s$ ;  $H_A: K_a < K_s$ ) para el mismo conjunto de datos y se obtuvieron valores estadísticamente significativos para todas las comparaciones de a pares (valor  $p < 0,05$ ) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados del Test Z de selección purificadora (H0:  $K_a=K_s$ ; HA:  $K_a < K_s$  para secuencias de un fragmento de 811 pb del gen ND4, correspondientes a *Salvator sp.*, *S. merianae* y *S. rufescens*. Por debajo de la diagonal se indican las probabilidades de rechazar la hipótesis nula de neutralidad (valores  $p$ ). Por arriba de la diagonal se ubican los valores del test estadístico ( $K_s-K_a$ ).

	<i>S. rufescens</i>	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. merianae</i>
<i>S. rufescens</i>		10,885	7,655
<i>Salvator sp.</i>	0,000*		10,960
<i>S. merianae</i>	0,000*	0,000*	

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Estos resultados indican, en base a los valores  $p$  obtenidos, que resultaron significativos, que se rechaza la hipótesis nula de neutralidad y se acepta la hipótesis alternativa de que existe selección purificadora actuando sobre las secuencias.

Los datos aquí obtenidos corroboran, para ambos conjuntos de datos, los resultados recabados mediante el análisis descriptivo realizado con el programa DNAsp en cuanto a la presencia de selección purificadora actuando en las secuencias de los fragmentos del gen ND4 analizados. Por lo tanto, estos análisis cuyos resultados fueron aquí descriptos dan lugar a que no sea descartada la hipótesis de que las secuencias correspondientes al grupo denominado *Salvator sp.* podrían corresponder a un gen funcional, por lo cual dichas secuencias fueron mantenidas dentro del lote de datos empleado para realizar los análisis subsiguientes.

En cuanto al cálculo de las distancias genéticas, los dos métodos empleados (Jukes-Cantor [153] y dos parámetros de Kimura [154]), dieron como resultado valores similares en las comparaciones de a pares de secuencias analizadas del fragmento de 347 pb del gen ND4. La secuencia correspondiente al grupo *Salvator sp.* presenta un porcentaje de divergencia genética, con respecto a las otras especies analizadas, de entre el 20 y 23 % (Tabla 15-A y B). A su vez, al comparar a las especies del género *Salvator* con respecto a las especies del género *Tupinambis*, los porcentajes de divergencia genética hallados presentan valores similares, ya que varían en un rango de entre el 18 % (*S. rufescens* vs. *T. longilineus*) y el 23 % (*S. merianae* vs. *T. teguixin*) (Tabla 15-A y B).

**Tabla 15.** Matriz de distancias genéticas para un fragmento del gen ND4. Se analizaron seis secuencias pertenecientes a los géneros *Salvator* y *Tupinambis*, incluyendo también una secuencia del grupo *Salvator sp.* A) Distancias genéticas calculadas mediante el modelo Jukes-Cantor. B) Distancias genéticas calculadas mediante el método Kimura de dos parámetros.

A						
	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	<i>S. duseni</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. teguixin</i>
<i>Salvator sp.</i>						
<i>S. rufescens</i>	0,202					
<i>S. merianae</i>	0,213	0,099				
<i>S. duseni</i>	0,202	0,000	0,099			
<i>T. quadrilineatus</i>	0,229	0,187	0,209	0,187		
<i>T. teguixin</i>	0,202	0,221	0,229	0,221	0,133	
<i>T. longilineus</i>	0,205	0,183	0,205	0,183	0,063	0,126

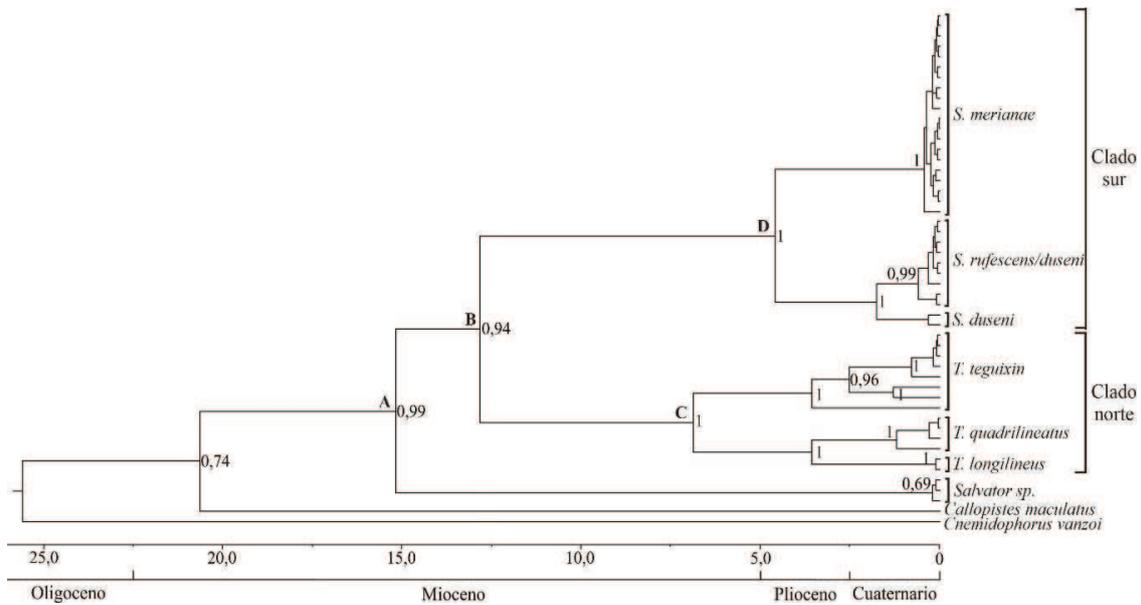
  

B						
	<i>Salvator sp.</i>	<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	<i>S. duseni</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. teguixin</i>
<i>Salvator sp.</i>						
<i>S. rufescens</i>	0,204					
<i>S. merianae</i>	0,216	0,101				
<i>S. duseni</i>	0,204	0,000	0,101			
<i>T. quadrilineatus</i>	0,234	0,190	0,214	0,190		
<i>T. teguixin</i>	0,206	0,226	0,233	0,226	0,136	
<i>T. longilineus</i>	0,210	0,186	0,210	0,186	0,065	0,129

#### IV.I.III Estimación de los tiempos de divergencia entre especies de los géneros *Tupinambis* y *Salvator*

##### IV.I.III.I Primera estimación realizada

El árbol génico obtenido utilizando 48 haplotipos de diferentes especies pertenecientes a los géneros *Salvator* y *Tupinambis* permitió comprobar que dichas especies están divididas en dos clados, que se corresponderían con los llamados “norte” y “sur” establecidos en la bibliografía (Figura 21). Las especies *T. longilineus*, *T. quadrilineatus* y *T. teguixin* resultaron monofiléticas (PP = 1) y corresponderían al "clado norte/amazónico". Las especies *S. merianae*, *S. rufescens* y *S. duseni* también resultaron monofiléticas (PP = 1) y corresponderían al "clado sur". En este último grupo los individuos de *S. duseni* muestran bajos niveles de divergencia con respecto a los individuos de *S. rufescens*. Según Fitzgerald y col. [3] la divergencia morfológica entre ambas especies, incongruente con la gran similitud genética hallada, puede deberse a dos motivos: que ambas especies se encuentran bajo una muy reciente evolución morfológica o que se haya producido un proceso de hibridación introgresiva entre ellas, por este motivo, en el árbol de la Figura 21 el conjunto de dichas secuencias fue denominado como *S. rufescens/ S. duseni*. Finalmente, cabe destacar que el nuevo clado hallado en este trabajo, es decir el haplogrupo *Salvator sp.*, sería el clado que divergió en primer lugar (PP = 0,99) con respecto a los otros linajes analizados.



**Figura 21.** Árbol génico y tiempos de divergencia calculados en la primera estimación para especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis*. Los números en los nodos corresponden a la probabilidad bayesiana *a posteriori* (PP). Las letras en los nodos hacen referencia a los TMRCA entre los clados y las especies que se detallan en la Tabla 16. La barra de escala inferior corresponde a la escala de tiempo en millones de años.

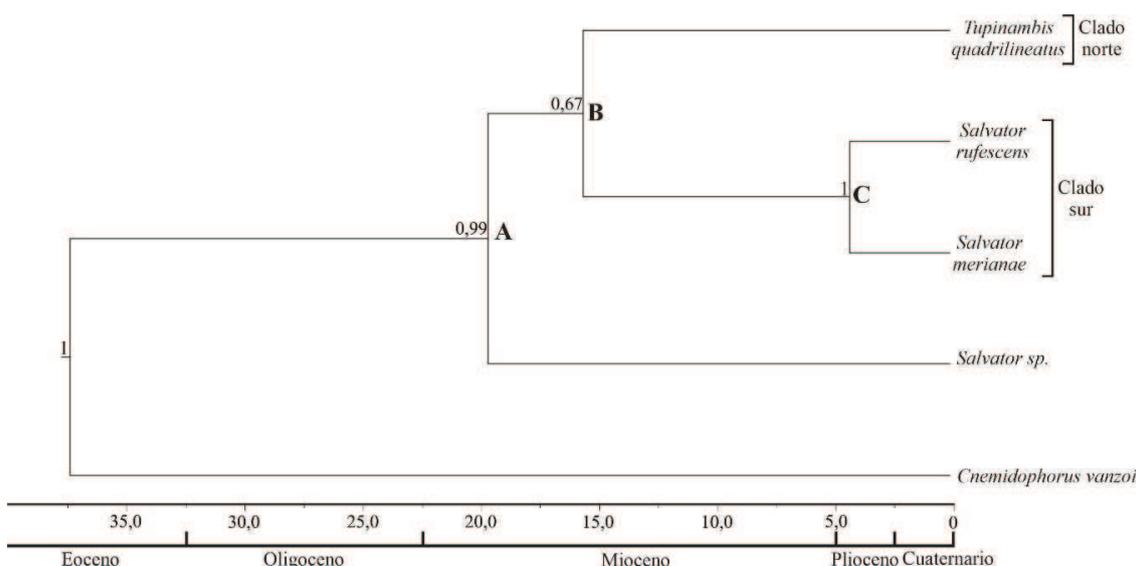
Los tiempos de divergencia estimados mediante BEAST son compatibles con el resultado anterior: en la Tabla 16 puede observarse que el TMRCA entre el haplogrupo *Salvator sp.* y el resto de las especies se localiza hace más de 14 MA. Además, se puede observar que los clados del norte y del sur divergieron hace casi 12 MA, mientras que para las especies del clado norte el TMRCA estimado fue de unos 6 MA. Por otro lado, el tiempo de divergencia entre *S. merianae* y *S. rufescens* es más reciente (3,7 MA) y lo mismo ocurre entre *S. rufescens* y *S. duseni*, que son las especies con menor tiempo de divergencia entre sí (aproximadamente 92000 años).

**Tabla 16.** Tiempo hasta el ancestro común más reciente en millones de años (MA) calculado en la primera estimación para especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis*. HPD (por sus siglas en inglés de *highest posterior density*): intervalo de confianza de máxima densidad posterior expresado en millones de años. En la primera columna se ubican los nodos referidos en la Figura 21.

Nodo	Clados	Tiempo de divergencia medio estimado (MA)	95% HPD (MA)
	<i>Salvator sp.</i> y clado norte	14,346	[10,509; 18,235]
A	<i>Salvator sp.</i> y <i>S. merianae</i>	14,368	[10,752; 18,181]
	<i>Salvator sp.</i> y clado sur	14,368	[10,752; 18,181]
B	<i>S. merianae</i> y clado norte	11,982	[7,683; 16,227]
	<i>S. rufescens</i> y clado norte	11,982	[7,683; 16,227]
C	Especies del clado norte	6,0399	[3,346; 8,575]
D	Especies del clado sur	3,7046	[1,125; 6,301]
	<i>S. merianae</i> y <i>S. rufescens</i>	3,7046	[1,125; 6,301]
	<i>S. rufescens</i> y <i>S. duseni</i>	0,0922	[0,017; 0,223]

#### IV.I.III.II Segunda estimación realizada

El análisis de los tiempos de divergencia utilizando un menor número de secuencias que en la anterior estimación, realizado con el objetivo de detectar algún sesgo que podría originarse principalmente al emplear secuencias de longitudes disímiles, permitió observar una topología similar en los árboles de ambas estimaciones. Se observan dos clados bien diferenciados que corresponderían a los denominados clados norte y sur (Figura 22). Las especies *S. merianae* y *S. rufescens* también resultaron monofiléticas (PP = 1) y *Salvator sp.* aparece como el clado que primero divergió con respecto a las otras especies (PP = 0,99).



**Figura 22.** Árbol génico y tiempos de divergencia calculados en la segunda estimación para especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis*. Los números en los nodos corresponden a la probabilidad bayesiana posterior (PP). Las letras en los nodos hacen referencia a los TMRCA entre los clados y las especies que se detallan en la Tabla 17. La barra de escala inferior corresponde a la escala de tiempo en millones de años.

La diferencia en los resultados obtenidos a partir de las dos estimaciones radica en que, en esta segunda estimación, el TMRCA entre *Salvator sp.* y el resto de los clados se ubica a principios del Mioceno (Tabla 17), mientras que en el análisis anterior se localizó a mediados del Mioceno (Tabla 16). Lo mismo ocurre con la divergencia entre los clados norte y sur, la cual se desplaza un poco más hacia atrás en el tiempo. Por otro lado, ambos análisis indican que la divergencia entre *S. merianae* y *S. rufescens* ocurrió durante el Plioceno (Tablas 16 y 17).

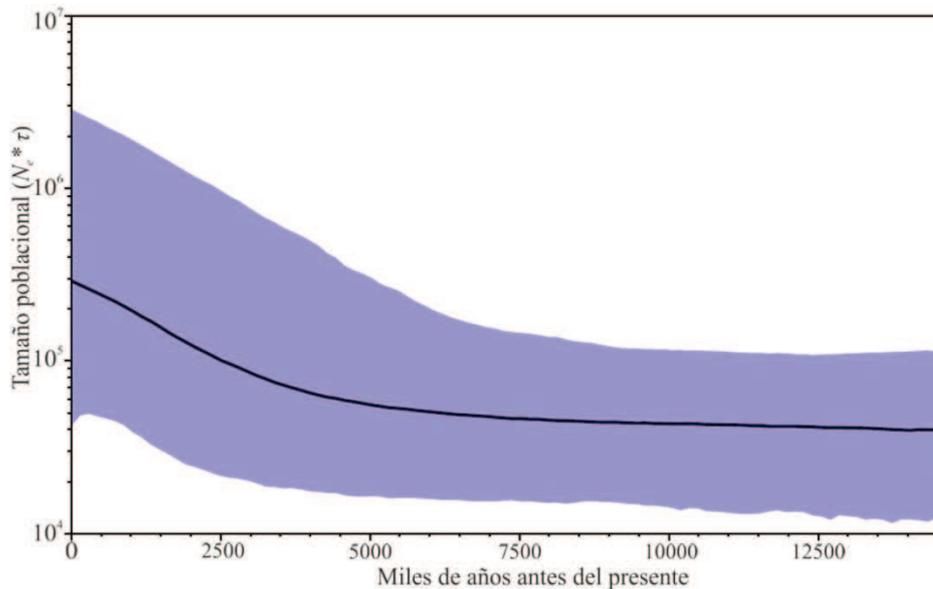
**Tabla 17.** Tiempo hasta el ancestro común más reciente en millones de años (MA) calculados en la segunda estimación para especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis*. HPD (por sus siglas en inglés de *highest posterior density*): intervalo de confianza de máxima densidad posterior expresado en millones de años. En la primera columna se ubican los nodos referidos en la Figura 22.

Nodo	Clados	Tiempo de divergencia medio estimado (MA)	95% HPD (MA)
A	<i>Salvator sp.</i> y clados norte-sur	19,746	[16,428; 23,213]
	<i>Salvator sp.</i> y clado norte	19,701	[16,637; 23,238]
	<i>Salvator sp.</i> y <i>S. merianae</i>	18,703	[13,395; 23,237]
	<i>Salvator sp.</i> y clado sur	18,703	[13,395; 23,237]
	<i>S. merianae</i> y clado norte	17,022	[11,508; 22,234]
	<i>S. rufescens</i> y clado norte	17,021	[11,508; 22,234]
B	Clados norte y sur	17,022	[11,508; 22,234]
C	<i>S. merianae</i> y <i>S. rufescens</i>	4,280	[1,711; 6,845]

#### IV.I.IV Dinámicas poblacionales pasadas

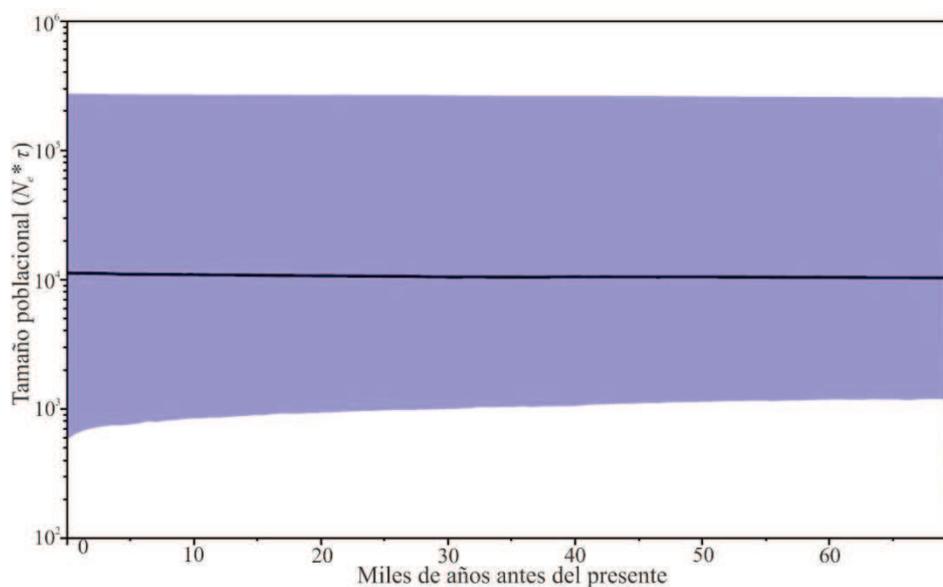
##### IV.I.IV.I Gráficos de líneas de Cielo

El gráfico resultante del BSP muestra que el haplogrupo *S. merianae*, conformado por 49 secuencias y 23 haplotipos, ha experimentado un episodio de expansión poblacional constante desde hace unos 2500 a 3500 años (Figura 23). El tamaño poblacional ( $N_e * \tau$ ) se incrementa partiendo desde un mínimo aproximado del tamaño efectivo poblacional de  $N_e = 8 \times 10^4 / 4 = 20000$  individuos hasta un máximo aproximado del tamaño efectivo poblacional de  $N_e = 4 \times 10^5 / 4 = 100000$  individuos.



**Figura 23.** Bayesian Skyline Plot derivado del alineamiento de las secuencias del haplogrupo *S. merianae*. El eje Y es igual a  $N_e * \tau$  (el producto entre el tamaño efectivo poblacional y la longitud del tiempo generacional, que es de 4 años en estos lagartos). La línea continua gruesa es la estimación de la mediana y la zona sombreada en celeste muestra los intervalos de confianza de máxima densidad posterior (HPD) del 95 %.

Por otro lado, el gráfico resultante del BSP para el haplogrupo *Salvator sp.* indicaría que la población se ha mantenido constante a través del tiempo (Figura 24), con un tamaño efectivo poblacional aproximado de  $N_e = 1 \times 10^4 / 4 = 2500$  individuos.



**Figura 24.** Bayesian Skyline Plot derivado del alineamiento de las secuencias del haplogrupo *Salvator sp.* El eje Y es igual a  $N_e * \tau$  (el producto entre el tamaño efectivo poblacional y la longitud del tiempo generacional). La línea continua gruesa es la estimación de la mediana y la zona sombreada en celeste muestra los intervalos de credibilidad de máxima densidad posterior (HPD) del 95 %.

Sin embargo, al observar la escala de tiempo, se concluye que los resultados no son comparables entre los dos haplogrupos ya que, para *S. merianae* la escala supera el límite de 14500 años mientras que para *Salvator sp.* alcanza solo hasta aproximadamente 80 años, lo cual lleva a pensar que, probablemente, el bajo nivel de polimorfismo hallado en las secuencias del gen mitocondrial ND4 para el haplogrupo *Salvator sp.* (3 haplotipos en 41 individuos), disminuya el nivel de resolución de la prueba, ya que la existencia de bajos niveles de polimorfismo posiblemente no resuelvan de manera exitosa los eventos filogeográficos [173]. Por lo tanto, este análisis no sería adecuado para el grupo de secuencias correspondientes a *Salvator sp.* dado el bajo número de haplotipos que presentó.

#### IV.I.IV.II Pruebas de neutralidad y de diferencias pareadas

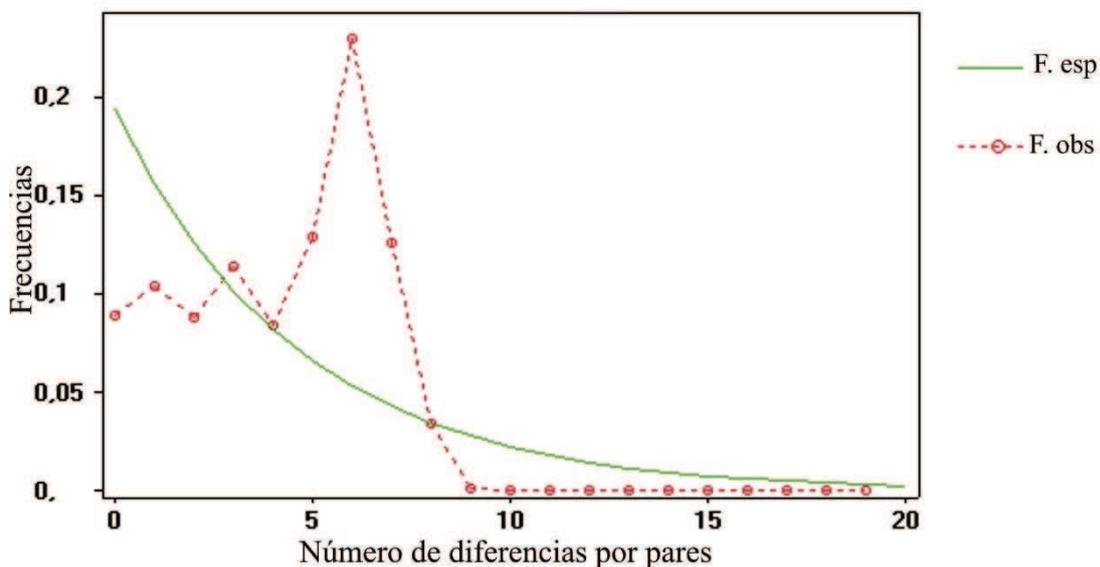
Para el haplogrupo *S. merianae*, solo el estadístico  $F_s$  de Fu resultó negativo y estadísticamente significativo (Tabla 18), el cual evidencia una posible expansión poblacional, por lo que posteriormente se llevó a cabo la prueba de diferencias pareadas.

**Tabla 18.** Pruebas de neutralidad y parámetro de expansión demográfica con sus correspondientes valores  $p$  para cada uno de los haplogrupos.

Haplogrupo	$D$ de Tajima	Valor $p$	$F_s$ de $F_u$	Valor $p$	$r$ raggedness	Valor $p$
<i>S. merianae</i>	-0,28	0,66	-6,77	0,01*	0,03	0,21

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

El gráfico de distribución de pruebas pareadas para el Haplogrupo *S. merianae* muestra una distribución unimodal que no se ajusta a una distribución esperada en equilibrio (Figura 25), otro indicio de que la población se halla en expansión. Además, el valor  $p$  de  $r$  raggedness no significativo también lleva a aceptar la hipótesis de expansión poblacional (Tabla 18), coincidiendo con lo obtenido en el BSP.



**Figura 25.** Gráficos de distribución de diferencias pareadas para el Haplogrupo *S. merianae*. El eje X representa el número de sitios diferentes entre pares de individuos y el eje Y representa las frecuencias relativas de dichas diferencias. La línea sólida es la distribución esperada para una población en equilibrio neutral y la punteada es la distribución observada en los datos analizados.

En cuanto al haplogrupo *Salvator sp.*, en base al resultado obtenido del BSP se decidió no presentar los resultados en esta sección, ya que el bajo número de haplotipos no permitiría obtener resultados que permitan una interpretación biológica válida.

#### IV.II Conclusiones

Los análisis realizados a partir de las fragmentos obtenidos correspondientes al marcador mitocondrial ND4, provenientes de los individuos analizados en la presente Tesis, llevan a hipotetizar, en primer lugar que, las tres secuencias del gen ND4 pertenecientes a *S. rufescens* (ver ANEXO B) que se amplificaron a partir de muestras de individuos identificados como lagarto overo, podrían ser resultado de hibridación introgresiva, ya que existe evidencia de introgresión

en la zona de simpatría entre ambas especies, particularmente en la provincia de Córdoba [48]. La ocurrencia de introgresión en áreas alejadas de la zona de simpatría, como muestra el hallazgo de una secuencia del gen ND4 perteneciente a la especie *S. rufescens* en un lagarto overo proveniente del centro-sur de la provincia de Santa Fe, puede deberse, por un lado, a que exista un elevado flujo génico entre individuos de diferentes zonas geográficas, ya que se sabe que los individuos pertenecientes a la especie *S. merianae* poseen una elevada vagilidad, en particular los ejemplares machos [35]. Por otro lado, pudo haber ocurrido que la zona de simpatría para *S. merianae* y *S. rufescens* en décadas pasadas haya sido más extensa que en la actualidad, tal y como expone Presch [32], quien afirma que se hallaron registros de ambas especies coexistiendo en la provincia de Santa Fe, aunque en la actualidad no existen datos de que *S. rufescens* habite en dicha provincia.

Otra explicación posible es que se haya producido una división de linaje incompleta entre ambas especies. La división de linajes, es decir la separación de poblaciones que luego darán lugar a especies monofiléticas, ocurre antes de que los alelos se vuelvan específicos de cada una de las especies derivadas, por lo tanto, durante los primeros estadios de separación de dichas poblaciones, ambas retendrán copias de al menos algunos de los alelos ancestrales [82]. En la práctica es difícil determinar si dichas copias de alelos presentes en especies cercanas son resultado del polimorfismo ancestral compartido (división de linaje incompleta) o debido a hibridación (introgresión). Una manera de aproximarse a la posible causa es analizando la distribución geográfica de las especies involucradas: si dos especies comparten alelos solo cuando se hallan en simpatría, pero no los comparten cuando se hallan en alopatría, entonces la hibridación es la causa más probable; por el contrario, si los alelos compartidos se presentan tanto en poblaciones simpátricas como alopátricas de dichas especies, la división de linaje incompleta puede ser la explicación más plausible [82]. Por lo tanto, el hallazgo de la secuencia de *S. rufescens* en un individuo de lagarto overo presente en una zona de alopatría (centro de la provincia de Santa Fe) lleva a que no deba ser descartada la hipótesis de división de linaje incompleta entre *S. merianae* y *S. rufescens*.

Por su parte, el hallazgo inesperado de un grupo de haplotipos altamente divergentes con respecto a las especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* (Figuras 18 y 20) puede deberse a diferentes causas: que dicho haplogrupo corresponda en realidad a un pseudogen; que se haya producido un *sweep* mitocondrial que dio origen a un linaje mitocondrial ancestral; y que el nuevo linaje no se limite solo al genoma mitocondrial, sino que también implique al genoma nuclear, por lo que el nuevo haplogrupo podría corresponder a un linaje hasta ahora desconocido para el lagarto overo.

En lo que refiere a la hipótesis de que el nuevo haplogrupo corresponda a secuencias nucleares de origen mitocondrial no funcionales, es decir *Numts* o pseudogenes, los análisis descriptivos y estadísticos realizados indicarían que dichas secuencias corresponderían a un gen

funcional ya que fueron detectados efectos de la selección actuando sobre las mismas (Tablas 7 a 12). A partir de dichos análisis específicamente se infirió la presencia de selección purificadora, un tipo de selección relacionado con mecanismos de reparación del ADN que llevan a la eliminación de las mutaciones deletéreas, logrando así que la proteína resultante pueda mantenerse funcional a lo largo del tiempo [135][136]. Una de las posibles interpretaciones de estos resultados, es que las secuencias del haplogrupo divergente correspondan a un gen funcional, dando lugar entonces, a que se formulen las otras dos hipótesis antes mencionadas, las cuales se mencionan en párrafos siguientes.

La suposición de la existencia de un *sweep* mitocondrial ancestral tiene sustento en la hipótesis de que el genoma mitocondrial es el resultado de recurrentes barridos selectivos (*selective sweeps*) que provocarían frecuentes caídas en la diversidad a nivel de dicho genoma. Dicha hipótesis está de acuerdo con el proceso de “borrador genético”, es decir la fijación recurrente de mutaciones ventajosas, que conduce a una pérdida frecuente de variabilidad en los *loci* vinculados. La naturaleza no recombinante del ADN mitocondrial y su baja densidad de genes maximiza el impacto potencial del borrador genético en el genoma mitocondrial, en comparación con el genoma nuclear; a su vez, dicho proceso daría lugar a la homogeneidad en la diversidad media del ADN mitocondrial entre los grupos de vertebrados e invertebrados [174][175][176]. Por lo tanto, resultaría factible que las secuencias del haplogrupo altamente divergente hallado en este trabajo correspondan a un linaje mitocondrial ancestral que fue propagado a través de un barrido selectivo (*selective sweep*) con posterior introgresión, en una subpoblación del lagarto overo, lo cual podría haber dado lugar a un linaje mitocondrial diferente y persistente hasta la actualidad.

Por otro lado, lo que se desarrollará a continuación deriva únicamente de lo que puede inferirse a partir de los resultados obtenidos del análisis del marcador del gen ND4. Debido a esto, todas las conclusiones que siguen deben tomarse a manera de hipótesis en relación con la historia evolutiva de dicho gen, lo cual no implica que corresponda también a la historia evolutiva del genoma nuclear, debido a las características intrínsecas de cada genoma [177][178][179].

En lo que respecta a los árboles génicos resultantes de las dos estimaciones empleadas para calcular los tiempos de divergencia (Figuras 21 y 22), cabe mencionar que, más allá de que en el presente trabajo se analice una única secuencia mitocondrial, se observa que ambos árboles presentan una topología similar a la obtenida en otros trabajos donde se analizaron las relaciones filogenéticas de la subfamilia Tupinambinae, lo cual indicaría que la longitud y el número de las secuencias empleadas en los análisis no generarían sesgos sustanciales en los resultados.

Como se mencionó en capítulos anteriores, tanto Fitzgerald y col. [3] como Murphy y col. [6], mediante el análisis de marcadores mitocondriales, entre ellos el gen ND4, encontraron dos clados profundamente divergentes en esta Familia de lagartos, por un lado, el “clado norte”, que incluye a las especies del género *Tupinambis* y por otro lado el “clado sur” que abarca a las

especies del género *Salvator*. En el presente trabajo, los árboles obtenidos también muestran la existencia de dichos clados, además de la presencia de las secuencias aquí denominadas *Salvator sp.*

Los datos paleoambientales descritos en la Introducción general y la datación de los TMRCA obtenidos en el presente trabajo, darían soporte a la hipótesis de que el género *Tupinambis* (y el actual género *Salvator*; Harvey y col. [5]) se habría originado durante el Mioceno, muy posiblemente en el centro sur de Sudamérica, como describe la bibliografía, y luego los teíidos se habrían expandido hacia el norte favorecidos por las condiciones climáticas [22][23]. En el trabajo de Gols-Ripoll y col. [157], los autores estudiaron la estructura poblacional de la especie *Tupinambis teguixin* en el extremo norte de Sudamérica, y concluyeron que los lagartos del género *Tupinambis* habitaron esa zona antes del surgimiento de los Andes y antes de la ubicación actual del río Orinoco durante el Mioceno tardío (13,5-12,9 MA), lo cual otorga sustento a la hipótesis de que los teíidos ya habitaban gran parte de Sudamérica durante el Mioceno medio-tardío, previamente a los grandes cambios geológicos y climáticos que ocurrieron en el Subcontinente.

Es probable que una vez que comenzó el proceso de divergencia por expansión de los teíidos hacia el norte, las sucesivas introgresiones marinas hayan actuado como barreras que impidieron que los clados entraran en contacto nuevamente, dando lugar así a los clados “norte” y “sur”. Posiblemente, las poblaciones de *Tupinambis* que llegaron hasta el norte del subcontinente hayan quedado separadas geográficamente de las poblaciones del sur (actual género *Salvator*) por alguna de las introgresiones marinas ocurridas en el Mioceno, impidiendo de esta manera el flujo génico entre ellas. En la bibliografía se encuentran ejemplos que apoyan la hipótesis de especiación como consecuencia de los eventos geológicos del continente: Yoke y col. [29] utilizaron la región del gen ND4 para examinar la filogeografía y la estructura genética del complejo de especies del lagarto *Cnemidophorus longicauda* (Squamata, Teiidae). Los diferentes análisis que realizaron estos autores revelaron una profunda divergencia genética entre las poblaciones del norte y del sur, las cuales están separadas geográficamente por las montañas Famatina-Sañogasta, datando además la divergencia entre ambos clados hace unos 6,6-10,8 MA. Los autores postulan que esta antigua división probablemente se deba a que alguna de las introgresiones marinas ocurridas en ese período sería la responsable del aislamiento y posterior especiación de las poblaciones *C. longicauda* y que, además, luego de que se retirara el mar Paranaense, dichas poblaciones se expandieron de manera independiente hacia el norte y hacia el sur aprovechando las grandes llanuras recientemente formadas.

Otro evento paleoambiental importante que influyó en la distribución de la biota sudamericana fue el final de la "era de las grandes planicies", que se correlaciona con una fase diastrófica andina, denominada "Fase Diaguita" (hace aproximadamente 3 MA), cuyo resultado fue la elevación de la Cordillera Central de Argentina y Chile, los sistemas orográficos orientales

de Argentina (Puna, Cordillera Pampeana) y el levantamiento de la región mesopotámica (noreste de la República Argentina). Estos procesos produjeron marcadas consecuencias ecológicas, provocando un efecto de sombra de lluvia que resultó en las condiciones extremadamente xéricas y con bajas temperaturas que existen actualmente en las áreas ubicadas entre la Cordillera Pampeana y los Andes Centrales [17]. Por otro lado, en la Mesopotamia sudamericana los climas eran básicamente cálidos y húmedos, pero con algunos intervalos de aridez. En este área, los bosques en galería presentes en los márgenes de ríos, lagunas y pantanos, actuaron como refugio para las especies que no toleraron las condiciones xéricas antes mencionadas y como un enlace vial con la biota de las áreas tropicales del norte [17].

Es probable que los ejemplares de las especies del actual género *Salvator* se hayan mantenido en la zona centro y norte del continente Sudamericano beneficiados por el clima y el ambiente de las grandes planicies y pastizales [23]. Sin embargo, la creciente aridez en la región central del continente Sudamericano, intensificada por el proceso de la "Fase Diaguíta", posiblemente hayan favorecido la divergencia del lagarto colorado, adaptado a este tipo de ambientes, en contraposición al lagarto overo, que se halla adaptado a ambientes más húmedos [180]. Tal y como propone Albino [23], la adaptación a los nuevos ambientes xéricos ubicados entre los Andes centrales y la Cordillera Pampeana, habrían permitido a *S. rufescens* extender su dominio hacia el oeste y hacia el sur con respecto al lagarto overo, posiblemente quedando este último restringido a las condiciones más cálidas y húmedas de la región mesopotámica. Una prueba de la colonización de los ambientes xéricos del centro sur de Argentina por parte del lagarto colorado es la presencia de una población aislada de la especie ubicada al sur del Río Negro [181], la cual constituye la localización actual más austral del género *Salvator*.

En este punto cabe recordar una de las hipótesis propuestas por Fitzgerald y col. [3], quienes postularon que durante o después de la división entre los clados del norte y sur, *S. rufescens* derivó de *S. merianae*. Además, los autores propusieron que la especialización morfológica y ecológica al ambiente de la región del Chaco seco de Bolivia, Paraguay y Argentina, parecería ser una condición derivada dentro del género. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan evidencia para sustentar dicha hipótesis, en el sentido de que se puede deducir que las especies *S. merianae*, *S. rufescens* y *S. duseni* se separaron luego de la división de *Tupinambis* en los clados norte y sur. Además, se deduce que la especialización de *S. rufescens* en particular, se habría producido durante el Plioceno debido a la adaptación de poblaciones que antes habitaban regiones más húmedas, a las nuevas condiciones de aridez resultantes de los procesos orogénicos. Por otro lado, Albino [23], propuso que las poblaciones del género *Salvator* se habrían separado como consecuencia de las introgresiones marinas, quedando *S. rufescens* al sur, por lo que se habría adaptado a los ambientes áridos de dicha zona, mientras que *S. merianae* habría quedado aislada al norte de la introgresión diferenciándose en los ambientes más cálidos y húmedos del este de Brasil, al sur de la Amazonia, para luego colonizar el bioma del Chaco en

períodos más recientes. Sin embargo, nuestros resultados no estarían en relación con esa hipótesis, ya que las introgresiones marinas ocurrieron entre mediados y finales del Mioceno (hace unos 14-10 MA), mientras que la divergencia calculada en el presente trabajo entre el lagarto colorado y el overo se ubica en un período más reciente, durante el Plioceno (hace unos 4 MA).

Cabe recordar que los resultados expuestos en la presente Tesis fueron obtenidos a partir de un único marcador mitocondrial, por lo que el análisis de los tiempos de divergencia a partir de un único *locus*, puede sobreestimar dicha estimación, en comparación con los análisis realizados a partir de múltiples *loci*. Esta discordancia en los tiempos de divergencia puede deberse, principalmente, a que los árboles de genes y los árboles de especies muchas veces no coinciden, como consecuencia de variaciones en las historias evolutivas de los genes analizados [177][178][179]. Por lo tanto, para confirmar las hipótesis de divergencia propuestas, deberían realizarse estimaciones más precisas a partir del estudio de múltiples marcadores genéticos.

Es importante incluir una mención respecto a *S. duseni*, ya que su clasificación como especie ha sido motivo de conflicto. Según Fitzgerald y col. [3] muchos autores la consideraron perteneciente a *S. rufescens* [32][57][182] a pesar de las claras distinciones morfológicas y ecológicas existentes entre los ejemplares de ambas entidades. En el trabajo de Fitzgerald y col. [3] los individuos clasificados como *S. duseni* se encontraron al este del río Paraguay, en la región del Cerrado, mientras que las poblaciones de *S. rufescens* se ubican al oeste del mismo río, en la región del Chaco Seco. Una posible causa de esta distribución es que *S. rufescens* haya colonizado la región oriental del río Paraguay, la cual posee características geomorfológicas, de suelos, vegetación y clima muy diferentes a las de la región occidental del gran Chaco [183][184], por lo que es factible que las poblaciones de *S. rufescens* que llegaron a dicha región, se hayan adaptado y comenzado a diferenciarse de las poblaciones de las que provenían hace unos 90000 años (según las estimaciones realizadas en la presente Tesis realizadas con un único marcador) dando lugar a la especie actualmente conocida como *S. duseni*. Esto coincide con la hipótesis propuesta por Fitzgerald y col [3], quien postuló que *S. duseni* pudo haberse separado recientemente de *S. rufescens* y experimentado una rápida divergencia morfológica en el hábitat aislado de la región del Cerrado, divergencia que probablemente aún no se refleja completamente en los datos genéticos, ya que, como se mencionó previamente, en el árbol obtenido en este trabajo y en el propuesto por Murphy y col. [6] algunos individuos clasificados como *S. duseni* fueron ubicados dentro del haplogrupo *S. rufescens*, posiblemente debido a su reciente divergencia.

En lo que refiere particularmente a la presencia del grupo de secuencias denominadas *Salvator sp.*, los árboles obtenidos indicarían, con altos valores de probabilidad, que dichas secuencias podrían corresponder a un linaje ND4 diferente dentro del grupo de individuos clasificados como lagarto overo, implicando tanto al genoma mitocondrial como al genoma nuclear, por lo que se podría hipotetizar que se estaría en presencia de un linaje *Salvator sp.* altamente diferenciado con respecto a los individuos pertenecientes a *S. merianae*. En base a esto,

se podría deducir que la divergencia entre *Salvator sp.* y el resto de las especies de los géneros *Salvator* y *Tupinambis* podría también ser consecuencia de los procesos de divergencia por expansión de los tejidos y de las introgresiones marinas actuando como barreras geográficas. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se debería, como ya fue mencionado previamente, ampliar el número de marcadores nucleares y mitocondriales en análisis, que permitan determinar que *Salvator sp.* correspondería efectivamente a un linaje hasta ahora desconocido para el lagarto overo en el sur de su distribución.

Por otro lado, los análisis de dinámicas poblacionales realizados indicarían que se produjo una expansión poblacional de la especie *S. merianae* en la región más austral de su distribución hace unos 2500 años, durante el Holoceno tardío (Figura 23). El Holoceno, un periodo posglacial que comenzó hace unos 10000 años [185], se caracteriza por haber presentado durante su fase media condiciones climáticas secas y estacionales, alcanzando valores máximos de temperatura particularmente en la región centro-sur de Sudamérica, luego dicho período seco fue seguido por un aumento en las precipitaciones, hasta llegar a condiciones climáticas similares a las actuales en el Holoceno tardío [185][186].

Durante el Holoceno tardío, estos cambios climáticos sumados a la última regresión marina datada hace unos 3000 años, influyeron en las características de la flora y la fauna de Sudamérica. Particularmente en la región del centro-sur de Sudamérica se registró una mayor variabilidad climática con episodios cortos de clima árido-semiárido a húmedo y cálido. Estos datos fueron obtenidos a partir de estudios de yacimientos fósiles de polen y animales, los cuales indican que en un período de entre 2000 y 3000 años la zona era árida y semiárida, pero que luego dichas condiciones mejoraron debido a un aumento de humedad, a la presencia de cuerpos de agua y a un aumento de la temperatura, situación evidenciada por el hallazgo de fauna “brasileña” en el registro fósil, la cual se habría expandido hacia latitudes más australes, favorecidas por la existencia de mejores condiciones climáticas de la zona [185][186]. Por lo tanto, es posible que la especie *S. merianae* haya permanecido al norte del subcontinente, mientras las condiciones más áridas y de bajas temperaturas prevalecían en la región del centro-sur, para luego desplazarse hacia zonas más australes a medida que se incrementaban la temperatura y humedad durante el Holoceno tardío [185][186], teniendo en cuenta la datación de la expansión de dicha especie obtenida a través de los análisis de dinámicas poblacionales realizadas en la presente Tesis.

A partir de los resultados antes expuestos se considera que los objetivos planteados en el presente capítulo fueron alcanzados.

## **6. CAPÍTULO III: ESTUDIOS GENÉTICO-POBLACIONALES REALIZADOS MEDIANTE EL EMPLEO DE MICROSATÉLITES**

### **I. INTRODUCCIÓN**

#### **I.I Genética de poblaciones: concepto e historia**

La genética de poblaciones es una disciplina basada en un conjunto de teorías que permiten entender la variabilidad genética y analizar su presencia y dinámica en las poblaciones. Su historia está íntimamente ligada al descubrimiento y formalización de la teoría evolutiva y constituye un soporte a la evolución por selección natural [187]. El origen de esta rama de la genética se remonta hacia 1908, cuando Godfrey Harold Hardy y Wilhelm Weinberg propusieron la ley que explica cómo se pueden estimar las frecuencias genotípicas esperadas en una población partiendo de las frecuencias alélicas de los individuos de la generación previa, en el caso teórico de que dicha población se mantuviera en equilibrio. En este marco, los cambios evolutivos debían contemplarse como la consecuencia de los cambios genéticos en las poblaciones y el estudio predictivo de los cambios en las frecuencias génicas y genotípicas se impuso como el método para entender la evolución darwiniana [187][188].

La metodología de estudio de la genética de poblaciones es multidisciplinaria, ya que incluye herramientas de biología molecular, de sistemática, de mejoramiento animal y vegetal, de conservación y manejo de la vida silvestre, de genética humana, sociología, antropología, matemáticas y estadística. Por lo tanto su alcance es amplio y proporciona la base genética para la biología evolutiva, ya que se ocupa especialmente de los procesos y mecanismos mediante los cuales se realizan los cambios evolutivos [120]. En las poblaciones, la evolución es un cambio acumulativo de las frecuencias alélicas en un *locus* a través de las generaciones y los factores que producen dicho cambio son la mutación, la deriva genética, el flujo génico y la selección natural [188][189].

#### **I.II Agentes de cambio en las frecuencias alélicas de las poblaciones**

La fuente primaria de variación entre individuos es la mutación, la cual constituye un cambio en el material genético y puede surgir por errores de la replicación del ADN, dando lugar a sustituciones, deleciones o inserciones de nucleótidos. Estas variantes pueden ser deletéreas, cuando disminuyen la eficacia biológica del individuo; neutras, cuando no son detectadas por la selección natural; o beneficiosas cuando aumenta la eficacia biológica de los individuos [187][188][189]. La variabilidad genética originada a través de la mutación da lugar a que la selección natural pueda actuar. El proceso de selección natural se produce cuando existe variación fenotípica con base genética entre los individuos de una población y se detecta supervivencia o reproducción diferencial de algunos de ellos, asociada a dicha variación [189]. Así, la selección natural se basa en la reproducción diferencial de unas variantes genéticas respecto de otras, es decir que las proporciones de los alelos de los genes que determinan características adaptativas

cambiarán con el tiempo, de acuerdo a la acción del ambiente actuando en contra o a favor de tales características [188][189].

Por su parte, la deriva genética es un proceso que modifica las frecuencias alélicas de una población entre una generación y otra simplemente como resultado del azar. Los efectos de la deriva son más profundos en poblaciones pequeñas donde, en ausencia de selección, la deriva llevará a cada alelo a la fijación o la extinción en un período de tiempo relativamente corto [82]. Por otro lado, el flujo génico hace referencia a la transferencia de genes de una población a otra y es un componente principal para la existencia de estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local (o subpoblación) de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existen altos niveles de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay escaso flujo génico cada población local evoluciona en forma casi independiente [190].

### **I.III Análisis de diversidad genética y estructura mediante los marcadores microsatélites**

Los marcadores microsatélites pueden utilizarse para estimar los índices de variabilidad y la estructura genética presente en las poblaciones. Como fue señalado en el Capítulo I, los marcadores moleculares han sido utilizados para diferentes fines y uno de los que más se destaca es la estimación de la diversidad genética intra e interpoblacional. En los estudios de genética de poblaciones, los marcadores moleculares permiten identificar alelos, calcular sus frecuencias y así obtener diversos datos poblacionales. De esta manera se pueden estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos; así como también realizar análisis de la estructura de la población [85].

Los datos obtenidos a partir de los marcadores microsatélites permiten el cálculo de una gran variedad de índices, de los cuales los más utilizados son:

- Diversidad alélica ( $N_a$ ): Número promedio de alelos por *locus*, es decir el número total de alelos presente en todos los *loci* dividido por el número total de *loci* analizados [191].
- Número efectivo de alelos ( $N_e$ ): número de alelos que proporcionarían los valores observados de heterocigosis si todos fueran igualmente frecuentes. El  $N_e$  solo es igual al número real de alelos hallados cuando todos esos alelos tienen la misma frecuencia, pero en la mayoría de los casos el  $N_e$  es mucho menor [191].
- Número de alelos privados ( $P_a$ ): alelos presentes exclusivamente en una población, se calcula dividiendo el número de alelos privados en una población por el número de *loci* analizados y depende del tamaño poblacional [192].
- Heterocigosis observada ( $H_o$ ): Se obtiene al dividir el número de heterocigotas para un *locus* en particular por el número total de individuos muestreados [82].
- Heterocigosis esperada ( $H_e$ ): frecuencia de heterocigotos que se esperaría obtener si la población estuviera en equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir, representa la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en la población sean diferentes [82].

Por su parte, como se mencionó en el capítulo II, el método más utilizado para cuantificar la diferenciación genética entre subdivisiones de una población se basa en los estadísticos  $F$ , desarrollados por Wright [130], los cuales emplean los valores de heterocigosis para describir la partición de la variación genética dentro y entre las poblaciones y se calculan a nivel de población total, de subpoblaciones e individual [82][131]. A continuación, se describen los diferentes estadísticos  $F$ :

- Estadístico  $F_{IS}$  (Coeficiente de endogamia): mide el grado de consanguinidad dentro de los individuos en relación con el resto de la subpoblación, es decir, es una medida de la probabilidad de que dos alelos de un individuo sean idénticos por descendencia. Se calcula como:  $F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$ , en donde  $H_I$  es la heterocigosis observada individual en una subpoblación al momento de la investigación. Dicha heterocigosis se calcula como el Número de individuos heterocigotas para un *locus*/Número total de individuos de la subpoblación. Mientras que  $H_S$  es la heterocigosis de la subpoblación que se esperaría obtener si la subpoblación estuviera en equilibrio de Hardy–Weinberg (HW) [82].

- Estadístico  $F_{ST}$ : proporciona una estimación de la diferenciación genética entre subpoblaciones. Es una medida del grado de consanguinidad dentro de una subpoblación en relación con la población total y refleja la probabilidad de que dos alelos tomados al azar dentro de una subpoblación sean idénticos por descendencia. Se calcula como:  $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$ , en donde  $H_T$  es la heterocigosis esperada para la población total. Este estadístico siempre presenta valores positivos. Si dos subpoblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, no serán diferenciadas genéticamente y, por lo tanto,  $F_{ST}$  será cero. Por el contrario, si en dos subpoblaciones se fijan dos alelos diferentes, entonces su valor será igual a uno [82][131]. Según Freeland y col. [82], dentro de ese rango generalmente se considera que:

- \* Valores de  $F_{ST}$  de 0-0,05 indican escasa diferenciación genética;
- \* Valores de 0,05–0,25 indican una diferenciación genética moderada;
- \* Valores superiores a 0,25 representan niveles pronunciados de diferenciación genética.

Las estimaciones de este estadístico se basan en un procedimiento de permutación que combina miles de veces genotipos y poblaciones, y se calcula un valor de  $F_{ST}$  para cada permutación. El valor  $P$  de la prueba se basa en el número de veces que estos valores  $F_{ST}$  son iguales o mayores que el calculado a partir del conjunto de datos real [82].

- Estadístico  $F_{IT}$ : proporciona un coeficiente general de endogamia para un individuo, al medir la heterocigosis de un individuo en relación con la población total. Está influenciado por lo tanto por la existencia de apareamiento no aleatorio dentro de una subpoblación ( $F_{IS}$ ) y la subdivisión de población ( $F_{ST}$ ). Se calcula como:  $F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$ , donde  $H_T$  y  $H_I$  representan los valores descritos en las otras dos ecuaciones [82].

$F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y de la población total respectivamente, y sus valores se encuentran entre -1 y 1, donde los valores positivos indican déficit de heterocigotas y los valores negativos indican exceso de heterocigotas [131].

A su vez, en el análisis de la estructura de las poblaciones, es de suma importancia la determinación de la cantidad de flujo génico existente entre ellas. Por lo general, el flujo génico es precedido por la migración o dispersión de individuos, pero el flujo génico sólo se produce si tales individuos se reproducen exitosamente al llegar a la nueva locación. La comprensión de los movimientos de individuos, gametos (por ejemplo, el polen) y genes entre las poblaciones es fundamental para los estudios de ecología y genética de poblaciones debido a que el flujo génico puede influir profundamente en una gran cantidad de variables relevantes que incluyen el tamaño de la población, su diversidad genética, su adaptación local y, en última instancia, la especiación, ya que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay escaso flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente [82][190].

El modelo teórico empleado generalmente para estimar flujo génico es el de "*islas infinitas*" [130], el cual supone que los organismos forman poblaciones discretas que se diferencian por mutación y deriva génica. El modelo considera condiciones en equilibrio entre deriva y flujo génico para un número infinito de islas o subpoblaciones de igual tamaño, que intercambian migrantes entre cualquiera de las islas con igual probabilidad, y a una tasa constante. Dicho modelo se puede caracterizar con dos parámetros: el tamaño poblacional  $N$  y la tasa de migración  $m$ . Por su parte, el valor de flujo génico ( $Nm$ ), representa el número de migrantes que se incorporan al conjunto génico de la población receptora. Si  $Nm$  es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si  $Nm$  es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada subpoblación [190][193].

En el presente capítulo se incluyen análisis de diversidad y estructura genética, realizados mediante el empleo de los datos obtenidos a partir de los marcadores microsatélites. Se analiza la variabilidad genética tomando como referencia los diferentes sitios de muestreo y se asocian los patrones encontrados con las características ambientales y geográficas de dichos sitios.

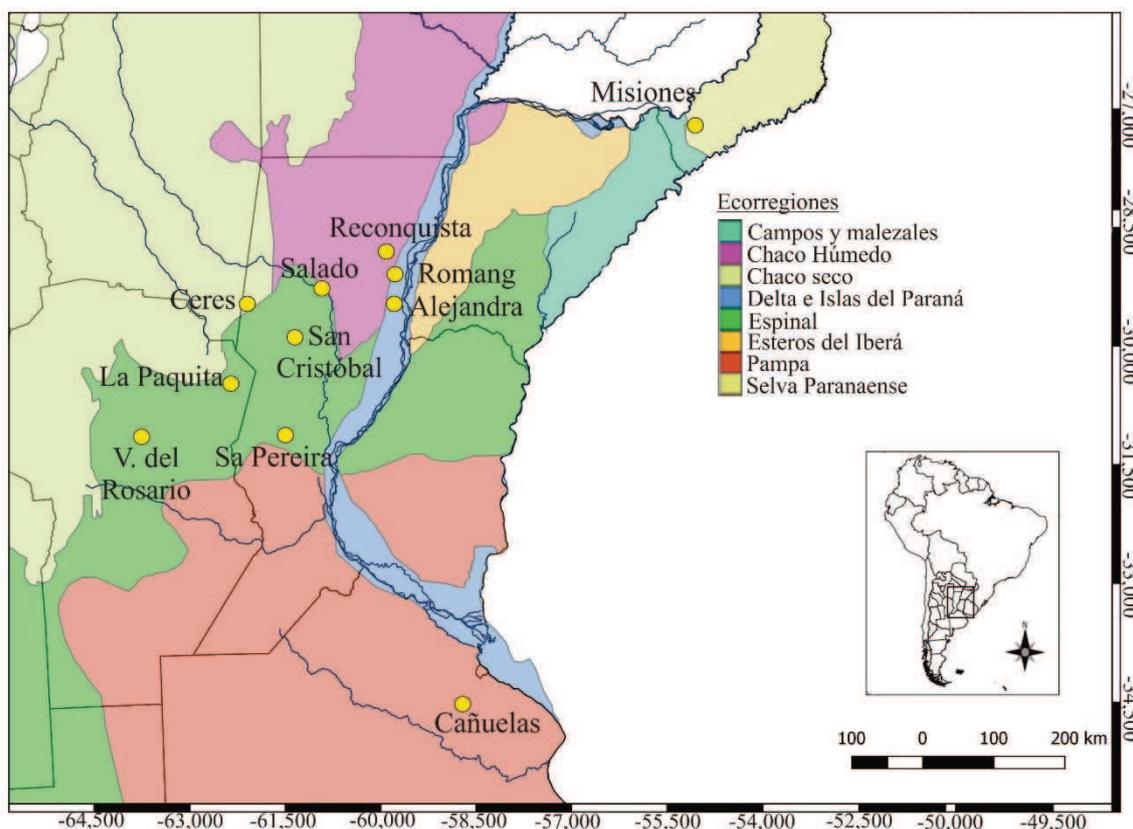
## **II OBJETIVOS DEL CAPÍTULO III**

- Estimar parámetros de variabilidad y estructura genética en las poblaciones analizadas, teniendo en cuenta el grado de divergencia, mediante el análisis de los marcadores microsatélites.
- Asociar los resultados obtenidos de estructura y variabilidad con las características ambientales y geográficas de los sitios de muestreo.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.I Amplificación y genotipificación de muestras con los marcadores microsatélites

Se procedió a la amplificación de 120 muestras de lagarto overo provenientes de once diferentes sitios de muestreo (Figura 26), empleando los diez marcadores microsatélites optimizados descritos en el Capítulo I.



**Figura 26.** Sitios de muestreo en cada una de las provincias. Se observan también las ecorregiones definidas por Burkart y col (8)[8].

En las provincias de Córdoba y Buenos Aires, todas estas muestras fueron analizadas con el marcador mitocondrial (ver Capítulo II), pero aquí se seleccionó un menor número de individuos para amplificar con los marcadores microsatélites con el objetivo de evitar el sobremuestreo de los sitios con dichos marcadores. En lo que respecta a Misiones, debido al bajo número de muestras disponibles, todas fueron amplificadas con ambos marcadores. Por otro lado, la provincia de Santa Fe fue la región de la cual se obtuvieron mayor cantidad de muestras, por lo cual, para evitar el sobremuestreo y para reducir el costo del análisis de las mismas, se decidió amplificar con los marcadores microsatélites aquellas muestras provenientes de sitios de interés por su localización geográfica y que además pudieran ser empleadas en los análisis de paternidad descritos en el Capítulo IV. Así, en la provincia de Santa Fe fueron seleccionados 6 de los 10 nidos previamente utilizados para los análisis descritos en el Capítulo II, con el objetivo de analizar un solo nido por cada localidad muestreada (Romang, San Cristóbal, Alejandra,

Reconquista, Salado y Sa Pereira). A su vez, fueron amplificadas un mayor número de muestras por nido en relación al marcador mitocondrial, seleccionando entre 8 y 10 neonatos en cada uno, ya que el genotipado del total de los individuos de cada nidada resulta de utilidad para el análisis de paternidad descrito en el Capítulo siguiente. Por otro lado, los individuos hallados muertos en rutas y caminos de la provincia de Santa Fe que habían sido analizados con el marcador mitocondrial, no fueron considerados para su análisis con los marcadores microsatélites debido a que no formaban parte de nidos que pudieran ser empleados en los análisis de paternidad. Los detalles de los individuos y del o de los marcadores empleados para la amplificación de las muestras correspondientes se presentan en el ANEXO A. Los productos de amplificación fueron enviados a analizar a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur, donde las reacciones se llevaron a cabo mediante el secuenciador automático ABI 3730 (*Applied Biosystems*®).

Una vez obtenidos los resultados, se llevó a cabo la genotipificación de cada una de las muestras mediante el empleo del programa Peak Scanner® versión 1.0 (*Applied Biosystems*). Finalmente, los genotipos de cada uno de los individuos analizados fueron registrados en una planilla en formato Excel (*Microsoft*® Excel, 2007), paso necesario para el posterior análisis de los datos.

Luego se estimó la presencia de alelos nulos en el genotipo obtenido de los individuos, para cada *locus* y para cada uno de los sitios de muestreo, utilizando para ello el programa MICROCHECKER 2.2.3 [194], un programa que evalúa los genotipos detectados mediante el uso de microsatélites en poblaciones diploides. El programa facilita la identificación de errores de genotipado debidos a la existencia de alelos que no fueron amplificados en las muestras bajo análisis (denominados “alelos nulos”), la identificación del dominio de alelos correspondientes a secuencias cortas debido a la amplificación preferencial de dichas secuencias durante la PCR, y la detección de errores tipográficos [194]. La estimación de los alelos nulos se basa en el supuesto de que en el conjunto de datos analizado se cuenta con una muestra de una población en equilibrio de Hardy-Weinberg en la que se puede estimar la frecuencia de los alelos nulos mediante la evaluación del déficit de heterocigotos [195].

### **III.II Estructura y variabilidad genética de los datos obtenidos con los marcadores microsatélites en los sitios muestreados**

En primer lugar se calculó el desvío del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el programa Arlequin [150] para cada *locus* y para cada uno de los sitios de muestreo. Luego, la estructura poblacional se evaluó mediante el programa STRUCTURE 2.3.4 [196], el cual utiliza un método de agrupamiento basado en modelos que usan datos de genotipos multi *locus* para inferir la estructura poblacional y asignar individuos a las diferentes poblaciones, mientras que simultáneamente estima las frecuencias de alelos de dichas poblaciones. El programa asume un modelo en el que existen  $K$  poblaciones en el conjunto de datos analizados (donde  $K$  puede ser

desconocido), cada una de las cuales se caracteriza por sus frecuencias alélicas para cada *locus*. Cada uno de los individuos contenido en la muestra es asignado probabilísticamente a una población, o bien, conjuntamente a dos o más poblaciones si el genotipo indica que posee información combinada de diferentes poblaciones [196].

Mediante el empleo de dicho programa se realizó una estimación bayesiana de las proporciones de mezcla ( $q_i$ ), es decir la proporción del genoma de cada individuo que deriva de cada población de origen  $i$ . El análisis fue realizado usando el modelo *admixture*, el cual se usa generalmente debido a que la “mezcla” genética entre poblaciones es una característica común, de tal manera que una gran proporción de individuos muestreados pueden tener antepasados recientes provenientes de múltiples poblaciones. Además, se usó el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas ya que proporciona un mayor poder para detectar poblaciones distintas que están estrechamente relacionadas [197].

Se realizó una primera corrida, en la cual, para el número probable de poblaciones ( $K$ ) se tomó como máximo valor el número de sitios muestreados, dando como resultado un rango probable de entre 1 a 11 poblaciones (los 11 sitios de muestreo), con 10 iteraciones para cada  $K$  probado. El número de iteraciones de la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) fue de 1 millón y el *burnin* de 100000. Para calcular el  $K$  más probable se utilizó el servicio web STRUCTURE Harvester 0.6.94 [198], el cual proporciona una forma rápida de evaluar y visualizar valores de probabilidad en múltiples valores de  $K$  y cientos de iteraciones, y facilitar la detección de la cantidad de grupos genéticos que mejor se ajustan a los datos. Para ello se ejecutó el método "Delta  $K$  de Evanno:  $\Delta K$ " [199], el cual permite obtener una gráfica de los valores de probabilidad media por  $K$  y una tabla con los resultados del análisis [198]. Posteriormente los resultados derivados a partir de las 10 iteraciones para el  $K$  más probable, fueron resumidos y promediados usando CLUMPP 1.1.2 [200], cuyos datos obtenidos son utilizados para realizar el gráfico definitivo que muestra los porcentajes de asignación de cada individuo a las poblaciones halladas. Para la elaboración del gráfico resultante se empleó una plantilla personalizada del programa Microsoft® Excel (2007).

Luego, en base al resultado de la primera corrida, se redujo el número de  $K$  probados y se aumentó el número de iteraciones de la MCMC, con el objetivo de lograr mayor poder estadístico. En esta segunda corrida se probó un rango probable de  $K$  de entre 1 a 9 poblaciones, con 10 iteraciones para cada uno. Cabe mencionar que la elección de dicho rango radica en el hecho de que, en la primera corrida, se obtuvo un  $K$  más probable bien definido, pero a la vez se observó un segundo número de grupos probables ( $K=9$ ) con un elevado Delta  $K$  (ver sección Resultados), por lo que se decidió probar si, al aumentar el número de iteraciones, cambiaba el patrón obtenido en cuanto a cuál sería el  $K$  más probable para los datos analizados. El número de iteraciones de la MCMC fue de 5 millones y el *burnin* de 500000. El cálculo del  $K$  más probable se realizó con el

mismo procedimiento que en la anterior corrida. Nuevamente, para la elaboración del gráfico se empleó la plantilla personalizada del programa Microsoft® Excel (2007).

También se estimó el índice de fijación ( $F_{IS}$ ), el índice de subdivisión poblacional  $F_{ST}$  de Wright [130] y el nivel de flujo génico  $Nm$  para complementar el análisis de los patrones de estructura genética. Además, se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), similar al descrito en el Capítulo II, pero calculado en base a los datos de los microsatélites. Estos análisis se realizaron empleando los programas Arlequin [150] y GenAlEx [201]. Además se aplicó un Test de Mantel para evaluar si la diferenciación genética encontrada se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia [202], para lo cual se empleó el programa AIS 1.0 [203].

Por su parte, los índices de variabilidad genética estimados fueron: número promedio de alelos por *locus* ( $N_a$ ), número de efectivo alelos ( $N_e$ ), número de alelos privados ( $P_a$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ), porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ). Los cálculos fueron realizados utilizando el programa GenAlEx [201].

## **IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

### **IV.I Resultados**

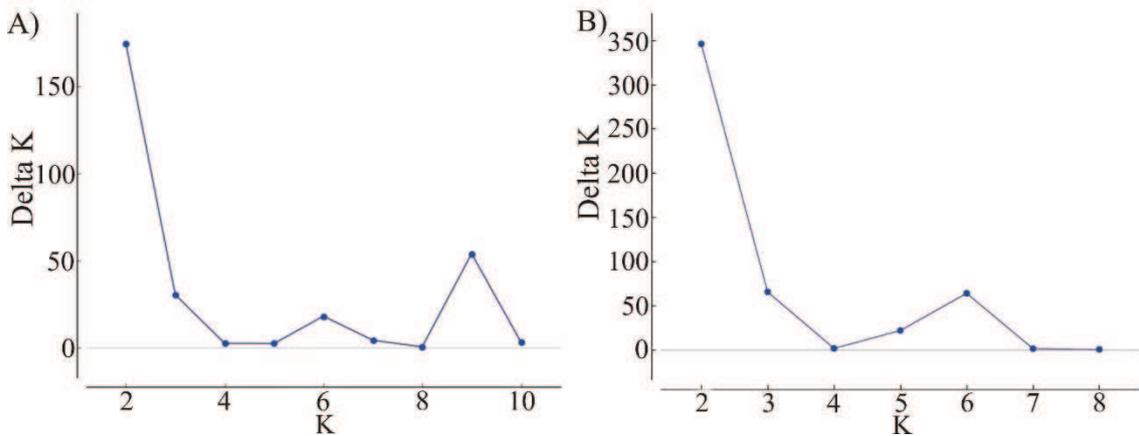
#### **IV.I.I Amplificación y genotipificación de las muestras con los marcadores microsatélites**

Se logró amplificar exitosamente las 120 muestras con los 10 marcadores microsatélites optimizados descritos en el Capítulo I, (con excepción de 7 muestras en las cuales el genotipo resultó incompleto), obteniendo así el genotipo compuesto correspondiente a cada uno de los individuos (ANEXO D). El análisis realizado mediante el programa MICROCHECKER dio como resultado que, en algunos de los sitios muestreados, los marcadores *Smer23*, *Smer157* y *Smer240* presentaron evidencia de alelos nulos, mientras que en otros sitios ninguno de los marcadores amplificados presentó evidencia de dichos alelos (ANEXO E- Tabla A). En base a esta discordancia en los resultados se decidió emplear en los sucesivos análisis los datos de los 10 marcadores microsatélites, ya que la presencia/ausencia de alelos nulos no correspondería a una característica del marcador, sino que sería un factor intrínseco de cada uno de los sitios de muestreo.

#### **IV.I.II Estructura y variabilidad genética de los datos obtenidos con los marcadores microsatélites**

En primer lugar, mediante el análisis del desvío del equilibrio de HW en cada sitio muestreado por separado, pudo constatar la presencia de *loci* con desvíos significativos de dicho equilibrio ( $p < 0,05$ ) y que, además, los *loci* que se desviaron de dicho equilibrio variaron dependiendo del sitio analizado, por lo que se infiere la existencia de diferentes fuerzas de selección actuando sobre esos sitios (ANEXO E- B). Por estos motivos se decidió realizar los análisis con el total de los 10 microsatélites bajo análisis.

Por su parte, la inferencia bayesiana en el estudio de las proporciones de mezcla para los 120 individuos y el test de Evanno ( $\Delta K$ ) aplicado a los datos obtenidos mediante STRUCTURE, identificaron en la primera corrida ( $K= 1$  a 11, considerando los 11 sitios de muestreo) como resultado más probable la existencia de 2 grupos en el set de datos ( $K= 2$ : Media LnP ( $K$ )= -3218,43; Desviación estándar= 0,37; Delta  $K= 174,16$ ) (Figura 27-A). Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, en la gráfica obtenida puede observarse un segundo pico en  $K= 9$  (Media LnP ( $K$ )= -2794,73; Desviación estándar= 2,45; Delta  $K= 54,02$ ) (Figura 27-A).



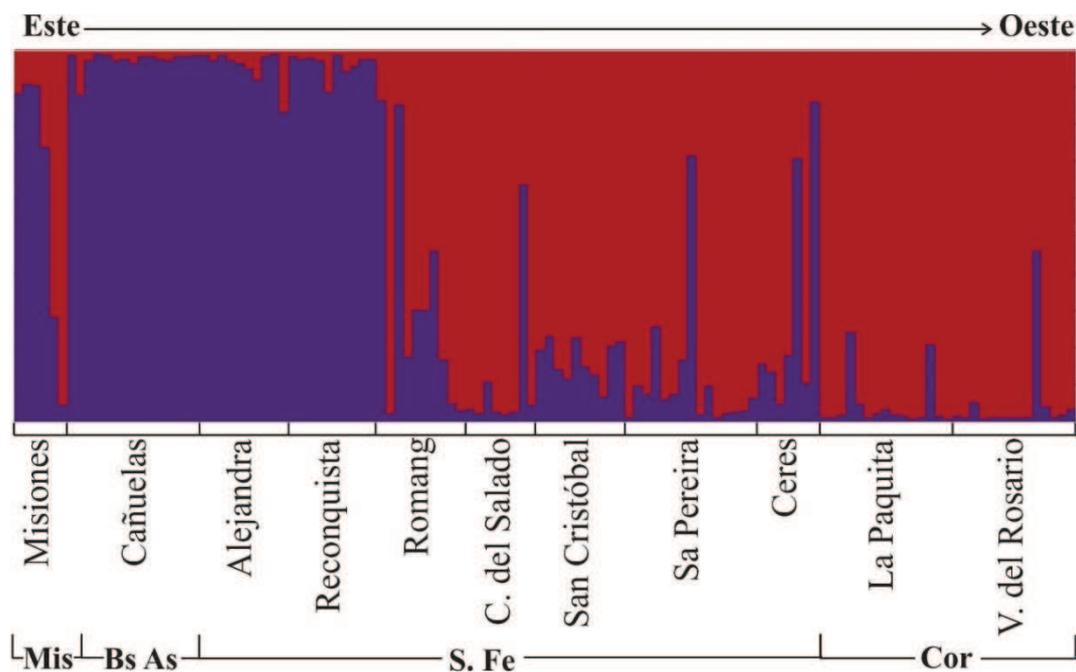
**Figura 27.** Resultados de STRUCTURE Harvester de las corridas para el método de Evanno ( $\Delta K$ ) en base a las posibles poblaciones definidas previamente en el programa STRUCTURE. A) Rango probable de poblaciones: 1 a 11. B) Rango probable de poblaciones: 1 a 9. Se observa que  $K= 2$  es el valor más probable en los datos analizados para las dos corridas realizadas (*delta K* de mayor valor).

De todos modos, en la segunda corrida ( $K= 1$  a 9), los análisis también identificaron como resultado más probable, la existencia de 2 grupos en el set de datos con un Delta  $K$  de aproximadamente el doble que el obtenido con el menor número de iteraciones empleadas en la primera corrida ( $K= 2$ : Media LnP ( $K$ )= -3218,43; Desviación estándar= 0,19; Delta  $K= 346,24$ ). Los resultados de la segunda corrida se presentan en la figura 27-B y la Tabla 19.

**Tabla 19.** Resumen de los resultados de la segunda corrida, obtenidos a partir del método de Evanno desarrollado mediante el uso del servicio web STRUCTURE Harvester. El resaltado amarillo muestra el valor mayor en la columna *Delta K*, es decir el de mayor verosimilitud. En este caso el valor  $K=2$ , replicado un número de 10 veces, presenta el valor *delta K* más alto.

K	Rep.	Media LnP(K)	Desv. LnP(K)	Ln'(K)	Ln"(K)	Delta K
1	10	-3388,1200	0,1317	—	—	—
2	10	-3218,4300	0,1889	169,69000	65,39000	346,242262
3	10	-3114,1300	0,3683	104,30000	24,27000	65,892077
4	10	-3034,1000	1,7068	80,030000	3,500000	2,050562
5	10	-2957,5700	0,6290	76,530000	14,00000	22,256830
6	10	-2895,0400	0,4006	62,530000	25,75000	64,285776
7	10	-2858,2600	4,8480	36,780000	8,450000	1,743003
8	10	-2829,9300	7,0739	28,330000	6,740000	0,952798
9	10	-2794,8600	3,3138	35,070000	—	—

Al analizar la distribución de los dos *clusters* definidos por STRUCTURE pudo constatarse un gradiente longitudinal (de este a oeste) en la estructuración de los sitios analizados: el *cluster 1* agruparía los sitios de muestreo que se encuentran más hacia el este de la distribución y el *cluster 2* agruparía los sitios de muestreo localizados más hacia el oeste de la distribución, quedando en el centro del gradiente los individuos localizados en la región central del área muestreada (Figura 28).



**Figura 28.** Estructura poblacional. Los *clusters* ( $K$  poblaciones) son identificados con colores. Cada barra representa un individuo y se divide en segmentos (probabilidades) que indican su origen genético probable. El *cluster 1* está representado por el color violeta y agrupa a los sitios de muestreo localizados hacia el este de la distribución. El *cluster 2* está representado por el color rojo y agrupa los sitios de muestreo localizados hacia el oeste de la distribución. En la sección superior del gráfico se observa la dirección del gradiente longitudinal en base al cual fueron organizados los sitios de muestreo: Este a Oeste. En la sección inferior del gráfico se detalla el sitio de muestreo de los cuales provienen los individuos y las provincias a las que pertenecen: Mis: Misiones; BsAs: Buenos Aires S.Fe: Santa Fe; Cor: Córdoba.

Por su parte, los índices de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) entre los sitios de muestreo resultaron en su mayoría moderados [82] y todas las comparaciones de a pares resultaron altamente significativas (Valor  $p < 0,0001$ ) (Tabla 20). Entre algunos sitios cercanos entre sí, los valores  $F_{ST}$  muestran baja diferenciación genética, por ejemplo, entre Sa Pereira y La Paquita ( $F_{ST}= 0,08146$ ) o entre Sa Pereira y Villa del Rosario ( $F_{ST}= 0,06038$ ). En cambio entre otros sitios cercanos geográficamente, el  $F_{ST}$  alcanza valores mucho más altos, por ejemplo, entre San Cristóbal y Costa del Salado ( $F_{ST}= 0,19058$ ) o entre San Cristóbal y Romang ( $F_{ST}= 0,18470$ ), lo que lleva a suponer que la distancia geográfica no influye en forma determinante en la diferenciación genética de los grupos de individuos (ver Figura 26 para referencias de la ubicación geográfica).

**Tabla 20.** Comparaciones de a pares de los valores  $F_{ST}$  (debajo de la diagonal) y valores  $p$  (arriba de la diagonal), resultantes de las comparaciones entre los sitios de muestreo a partir de los marcadores microsatélites. Todos los valores  $p$  resultaron significativos ( $p < 0,0001$ ).

	Misiones	Buenos Aires	Alejandra	Reconquista	Romang	C. del Salado	San Cristóbal	Sa Pereira	Ceres	La Paquita	V. del Rosario
Misiones		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
Buenos Aires	0,14833		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
Alejandra	0,18839	0,19316		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
Reconquista	0,16454	0,10736	0,14326		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
Romang	0,17286	0,15688	0,17006	0,11862		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
C. del Salado	0,20845	0,14497	0,20989	0,18124	0,18271		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
San Cristóbal	0,23820	0,18836	0,20429	0,18374	0,18470	0,19058		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
Sa Pereira	0,14475	0,09078	0,17565	0,13085	0,10539	0,07605	0,13755		0,00000*	0,00000*	0,00000*
Ceres	0,14761	0,13024	0,24182	0,14233	0,14697	0,17699	0,21224	0,10005		0,00000*	0,00000*
La Paquita	0,13013	0,11430	0,16147	0,15171	0,12770	0,13280	0,16461	0,08146	0,19241		0,00000*
V.del Rosario	0,13904	0,10159	0,18098	0,14462	0,11750	0,11416	0,16064	0,06038	0,15731	-0,00533	

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Del mismo modo, el resultado del Test de Mantel ( $r= 0,2249$ ; valor  $p= 0,001$ ) indica que, aunque fue significativo, el valor  $r$  resultó bajo ya que un 78 % de los datos se comportarían de manera independiente, por lo que la diferenciación genética no se ajusta a un modelo estricto de aislamiento por distancia, corroborando lo observado anteriormente en los valores  $F_{ST}$ .

A su vez, los valores de  $Nm$  pareados (Tabla 21) sugieren que existe flujo génico entre las poblaciones, incluso en lo que respecta a sitios tan alejados como Misiones y Buenos Aires ( $Nm= 1,43543$ ). Resulta interesante destacar el caso de Sa Pereira, ya que es el sitio que intercambia mayor cantidad de migrantes con la mayoría de los otros sitios, lo cual puede deberse a que se encuentra en el centro geográfico del área analizada (Figura 26). Otro resultado relevante es el  $Nm$  que se observa entre La Paquita y Villa del Rosario, el cual es tan alto que el programa Arlequin lo consideró como “infinito”.

**Tabla 21.** Número efectivo de migrantes por generación ( $N_m$ ) entre los sitios de muestreo analizados. Datos obtenidos a partir de los *loci* microsatélites.

	Misiones	Buenos Aires	Alejandra	Reconquista	Romang	Salado	San Cristóbal	Sa Pereira	Ceres	La Paquita
Misiones										
Buenos Aires	1,43543									
Alejandra	1,07701	1,04427								
Reconquista	1,26940	2,07857	1,49503							
Romang	1,19629	1,34353	1,20110	1,85752						
Salado	0,94936	1,47445	0,94110	1,12941	1,11830					
San Cristóbal	0,79954	1,07726	0,97375	1,11062	1,10358	1,06177				
Sa Pereira	1,47714	2,50389	1,17329	1,66061	2,12222	3,03745	1,56750			
Ceres	1,44371	1,66949	0,78383	1,50653	1,45100	1,16253	0,92791	2,24864		
La Paquita	1,67117	1,93726	1,29830	1,39784	1,70765	1,63247	1,26876	2,81894	1,04933	
V.del Rosario	1,54807	2,21088	1,13139	1,47868	1,87765	1,93988	1,30628	3,89025	1,33922	infinito

En lo que respecta al Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los datos de los marcadores microsatélites, la diferenciación genética global resultó moderada ( $F_{ST}= 0,14974$ ; valor  $p < 0,0000$ ) [82]. Además, en la Tabla 22 se observa que la mayor diversidad genética se encuentra principalmente dentro de los sitios de muestreo, lo que sugiere una leve estructuración poblacional.

**Tabla 22.** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) basado en los *loci* microsatélites para los once sitios de muestreo analizados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre Provincias	48.352	0.09669	2.98709
Entre sitios de muestreo dentro de las provincias	76.647	0.38802	11.98694
Dentro de los sitios de muestreo	630.280	2.75232	85.02597
Total	755.279	3.23703	100

Por su parte, la variabilidad genética resultó moderada en cada uno de los sitios analizados ( $H_o= 0,510-0,679$ ;  $H_e= 0,445-0,586$ ) (Tabla 23). Además la heterocigosis observada ( $H_o$ ) fue mayor a la esperada ( $H_e$ ) en la mayoría de los sitios, presentando en su mayoría un exceso de heterocigotas (valores negativos del  $F_{IS}$ ); únicamente el sitio Villa del Rosario mostró un leve déficit de heterocigotas (valor positivo de  $F_{IS}$ ) (Tabla 23).

**Tabla 23.** Diversidad genética basada en *loci* microsatélites para los sitios de muestreo analizados. Número de individuos ( $N$ ), número promedio de alelos por *locus* ( $N_a$ ), número de efectivo alelos ( $N_e$ ), número de alelos privados ( $P_a$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ). Índice de fijación ( $F_{IS}$ ) y su error estándar ( $SE$ ).

Índices de diversidad genética estimados por sitio con los datos de microsatélites								
Sitio de muestreo	$N$	$N_a$	$N_e$	$P_a$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$	$SE$
Misiones	6	3,900	2,916	0,367	0,625	0,541	-0,165	0,076
Cañuelas	15	4,000	2,846	0,213	0,673	0,535	-0,246	0,121
Alejandra	10	3,200	2,609	0,000	0,610	0,563	-0,094	0,125
Reconquista	10	3,000	2,273	0,000	0,550	0,474	-0,136	0,104
Romang	10	3,400	2,468	0,000	0,590	0,509	-0,122	0,101
Salado	8	2,800	2,406	0,000	0,554	0,477	-0,184	0,103
San Cristóbal	10	2,300	1,913	0,000	0,510	0,395	-0,263	0,135
Sa Pereira	15	4,500	2,856	0,221	0,593	0,565	-0,043	0,095
Ceres	7	3,200	2,424	0,100	0,529	0,445	-0,196	0,084
La Paqueta	15	4,700	3,115	0,100	0,679	0,586	-0,170	0,080
V. del Rosario	14	4,700	3,012	0,133	0,533	0,576	0,079	0,094
Promedio		3,609	2,622	0,103	0,586	0,515	-0,140	0,102

Los sitios presentaron en general bajos niveles de diversidad alélica, lo cual puede constatarse al observar los valores medios del número de alelos ( $N_a= 3,609$ ) y del número efectivo de alelos ( $N_e= 2,622$ ) (Tabla 23). Además, los valores de  $N_a$  y de  $N_e$  por lo general son más altos en aquellos sitios que presentan un mayor número de individuos analizados (Cañuelas, Sa Pereira, La Paquita y Villa del Rosario), siendo Misiones la excepción ya que es el sitio con menor número de individuos analizados, pero presenta valores de  $N_a$  y de  $N_e$  por encima del promedio general (Tabla 23). Sin embargo, cabe mencionar que los individuos de Misiones no pertenecen a un único sitio, sino que se localizaron separados por algunos kilómetros, pero como solo se dispone de un individuo por punto de muestreo se los agrupó a fines de poder realizar los análisis poblacionales comparativos. Por su parte, los valores más altos de  $P_a$  (Tabla 23) se presentan en los sitios localizados en los límites latitudinales de la zona de muestreo: Misiones y Cañuelas, que son los sitios ubicados más al norte y al sur respectivamente de nuestra zona de estudio. A su vez, se observan valores altos de este índice en Sa Pereira, que es el sitio ubicado más al sur dentro de la provincia de Santa Fe, y Villa del Rosario que es el sitio que se localiza más hacia el oeste en nuestra región de estudio (Figura 26). En el ANEXO F, se detallan los alelos privados pertenecientes a cada uno de los sitios mencionados.

#### **IV.II Conclusiones**

El análisis con STRUCTURE indica, como resultado más probable, la presencia de dos *clusters* (Figura 27 y Tabla 19), los cuales, como se mencionó en la sección Resultados, parecerían reflejar un gradiente Este – Oeste (Figura 28). Al analizar la distribución de los sitios de muestreo en ambos *clusters*, puede hipotetizarse que dicho gradiente longitudinal estaría relacionado con un gradiente de humedad, ya que todos los sitios agrupados en el *cluster* 1 están ubicados en ecorregiones con elevados índices de humedad, como son la Selva Paranaense: Misiones; Delta e Islas del Paraná: Alejandra, Reconquista, Romang (sitio que presenta ancestría mixta) y La Pampa: Cañuelas; mientras que los sitios agrupados en el *cluster* 2 se encuentran situados en ecorregiones con menores índices de humedad como es El Espinal: Villa del Rosario, San Cristóbal; o en el límite entre El Espinal y el Chaco seco: La Paquita, Ceres; entre El Espinal y el Chaco húmedo: Costa del Salado; y entre El Espinal y La Pampa: Sa Pereira; todas ecorregiones que se caracterizan por una reducción de las precipitaciones en sentido Este-Oeste [7][8]. Por lo tanto, las características del ambiente en el cual se desarrollan estos lagartos podrían estar ejerciendo influencia sobre la diversidad genética de sus poblaciones.

En este punto cabe mencionar el trabajo de Cabaña y col [10], citado previamente en el Capítulo I. En dicho trabajo los autores, mediante el estudio de un gen mitocondrial y un gen nuclear, analizaron la estructura genética de *S. merianae* y *S. rufescens* en el marco de análisis de nichos climáticos para comprender los principales factores que contribuyen a la variación genética y a la estabilidad en la zona híbrida de ambas especies. Para ello estudiaron una región que incluye una clina climática orientada de este a oeste y que abarcó dos ecorregiones: desde el Espinal

(centro-sur de la provincia de Córdoba y límite entre las provincias de Córdoba y Santa Fe) al Chaco seco (noroeste de la provincia de Córdoba), incluyendo además el ecotono entre ellas. La región que estudiaron alberga poblaciones únicamente de *S. merianae* (muestreadas de la ecorregión El Espinal), poblaciones únicamente de *S. rufescens* (muestreadas de la ecorregión del Chaco seco) y poblaciones simpátricas. Estas últimas se encuentran en la región central, en el ecotono entre el Chaco seco y el Espinal, dando lugar a la zona híbrida, la cual se ubica geográficamente en el centro-norte de la provincia de Córdoba. Los autores encontraron, particularmente para la especie *S. merianae*, diferencias genéticas entre los individuos que habitan la zona híbrida y los individuos que habitan en la zona de alopatría (Chaco seco y El Espinal), además de detectar un patrón de aislamiento por ambiente por lo que concluyeron que las condiciones climáticas podrían explicar las diferencias genéticas halladas en *S. merianae*, indicio de que el tipo de ambiente tendría influencia sobre la diferenciación genética de las poblaciones del lagarto overo. Mientras que, para el lagarto colorado, concluyeron que los nichos ocupados en la zona de alopatría y simpatría son similares y que el clima podría no estar influyendo en su estructura genética. Es decir, que los resultados obtenidos por Cabaña y col [10] coinciden con las conclusiones enunciadas aquí para el lagarto overo, en cuanto a que las características genéticas de las poblaciones de estos lagartos estarían influenciadas por las condiciones ambientales en donde se desarrollan.

Por su parte, los análisis de diversidad genética y estructura poblacional realizados en las poblaciones estudiadas de lagarto overo, indican que la mayor variabilidad genética se halla dentro de los sitios de muestreo y que existe una diferenciación genética baja a moderada entre dichos sitios (Tabla 22). Además, el test de Mantel, aunque resultó significativo, presenta un valor muy bajo, lo cual indica que los datos no se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia y esto lleva a suponer que hay otros factores que tienen mayor influencia que la distancia geográfica sobre la diferenciación genética entre los sitios.

En este sentido, Sa Pereira sería un ejemplo de lo antes enunciado, ya que su diferenciación genética es baja a moderada con respecto a los otros sitios, presenta un número de alelos por encima de la media general e intercambia mayor cantidad de migrantes con la mayoría de los otros sitios (Tablas 20, 21 y 23), además de poseer alelos privados. Esto puede deberse, a que este sitio se encuentra en un punto geográfico central en la zona de muestreo, pero a su vez las condiciones ambientales podrían estar favoreciendo su diversidad, ya que se localiza en el límite entre las ecorregiones del Espinal y La Pampa, además de hallarse cercano a la ecorregión del Delta e Islas del Paraná (Figura 26), es decir que se encuentra en una zona de transición entre diferentes ecorregiones. Esta diversidad de ambientes posiblemente favorezca el intercambio genético entre las poblaciones de lagarto overo y contribuya a incrementar la diversidad genética, ya que ha sido demostrado que, en la mayoría de los casos, la heterogeneidad ambiental y las altas tasas de migración favorecen el incremento de la diversidad genética en muchas especies

[82][204]. Algo similar podría ocurrir con los sitios Ceres y La Paquita, los cuales se localizan en el límite entre el Chaco seco y el Espinal y también poseen alelos privados. Además, La Paquita presenta los mayores valores de *Ho* y *He*, por lo que nuevamente el área de transición entre ecorregiones parecería estar favoreciendo la variabilidad genética.

A su vez, Misiones y Cañuelas también se cuentan entre los sitios de mayor variabilidad genética, debido a sus altos índices de *Ho* y *He*, además de presentar valores de *Na*, *Ne* y *Pa* superiores a la media general (Tabla 23). En este caso dicha variabilidad podría explicarse por el hecho de estar ubicados más al norte y al sur respectivamente (Figura 26): Misiones localizado en la ecorregión de la Selva Paranaense, zona caracterizada por una gran diversidad biológica [7], mientras que Cañuelas se halla ubicado en la ecorregión pampeana y cercano al límite con la ecorregión Delta e Islas del Paraná. Lo destacable en estos sitios es que, aún estando muy distanciados geográficamente, se constató la presencia de flujo génico entre ambos, muy probablemente debido a que la Selva Paranaense se extiende en las márgenes de los ríos hacia el sur, conformando de esta manera un corredor biológico para una gran variedad de especies vegetales y animales, incluyendo en este caso al lagarto overo [7][205].

Es importante mencionar el trabajo realizado por Wood [89], ya que es el único llevado a cabo mediante el empleo de marcadores microsatélites específicos para *S. meriana*. En dicho trabajo, como ya se mencionó en el Capítulo I, se analizaron dos poblaciones localizadas en Florida (Estados Unidos), con el fin de emplear los datos resultantes para delinear planes de manejo de esta especie, considerada invasora en dicho país. El autor encontró que ambas poblaciones presentan bajos niveles de diversidad alélica, con un rango de 2 a 4 alelos, valores similares a los obtenidos en la presente Tesis. A su vez, el valor de la heterocigosis también resultó moderado (*He* media = 0,44), aunque algo menor a la heterocigosis media obtenida en la presente Tesis (*He* media = 0,51). El autor postula que las estimaciones obtenidas en su trabajo son consistentes con niveles bajos de diversidad alélica reportadas para otros reptiles invasores en Florida, sin embargo, en base a los resultados obtenidos en la presente Tesis a partir de poblaciones nativas, puede hipotetizarse que la baja diversidad alélica es una característica de la especie. Por su parte, el autor halló, a diferencia de los resultados aquí descriptos, que las poblaciones se encuentran bien estructuradas y con escasos niveles de flujo génico entre ellas, pero esto puede ser consecuencia de que ambas poblaciones se hallaban en los primeros estadios del proceso invasivo.

Teniendo en cuenta los resultados antes descriptos, se considera que los objetivos planteados para este capítulo fueron alcanzados.

## 7. CAPÍTULO IV: ESTUDIO DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO

### I INTRODUCCIÓN

#### I.I Sistemas de apareamiento y análisis de parentesco

El sistema de apareamiento de una especie hace referencia al modo en que los individuos obtienen pareja, al número de parejas que establecen durante la etapa reproductiva y al tipo de cuidado parental que llevan a cabo [206].

Los sistemas de apareamiento son el resultado de una serie de procesos de selección, como la elección de pareja, la competencia por las parejas, la sincronía de la receptividad sexual, entre otros [206], por lo cual son diversos, y su clasificación resulta difícil ya que el comportamiento reproductivo de los individuos de una especie a menudo puede englobarse en varias categorías [207], las cuales se mencionan a continuación.

- Existen cinco tipos básicos de sistemas de apareamiento animal definidos por Freeland y col. [82]. El primero de ellos, la **monogamia**, implica un vínculo de pareja entre un macho y una hembra, y prevalece cuando los recursos están uniformemente distribuidos. Este sistema es muy raro en la mayoría de los grupos taxonómicos, excepto en las aves, grupo en el cual se estima que el 90% de las especies son monógamas, lo cual puede ser explicado por la preponderancia del cuidado biparental en estos animales. Por otro lado, en la **poligamia** los lazos reproductivos involucran a múltiples machos y / o hembras. Dentro de la poligamia, Freeland y col. [82] incluye diferentes categorías:
- **Poliginia**: puede producirse si la descendencia logra sobrevivir sin el cuidado paterno y si un macho resulta atractivo para múltiples hembras. En muchas especies, esto ocurre cuando recursos como el alimento se distribuyen de manera irregular, ya que los machos suelen defender territorios de alta calidad que atraen a varias hembras.
- **Poliandria**: los roles sexuales de los machos y las hembras se invierten y las hembras, que en estos casos tienden a ser más grandes y coloridas que los individuos del sexo masculino, competirán y defenderán territorios a los que atraerán a múltiples machos, además en este caso son los machos quienes realizan la mayor parte del cuidado parental.
- **Poliginandria**: se refiere a la situación en la que dos o más machos dentro de un grupo están unidos reproductivamente con dos o más hembras.
- **Promiscuidad**: Sistema en el que cualquier hembra puede aparearse con cualquier macho sin que existan vínculos sociales, por lo tanto, la diferencia con la poliginandria radica en la ausencia de dichos vínculos.

La caracterización de los sistemas de apareamiento se basó originalmente en observaciones etológicas y experimentos de campo y laboratorio, y se ha modificado sustancialmente en los últimos años. La clave para una mejor comprensión de los sistemas de apareamiento ha sido la incorporación de datos genéticos moleculares a los análisis de parentesco, un enfoque que ha permitido identificar las relaciones genéticas de la descendencia y de sus supuestos padres [82].

El análisis de paternidad es una piedra angular de la investigación en ecología molecular, ya que desempeña un papel central en el estudio de diversos temas ecológicos y evolutivos, como la selección sexual, los patrones de dispersión y la estimación de parámetros genéticos cuantitativos. Además, la introducción de los marcadores microsatélites consistió en un avance tecnológico importante para los estudios de ecología molecular, lo cual fue acompañado por una proliferación y refinamiento de técnicas estadísticas para desarrollar los análisis de datos de parentesco. La introducción de los marcadores microsatélites produjo una revisión completa del análisis de paternidad porque representan el estudio de *loci* únicos, fácilmente evaluables, son codominantes e hipervariables y además siguen las reglas de segregación Mendeliana [208]. Asimismo, estas metodologías genéticas han demostrado ser herramientas invaluable en la biología de la conservación ya que el manejo de las poblaciones naturales y en cautiverio se puede optimizar al conocer *pedigrees*, sistemas de apareamiento y elección de pareja. Esa información permite maximizar la diversidad genética en las poblaciones manejadas, minimizar la endogamia y aumentar numéricamente las poblaciones en declive [206].

En el trabajo realizado por Jones y col. [208], los autores dividen a las técnicas para el análisis de parentesco dentro de seis categorías, que, según consideran, son las más utilizadas debido a que se han implementado en paquetes de programa accesibles para los investigadores. Dichas técnicas se detallan a continuación:

- **Exclusión:** en los organismos diploides que se reproducen sexualmente, cada progenitor comparte al menos un alelo por *locus* con cada uno de sus descendientes, por lo tanto, utilizando este método los genotipos de los padres candidatos se comparan con los de un conjunto de individuos en particular (por ejemplo, individuos pertenecientes a un nido). Así, cualquier padre candidato que no comparta al menos un alelo con la descendencia en cualquier *locus* es eliminado.
- **Asignación categórica:** si la exclusión completa es imposible se puede utilizar un enfoque de asignación de parentesco para elegir entre los padres candidatos no excluidos. En este método, toda la descendencia se asigna a un progenitor candidato con la mayor probabilidad (si se emplea un enfoque de probabilidad o *likelihood*) o probabilidad *a posteriori* (si se emplea un enfoque bayesiano). Si dicho padre candidato es el verdadero progenitor, el beneficio más obvio de esta técnica es que proporciona un método para elegir un único padre como más probable a partir de un grupo de padres putativos no excluidos.
- **Asignación fraccional:** en este enfoque las mayores probabilidades o probabilidades *a posteriori* se determinan de la misma manera que en los métodos de asignación categórica. Cada individuo descendiente se asigna parcialmente a cada uno de los padres candidatos no excluidos sobre la base de sus probabilidades relativas de paternidad. La principal diferencia con el método anterior es que la asignación categórica asigna toda la

descendencia al macho más probable, mientras que la asignación fraccional asigna la descendencia parcialmente a cada progenitor candidato no excluido, en función de sus probabilidades relativas o probabilidades *a posteriori*, por lo tanto, el número de descendientes para un progenitor candidato puede no ser un número entero. La asignación fraccional posee mejores propiedades estadísticas en relación con la asignación categórica para resolver muchos problemas que involucran la estimación de variables a nivel de la población, como la aptitud relativa de las clases genotípicas o las variaciones en el éxito reproductivo.

- **Análisis de probabilidad de parentesco completa:** este método estima los parámetros de interés a nivel de población simultáneamente con las relaciones padre-hijo, en un marco de modelado único, lo que resulta en una evaluación más precisa de la confianza en las estimaciones de las variables de interés. Además, este enfoque bayesiano permite la inclusión de datos previos (*priors*), y esta capacidad de incluir información previa abre la posibilidad de hacer un mejor análisis de los datos disponibles. Por ejemplo, las técnicas de asignación categórica y fraccionaria suponen implícitamente que, en ausencia de datos genotípicos, todos los padres alegados incluidos en el análisis tienen la misma probabilidad de ser los verdaderos padres de una descendencia determinada. Los modelos de probabilidad completa pueden relajar esta suposición teniendo en cuenta la información ecológica relevante, como la territorialidad, la ubicación espacial, el estado reproductivo, etc.
- **Reconstrucción parental:** esta técnica utiliza el genotipo de la descendencia en familias de hermanos completos o medios hermanos para reconstruir los genotipos parentales. Si se conoce el genotipo de uno de los padres, entonces los alelos del o los padres desconocidos se pueden determinar sustrayendo los alelos de los padres conocidos de la matriz de genotipos de la descendencia. El número de alelos de padres desconocidos por *locus* en la matriz de progenie, proporciona un indicio del número de padres desconocidos. Para las matrices de progenie sin padres conocidos, el problema no es mucho más complejo. Siempre que la matriz de progenie incluya hermanos completos o medios hermanos, todos los descendientes compartirán al menos un padre. Para cualquier *locus* dado, se puede inferir el genotipo del progenitor compartido identificando un par de alelos para los cuales cada descendiente tiene al menos un alelo del par. Una vez que se identifica el genotipo del padre compartido, la inferencia de los otros padres sigue la lógica anterior. Las técnicas disponibles se basan en la lógica de parsimonia (es decir, identificar el número mínimo de padres necesarios para explicar la matriz y sus genotipos), en la probabilidad de máxima verosimilitud o los enfoques bayesianos. Una vez que se reconstruyen los genotipos, se pueden comparar con los genotipos de los padres candidatos para asignar la paternidad.

- **Reconstrucción de hermandad:** este método puede ser útil en el contexto del análisis de paternidad cuando se pueden recolectar datos de un gran grupo de descendientes, pero que no están asociados con ningún padre en particular ni clasificados en grupos familiares. Si hay disponible un grupo de padres candidatos, se puede usar una técnica de asignación, con la reconstrucción de la hermandad como un enfoque complementario. Si no se dispone de padres candidatos, la reconstrucción entre hermanos podría permitir alguna inferencia de patrones de paternidad a través de la comparación de dichos genotipos reconstruidos. Los algoritmos utilizan patrones de relación o técnicas de máxima verosimilitud para agrupar a los individuos en diferentes clases de relación. Una vez que estos enfoques identifican los grupos de medios hermanos o de hermanos completos, los genotipos parentales pueden reconstruirse y usarse para el análisis de parentesco.

### **I.II Antecedentes de estudios del sistema de apareamiento en reptiles**

La extraordinaria diversidad en los rasgos reproductivos exhibidos por los reptiles hace que sea muy difícil generalizar en ese aspecto. Sin embargo, lo que se observa en la mayoría de las especies es que el cuidado parental está ausente o es rudimentario y que los machos no proporcionan ningún recurso directo a la hembra antes, durante o después del apareamiento, aunque pueden proporcionar recursos indirectos a través de la calidad del territorio. Los sistemas de apareamiento generalmente se clasifican por una intensa competencia entre los machos por las hembras y, en muchas especies existe poliginia [209]. La monogamia es la excepción y ha sido registrada únicamente en dos especies australianas de lagartos. La situación más frecuente es la defensa por parte del macho de un territorio que contiene el área de campeo (*home range*) de una o más hembras. Por lo general el área de campeo de macho y hembra se solapan en el espacio mientras que el territorio de los distintos machos no se solapa [41][207].

Los factores que llevan al sistema de apareamiento poligínico son muy variados, puede ocurrir que los machos defiendan un recurso importante, como por ejemplo lugares donde el alimento es abundante, un refugio seguro, sitios de asoleamiento o lugares de puesta, lo cual hace que las hembras se acerquen para aprovechar los recursos defendidos por el macho. A su vez, las características de ciertas áreas pueden provocar agregaciones de hembras en lugares favorables, por lo que la presencia de las hembras atrae también machos y luego esos lugares pasan a formar parte del área de campeo del macho dominante. El sistema de apareamiento poligínico también puede ocurrir cuando varias hembras son atraídas por las características de un macho en particular, como se observa en especies que presentan comportamiento de exhibición y cortejo [207].

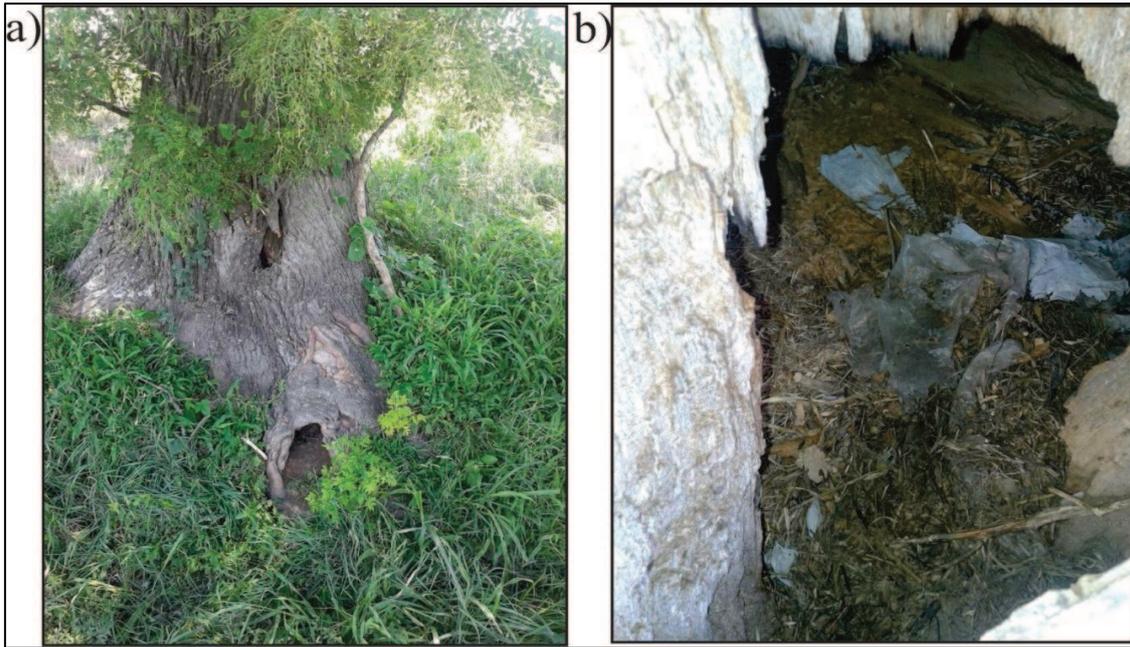
La paternidad múltiple es común en los reptiles y su existencia se determinó en gran porcentaje en todos los grupos principales. La evidencia disponible sugiere que este tipo de sistema de apareamiento surge principalmente como consecuencia de una fuerte selección hacia el apareamiento múltiple en el macho y ocurre particularmente en especies donde no existe

cuidado parental, por lo que el costo energético de dicho apareamiento en los machos es bajo. También puede surgir en poblaciones con gran densidad poblacional, lo que lleva a una alta tasa de encuentro de parejas y a un bajo grado de selección de las mismas, a su vez este tipo de apareamiento representa un costo energético no muy alto para las hembras [209].

La organización social registrada en reptiles está influenciada por el tamaño corporal de los machos ya que éste a su vez, está correlacionado con el grado de dominancia o la probabilidad de resultar vencedor en los combates con otros machos, entonces, los individuos jóvenes de menor tamaño consiguen pocas cópulas porque no pueden competir con los machos de mayor tamaño. A veces, esos individuos actúan como subordinados y llegan a defender un territorio que se solapa con el de los machos dominantes. La coexistencia es posible porque los subordinados adoptan comportamientos poco conspicuos que evitan el ataque de los machos adultos o actúan como “satélite”, permitiendo a los dominantes defender su territorio frente a intrusos de manera más efectiva que si estuvieran solos en su defensa [207].

### **I.III Aspectos reproductivos de las especies del género *Salvator***

Como se mencionó en la Introducción General, los ejemplares pertenecientes a las especies del género *Salvator* se mantienen inactivos o en letargo desde abril hasta septiembre y presentan un ciclo reproductivo estacional. Hacia el final del período de hibernación, los niveles de testosterona en los machos aumentan de 20 a 30 veces, en ese momento emergen de sus madrigueras y participan en comportamientos territoriales y de búsqueda de pareja, presentando mayor actividad y un mayor rango de acción con respecto a las hembras. Por otro lado, las hembras permanecen cerca de sus madrigueras, alimentándose y recolectando materiales para el nido. Estos lagartos pueden cavar sus propias cuevas, pero por lo general ocupan las madrigueras de otros animales, así como troncos huecos (Figura 29) y otras cavidades naturales [12][35][39][45]. Durante la temporada de primavera y verano estos lagartos presentan su mayor actividad, el período de reproducción se concentra en octubre, noviembre y diciembre, con sincronización entre machos y hembras en su ciclo reproductivo [12][210].



**Figura 29.** Sitio de anidamiento utilizado por una hembra de lagarto overo. a) Entrada de la madriguera en la base del tronco de un árbol hueco. b) Nido elaborado por la hembra dentro del tronco, se observa una gran cantidad de materia orgánica depositada, así como también restos de material inorgánico recolectado por la hembra para la construcción del nido, debajo del material depositado se hallan los huevos. Fotos: gentileza Gisela Schaumburg; Lugar: Sa Pereira, provincia de Santa Fe.

La supervivencia y la reproducción de estos lagartos están determinadas por su tamaño corporal. Los tamaños mínimos reproductivos son de 32 cm para los machos y 35 cm para las hembras, requiriendo cuatro años de crecimiento para alcanzar dicho tamaño y la madurez sexual. Como se mencionó en la Introducción General, el lagarto overo posee un dimorfismo sexual bastante marcado, además los machos presentan botones sexuales (poros femorales) a ambos lados de la cloaca que utilizan para marcar territorio, mediante la acción de frotar el suelo o pasto. Las hembras también realizan marcas, pero con menor frecuencia [12][44][45]. Los ejemplares del género *Salvator* son muy agresivos, los machos luchan por el acceso a los territorios, las hembras luchan por los sitios de anidamiento y ambos sexos luchan entre sí por los recursos alimenticios [211].

A su vez, el pico en el período de nidificación coincide con los períodos de mayor actividad, ya que ocurre en los meses de noviembre y diciembre, dependiendo de la localidad geográfica. Las hembras construyen nidos muy elaborados de pasto, tierra y otra materia orgánica dentro de madrigueras (Figura 29-b). En promedio ponen alrededor de 30 huevos y las hembras se quedan en sus nidos durante todo el período de incubación [12]. En la naturaleza se ha observado competición entre las hembras por un sitio de anidamiento. En el trabajo de Winck y col. [35], se registró una pelea entre dos hembras que terminó cuando la “dueña” de la madriguera soltó a la contrincante, dejando que esta última ocupe su madriguera y se quede allí hasta la

mañana siguiente, por lo cual los autores creen que es probable que ambas hembras hayan depositado huevos dentro del mismo nido.

En un trabajo realizado por Manes y col. [212], describieron las características de la nidificación en cautiverio en la especie *Salvator merianae*. Los autores observaron que las hembras trasladan el material vegetal al nido con sus miembros, entre 2 y 7 días previos a la oviposición. Luego, una vez depositados los huevos cierran el receptáculo del nido con el mismo material y dispersan alrededor gran cantidad de material vegetal adicional, lo cual podría ser una estrategia para ocultar al nido y a la madre durante la incubación. Durante gran parte del periodo de incubación (unos 65 días aproximadamente), la hembra permanece tendida sobre el nido, excepto por las salidas periódicas de asoleo y alimentación. Al final del proceso los alejamientos del nido se hacen más prolongados, pero la hembra siempre mantiene la vigilancia. Por lo tanto, los autores proponen que el comportamiento materno en esta especie parecería tener una influencia decisiva sobre las condiciones apropiadas para el desarrollo embrionario, siendo el comportamiento de asoleo de la hembra y la subsiguiente transferencia del calor acumulado a la nidada, el principal mecanismo de calentamiento de la misma, mientras que las otras fuentes complementarias de calor serían la fermentación del material vegetal y el metabolismo embrionario.

Además, Manes y col. [212] concluyen que, la fermentación del material vegetal, se vería favorecida por la creciente humedad generada por las micciones realizadas por la hembra en el sitio de nidificación. Los autores señalan que el aporte de humedad al nido en esta especie debe relacionarse principalmente con los requerimientos hídricos del huevo (de cáscara flexible y porosa), el cual absorbe gran cantidad de agua durante la incubación. La adecuada absorción de este elemento se relaciona con un mayor peso y capacidad de supervivencia en las crías, posiblemente a través de un aprovechamiento más eficiente de las reservas del embrión. Por lo tanto, los autores postulan que la atmósfera saturada con vapor de agua en los nidos, contribuiría a la estabilización de las condiciones hídricas y térmicas en el medio de incubación.

Una vez finalizado el período de incubación, se produce la eclosión de los neonatos, en su mayoría en los meses de febrero y marzo [12]. Winck y col. [35] observaron que los neonatos permanecen en el área de anidamiento hasta el final de la actividad de la población, lo que indicaría que ocupan un hibernáculo comunitario con otros individuos de mayor edad. Los autores concluyen que la tasa de crecimiento registrada para un lagarto juvenil y el comportamiento gregario sugieren la posibilidad de que los recién nacidos permanezcan en el área hasta alcanzar un tamaño corporal que permita su dispersión.

Para concluir, es necesario mencionar que el conocimiento del ciclo biológico de las especies y su sistema de apareamiento resulta de gran importancia, particularmente en especies silvestres que poseen interés comercial [210]. En lo que refiere a las especies del género *Salvator* el inicio de la caza coincide con el comienzo de la actividad de los lagartos en septiembre y

continúa hasta marzo, cuando la actividad es mínima, lo que implica que ejemplares de determinados tamaños corporales y condiciones reproductivas sean más vulnerables a los cazadores durante la época de cosecha del lagarto overo. Estos datos son relevantes en lo que respecta al desarrollo de planes de manejo, porque la existencia de diferencias en la vulnerabilidad de distintos segmentos de la población (en relación a tamaño y edades), lleva a que resulte de suma importancia modificar el sistema tradicional de caza para diseñar pautas de manejo que seleccionen ciertos segmentos de la población para la cosecha [45][210]. Naretto y col. [210] determinaron los parámetros reproductivos de *S. merianae* y evaluaron los tamaños de clase de individuos que se utilizan para el comercio en el centro de Argentina (provincia de Córdoba), y sus resultados dieron lugar a que las autoridades locales impongan el cierre del período de caza durante parte del mes de diciembre, y aumentaran el tamaño mínimo de captura de los individuos. Así, el trabajo antes mencionado marca un precedente de gran relevancia que debería ser replicado en todas las regiones en donde se ejerce gran presión de caza sobre estos lagartos, lo cual ocurre en prácticamente toda su área de distribución.

En el presente capítulo se emplea la información obtenida de los marcadores microsatélites para caracterizar el sistema de apareamiento del lagarto overo como aporte al conocimiento de su biología reproductiva, información que puede ser una herramienta sumamente útil al momento de elaborar las estrategias de manejo de estos lagartos.

## **II OBJETIVOS DEL CAPÍTULO IV**

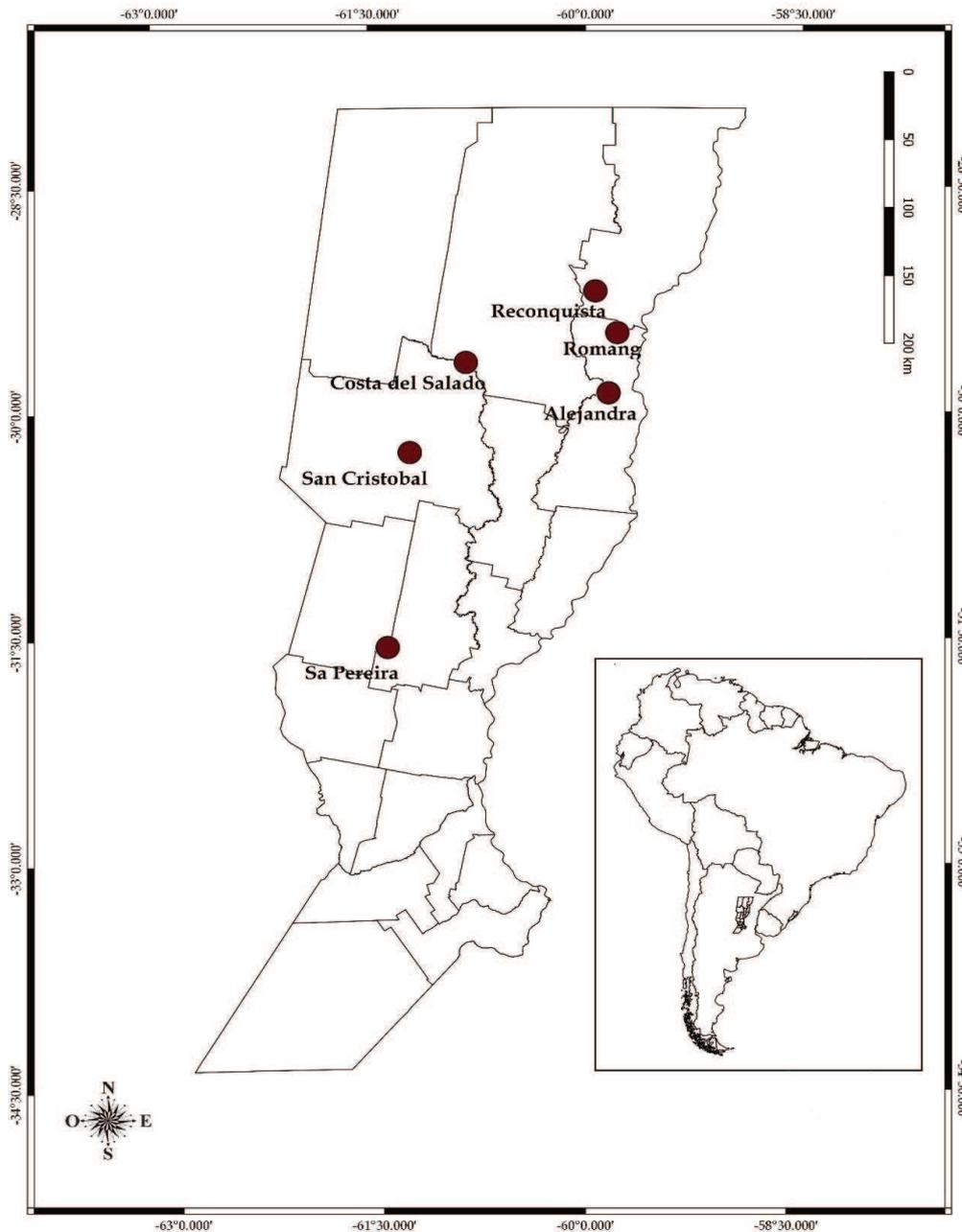
- Analizar el sistema de apareamiento en 10 familias muestreadas de lagarto overo utilizando la información obtenida a partir de marcadores microsatélites.
- Reconstruir los genotipos maternos y paternos de los nidos analizados empleando el método de reconstrucción parental y, en los nidos donde logró muestrearse la madre candidata, evaluar si la hembra hallada al cuidado de la nidada es la madre biológica de la descendencia.
- Caracterizar aspectos reproductivos de esta especie como aporte al conocimiento de su biología.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. I Colección de muestras**

El muestreo de los nidos para el análisis del sistema de apareamiento se realizó como parte de las actividades del Proyecto Iguana (PI). Fueron seleccionados diez nidos pertenecientes a diferentes sitios de muestreo dentro de la Provincia de Santa Fe, de los cuales, cinco nidos ya habían sido utilizados completos previamente para los análisis genético-poblacionales; Nido 13

(Romang), Nido 17 (San Cristóbal), Nido 1 (Alejandra), Nido 16 (Reconquista), Nido 39 (Costa del Salado). En lo que respecta al sitio Sa Pereira, se habían empleado en los análisis descriptos en el capítulo anterior, 3 individuos de cada uno de los siguientes nidos: Nido 3, Nido 18, Nido 19, Nido 35; por lo que en el presente Capítulo se amplificaron las muestras de todos los individuos correspondientes a cada nido, adicionando además el Nido 38, que no había sido utilizado en el Capítulo anterior (para la localización geográfica de los sitios de los cuales provienen los nidos ver Figura 30). Los 5 nidos colectados en Sa Pereira tuvieron la particularidad de que, además, se pudo obtener una muestra de sangre de la madre candidata (hembra al cuidado del nido). Por lo tanto, el análisis de paternidad se llevó a cabo en cinco nidos con madre "conocida" (candidata) y en otros cinco nidos con madre desconocida. Luego del período de incubación artificial de los huevos en las instalaciones del PI, se produjo la eclosión de los individuos y se extrajo sangre a entre 8 y 10 neonatos seleccionados al azar en cada nido. Las muestras de sangre se procesaron y los individuos se genotipificaron empleando las metodologías previamente descritas en los Capítulos I y III, empleando los mismos diez marcadores microsátélites.



**Figura 30.** Mapa de la provincia de Santa Fe en donde pueden observarse los sitios de muestreo de los nidos de lagarto oovero que fueron seleccionados para realizar el análisis del sistema de apareamiento.

### III.II Análisis de muestras

#### III.II.I Análisis preliminares de los datos

Para detectar la presencia de alelos nulos en las muestras analizadas con cada uno de los marcadores microsatélites se empleó el programa MICROCHECKER 2.2.3 [194]. Con este programa fue analizado el genotipo de un total de 101 individuos, incluyendo a las cinco madres candidatas y los neonatos seleccionados en los diez nidos para el análisis de paternidad.

Mediante el programa GenAlEx [201], se calculó la probabilidad de exclusión de paternidad para cada *locus* individual y la probabilidad de exclusión combinada para todos los

*loci* analizados. Para llevar a cabo este análisis el set de datos se dividió en dos, por un lado, se analizaron los datos de los individuos de cada nido con madre conocida y por el otro se analizaron los datos de los individuos de cada nido con madre desconocida. La probabilidad de exclusión (PE) hace referencia a la probabilidad de que el sistema de marcadores genéticos elegido sea capaz de excluir a un macho falsamente indicado como el padre, es decir que este parámetro mide la capacidad del sistema para detectar una falsa asignación de paternidad. Tradicionalmente, esta probabilidad de exclusión promedio se ha estimado como la probabilidad de excluir a un macho que no es el padre por una inconsistencia en al menos uno de los *loci* estudiados. Posteriormente este criterio se modificó: un supuesto padre se excluye cuando se encuentran al menos tres inconsistencias genéticas con la descendencia. Este cambio de criterio se produjo debido al uso de *loci* microsátélites, cuyas tasas de mutación son mucho mayores que las de los genes codificantes utilizados previamente en estudios de paternidad [213]. Cuanto más cercano al 100 % es el porcentaje de exclusión, más confiable será la prueba de paternidad realizada con el conjunto de marcadores analizados, pero se debe tener en cuenta que dicho porcentaje de exclusión en sistemas con múltiple paternidad puede disminuir cuando se desconoce o está ausente en el análisis alguno de los progenitores [214].

Por su parte, también mediante el programa GenAEx, se calculó la probabilidad de identidad ( $PI_{SIBS}$ ) para cada *locus* individual y para todos los *loci* analizados, dividiendo también el conjunto de datos en dos: nidos con madre conocida y nidos con madre desconocida. Este índice permite averiguar el poder informativo de un conjunto de marcadores microsátélites y se interpreta como la probabilidad de que dos hermanos completos seleccionados de una población presenten genotipos idénticos para un *locus*. Este estimador es conservador y, cuanto menor es el valor del índice, más informativo es el marcador [215].

### **III.II.II Análisis de paternidad mediante el método Mínimo Simple Locus**

El método Mínimo Simple *locus* propuesto por Myers y Zamudio [216], se basa en el recuento de alelos de los individuos dentro de cada nido, asignando la paternidad mediante el uso de patrones de distribución alélica en la descendencia luego de determinar los genotipos maternos. Para cada *locus* y nidada, se estima el genotipo materno buscando la presencia de una o dos crías homocigotas y / o dos alelos que estén representados en todas las crías en la nidada. Este método supone que todos los alelos no incluidos en el genotipo materno son necesariamente aportados por el o los padres, por lo tanto, si se infiere el genotipo materno en un *locus* particular, se cuentan los alelos restantes en el nido como contribución paterna. En base a esto, se asigna paternidad múltiple inequívocamente solo en aquellos casos en los que, luego de ser reconstruido el genotipo materno, tres o más alelos están presentes adicionalmente en la descendencia. También suele ocurrir que el genotipo materno no puede ser reconstruido, pero se asigna paternidad múltiple cuando cinco o más alelos están presentes en la nidada.

Para llevar a cabo este método se dividió el set de datos en dos, por un lado, se analizaron los nidos que presentaban madre candidata y por otro lado se analizaron los datos de los nidos en los que no se contaba con el genotipo de la madre candidata. El método Mínimo Simple *Locus* se utilizó para:

- Determinar si el genotipo de la madre candidata se correspondía con el de la madre biológica de la nidada (en los nidos con madre candidata).
- Poner a prueba la hipótesis de la existencia de una única madre por nido mediante la reconstrucción del genotipo materno.
- Determinar la existencia de múltiple paternidad en los nidos mediante el conteo de alelos presentes.

### **III.II.III Análisis de paternidad mediante el programa GERUD 2.0**

El método Mínimo Simple *Locus* [216], aunque informativo, es conservador en el sentido de que no tiene en cuenta la paternidad múltiple de machos con genotipos similares. Por este motivo se emplean programas estadísticos de paternidad que permiten realizar la reconstrucción parental a partir de los datos genotípicos de la progenie y confirmar la información obtenida a partir del método Mínimo Simple *Locus*. Para realizar dichos análisis se utilizó el programa GERUD 2.0 [217], que reconstruye genotipos parentales a partir de matrices de progenie. La matriz de progenie debe contener sólo medio hermanos o hermanos completos, con o sin un genotipo parental conocido. Si no se conoce ninguno de los genotipos parentales, GERUD encontrará todos los genotipos que podrían representar a un progenitor compartido entre toda la progenie. Luego, el programa utiliza un algoritmo exhaustivo que evalúa todos los genotipos parentales posibles contra la matriz de progenie para encontrar el número mínimo de genotipos necesarios para explicar dicha matriz. Entonces, además de determinar el número mínimo de padres probables, GERUD informa sus genotipos. Cabe mencionar que, para el programa, resulta mucho más sencillo realizar el análisis si se tiene el dato genotípico de uno de los progenitores [208].

Según detalla Jones [217], el algoritmo empleado en GERUD 2.0 comienza por determinar todos los genotipos maternos consistentes con la matriz de la progenie. En primer lugar, todos los alelos presentes en la matriz de la progenie se combinan en todos los arreglos por pares. Cada una de dichas combinaciones se prueba contra la matriz de progenie. Si cada individuo de la matriz de la progenie posee uno u otro de los alelos en un par dado, entonces el genotipo se retiene como un genotipo materno potencial. Este procedimiento se repite para todos los *loci*, y estos genotipos maternos de un solo *locus* se combinan a lo largo de los *loci* en todas las disposiciones posibles para producir un conjunto de genotipos maternos multi *locus* potenciales.

Posteriormente, para cada genotipo materno potencial, GERUD 2.0 usa un procedimiento paso a paso para determinar el número mínimo de padres necesarios para producir los genotipos de la progenie. Primero, todos los alelos paternos se determinan por sustracción del alelo materno conocido. Luego, estos alelos paternos se combinan para producir todos los posibles genotipos multi *locus*, los cuales se prueban en combinación para determinar qué conjunto de genotipos paternos potenciales podrían haber producido toda la matriz de la progenie. Si un único genotipo paterno puede explicar la matriz, entonces el número mínimo de progenitores es uno y el programa retiene todas las soluciones de un solo padre. Pero, si un solo padre no puede explicar todos los genotipos de la progenie de la matriz, a continuación, se prueban todas las combinaciones posibles de genotipos paternos de a pares. Luego, si dos padres no pueden explicar la matriz, entonces se prueban todas las combinaciones de tres genotipos paternos, y así sucesivamente. Para aquellas matrices de progenie con múltiples soluciones mínimas, GERUD 2.0 puede elegir la solución más probable (cada una de las cuales consiste en un genotipo materno único y uno o más genotipos paternos) basado en patrones de segregación mendeliana y frecuencias genotípicas esperadas en la población. Así, la probabilidad relativa total de una solución es el producto de la probabilidad de la frecuencia genotípica y la probabilidad de la frecuencia mendeliana [217].

De este modo, el programa GERUD 2.0 se utilizó para corroborar los resultados obtenidos con el método Mínimo Simple *Locus* y, además, se reconstruyeron el o los genotipos paternos más probables que dieron lugar a la matriz de la progenie en cada uno de los nidos. En este punto, cabe mencionar que el programa tiene ciertas limitaciones: cuando en el cálculo de la cantidad mínima de padres necesarios para explicar la matriz de la progenie existen más soluciones de las que la memoria del programa puede manejar, entra en conflicto y no logra resolver con la suficiente confianza estadística el arreglo adecuado de genotipos. Este inconveniente puede solucionarse reduciendo el número de *loci* a analizar y mediante el empleo de los marcadores considerados más informativos [218]. Por lo tanto, para estudiar los nidos cuyo análisis producía conflictos en el programa, se decidió utilizar un menor número de *loci*, probando a la vez diferentes combinaciones de *loci* hasta hallar el arreglo correcto para una adecuada resolución por parte del programa. Esto último se realizó teniendo en cuenta que no se modificarían los resultados en base al análisis de probabilidad de exclusión.

## **IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

### **IV.I Resultados**

#### **IV.I.I Colección de muestras**

Se obtuvo el genotipo de la mayoría de los 101 individuos analizados utilizando los 10 marcadores microsatélites. Sólo en el caso de 13 individuos no se logró obtener el genotipo completo, principalmente por dificultades en la amplificación del marcador Smer240. En el

ANEXO G se detalla el arreglo genotípico de cada uno de los individuos analizados, donde se incluye el genotipo de individuos provenientes de nidos que ya habían sido empleados en los análisis genético-poblacionales del Capítulo anterior además de adicionar el genotipo de individuos que no habían sido empleados para tales análisis poblacionales (ver detalles de las muestras analizadas en la sección III.I).

#### **IV.I.II Análisis de muestras**

##### **IV.I.II.I Análisis preliminares de los datos**

El análisis con el programa MICROCHECKER dio como resultado que para tres de los diez marcadores analizados (*Smer157*, *Smer240* y *Teg14*) se halló evidencia de exceso de homocigotas, lo que indicaría la presencia de alelos nulos. La importancia de analizar la presencia de alelos nulos radica en el hecho de que dichos alelos pueden dar como resultado una discordancia entre un progenitor y la descendencia, ya que esta discordancia implicará invariablemente genotipos aparentemente homocigotos que en realidad son heterocigotos para el alelo nulo [208].

En este punto, es necesario mencionar que el programa GERUD 2.0 no posee herramientas para sortear los inconvenientes que surgen de la presencia de estos alelos nulos [218]. Por este motivo se decidió no emplear en los análisis a los tres marcadores que presentaron evidencia de la existencia de tales alelos nulos. De todas maneras, los análisis realizados con el programa GenAlEx [201] indicaron que los siete marcadores restantes eran informativos ( $PI_{SIBS}$  combinada para el conjunto de individuos con madre conocida= 0,016;  $PI_{SIBS}$  combinada para el conjunto de individuos con madre desconocida= 0,005), y que además el análisis de paternidad empleando el conjunto de estos marcadores garantizaba confiabilidad ya que la PE combinada para el conjunto de individuos con madre conocida fue alto (PE combinado= 0,97) (Tabla 24). Similares resultados se obtuvieron para el conjunto de individuos con madre desconocida (PE combinado= 1,0) (Tabla 25).

**Tabla 24.** Cálculo de las probabilidades de identidad ( $PI_{SIBS}$ ) y de exclusión (PE) para el conjunto de individuos con madre candidata y con padre desconocido. En la Tabla se detalla el *locus*, la probabilidad de identidad y la probabilidad de exclusión para cada *locus* individual y para la combinación de los 7 *loci* analizados.

<i>Locus</i>	Probabilidades para cada <i>locus</i>		<i>Loci</i> combinados	Probabilidades para los <i>loci</i> combinados	
	$PI_{SIBS}$	PE		$PI_{SIBS}$	PE
Teg10	0,51	0,33	Teg10	0,51	0,33
Teg13	0,88	0,13	Teg10+Teg13	0,45	0,41
Teg19	0,63	0,22	Teg10+Teg13+Teg19	0,28	0,54
Teg7	0,40	0,49	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7	0,11	0,77
Teg20	0,78	0,22	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20	0,088	0,82
Smer159	0,37	0,66	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20+Smer159	0,033	0,94
Smer23	0,49	0,49	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20+Smer159+Smer23	0,016	0,97

**Tabla 25.** Cálculo de las probabilidades de identidad ( $PI_{SIBS}$ ) y de exclusión (PE) para el conjunto de individuos con madre y padre desconocidos. En la Tabla se detalla el *locus*, la probabilidad de identidad y la probabilidad de exclusión para cada *locus* individual y para la combinación de los 7 *loci* analizados.

<i>Locus</i>	Probabilidades para cada <i>locus</i>		<i>Loci</i> combinados	Probabilidades para los <i>loci</i> combinados	
	$PI_{SIBS}$	PE		$PI_{SIBS}$	PE
Teg10	0,45	0,77	Teg10	0,45	0,77
Teg13	0,81	0,28	Teg10+Teg13	0,37	0,84
Teg19	0,59	0,52	Teg10+Teg13+Teg19	0,22	0,92
Teg7	0,36	0,90	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7	0,077	0,99
Teg20	0,48	0,68	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20	0,037	1,0
Smer159	0,32	0,94	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20+Smer159	0,012	1,0
Smer23	0,43	0,77	Teg10+Teg13+Teg19+Teg7+Teg20+Smer159+Smer23	0,005	1,0

#### **IV.I.II.II Análisis de paternidad mediante el método Mínimo Simple *Locus***

Mediante el empleo del método Mínimo Simple *Locus*, se pudo comprobar que, el genotipo de las madres candidatas coincide con los genotipos de la progenie ya que al menos un alelo de la madre candidata se halla presente en todos los individuos del nido correspondiente (Tabla 26). Es decir, que la madre candidata fue confirmada como la madre biológica en cada uno de los cinco nidos de los que se tomaron muestras de la hembra al cuidado del nido.

**Tabla 26.** Arreglo genotípico de los siete *loci* seleccionados para los individuos correspondientes a los nidos con madre candidata. Se detalla el número de nido; la identificación del individuo (ID) y el arreglo genotípico para cada *locus*. Los números remarcados en rojo corresponden a los genotipos de las madres candidatas determinados a partir del análisis de las muestras disponibles. En la última fila correspondiente a cada *locus* se especifica el número mínimo de genotipos paternos que pudieran dar lugar al arreglo de la progenie, en base al conteo de alelos.

Nido	ID	Genotipos en cada <i>locus</i>													
		Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
35	Madre	207	215	272	274	386	386	184	200	146	150	400	406	408	435
	Hijo 1	207	213	272	272	386	386	184	200	146	150	400	406	408	435
	Hijo 2	205	207	272	298	386	386	184	184	146	150	400	408	408	435
	Hijo 3	205	215	272	274	386	419	184	200	146	150	400	406	408	438
	Hijo 4	213	215	272	274	386	419	184	184	146	150	400	406	408	435
	Hijo 5	207	213	272	272	386	419	184	200	150	150	400	406	408	408
	Hijo 6	213	215	272	272	386	419	184	200	146	150	400	412	408	408
	Hijo 7	207	213	272	272	386	419	184	200	146	150	400	406	408	435
	Hijo 8	207	213	272	272	386	419	184	184	146	150	400	410	408	408
	Hijo 9	207	213	272	274	386	419	184	200	150	154	400	406	408	435
Hijo 10	205	207	272	272	386	386	184	204	146	150	400	406	408	408	
Número mínimo de genotipos		1 (2 alelos adicionales al genotipo)		1 (1 alelo adicional al genotipo)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno:		1 (1 alelo adicional al		1 (1 alelo adicional al genotipo materno:		2 (3 alelos adicionales a los		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 438, al	

paternos en cada <i>locus</i>		materno: 205, 213)		materno: 298, al menos un alelo similar al genotipo materno: 272 en el homocigota)		419, al menos un alelo similar al genotipo materno: 386 en el homocigota)		genotipo materno: 204)		154, al menos un alelo similar al genotipo materno: 150 en el homocigota)		alelos maternos: 408, 410, 412)		menos un alelo similar al genotipo materno: 408 en el homocigota)	
Nido	ID	Genotipos en cada <i>locus</i>													
		Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
3	Madre	205	207	298	298	386	386	184	200	150	150	400	406	426	432
	Hijo 1	205	207	298	298	386	386	184	200	150	150	410	406	426	420
	Hijo 2	205	205	298	298	386	386	184	200	150	150	400	406	426	432
	Hijo 3	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	426
	Hijo 4	207	207	298	298	386	386	184	204	150	150	400	406	429	432
	Hijo 5	205	207	298	298	386	386	184	200	150	150	400	410	426	429
	Hijo 6	205	205	298	298	386	386	184	204	150	150	400	406	426	432
	Hijo 7	205	205	298	298	386	386	184	204	150	150	400	410	426	432
Número mínimo de genotipos		1 (1 alelo adicional al genotipo)		1 (no hay alelos adicionales,		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno:		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre)		1 (1 alelo adicional al		2 (3 alelos adicionales a los	

paternos en cada <i>locus</i>		materno: 213, al menos un alelo similar al genotipo materno: 205 en el homocigota)		padre/s y madre comparten mismos alelos)		comparten mismos alelos)		204, al menos un alelo similar al genotipo materno: 184 en el homocigota)		comparten mismos alelos)		genotipo materno: 410)		alelos maternos: 384, 420, 432)	
		Genotipos en cada <i>locus</i>													
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
18	Madre	205	205	272	298	386	386	184	204	150	150	400	406	408	408
	Hijo 1	205	219	272	274	386	386	184	204	150	150	400	412	408	423
	Hijo 2	205	215	272	272	386	386	184	204	146	150	406	410	408	426
	Hijo 3	205	215	272	272	386	386	184	200	146	150	400	406	408	435
	Hijo 4	205	207	272	272	386	386	184	204	150	150	400	406	408	429
	Hijo 5	205	215	274	298	386	386	184	204	150	150	400	404	408	423
	Hijo 6	205	219	272	298	386	386	184	204	150	150	400	412	408	429
	Hijo 7	205	215	272	272	386	386	184	204	150	150	400	400	408	435
	Hijo 8	205	219	274	298	386	386	184	204	150	150	406	406	408	435
	Hijo 9	205	207	272	274	386	386	184	204	150	150	400	406	408	426

	Hijo 10	205	219	272	272	386	386	184	204	150	150	400	400	408	423
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>		2 (3 alelos adicionales a los alelos maternos: 207, 215, 219)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 274, al menos un alelo similar al genotipo materno: 272 en el homocigota)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 146, al menos un alelo similar al genotipo materno: 150 en el homocigota)		2 (3 alelos adicionales a los alelos maternos: 404, 410, 412)		2 (4 alelos adicionales a los alelos maternos: 423, 426, 429, 435)	
Genotipos en cada <i>locus</i>															
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
19	Madre	207	207	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	411
	Hijo 1	205	207	298	298	386	386	184	184	150	150	406	412	411	435
	Hijo 2	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	435
	Hijo 3	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	406	412	384	435
	Hijo 4	205	207	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	435
	Hijo 5	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	435
	Hijo 6	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	406	412	384	435

	Hijo 7	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	435
	Hijo 8	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	406	412	411	435
	Hijo 9	207	213	298	298	386	386	184	184	150	150	400	412	411	435
	Hijo 10	205	207	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	435
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>		1 (2 alelos adicionales al genotipo materno: 205, 213)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 412)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 435)	
Genotipos en cada <i>locus</i>															
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
38	Madre	205	217	272	298	386	386	184	184	150	150	400	406	408	411
	Hijo 1	205	205	272	300	386	386	184	184	150	154	400	406	408	426
	Hijo 2	205	217	272	298	386	386	184	184	150	150	400	406	408	435
	Hijo 3	205	217	298	300	386	386	184	184	150	150	400	406	408	435
	Hijo 4	205	217	272	298	386	386	184	184	150	150	400	406	384	408
	Hijo 5	205	217	272	298	386	386	184	200	150	150	400	406	408	435

	Hijo 6	205	217	272	300	386	386	184	184	150	150	400	406	408	435
	Hijo 7	207	217	272	298	386	386	184	184	150	150	400	406	408	435
	Hijo 8	205	217	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	411	435
	Hijo 9	205	205	274	298	386	386	184	204	150	154	400	406	384	411
	Hijo 10	205	217	298	300	386	386	184	184	150	150	400	406	411	435
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>	1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)	1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 300, al menos un alelo similar al genotipo materno: 298 en el homocigota)			1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (2 alelos adicionales al genotipo materno: 200, 204)		1 (1 alelo adicional al materno: 154, al menos un alelo similar al genotipo materno: 150 en el homocigota)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		2 (3 alelos adicionales al genotipo materno: 384, 426, 435)		

A excepción del nido 19, los nidos analizados en este conjunto de datos, indicaron poseer dos padres como número mínimo. En base al hecho de que, en al menos uno de los *loci* se halló evidencia de multipaternidad de manera inequívoca (por hallarse como mínimo tres alelos adicionales a los alelos del genotipo materno), se deduce que cuatro de los cinco nidos en estudio con madre candidata presentan multipaternidad. De todas maneras, mediante este análisis no se pudo establecer con certeza el número de padres debido a que, como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, esta técnica tiene limitaciones en cuanto a la determinación del número exacto de padres que pudieran haber dado origen a la progenie, ya que no se pueden identificar los padres con genotipos similares entre sí y similares al genotipo materno. Por ello en los *loci* en donde se halla como mínimo un genotipo paterno, existe la posibilidad de que puedan ser más los genotipos progenitores dependiendo de la combinación de alelos.

Por su parte, para el conjunto de nidos que no presentaban madre candidata, la reconstrucción de los genotipos parentales resultó más difícil, ya que en algunos *loci* no se pudo determinar con exactitud el genotipo materno, sino que se hallaron varios arreglos genotípicos probables. De todos modos, en base al conteo de alelos pudo establecerse que, para todos los nidos, se halló un mínimo de entre uno y dos padres dependiendo del *locus* analizado, lo cual también indica la presencia de multipaternidad para estos nidos (Tabla 27). En este caso tampoco se pudo determinar con exactitud el número de padres probables como resultado de la limitación que presenta la técnica en cuanto a la identificación de genotipos parentales similares entre sí.

**Tabla 27.** Arreglo genotípico de los siete *loci* seleccionados para los individuos correspondientes a los nidos sin madre candidata. En las celdas correspondientes a la reconstrucción del genotipo materno, se detallaron todos los arreglos alélicos posibles en los casos en que dicho genotipo no logró determinarse con exactitud. Al final de la columna de cada *locus* se especifica el número mínimo de genotipos paternos que pudieran dar lugar al arreglo de la progenie en base al conteo de alelos.

		Genotipos en cada <i>locus</i>													
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
13	Madre	223	227	272 298	298 300	386 386	386 419	184 184	184 200	150	146	400 406	410 410	438	384
	Hijo 1	207	223	298	298	386	419	184	200	150	154	400	406	438	438
	Hijo 2	207	227	298	298	386	386	184	204	150	150	400	406	384	417
	Hijo 3	207	223	298	298	386	386	184	204	150	154	400	406	384	408
	Hijo 4	205	223	298	300	386	386	184	204	146	146	400	406	384	384
	Hijo 5	215	223	298	298	386	386	184	204	146	150	400	410	384	438
	Hijo 6	205	223	298	300	386	386	184	184	146	146	400	410	384	438

	Hijo 7	207	223	272	298	386	386	184	204	146	150	400	410	384	417
	Hijo 8	205	227	272	298	386	386	184	184	146	154	400	410	438	438
	Hijo 9	205	227	272	300	386	386	184	204	146	146	410	410	384	438
	Hijo 10	205	227	298	300	386	386	184	204	146	146	400	406	384	438
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>		2 (3 alelos adicionales a los alelos maternos)		1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		1 (tres posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 154, al menos un alelo similar al genotipo materno: 150 en el homocigota)		1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (2 alelos adicionales a los alelos maternos: 417, 408)	
		Genotipos en cada <i>locus</i>													
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2

17	Madre	213	213	272	298	386	386	184	204	150	150	400	400	435	438	
		213	215	274	298	386	386	184	204	150	154	400	406			
		213	217													
	Hijo 1	213	217	272	274	386	386	184	204	150	154	400	406	429	435	
	Hijo 2	213	215	274	298	386	386	184	204	150	150	400	406	438	447	
	Hijo 3	213	215	298	298	386	386	184	184	150	150	400	406	429	435	
	Hijo 4	213	215	298	298	386	386	184	184	150	154	400	406	435	435	
	Hijo 5	213	215	272	298	386	386	184	204	150	150	400	400	435	447	
	Hijo 6	213	215	274	298	386	386	184	204	150	154	400	406	435	435	
	Hijo 7	213	215	272	298	386	386	204	204	150	154	400	406	429	435	
	Hijo 8	213	217	274	298	386	386	204	204	150	154	400	406	417	438	
Hijo 9	213	215	274	298	386	386	204	204	150	154	400	406	435	438		
Hijo 10	213	217	274	298	386	386	184	204	150	154	400	406	438	447		

Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>		1 (tres posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		2 (3 alelos adicionales al genotipo materno: 417, 429, 447)	
		Genotipos en cada <i>locus</i>													
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	Madre	215	215	298	304										
		207	215	272	298	386	419	184	204	154	158	408	410	426	429
		205	215	272	304									429	441
		205	207												
	Hijo 1	205	215	298	304	386	386	184	204	154	158	408	408	426	441
	Hijo 2	207	215	298	304	386	419	204	204	150	158	408	410	429	435

	Hijo 3	207	215	272	304	386	386	204	204	150	154	410	410	429	441
	Hijo 4	207	215	298	304	419	419	184	204	150	158	400	408	429	441
	Hijo 5	205	215	272	304	386	386	184	184	154	154	406	410	426	441
	Hijo 6	207	215	272	298	386	419	184	204	154	158	400	408	426	429
	Hijo 7	207	215	272	298	386	386	184	204	154	154	410	410	426	429
	Hijo 8	207	215	272	298	386	386	204	204	150	158	410	410	429	441
	Hijo 9	205	215	272	304	386	419	184	204	154	154	408	408	429	441
	Hijo 10	207	215	272	304	386	419	204	204	150	154	410	410	426	441
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>	1 (cuatro posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)	1 (tres posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)	1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)	1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)	1 (1 alelo adicional al genotipo materno: 150, al menos un alelo similar al genotipo materno: 154 en el homocigota)	2 (dos alelos adicionales al genotipo materno: 400, 406, dos alelos similares al genotipo materno: 408,	1 (dos posibles genotipos maternos, 4 alelos en total entre padre/s madre)								

																410 en los homocigotas)	
		Genotipos en cada <i>locus</i>															
Nido	ID.	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159			
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2		
16	Madre	205	207	298	304	386	386	184	204	150	154	400	406	444	447		
		205	215	274	298	386	419			154	154	400	404				
	Hijo 1	205	207	298	304	386	419	184	204	150	154	400	406	426	447		
	Hijo 2	205	205	298	298	386	386	204	204	150	154	400	406	432	447		
	Hijo 3	205	207	298	304	386	386	184	204	154	154	400	406	429	447		
	Hijo 4	207	215	274	298	386	419	184	204	150	154	400	400	432	444		
	Hijo 5	205	215	298	298	386	386	204	204	150	154	404	406	408	444		
	Hijo 6	205	207	274	298	386	419	184	184	154	154	400	408	426	444		
Hijo 7	205	213	298	298	386	419	184	184	150	154	400	406	429	447			

	Hijo 8	205	215	274	304	386	386	184	184	150	154	400	406	438	447
	Hijo 9	205	207	298	298	386	386	184	184	150	154	400	406	426	444
	Hijo 10	207	215	274	304	386	386	184	184	154	154	400	406	426	447
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>		1 (dos posibles genotipos maternos, 4 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		2 (4 alelos adicionales a los alelos maternos: 408, 426, 432, 438)	
		Genotipos en cada <i>locus</i>													
Nido	ID	Teg7		Teg10		Teg13		Teg19		Teg20		Smer23		Smer159	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
39	Madre			272	298			184	184	150	150			408	435
		207	221	298	304	386	386	184	204	150	154	400	410	408	435
	Hijo 1	207	221	272	298	386	386	184	204	150	154	400	406	408	408

	Hijo 2	207	221	298	304	386	386	184	184	150	154	400	406	426	435
	Hijo 3	207	207	272	304	386	386	184	184	150	154	400	408	384	435
	Hijo 4	207	221	298	298	386	386	184	204	150	150	400	404	426	435
	Hijo 5	221	221	298	304	386	386	184	184	150	150	410	410	384	435
	Hijo 6	207	221	298	304	386	386	184	204	150	150	400	406	426	435
	Hijo 7	207	221	298	304	386	386	184	204	150	154	410	408	426	435
	Hijo 8	207	207	272	304	386	386	184	204	150	150	400	406	384	435
Número mínimo de genotipos paternos en cada <i>locus</i>	1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)	1 (dos posibles genotipos maternos, 3 alelos en total entre padre/s madre)		1 (no hay alelos adicionales, padre/s y madre comparten mismos alelos)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		1 (dos posibles genotipos maternos, 2 alelos en total entre padre/s madre)		2 (3 alelos adicionales a los alelos maternos: 404, 406, 408)		2 (2 alelos adicionales a los alelos maternos: 384, 426)			

Es importante mencionar que, tanto para el conjunto de datos con madre candidata, así como para el conjunto de datos con madre desconocida, el nivel de polimorfismo de cada uno de los *locus* tiene gran influencia en cuanto al número mínimo de padres posibles, ya que cuanto menor sea el nivel de polimorfismo del *locus*, habrá menos alelos disponibles para la reconstrucción de los genotipos parentales, lo cual puede llevar a una subestimación de los resultados.

#### **IV.I.II.III Análisis de paternidad mediante el programa GERUD 2.0**

El análisis de los datos genotípicos realizado empleando el programa GERUD 2.0 [217], permitió comprobar que, para el conjunto de nidos que presentaban madre candidata, las hembras muestreadas mostraron, en efecto, un genotipo compatible con todos los individuos de la progenie (Tabla 28-A). Además, en los otros cinco nidos en los cuales no se contó con muestras de las hembras al cuidado de la nidada, el programa detectó una única madre por nido, aunque, como ocurrió con el método Mínimo Simple *Locus*, para algunos *loci* dentro de un mismo nido el programa reconstruyó más de un genotipo posible para la madre candidata y por lo tanto varios arreglos genotípicos posibles para la madre en cada nido (Tabla 28-B; ANEXO H).

En cuanto a la reconstrucción de los genotipos de los padres de la progenie, en los nidos con madre conocida el análisis pudo realizarse exitosamente con los 7 *loci* seleccionados (Tabla 28-A). Por su parte, para los nidos sin madre conocida, se obtuvo un número muy alto de combinaciones de todos los posibles arreglos genotípicos maternos y paternos, lo que llevó a que el programa entre en conflicto y no logre resolver con la suficiente confianza estadística el arreglo adecuado de genotipos. Por lo tanto, en los nidos cuyo análisis producía conflictos en el programa se decidió emplear un menor número de *loci*. Esto último se realizó teniendo en cuenta que, inclusive con el empleo de seis de los siete marcadores, se obtenía un elevado porcentaje de probabilidad de exclusión y una apropiada probabilidad de identidad (Tabla 25: PE para seis *loci*= 1,0; P<sub>SIBS</sub> para seis *loci*= 0,005). Por este motivo para el análisis del nido 13 fue excluido el marcador Smer159, mientras que para analizar los nidos 16 y 39 fue excluido el marcador Smer23 (Tabla 28-B). La diferencia en cuanto a la selección del marcador excluido en estos tres nidos (Smer159 o Smer23), radica en el hecho de que, como se mencionó en Materiales y Métodos, incluso algunas combinaciones de seis *loci* también generan conflictos en los análisis de GERUD, por lo que se realizaron diferentes combinaciones hasta hallar la correcta.

**Tabla 28.** Resumen de los resultados obtenidos empleando GERUD 2.0. A) Resultados obtenidos en los nidos con madre candidata. B) Resultados obtenidos en los nidos sin madre candidata. Se detalla: el número de *loci* analizados por el programa; genotipo estimado de la madre y compatibilidad con la madre candidata; el número mínimo de padres probables que dieron lugar a la matriz de la progenie analizada; el número de combinaciones posibles para el genotipo materno y los genotipos paternos estimados

A) Nidos con madre candidata				
Nido	Número de <i>loci</i> analizados	Genotipo estimado de la madre	Número mínimo de padres probables	Número de combinaciones posibles
35	7	Compatible con la madre candidata	2	12
3	7	Compatible con la madre candidata	2	50
18	7	Compatible con la madre candidata	3	50
19	7	Compatible con la madre candidata	1	2
38	7	Compatible con la madre candidata	2	50
B) Nidos sin madre candidata				
13	6	Una madre con 24 arreglos genotípicos posibles	2	50
17	7	Una madre con 32 arreglos genotípicos posibles	2	50
1	6	Una madre con 48 arreglos genotípicos posibles	2	50
16	6	Una madre con 16 arreglos genotípicos posibles	3	50
39	7	Una madre con 8 arreglos genotípicos posibles	3	50

En base a los resultados obtenidos a partir del programa GERUD 2.0 (Tabla 28) puede concluirse que el número de padres probables varía en los nidos analizados entre un mínimo de uno a tres. En este punto cabe mencionar que, con el método Mínimo Simple *Locus*, se detectó un mínimo de entre uno y dos padres. Esta diferencia en los resultados puede deberse a que el programa GERUD analiza los *loci* en su conjunto, obteniendo una mayor información a través de todas las combinaciones posibles de los alelos en cada *locus*, mientras que en el método Simple *Locus* se analiza cada *locus* de manera individual, por lo que los resultados son menos informativos.

A su vez, cabe recordar lo mencionado en la sección Materiales y Métodos en cuanto a que, para el programa GERUD, resulta mucho más sencillo realizar el análisis si se tiene el dato genotípico de uno de los progenitores, tal y como ocurrió en este caso para los nidos con madre candidata.

Otra información importante que aporta el programa es el detalle de los arreglos genotípicos de la madre y el/los padres que pudieron haber dado lugar a la matriz de la progenie analizada. Como puede observarse en la Tabla 28, el número de combinaciones genotípicas posibles resultó muy alto para la mayoría de los nidos, por este motivo se realizó un resumen de los tres grupos de arreglos genotípicos con mayor valor de probabilidad para cada uno de los nidos analizados (Tablas 29 y 30).

**Tabla 29.** Grupos de genotipos parentales estimados por el programa GERUD 2.0 para los cinco nidos con madre candidata. Para cada nido se muestran los tres grupos con mayor valor de probabilidad. Se detalla el número de individuos analizados en cada nido, el arreglo genotípico de cada progenitor, el número de neonatos asignados a cada padre probable y la probabilidad de que cada progenitor posea dicho arreglo genotípico en cada uno de los grupos.

Nidos con madre candidata						
Nido y número de individuos	Grupos de parentales	Arreglo genotípico			Número de neonatos asignados	Probabilidad para cada padre
		Teg7-	Teg10-	Teg13- Teg19- Teg20- Smer23-Smer159		
Nido 35 N= 10	Grupo 1					
	Madre	207/215-272/274-386/386-184/200-146/150-400/406-408/435				
	Padre 1	213/213-272/272-419/419-184/184-146/146-412/410-408/408			2	1,188E-14
	Padre 2	213/205-272/298-386/419-184/204-150/154-400/408-408/438			8	1,188E-14
	Grupo 2					
	Madre	207/215-272/274-386/386-184/200-146/150-400/406-408/435				
	Padre 1	213/205-272/298-386/419-184/184-146/146-408/410-408/408			2	1,188E-14
	Padre 2	213/205-272/272-386/419-184/204-150/154-400/412-408/438			8	1,188E-14
	Grupo 3					
Madre	207/215-272/274-386/386-184/200-146/150-400/406-408/435					
Padre 1	213/205-272/298-386/419-184/184-146/146-408/412-408/408			2	1,188E-14	
Padre 2	213/205-272/272-386/419-184/204-150/154-400/410-408/438			8	1,188E-14	
Nido 3 N= 7	Grupo 1					
	Madre	205/207-298/298-386/386-184/200-150/150-400/406-426/432				
	Padre 1	205/213-298/298-386/386-184/184-150/150-410/406-420/384			2	6,664E-6

	Padre 2	205/207-298/298-386/386-184/204-150/150-410/400-426/429	5	6,664E-6
	Grupo 2			
	Madre	205/207-298/298-386/386-184/200-150/150-400/406-426/432		
	Padre 1	207/213-298/298-386/386-184/184-150/150-410/406-420/384	2	3,998E-6
	Padre 2	205/207-298/298-386/386-184/204-150/150-410/400-426/429	5	3,998E-6
	Grupo 3			
	Madre	205/207-298/298-386/386-184/200-150/150-400/406-426/432		
	Padre 1	205/205-298/298-386/386-184/204-150/150-410/406-420/426	4	3,887E-6
	Padre 2	207/213-298/298-386/386-184/204-150/150-410/400-384/429	3	3,887E-6
	Nido 18 N= 10	Grupo 1		
Madre		205/205-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-408/408		
Padre 1		219/215-274/274-386/386-184/184-150/150-406/404-423/435	2	4,283E-9
Padre 2		219/207-274/272-386/386-204/204-150/150-412/400-423/429	4	4,283E-9
Padre 3		215/207-274/272-386/386-184/200-150/146-410/400-426/435	4	4,283E-9
Grupo 2				
Madre		205/205-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-408/408		
Padre 1		219/215-274/274-386/386-204/204-150/150-406/404-423/435	2	3,569E-9
Padre 2		219/207-274/272-386/386-184/184-150/150-412/400-423/429	4	3,569E-9
Padre 3		215/207-274/272-386/386-204/200-150/146-410/400-426/435	4	3,569E-9
Grupo 3				
Madre	205/205-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-408/408			
Padre 1	219/215-274/274-386/386-184/184-150/150-406/404-423/435	2	3,569E-9	

	Padre 2	219/207-274/272-386/386-184/184-150/150-412/400-423/429	4	3,569E-9
	Padre 3	215/207-274/272-386/386-204/200-150/146-410/400-426/435	4	3,569E-9
Nido 19 N= 10	Grupo 1			
	Madre	207/207-298/298-386/386-184/184-150/150-400/406-384/411		
	Padre 1	205/213-298/298-386/386-184/184-150/150-412/406-435/435	10	6,931E-4
	Padre 2			
Nido 38 N= 10	Grupo 2			
	Madre	207/207-298/298-386/386-184/184-150/150-400/406-384/411		
	Padre 1	205/213-298/298-386/386-184/184-150/150-412/400-435/435	10	3,3E-5
	Padre 2			
Nido 38 N= 10	Grupo 1			
	Madre	205/217-272/298-386/386-184/184-150/150-400/406-408/411		
	Padre 1	205/205-300/298-386/386-184/200-154/150-406/406-426/435	7	4,105E-11
	Padre 2	205/207-272/274-386/386-184/204-154/150-400/400-435/384	4	4,105E-11
	Grupo 2			
	Madre	205/217-272/298-386/386-184/184-150/150-400/406-408/411		
	Padre 1	205/205-300/298-386/386-184/200-154/150-400/400-426/435	7	4,105E-11
	Padre 2	205/207-272/274-386/386-184/204-154/150-406/406-435/384	4	4,105E-11
	Grupo 3			
Madre	205/217-272/298-386/386-184/184-150/150-400/406-408/411			
Padre 1	205/205-300/274-386/386-184/204-154/154-406/406-426/384	8	3,873E-11	
Padre 2	205/207-300/298-386/386-184/200-150/150-400/400-435/384	2	3,873E-11	

**Tabla 30.** Grupos de genotipos parentales estimados por el programa GERUD 2.0 para los cinco nidos sin madre candidata. Para cada nido se muestran los tres grupos con mayor valor de probabilidad. Se detalla el número de individuos analizados en cada nido, el arreglo genotípico de cada progenitor, el número de neonatos asignados a cada padre probable y la probabilidad de que cada progenitor posea dicho arreglo genotípico en cada uno de los grupos. Nótese que el número de *loci* analizados varía en cada nido dependiendo de la capacidad de resolución del programa.

Nidos sin madre candidata				
Nido y número de individuos	Grupos de parentales	Arreglo genotípico	Número de neonatos asignados	Probabilidad para cada padre
Nido 13 N= 10	6 <i>loci</i> analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23		
	Grupo 1			
	Madre	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-406/410		
	Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/204-154/150-400/400	4	4,158E-9
	Padre 2	207/205-298/272-386/386-184/184-154/146-400/410	7	4,158E-9
	Grupo 2			
Madre	223/227-298/272-386/386-184/204-150/146-406/410			
Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/204-154/150-400/400	5	2,376E-9	

	Padre 2	207/205-298/300-386/386-184/184-154/146-400/410	7	2,376E-9
	Grupo 3			
	Madre	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-406/410		
	Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/184-154/150-400/400	4	1,98E-9
	Padre 2	207/205-298/272-386/386-184/184-154/146-400/410	7	1,98E-9
	7 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23-Smer159		
Nido 17 N= 10	Grupo 1			
	Madre	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438		
	Padre 1	213/213-272/298-386/386-184/204-154/150-400/400-429/447	6	1,112E-7
	Padre 2	213/213-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	1,112E-7
	Grupo 2			
	Madre	213/213-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438		
	Padre 1	217/215-272/298-386/386-184/204-154/150-400/400-429/447	6	1,001E-7

	Padre 2	217/215-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	1,001E-7
	Grupo 3			
	Madre	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438		
	Padre 1	213/213-272/298-386/386-184/204-154/150-406/400-429/447	6	4,236E-8
	Padre 2	213/213-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	4,236E-8
	6 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer159		
Nido 1 N= 10	Grupo 1			
	Madre	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429		
	Padre 1	215/215-304/272-386/386-184/204-154/150-426/441	8	5,84E-8
	Padre 2	215/215-304/304-419/419-204/204-150/150-435/429	2	5,84E-8
	Grupo 2			
	Madre	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429		
	Padre 1	215/215-304/272-386/386-184/204-154/150-426/429	8	5,84E-8

	Padre 2	215/215-304/304-419/419-204/204-150/150-435/441	2	5,84E-8
	Grupo 3			
	Madre	205/207-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429		
	Padre 1	215/215-298/272-386/386-184/204-154/150-426/429	8	4,172E-8
	Padre 2	215/215-298/298-419/419-204/204-150/150-435/441	2	4,172E-8
	6 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer159		
Nido 16 N= 10	Grupo 1			
	Madre	205/215-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444		
	Padre 1	205/205-304/304-386/386-184/184-150/150-438/438	1	1,095E-7
	Padre 2	207/213-304/298-386/386-184/184-150/154-426/429	6	1,095E-7
	Padre 3	207/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	3	1,095E-7
	Grupo 2			
	Madre	205/215-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444		

	Padre 1	207/207-304/298-386/386-184/184-150/154-426/429	5	9,729E-8
	Padre 2	205/213-304/298-386/386-184/184-150/150-429/438	2	9,729E-8
	Padre 3	207/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	3	9,729E-8
	Grupo 3			
	Madre	205/215 298/304-386/419-184/204 154/154-447/444		
	Padre 1	205/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	2	8,757E-8
	Padre 2	207/213-298/274-386/386-184/184-150/154-426/429	6	8,757E-8
	Padre 3	207/205-274/274-386/386-184/184-150/150-432/438	2	8,757E-8
	<i>7 loci</i> analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23-Smer159		
Nido 39 N= 8	Grupo 1			
	Madre	207/221-272/298-386/386-184/184-150/154-400/410-408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-204/204-150/150-406/404-408/426	2	4,265E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-204/184-150/150-406/408-426/384	5	4,265E-7

	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	4,265E-7
	Grupo 2			
	Madre	207/221 272/298-386/386-184/204-150/154 400/410 408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-204/204-150/150-406/404-408/426	2	2,986E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-184/184-150/150-406/408-426/384	5	2,986E-7
	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	2,986E-7
	Grupo 3			
	Madre	207/221 272/298-386/386-184/204-150/154-400/410-408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-184/184-150/150-406/404-408/426	2	2,986E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-184/184-150/150-406/408-426/384	5	2,986E-7
	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	2,986E-7
Nidos sin madre candidata				
Nido y número de individuos	Grupos de parentales	Arreglo genotípico	Número de neonatos asignados	Probabilidad para cada padre

Nido 13 N= 10	6 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23		
	Grupo 1			
	Madre	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-406/410		
	Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/204-154/150-400/400	4	4,158E-9
	Padre 2	207/205-298/272-386/386-184/184-154/146-400/410	7	4,158E-9
	Grupo 2			
	Madre	223/227-298/272-386/386-184/204-150/146-406/410		
	Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/204-154/150-400/400	5	2,376E-9
	Padre 2	207/205-298/300-386/386-184/184-154/146-400/410	7	2,376E-9
	Grupo 3			
	Madre	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-406/410		
	Padre 1	207/215-298/298-419/386-200/184-154/150-400/400	4	1,98E-9
Padre 2	207/205-298/272-386/386-184/184-154/146-400/410	7	1,98E-9	
Nido 17 N= 10	7 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23-Smer159		
	Grupo 1			
	Madre	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438		
	Padre 1	213/213-272/298-386/386-184/204-154/150-400/400-429/447	6	1,112E-7
	Padre 2	213/213-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	1,112E-7
Grupo 2				
Madre	213/213-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438			

	Padre 1	217/215-272/298-386/386-184/204-154/150-400/400-429/447	6	1,001E-7
	Padre 2	217/215-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	1,001E-7
	Grupo 3			
	Madre	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438		
	Padre 1	213/213-272/298-386/386-184/204-154/150-406/400-429/447	6	4,236E-8
	Padre 2	213/213-298/298-386/386-184/204-154/154-406/406-435/417	4	4,236E-8
	6 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer159		
Nido 1 N= 10	Grupo 1			
	Madre	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429		
	Padre 1	215/215-304/272-386/386-184/204-154/150-426/441	8	5,84E-8
	Padre 2	215/215-304/304-419/419-204/204-150/150-435/429	2	5,84E-8
	Grupo 2			
	Madre	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429		
	Padre 1	215/215-304/272-386/386-184/204-154/150-426/429	8	5,84E-8
	Padre 2	215/215-304/304-419/419-204/204-150/150-435/441	2	5,84E-8
	Grupo 3			
Madre	205/207-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429			
Padre 1	215/215-298/272-386/386-184/204-154/150-426/429	8	4,172E-8	
Padre 2	215/215-298/298-419/419-204/204-150/150-435/441	2	4,172E-8	
Nido 16 N= 10	6 loci analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer159		

	Grupo 1			
	Madre	205/215-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444		
	Padre 1	205/205-304/304-386/386-184/184-150/150-438/438	1	1,095E-7
	Padre 2	207/213-304/298-386/386-184/184-150/154-426/429	6	1,095E-7
	Padre 3	207/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	3	1,095E-7
	Grupo 2			
	Madre	205/215-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444		
	Padre 1	207/207-304/298-386/386-184/184-150/154-426/429	5	9,729E-8
	Padre 2	205/213-304/298-386/386-184/184-150/150-429/438	2	9,729E-8
	Padre 3	207/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	3	9,729E-8
	Grupo 3			
	Madre	205/215 298/304-386/419-184/204 154/154-447/444		
Padre 1	205/205-298/298-386/386-204/204-150/150-432/408	2	8,757E-8	
Padre 2	207/213-298/274-386/386-184/184-150/154-426/429	6	8,757E-8	
Padre 3	207/205-274/274-386/386-184/184-150/150-432/438	2	8,757E-8	
	<i>7 loci</i> analizados	Teg7-Teg10-Teg13-Teg19-Teg20-Smer23-Smer159		
Nido 39 N= 8	Grupo 1			
	Madre	207/221-272/298-386/386-184/184-150/154-400/410-408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-204/204-150/150-406/404-408/426	2	4,265E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-204/184-150/150-406/408-426/384	5	4,265E-7
	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	4,265E-7

	Grupo 2			
	Madre	207/221 272/298-386/386-184/204-150/154 400/410 408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-204/204-150/150-406/404-408/426	2	2,986E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-184/184-150/150-406/408-426/384	5	2,986E-7
	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	2,986E-7
	Grupo 3			
	Madre	207/221 272/298-386/386-184/204-150/154-400/410-408/435		
	Padre 1	221/221-298/298-386/386-184/184-150/150-406/404-408/426	2	2,986E-7
	Padre 2	207/207-304/304-386/386-184/184-150/150-406/408-426/384	5	2,986E-7
	Padre 3	221/221-304/304-386/386-184/184-150/150-410/410-384/384	1	2,986E-7

En las Tablas puede observarse que los valores de probabilidad de los arreglos genotípicos son muy bajos y similares entre sí, como consecuencia de la gran cantidad de combinaciones de genotipos posibles, incluso para los nidos en los que se disponía del arreglo genotípico de la madre de la progenie. También puede observarse que, para los nidos con madre candidata, el arreglo genotípico estimado por el programa coincide con el arreglo genotípico obtenido para la misma a través de la genotipificación (ver Tablas 26 y 29). Otro dato interesante que se puede observar es que, en la mayoría de los nidos en donde el programa estimó entre dos y tres padres como número mínimo, uno de los progenitores aportaría un mayor número de individuos a la progenie en comparación con los otros progenitores del mismo nido.

#### **IV.II Conclusiones**

En base a los resultados obtenidos a partir del método Mínimo Simple *Locus* y del programa GERUD 2.0 [217] pudo confirmarse, en todos los nidos con madre candidata, que la hembra que se encontraba al cuidado de la nidada en el momento del muestreo, resultó ser, efectivamente, la madre biológica, ya que el genotipo obtenido de dicha hembra coincide con el de la madre probable estimado por el programa (Tablas 26, 28 y 29). Además, pudo corroborarse la existencia de multipaternidad en la mayoría de los nidos analizados de lagarto overo, con la presencia de una única madre y de uno a tres padres probables para los nidos con madre conocida y, dos a tres padres probables para los nidos sin madre conocida (Tablas 26, 27 y 28).

Estos resultados coinciden con el comportamiento reproductivo reportado para la especie, con un macho dominante en la época reproductiva al cuidado del territorio y de las hembras, coexistiendo con machos de menor jerarquía que pueden reproducirse si encuentran la oportunidad [35][211], corroborando de este modo que el sistema de apareamiento característico del lagarto overo es la poligamia, tal y como ocurre en la mayoría de los reptiles. Sin embargo, en esta especie la clasificación precisa de su sistema de apareamiento resulta difícil, ya que el comportamiento reproductivo puede englobarse en varias categorías debido a que se estaría dando un caso de poliginia, por la presencia del macho dominante que puede copular con varias hembras, pero a su vez podrían estar ocurriendo en estos lagartos comportamientos de promiscuidad, ya que por cada madre en cada nido analizado existe por lo general más de un padre para la progenie. Además, se confirma que, en las nidadas analizadas del lagarto overo existe una única madre, es decir la madre biológica, que es la responsable del cuidado de la nidada durante el proceso de incubación, comportamiento que solo fue reportado para el lagarto colorado en condiciones de cautiverio [212].

Debe considerarse que la multipaternidad puede surgir a través de dos vías, ya sea por medio del apareamiento con más de un macho durante el mismo ciclo reproductivo, o por medio del apareamiento con uno o más machos a lo largo de diferentes ciclos reproductivos, junto con el almacenamiento de esperma a través de dichos ciclos [209]. El almacenamiento de esperma está muy extendido en los principales *taxa* de reptiles y puede producirse en especies con baja

densidad poblacional, lo cual puede llevar a una baja tasa de encuentro de parejas, lo que tendería a favorecer el almacenamiento prolongado de los espermatozoides. Sin embargo, en especies con alta tasa de encuentro de parejas también se produce almacenamiento de esperma. En este caso la explicación propuesta es que existe selección a través de un mecanismo denominado “elección femenina críptica”, mediante el cual la hembra retiene el esperma considerado “óptimo” para ser utilizado a lo largo de diferentes ciclos reproductivos [209].

En los trabajos realizados por Manes y col. [219] y García Valdéz y col. [220] se estudiaron las características del ciclo ovárico en hembras de *S. merianae*. Estos estudios concluyen que existe una actividad gonadal asincrónica entre los sexos, ya que la mayor actividad testicular en los machos coincide con los eventos de apareamiento, mientras que el desarrollo del folículo ovárico en las hembras se completa entre 15 a 20 días después del mismo, lo cual implica que el esperma del macho permanece retenido en el aparato reproductor de la hembra durante varios días hasta que se produce la fertilización. En dichos trabajos se sugiere que el oviducto de las hembras de *S. merianae* podría desempeñar un papel central en la sincronización del desarrollo de los gametos y la fertilización, actuando como un receptor de la señal vitelogénica, almacenando esperma y posiblemente activándolo en respuesta al proceso ovulatorio. Además, la vitelogénesis corta e intensa observada luego del encuentro sexual, explicaría que el proceso de apareamiento es el estímulo que desencadena dicha vitelogénesis y la ovulación posterior [219][220]. Este mecanismo representaría un modo particularmente conveniente para la reproducción ovípara, ya que evitaría la necesidad de una estricta coordinación sexual como consecuencia de la limitada viabilidad de los gametos femeninos y, además, aseguraría el éxito del uso de los recursos energéticos a través de una disponibilidad anticipada de esperma [219].

Los trabajos antes mencionados constituyen antecedentes en lo que respecta al almacenamiento de esperma en el lagarto overo, sin embargo, aún no se ha determinado si este almacenamiento puede darse de una temporada reproductiva a la siguiente. En el trabajo realizado por García Valdéz y col. [220], los autores analizaron la dinámica folicular en hembras de *S. merianae* mediante ultrasonido y radiofrecuencia. El método empleado para determinar la influencia de las interacciones sexuales en el desarrollo folicular y la ovulación, consistió en someter a dos grupos de ejemplares de *S. merianae* a condiciones experimentales diferentes a lo largo de tres estaciones reproductivas, es decir, durante tres años consecutivos: en cada año se crearon nuevos grupos para cada época reproductiva, redistribuyendo los individuos al azar, dichos grupos consistían en tres a cinco hembras en contacto con un macho (grupo reproductivo), y tres a cinco hembras en ausencia de un macho (grupo sexualmente aislado). En base a los resultados obtenidos los autores consideran, como se mencionó anteriormente, que la correspondencia entre la frecuencia de apareamiento y la oviposición es un indicador de que el proceso de apareamiento genera los estímulos necesarios para que el ciclo folicular culmine en ovulación. Además, los autores postulan que la retención del esperma en el oviducto no se

extendería más allá de un período reproductivo, ya que los animales que copularon sin oviponer en un ciclo, cuando formaban parte del grupo clasificado como reproductivo, tampoco lo hicieron en el siguiente ciclo, cuando se reasignaron al grupo sexualmente aislado. Sin embargo, en este punto los autores destacan que debe considerarse que, al mantener sexualmente aisladas a dichas hembras que copularon sin oviponer y que, posiblemente, hubieran almacenado esperma entre temporadas, la ausencia del macho llevaría a que no se produzca el estímulo necesario para que los óvulos maduren, por lo cual no debería ser descartada la posibilidad de que almacenen esperma a lo largo de más de un período reproductivo. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo debe ser considerada la posibilidad de que la paternidad múltiple hallada en los nidos analizados, sea consecuencia tanto del apareamiento con más de un macho en la misma temporada reproductiva, como así también del almacenamiento de esperma entre temporadas.

Otro trabajo que se considera importante mencionar en la línea de investigación del ciclo reproductivo del lagarto overo, es el realizado por Chamut y col. [221], en el cual se estudiaron los niveles plasmáticos de testosterona en machos de *S. merianae* y su relación con las actividades reproductivas estacionales observadas en la especie. Los autores encontraron que los niveles más altos de testosterona se asociaron con la actividad reproductiva en primavera, que comprende la producción de esperma y los comportamientos reproductivos (territorialidad, cortejo y apareamiento). Además, un dato relevante fue el hallazgo de un segundo pico espermatogénico en los machos a fines del otoño, el cual, según Chamut y col. [221], derivaría de un patrón reproductivo bimodal ancestral. Para explicar esto los autores proponen que *S. merianae* podría haber habitado ambientes ancestrales más favorables para la reproducción, basándose en el hecho de que los ciclos multimodales de reproducción son resultado de condiciones ambientales favorables, como las que se encuentran en las regiones tropicales, como es el caso de la especie *Tupinambis teguixin*, la cual habita en ambientes tropicales de Sudamérica y se reproduce varias veces al año. Además, consideran que esta interpretación sería consistente con la hipótesis de migración de estos reptiles hacia latitudes más altas, es decir hacia zonas subtropicales y templadas, tal y como fuera propuesto para el haplogrupo *S. merianae* en el capítulo II del presente trabajo.

El principal beneficio que se destaca del comportamiento de apareamiento múltiple en los grupos de organismos, es que podría aumentar la variabilidad genética (y probablemente fenotípica) de la descendencia, permitiendo a las especies responder mejor frente a las presiones selectivas del ambiente [209]. Para las especies sometidas a presión de caza y que además habitan áreas perturbadas, el comportamiento polígamo puede ser una estrategia para limitar la endogamia causada por la aglomeración de individuos en hábitats reducidos o por la disminución del tamaño poblacional como consecuencia de la sobreexplotación [222]. Por lo tanto, más allá de que el comportamiento polígamo posiblemente sea una estrategia ancestral de la especie para mantener la variabilidad genética, en la actualidad este tipo de sistema de apareamiento podría estar

beneficiando a las poblaciones de lagarto overo, las cuales, como se mencionó en la Introducción, se encuentran sometidas a explotación comercial y además su hábitat se halla altamente perturbado debido al desarrollo de actividades antrópicas [47].

Para finalizar, resulta relevante mencionar que las especies con mayor probabilidad de hibridación son las especies polígamas, en las que los machos no participan en el cuidado de la prole, por lo que se aparearían potencialmente con cualquier hembra, incluyendo las de otras especies, ya que el apareamiento implica para ellos una escasa inversión de energía [59]. Como fue mencionado en capítulos anteriores, se ha comprobado que existe hibridación introgresiva entre las especies *S. merianae* y *S. rufescens* [10][48]. En el trabajo realizado por Naretto y col. [223] se evaluaron los rasgos reproductivos involucrados en la competencia pre y postcopulatoria en poblaciones alopátricas y simpátricas de lagarto overo y lagarto colorado debido a que sus períodos de reproducción se superponen ampliamente. Según se describe en dicho trabajo, en ambas especies el tamaño del músculo de la mandíbula en los machos es un carácter sexual secundario, y su incremento en tamaño está asociado con la presencia de espermatozoides, por lo que esto actúa como una señal de su condición reproductiva. Además, este es un rasgo que favorece al individuo al momento de la competencia precopulatoria cuando se produce el enfrentamiento entre machos por las hembras. Como carácter de competencia postcopulatoria los autores mencionan la competencia espermática, la cual impulsa la evolución de rasgos espermáticos que maximizan el éxito de la fertilización, como son la velocidad y longevidad de los espermatozoides. Los resultados obtenidos por los autores demostraron que los individuos analizados, correspondientes a machos de *S. merianae*, viviendo en condición de simpatría con ejemplares de *S. rufescens*, en comparación con los que se hallaban en alopatría, presentaron los músculos de la mandíbula más desarrollados y además produjeron espermatozoides más longevos y veloces. Como consecuencia, los autores concluyeron que ambas especies no difieren en cuanto a caracteres sexuales secundarios cuando se hallan en simpatría, y que estas similitudes en las características involucradas en los rasgos pre y postcopulatorios sugieren que los machos de dichas especies compiten por la atención de las hembras con las mismas estrategias, dando lugar a que las barreras de aislamiento reproductivo en estos lagartos estén relajadas. Además, los autores observaron interacciones agonísticas entre machos de ambas especies durante un evento de cópula en la zona de simpatría, confirmando de este modo la competencia interespecífica por las hembras durante la etapa reproductiva.

A su vez, en un trabajo realizado por Blengini y col. [224], los autores estudiaron la variabilidad en los rasgos morfométricos y en la dinámica de los espermatozoides en el contexto de competencia espermática en lagartos del género *Salvator* (lagarto overo y lagarto colorado). Los autores postulan que la selección sexual postcopulatoria impulsa la evolución en la morfología y velocidad de los espermatozoides, y proponen que la competencia espermática podría considerarse como una presión de selección sexual sobre la ultraestructura de los

espermatozoides con el fin de maximizar el éxito de fertilización en los machos. Sin embargo, no encontraron diferencias en la mayoría de los componentes subcelulares que analizaron entre los machos de ambas especies, por lo que los autores concluyen que los rasgos de ultraestructura espermática se conservan filogenéticamente dentro del género *Salvator*, lo cual sugiere que los mecanismos de aislamiento postcopulatorio entre estos lagartos están relajados y no podrían evitar la hibridación entre especies cuando habitan en simpatria.

En virtud de los resultados antes expuestos se considera que los objetivos planteados para este capítulo han sido alcanzados.

## **8. CAPÍTULO V: ESTUDIOS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**

### **I. INTRODUCCIÓN**

#### **I.I Datos históricos y desarrollo de la morfometría**

Se define a la morfometría como la variación de la forma y su covariación con otras variables [225][226]. Comparar las características anatómicas de los organismos ha sido un elemento central de la biología durante siglos, ya que la clasificación taxonómica de los organismos y la comprensión de la diversidad de la vida se basaron históricamente en descripciones de las formas [64]. En los inicios, las comparaciones morfológicas entre grupos de individuos estaban basadas en el análisis de las diferencias de sus dimensiones lineales, y la forma no podía ser analizada cuantitativamente, solo se describía. Con el avance de las tecnologías conjuntamente con la estadística, se comenzaron a utilizar análisis estadísticos multivariados con el objetivo de describir patrones de variación morfológicos intra e intergrupales, dando lugar a la “morfometría multivariada” o “tradicional” [64][65]. Sin embargo, esta metodología seguía siendo limitada respecto a la definición de “forma” propuesta por Kendall [227]: “Toda información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto”, lo cual implica analizar la forma independientemente de los componentes que no definen la geometría de dicho objeto como por ejemplo el tamaño, y es justamente el tamaño el dato numérico que constituye una de las bases del análisis de la morfometría tradicional [65].

A finales de 1980 y principios de 1990, se produjo un cambio en la manera en que se cuantificaron las estructuras morfológicas y se analizaron los datos. Este cambio implicó el desarrollo de métodos que capturan la geometría de las estructuras morfológicas de interés y preservan dicha información a lo largo de los análisis [64], denominando a este nuevo enfoque “morfometría geométrica” [228], el cual tuvo como propósito extraer información de la geometría de una forma biológica para fines comparativos particulares [229]. Las herramientas de morfometría geométrica aplican la estadística multivariada para estudiar la covariación de la forma con sus factores causales mediante el uso de datos multidimensionales que logran capturar la geometría de la estructura del objeto, permitiendo así la visualización de los cambios morfológicos [65].

El principal aporte de la morfometría geométrica fue haber logrado separar la forma “biológica” o “total” del objeto con respecto a la forma “pura” (*shape* en inglés) definida por Kendall [227], siendo a la vez independiente del tamaño, lo que además permite medir de manera separada las diferencias en forma y tamaño presentes entre los organismos estudiados [63][65]. La importancia de estos avances radica en que el análisis mediante morfometría geométrica permite realizar interpretaciones de alto significado biológico de las diferencias entre individuos ya que puede señalar, tanto estadística como visualmente, qué región o estructura está siendo afectada por un factor analizado y de qué modo está siendo afectada [65].

## I.II Metodología de la morfometría geométrica

Los datos frecuentemente empleados en análisis de morfometría geométrica consisten en coordenadas cartesianas de puntos anatómicamente o geoméricamente homólogos entre las estructuras de los individuos, denominados en inglés: *landmarks* (*lm*) [66][229]. Existen diferentes tipos de *lm*, los cuales fueron descritos por Bookstein [225]: Los *lm* Tipo I son aquellos definidos con respecto a yuxtaposiciones discretas de tejidos, tales como puntos de intersección de suturas, y cuentan con la mayor evidencia biológica de su homología; los *lm* Tipo II son puntos de máxima curvatura asociados con estructuras locales de implicancia biomecánica, como las cúspides de los molares; los *lm* Tipo III son puntos extremos, cuya definición está dada en base a alguna estructura distante, como longitud máxima, extremos de un diámetro máximo, etc. [65][229][230].

A través de la determinación de los *lm* en base a la biología y a la morfología de los organismos estudiados, se logra capturar completamente la forma de interés. Una vez definidos los *lm*, se digitalizan en una serie de muestras, lo que resulta en una colección de coordenadas cartesianas. Luego estas coordenadas deben procesarse matemáticamente para obtener variables de forma “pura”, eliminando así las variables de tamaño, orientación, posición y escala, esto se realiza mediante métodos de superposición en los cuales las configuraciones de *lm* se superponen de acuerdo con criterios de optimización [64][66].

Existen varios métodos de superposición, uno de ellos se denomina “Análisis Generalizado de Procrustes”. Este método superpone configuraciones de *lm* utilizando estimaciones de mínimos cuadrados e intenta minimizar la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de *lm* [64][229]. Cada configuración de *lm* tiene un centro geométrico o “centroide”, que es el punto que describe su posición en el espacio matemático. Si la única diferencia entre dos estructuras es el centroide, se las considera idénticas, siempre que sus configuraciones sean centradas al llevar sus centroides a un punto común mediante traslación. Por lo tanto, lo que se hace en primer lugar para superponer las configuraciones de *lm*, es trasladar el centroide de cada configuración al origen, es decir, a un punto común [64][65]. Luego las configuraciones se escalan a un tamaño de unidad común, mediante una dilatación o una contracción fija de todos los puntos a lo largo de las direcciones que unen a cada uno de ellos con el centroide de la configuración [64][229]. Finalmente, las configuraciones se rotan de manera óptima para minimizar las diferencias al cuadrado entre los *lm* correspondientes. Como paso final, el proceso se itera para calcular la forma media o “consenso” [64].

Una vez realizada la superposición, se puede obtener una representación gráfica de las variaciones de forma entre las configuraciones de *lm*. Una manera de hacerlo es a través de la función de placa delgada (TPS por sus siglas en inglés *thin plate spline*) desarrollada por Bookstein [225], que se basa en imaginar una placa de metal infinitamente delgada donde se encuentra localizada una configuración de *lm*. Si se quiere transformar la forma de una

configuración (generalmente la forma consenso) en otra (configuración individual), habría que superponer los *lm* de ambas placas, manteniendo una de ellas fija (la configuración de *lm* consenso). Como resultado la placa "blanco" (configuración de *lm* individual), se deforma y se obtiene una grilla en la cual las diferencias de forma entre los objetos se pueden describir en términos de diferencias en las cuadrículas de deformación que representan esos objetos. Los parámetros que describen estas deformaciones (deformaciones parciales o *partial warps*) se pueden usar como variables de forma para realizar comparaciones estadísticas de variación de forma dentro y entre poblaciones. Es decir que, con este método, se obtiene información de las desviaciones de forma de las configuraciones biológicas individuales a partir de la configuración consenso [64][65]. Actualmente existen una gran variedad de programas informáticos que permiten llevar a cabo los procedimientos matemáticos necesarios y obtener las representaciones gráficas de las variaciones de forma analizadas [65].

### **I.III Variabilidad morfológica en lagartos, influencia del ambiente y empleo de la morfometría geométrica en esos estudios**

El estudio de la diferenciación fenotípica en los organismos es relevante debido a que los fenotipos observados resultan de las complejas correlaciones entre los patrones morfogenéticos, los fenómenos ecológicos y las fuerzas evolutivas estocásticas y deterministas [67]. Por lo tanto, la variación fenotípica observada en las poblaciones naturales es el resultado de procesos evolutivos que reflejan predominantemente interacciones entre presiones selectivas inherentes a los entornos donde evolucionan dichas poblaciones. La elección de determinado ambiente por parte de un organismo está directamente influenciada por la interacción entre sus capacidades morfológicas y fisiológicas, y factores ecológicos como el clima, la complejidad estructural del hábitat o la disponibilidad de alimentos [231]. Es probable que la heterogeneidad de los factores bióticos y abióticos que influyen en la eficacia biológica de los organismos resulte en una selección que promueva la adaptación local y las divergencias entre las diferentes poblaciones de la misma especie [232].

Los reptiles, debido a su condición de animales ectotermos, se hallan fuertemente condicionados por el entorno biofísico en el que se desarrollan, ya que este influye en el intercambio de energía que afecta la temperatura del cuerpo y el gasto metabólico, lo cual tiene consecuencias directas en el equilibrio energético del animal. Además, el ambiente también influye en los rasgos más importantes de la historia de vida de estos organismos, como los niveles de actividad, las tasas de crecimiento y tamaño corporal, así como la temporada de apareamiento y los modos de reproducción, la dieta y la supervivencia [233].

Asimismo, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los reptiles son ovíparos, reconociéndose dos tipos básicos de huevos en base a su ecofisiología. Uno de ellos es el huevo cleidoico, el cual posee cáscara rígida y contiene en su interior toda el agua que el embrión necesita para su desarrollo, intercambiando con el medio solo gases respiratorios y una mínima cantidad

de vapor de agua, este tipo de huevos es propio principalmente de cocodrilos y tortugas terrestres. El otro tipo de huevo es el denominado no-cleidoico o de cáscara flexible, el cual es característico de los reptiles lepidosaurios y presenta el intercambio gaseoso típico, además de flujo de agua líquida desde el ambiente hacia el huevo y de vapor de agua en ambos sentidos, estableciendo así un equilibrio dinámico entre el huevo y el ambiente, el cual determina las condiciones en que se desarrolla el embrión [40]. Particularmente en las especies del género *Salvator*, la característica de poseer huevos no-cleidoicos, lleva a que las condiciones ambientales experimentadas durante la ontogenia temprana afecten al embrión, ya que los huevos se desarrollan en nidos en los que pueden variar factores térmicos, hídricos, edáficos y bióticos, creando entornos de incubación característicos. Entonces, las condiciones ambientales durante la embriogénesis pueden inducir variación fenotípica en estos animales [234][235], la cual es factible de ser estudiada mediante las técnicas de morfometría geométrica.

Especialmente a nivel del cráneo de los animales, dichas técnicas pueden ser ideales para cuantificar el resultado de la selección en diferentes rasgos funcionales [236]. La región cefálica de los lagartos podría ser un paradigma para la evolución en mosaico, debido a las numerosas fuerzas selectivas que actúan sobre ella como resultado de estar involucrada en una variedad de funciones, tales como alimentación, adquisición y defensa del territorio, apareamiento, uso del hábitat y refugio; las cuales brindan oportunidades para la acción de fuerzas selectivas sobre el tamaño y la forma de la cabeza [237]. Por este motivo las técnicas de morfometría geométrica son ideales para cuantificar el efecto de la selección en diferentes características funcionales del cráneo de los lacertilianos [78] ya que permiten encontrar diferencias en tamaño y forma de la región cefálica de los organismos, relacionar la forma con las variables ambientales y, además estimar los valores de heredabilidad mediante la integración con métodos de genética cuantitativa [62].

Existen diversos estudios de la región cefálica de los lagartos mediante el empleo de la morfometría geométrica, los cuales en su mayoría se centran en el análisis del dimorfismo sexual y en el análisis de las variaciones morfológicas de las diferentes partes estructurales del cráneo y su significado adaptativo [236][238][239][240]. Particularmente en lo que respecta a la especie *S. meriana*, los estudios empleando morfometría geométrica son escasos. Como se mencionó en la Introducción general, el primero de dichos trabajos fue realizado por Monteiro y Abe [76], quienes estudiaron los procesos morfogénicos que actúan en el cráneo a lo largo del crecimiento ontogenético de los individuos. A su vez, Fabre y col. [77] usaron morfometría geométrica para cuantificar la forma del cráneo y la mandíbula del lagarto overo y estudiar su covariación, así como su covariación con la musculatura, con los rasgos funcionales y con la fuerza de la mordida. Además, en otro trabajo, Fabre y col. [78] demostraron la existencia de diferencias intersexuales en la forma del cráneo y mandíbula de individuos de *S. meriana* usando tanto la morfometría

geométrica como la tradicional y concluyeron que la primera metodología resultó más informativa.

#### **I.IV Morfometría geométrica y genética cuantitativa**

El campo de la genética cuantitativa fue desarrollado para caracterizar, cuantificar y predecir las maneras en que los caracteres pueden responder a diferentes tipos de selección. La forma, en particular, es importante como rasgo a examinar debido a que es probablemente el aspecto más importante del fenotipo sobre el que la selección natural puede actuar [68]. Para comprender la evolución morfológica primero se deben documentar los patrones de variación y luego examinar las influencias relativas que los factores ambientales y genéticos ejercen sobre el desarrollo y mantenimiento de estos patrones. Aunque la selección natural y sexual son fuerzas importantes que imponen patrones inmediatos sobre la morfología, para que estos patrones se desarrollen a través del tiempo evolutivo, las características morfológicas bajo selección deben exhibir variación heredable [68]. La Heredabilidad en sentido amplio se define como la proporción de varianza fenotípica debida a la varianza genética total, y tiene en cuenta diferentes fuentes de variación genética que pueden afectar el fenotipo: los efectos aditivos de los alelos, los efectos debidos a relaciones dominantes/recesivas de dichos alelos y los efectos debidos a interacciones epistáticas; este tipo de heredabilidad implica que un carácter particular está determinado por el genotipo. Por su parte, la Heredabilidad en sentido estricto es la proporción de varianza fenotípica debida sólo a la varianza aditiva (los efectos aditivos de los alelos) y expresa el grado en el cual los fenotipos son determinados por los genes transmitidos por los progenitores [187][241]. La heredabilidad de un carácter en una población determina su potencial evolutivo. Teniendo en cuenta la relación directa que existe entre forma, función y eficacia biológica, a menudo se supone que medir la heredabilidad de los caracteres de forma proporciona un modo aceptable para estimar la respuesta de esos caracteres a la selección [191][242].

Por lo tanto, en base a la riqueza de la información extraída de los datos mediante los métodos geométricos, y la relativamente fácil construcción de modelos lineales para las variables de formas [243], una extensión natural de estos estudios implicaría la evaluación de los componentes de forma heredables definidos por los descriptores geométricos. Dichos esfuerzos requerirían la integración de los procedimientos geométricos de la descripción de la forma dentro del marco de la genética cuantitativa, como una herramienta de relevancia que permitiría comprender mejor la respuesta de la forma a las presiones de selección [63].

En este capítulo se describen estudios de la forma y tamaño de la región cefálica del lagarto overo empleando las herramientas de morfometría geométrica, integrando además aspectos de la genética cuantitativa mediante el cálculo de la Heredabilidad en sentido amplio de dicha forma y tamaño. En una primera instancia los individuos se compararon teniendo en cuenta el tipo de ambiente al que pertenecen (natural o perturbado); y, en una segunda instancia se

compararon en función de la ecorregión en la cual habitan. Para finalizar, se realizó un análisis de los caracteres de la región cefálica con valor taxonómico en los individuos estudiados.

## **II OBJETIVOS DEL CAPÍTULO V**

- Analizar asociaciones entre el tamaño y forma de la región cefálica de ejemplares de lagarto overo en relación con las características ambientales y ecológicas del lugar de origen (natural o perturbado).
- Estudiar el tamaño y la forma de la región cefálica del lagarto overo en función de las variables ambientales y ecológicas de la ecorregión en la cual habitan.
- En base a la hipótesis de la presencia de dos linajes: determinar caracteres con valor taxonómico presentes en la región cefálica de los individuos analizados.
- Estimar valores de Heredabilidad en sentido amplio a partir del tamaño y forma de los ejemplares analizados.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. I Muestreo, capturas fotográficas, configuraciones de *lm* y pruebas de error**

Los individuos objeto de estudio provienen de los mismos nidos y sitios analizados de la provincia de Santa Fe en los capítulos anteriores: Reconquista, Romang, Sa Pereira, Alejandra, San Cristóbal y Costa del Salado. Se seleccionó un nido por cada sitio de muestreo y, como se detalló en la Introducción general, en el marco del programa de rancheo del “Proyecto Iguana” (PI), los huevos se incubaron artificialmente bajo condiciones controladas de temperatura (29 - 32 °C) y humedad (< 20%). Aproximadamente una semana después de la eclosión de los neonatos, de cada nido se seleccionaron al azar diez individuos para la recolección de datos (capturas fotográficas), es decir que se analizaron sesenta especímenes neonatos nacidos de huevos recolectados en la naturaleza.

Se debe mencionar que las escamas cefálicas son una herramienta importante para estudiar la morfología craneal en lagartos, las cuales se utilizan como indicadores de la morfología de la cabeza, ya que cubren todo el volumen cefálico y posiblemente constituyen referencias anatómicas homólogas. Además, son útiles en la investigación de la evolución y la morfogénesis de los lagartos debido a sus relaciones biomecánicas con los huesos subyacentes y la anatomía muscular. Por estos motivos dichas escamas pueden proporcionar herramientas para el estudio intra e interespecífico de las variaciones morfológicas [238][244], siendo esta la razón por la que la mayoría de los trabajos realizados en lagartos estudian principalmente la vista dorsal de la región cefálica, ya que allí se encuentran las escamas más conspicuas. A su vez, algunos trabajos complementan el análisis de la vista dorsal con el análisis de uno de los laterales de la región cefálica [244][245][246].

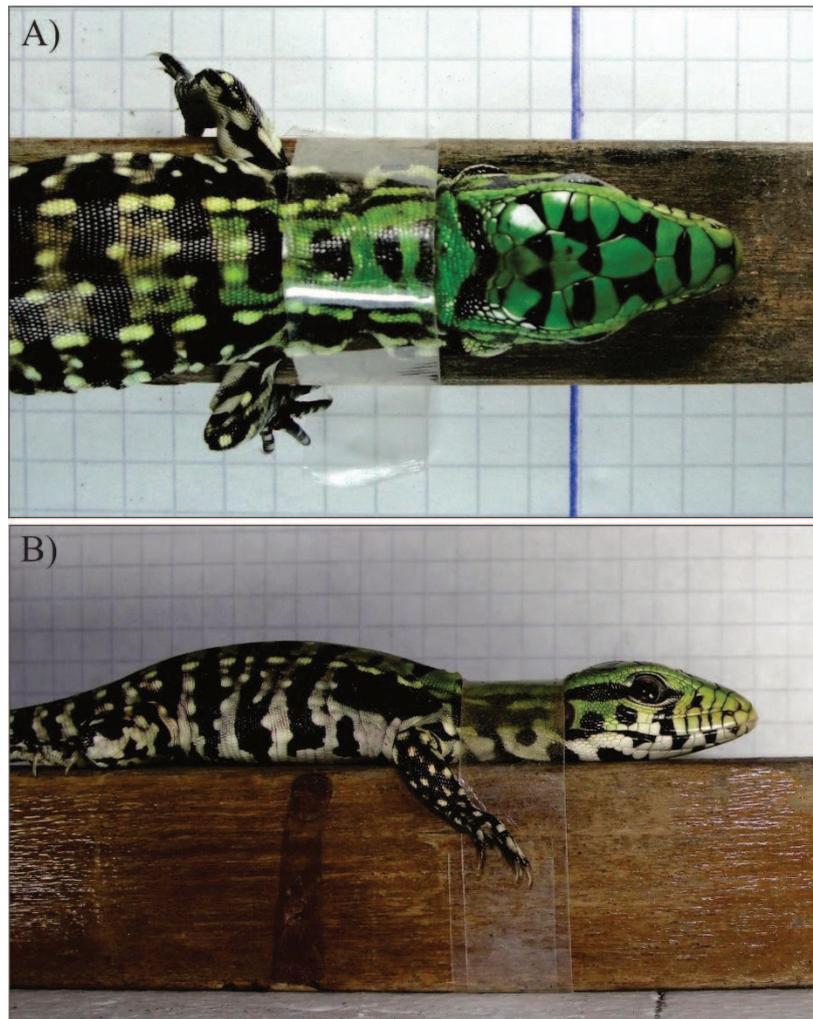
En base a lo antes expuesto, en la presente tesis se decidió estudiar la vista dorsal y lateral derecha de la región cefálica de los individuos analizados, las cuales fueron fotografiadas

empleando una cámara digital SONY *Cyber-shot* DSC-H20 (*Digital still camera*) Full HD 1080, con una resolución de 10.1 Mega pixels. Se programó la misma en el modo automático, resolución óptima, con flash y con iluminación adicional y se obtuvieron imágenes en formato JPEG. Para una correcta captura de las imágenes, se colocó la cámara perpendicular al centro de la cabeza de los individuos y al centro de la vista lateral, mediante la utilización de un trípode, a una distancia focal de aproximadamente 30 centímetros entre el individuo y la lente (Figura 31).



**Figura 31.** Montaje para la captura fotográfica de un individuo en su perfil derecho. Se observan los elementos utilizados para obtener fotografías adecuadas: cámara fotográfica de alta resolución, plataformas fabricadas especialmente para dichas capturas, trípode y lámparas para generar luz adicional.

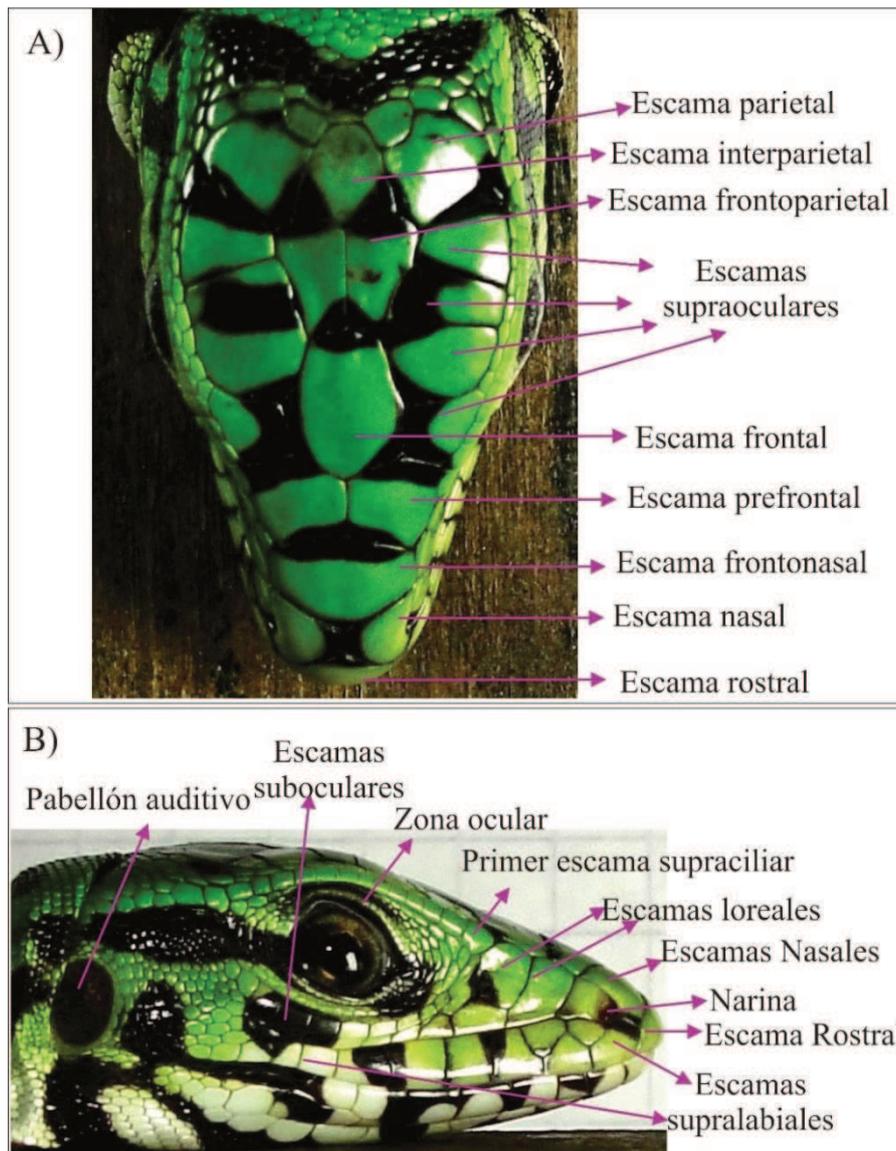
Para inmovilizar a cada animal, se colocó una cinta adhesiva alrededor del cuello sujetándolo a un soporte de madera ubicado debajo, con el objetivo de que permaneciera sobre dicho soporte sin posibilidad de movimiento. Además, se empleó como fondo una hoja de papel cuadrado con un espacio de cuadrícula de 0,5 cm, lo cual constituye una referencia métrica para escalar las imágenes, siendo este paso importante para el cálculo del tamaño además de la forma [247] (Figura 32).



**Figura 32.** Fotografías en las cuales puede apreciarse la metodología empleada para inmovilizar a los individuos al momento de la captura fotográfica. Se observa que la cinta adhesiva alrededor del cuello logra sujetarlos de manera eficaz al soporte de madera evitando movimientos. A) Captura fotográfica en vista dorsal. Debajo del individuo se observa el papel cuadriculado utilizado para escalar las fotografías. B) Captura fotográfica en vista lateral derecha. Detrás se observa el papel cuadriculado utilizado para escalar las fotografías.

Cada uno de los especímenes fue fotografiado a nivel de su región cefálica, tres veces en vista dorsal y tres veces en vista lateral derecha, esto se realizó para luego obtener un promedio de las tres fotografías de cada individuo con el objetivo de reducir el error en la colocación de *lm* (la obtención del error se detalla más adelante en la presente sección). Para la colocación de dichos *lm*, a partir de los archivos JPEG se crearon archivos \*.tps para el conjunto de los diez ejemplares de cada nido muestreado, mediante el programa TpsUtil [248] y se colocaron los *lm* con el programa TPSDig2 [249]. Además, cada una de las fotografías fue escalada en un rango de 1 cm mediante la referencia métrica obtenida a través del papel cuadriculado en las fotografías. Los puntos para la localización de los *lm* fueron seleccionados con el objetivo de lograr una cobertura completa de la forma de la región cefálica, para lo cual se colocaron *lm* en las suturas de las

grandes escamas cefálicas regulares que cubren las regiones dorsales y laterales de la cabeza (Figura 33).



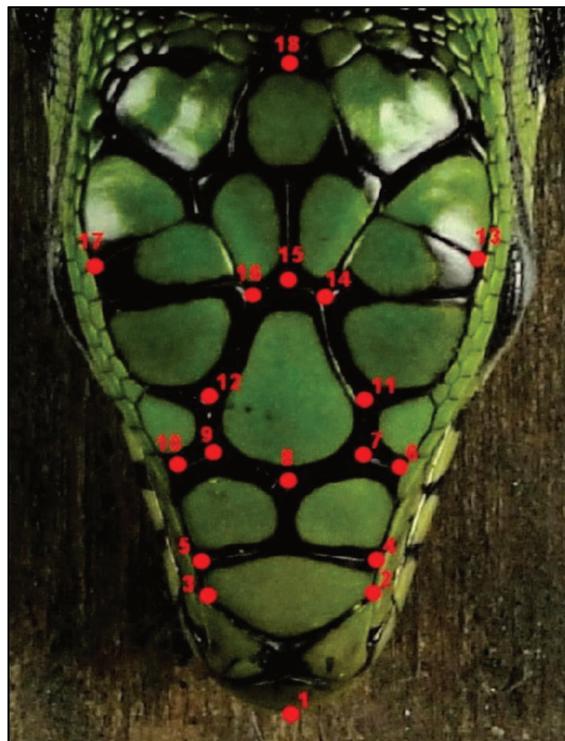
**Figura 33.** Nombres de las escamas ubicadas en la región cefálica del lagarto overo y puntos anatómicos considerados para la colocación de los *lm*. Las fotografías corresponden a un juvenil de una semana de vida. A) Referencias consideradas en la vista dorsal. B) Referencias consideradas en la vista lateral derecha.

En una primera instancia se realizaron análisis preliminares de diferentes configuraciones de *lm*, tanto en vista dorsal como en vista lateral, estos análisis implicaron la representación gráfica de las estructuras mediante el programa TPSRw [250], lo cual permitió observar la variación de cada uno de los *lm* en su localización específica en los distintos individuos analizados de cada nido. Si un *lm* presentaba demasiada variación o resultaba redundante, era eliminado o modificado con el fin de evitar un exceso de variación e información que pudiera alterar la interpretación de los resultados finales.

Además, empleando el programa MorphoJ [251], se realizaron diversos análisis estadísticos (como el PCA, Regresión y CVA, los cuales serán detallados más adelante) con el fin de determinar cuál de estas configuraciones representaba con mayor fidelidad la forma de la estructura bajo estudio. Dicho programa informático utiliza la información extraída a partir de arreglos de *lm* morfológicos y combina dicha información con un amplio rango de métodos para analizar la forma en diferentes contextos biológicos. Tales métodos involucran análisis multivariados estándar, componentes principales, análisis discriminante y regresión multivariada, así como aplicaciones especializadas que incluyen filogenética, genética cuantitativa y análisis de modularidad [251].

Específicamente, en vista dorsal se analizaron siete configuraciones diferentes que presentaron 24, 23, 21, 20, 18, 17 y 16 *lm* respectivamente, las cuales variaron en número y/o posición de los *lm*. En el caso de la vista lateral derecha, se analizaron cinco configuraciones diferentes que presentaron 20, 16, 14, 13 y 12 *lm* respectivamente.

Para el análisis de la región cefálica de los individuos en vista dorsal fue seleccionada la configuración de 18 *lm* como la más apropiada (Figura 34). En la Tabla 31 se realiza una descripción detallada de la ubicación de cada uno de los *lm* colocados en vista dorsal.

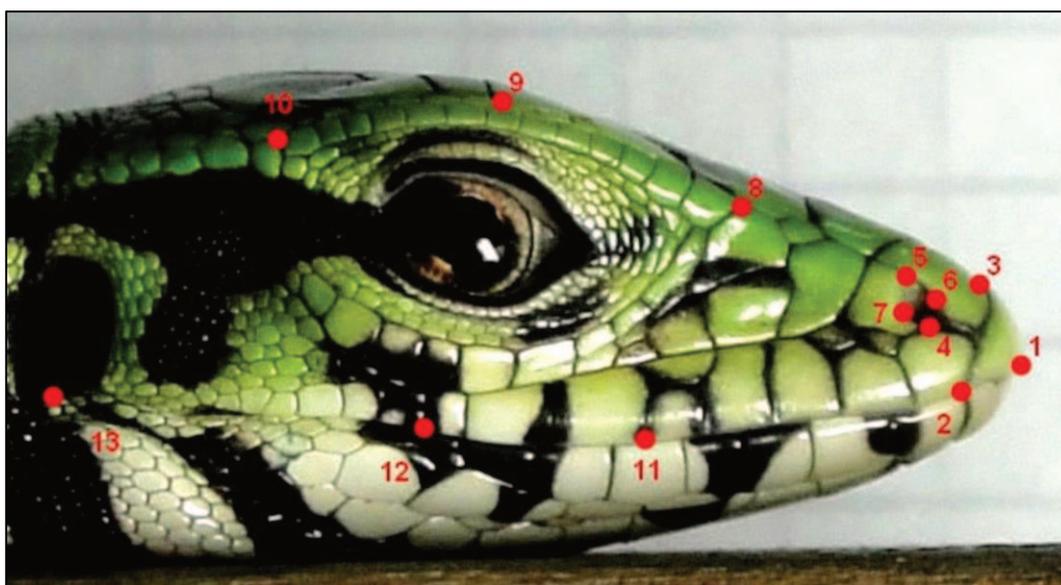


**Figura 34.** Fotografía de la región cefálica de lagarto overo en vista dorsal, mostrando la configuración definitiva de los 18 *lm* seleccionados.

**Tabla 31.** Descripción de la ubicación de cada uno de los 18 *lm* seleccionados para la configuración definitiva en vista dorsal de la región cefálica.

Número	Descripción de la ubicación de los <i>landmarks</i> analizados en vista dorsal
1	Extremo anterior del hocico (Punto de mayor ángulo de la escama rostral).
2	Punto de unión entre las escamas nasal y frontonasal, lado izquierdo.
3	Punto de unión entre las escamas nasal y frontonasal, lado derecho.
4	Punto de unión entre las escamas frontonasal y prefrontal, lado izquierdo.
5	Punto de unión entre las escamas frontonasal y prefrontal, lado derecho.
6	Punto de unión entre las escamas prefrontal y primera supraocular, lado izquierdo.
7	Punto de unión entre las escamas prefrontal, primera supraocular y frontal, lado izquierdo.
8	Punto de unión entre ambas escamas prefrontales, y la escama frontal.
9	Punto de unión entre las escamas prefrontal, primera supraocular y frontal, lado derecho.
10	Punto de unión entre las escamas prefrontal y primera supraocular, lado derecho.
11	Punto de unión entre la escama frontal y la primera y segunda supraocular, lado izquierdo.
12	Punto de unión entre la escama frontal y la primera y segunda supraocular, lado derecho.
13	Punto de unión entre la tercera y cuarta supraocular, lado izquierdo.
14	Punto de unión entre las escamas frontal, segunda supraocular y frontoparietal, lado izquierdo.
15	Punto de unión entre la escama frontal y ambas frontoparietales.
16	Punto de unión entre las escamas frontal, segunda supraocular y frontoparietal, lado derecho.
17	Punto de unión entre la tercera y cuarta supraocular, lado derecho.
18	Extremo posterior de la escama interparietal.

En vista lateral derecha fue seleccionada la configuración de 13 *lm* como la definitiva (Figura 35). En la Tabla 32 se detalla la ubicación de cada uno de los *lm* seleccionados para la configuración del lateral derecho.



**Figura 35.** Fotografía de la región cefálica de lagarto overo en vista lateral derecha, mostrando la configuración definitiva de los 13 *lm* seleccionados.

**Tabla 32.** Descripción de la ubicación de cada uno de los 18 *lm* seleccionados para la configuración definitiva en vista lateral derecha de la región cefálica.

Número	Descripción de la ubicación de los <i>landmarks</i> en vista lateral derecha
1	Extremo anterior del hocico (Punto de mayor ángulo de la escama rostral).
2	Punto de unión entre las escamas rostral y primera supralabial.
3	Punto de unión entre la escama rostral y ambas escamas nasales.
4 y 5	Longitud máxima de las narinas
6 y 7	Ancho máximo de las narinas.
8	Punto de unión entre la primera y segunda escama supraciliar.
9	Punto de mayor ángulo formado por las escamas supraciliares.
10	Extremo posterior de la última escama supraciliar.
11	Punto de unión entre la quinta y sexta escama supralabial.
12	Punto de unión entre la octava y novena escama supralabial.
13	Inicio del pabellón auditivo en su región inferior.

Una vez seleccionadas las dos configuraciones definitivas de *lm*, los sucesivos análisis fueron realizados mediante el programa MorphoJ.

En una primera instancia se evaluó el error de captura de la fotografía y el error de colocación de *lm*, lo cual resulta de suma importancia ya que es preciso considerar la magnitud del error humano en la colocación de los *lm* y el error producido por ligeras variaciones no detectadas entre las imágenes capturadas, ya sea por variación en el plano focal o en el ángulo de la cámara. El cálculo de estos errores se realiza para tratar de reducirlos al mínimo, con el fin de que no influyan en la variación real de la forma entre los individuos analizados. A continuación, se detallan los pasos realizados para la obtención de la magnitud de dichos errores:

Con el objetivo de obtener una buena estimación del error de la captura de las fotografías, fueron seleccionados al azar un subconjunto de siete individuos, y de cada uno de ellos fueron tomadas dos fotografías en vista dorsal y dos en vista lateral. Dichas fotografías no fueron tomadas una inmediatamente después de la otra, sino que, para evitar clonar las imágenes, se tomó primero una foto de cada uno de los individuos. Una vez terminada la primera ronda, se tomó una segunda foto de cada uno de los individuos. Este procedimiento se realizó tanto para la vista dorsal como para la vista lateral derecha.

Luego, para la obtención del error de colocación de *lm*, se duplicó cada una de las fotografías capturadas previamente, obteniendo así un total de cuatro fotografías por individuo y por configuración de *lm*.

Seguidamente los dos archivos \*.tps elaborados con sus correspondientes configuraciones de *lm* en vista dorsal (18 *lm*) por un lado y en vista lateral (13 *lm*) por el otro, fueron analizados con el programa MorphoJ.

En primer lugar, cada uno de los archivos \*.tps fue sometido a un ajuste Procrustes generalizado, el cual constituye el primer paso después de importar un archivo con datos sin procesar al programa MorphoJ.

Posteriormente, a cada una de las configuraciones de *lm* se las sometió a un análisis de Procrustes ANOVA, un método empleado para cuantificar cantidades relativas de variación en diferentes niveles [252][253]. Aquí este método se utilizó para evaluar las magnitudes relativas del error producido a partir de mediciones repetidas (*lm*). Cabe mencionar que, una vez ingresados al programa, los datos fueron categorizados, es decir que se le indicó al programa cuáles eran los datos que correspondían a error de captura de fotografía y cuáles al error de colocación de *lm*, por lo que, en la salida del programa y luego de realizado el análisis de Procrustes ANOVA, se pudieron discriminar fácilmente los resultados de cada uno de ellos.

Además, en base a los resultados obtenidos del ANOVA (ver sección Resultados) y para ejercer aún más control sobre la variación producida por el error humano, se decidió que los subsiguientes análisis para el conjunto total de los sesenta individuos se realicen utilizando la media de las tres fotografías tomadas a cada individuo. Para ello, los tres archivos \*.tps elaborados para cada uno de los nidos fueron combinados mediante el programa TPSUtil [248], obteniendo así un solo archivo \*.tps por nido que poseía las tres fotografías de cada uno de los diez individuos. Luego, mediante el programa TPSDig2 [249] se colocaron los *lm*. Posteriormente, cada uno de dichos archivos fue importado al programa MorphoJ y se obtuvo un promedio de las tres fotografías de cada individuo, lo cual permitió calcular la posición promedio de cada *lm* a partir de su posición en cada una de dichas fotografías, con el fin de reducir el error de colocación de *lm*. Esto se realizó para cada una de las configuraciones por separado, es decir que por cada nido se generaron dos archivos \*.tps promediados, uno para la vista dorsal y otro para la vista lateral derecha. Una vez obtenidos los archivos promediados se procedió a realizar el resto de los análisis con el programa MorphoJ.

### **III.II Análisis preliminares con morfometría geométrica**

En un análisis con morfometría geométrica, el conjunto de datos debe ser sometido a una variedad de acciones que constituyen pasos previos a cualquier otro análisis. En primer lugar, las coordenadas de *lm* de todos los especímenes fueron superpuestas sobre un sistema de coordenadas común mediante el Análisis Generalizado de Procrustes (AGP), con el fin de remover los efectos de traslación, rotación y escala [254]. Para ello, el programa MorphoJ emplea un ajuste Procrustes completo y proyecta los datos al espacio tangente mediante proyección ortogonal [226], lo cual permite alinear las imágenes y obtener la forma consenso [62].

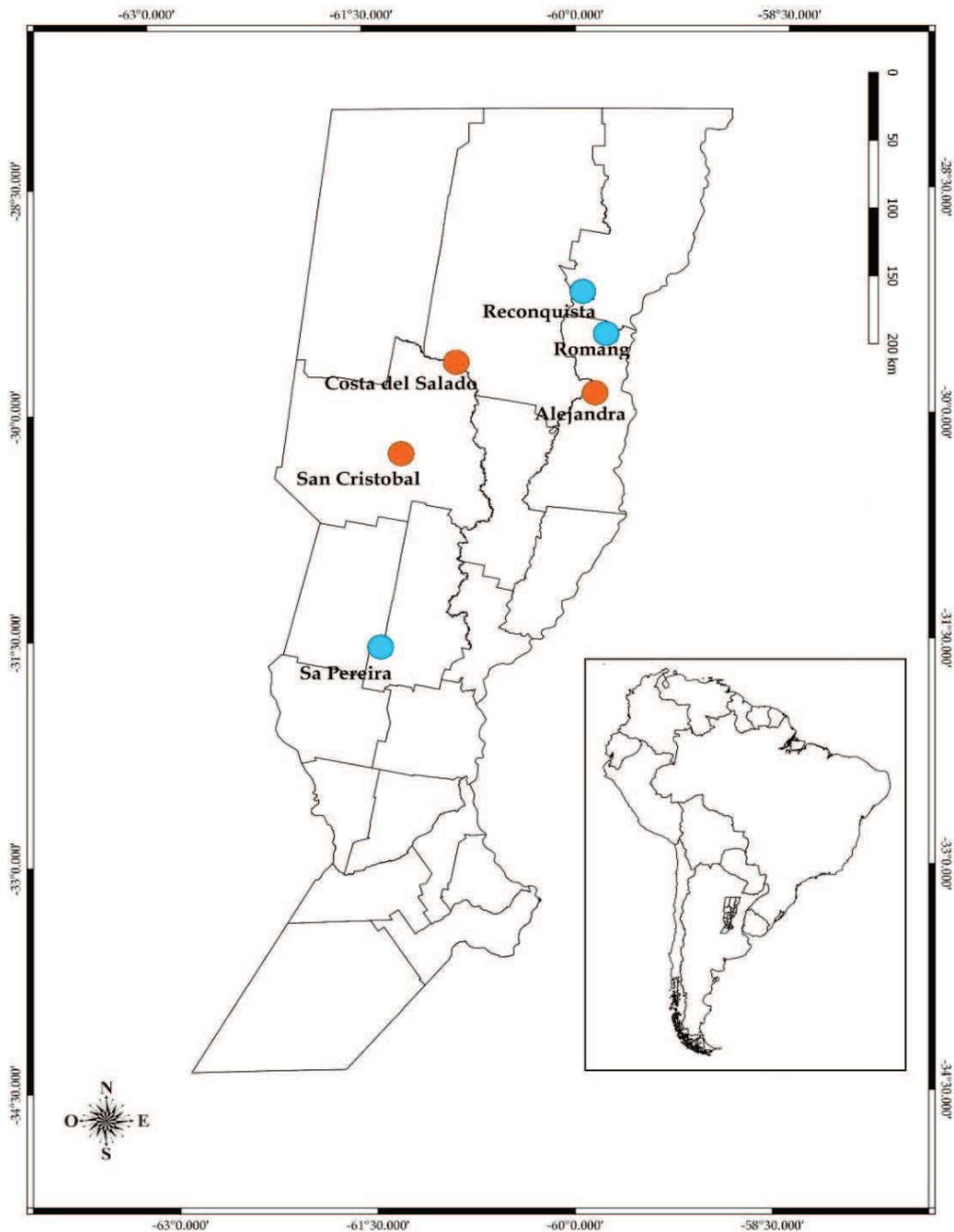
Un factor importante a tener en cuenta es que la variación en el tamaño de los organismos generalmente está asociada con la variación en la forma, dicha variación puede ser producida por distintos fenómenos biológicos, uno de ellos es la denominada alometría estática, la cual refleja la variación individual dentro de una población y clase de edad [255]. Por este motivo, se efectúa el análisis de regresión multivariada de coordenadas Procrustes (variable dependiente) [256] sobre el tamaño de centroide (CS: por sus siglas del inglés *centroid sizes*) de la configuración de *lm* (variable independiente) para detectar dicha alometría. En este análisis se considera al tamaño

de centroide, es decir la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde cada  $lm$  al centroide de la configuración [63], ya que es la única medida de tamaño no correlacionada con la forma en ausencia de alometría [257]. Así, en morfometría la regresión se utiliza con frecuencia para corregir los efectos del tamaño sobre la forma (alometría), siendo los residuos de esa regresión los valores de forma de los que se han eliminado los efectos del tamaño [256]. Es decir que, si se comprueba que existe una relación lineal significativa entre la forma y el tamaño de la estructura en estudio, esto se soluciona empleando los residuos de la regresión como un nuevo conjunto de datos, de los que se derivan las matrices de covarianza que se utilizan para todos los análisis posteriores.

En base a lo antes expuesto, en el presente trabajo se realizó un análisis de regresión multivariada para todo el conjunto de datos, tanto para la configuración de  $lm$  en vista dorsal como para la configuración en vista lateral derecha. Este análisis se realizó con el objetivo de determinar la presencia de alometría en el conjunto de datos bajo estudio, para poder luego llevar a cabo los análisis específicos de variabilidad morfológica.

### **III.III Análisis de la región cefálica dependiendo del tipo de ambiente (natural o perturbado)**

En una primera instancia, las variaciones en la forma y el tamaño de la región cefálica del lagarto overo fueron analizadas en base al tipo de ambiente en el que fueron colectados los huevos en la naturaleza. Tres de los seis sitios de muestreo (Reconquista, Romang y Sa Pereira) fueron considerados como hábitats perturbados porque los nidos se recolectaron en campos linderos a lotes sembrados con soja y sorgo, con escasa representación de la flora nativa. Los otros tres sitios (Alejandra, San Cristóbal y Costa del Salado) fueron considerados como ambientes naturales ya que los nidos se cosecharon en campos que carecían de dicha alteración antrópica, con poca o ninguna modificación de la flora local (Figura 36).



**Figura 36.** Sitios de muestreo seleccionados. Los círculos de color naranja representan los sitios de muestreo en ambientes naturales y los círculos de color turquesa representan los sitios de muestreo en ambientes perturbados.

Para realizar este análisis se consideraron las variables ambientales a las que fueron expuestos los nidos durante el período de incubación, antes de su recolección por parte del PI. Los datos de las variables ambientales fueron obtenidos a partir del Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [258] y las variables ambientales seleccionadas fueron: Precipitación (PP), Humedad relativa del ambiente (HR), Presión de vapor media (PVM), Temperatura máxima del aire (TMaxA), Temperatura

mínima del aire (TMinA), Temperatura media del aire (TMA) y Temperatura media del suelo a 10 cm de profundidad (TMS10). Además, se consideró el número de días aproximado que los huevos estuvieron expuestos al ambiente de origen antes de su cosecha, para así obtener un promedio de los valores de las variables ambientales registradas (Tabla 33). Para el cálculo del número de días de exposición de los huevos al ambiente de origen, se le restó al número total de días de incubación del lagarto overo (65 días), el número de días que pasaron en la incubadora artificial, previamente a la eclosión de los neonatos en las instalaciones del PI. Todos los datos de las variables ambientales fueron estandarizados antes de ingresarlos al programa MorphoJ; este paso es necesario debido a que dichas variables se registran inicialmente en diferentes unidades de medición [259].

**Tabla 33.** Valores promedio de las variables ambientales analizadas para cada sitio durante el período de incubación previo a la recolección de los huevos. NDEA: Número de días expuestos al ambiente; PP: Precipitaciones; HR: Humedad relativa; TMS10: Temperatura media del suelo a 10 cm de profundidad; TMaxA: Temperatura máxima del aire; TMinA: Temperatura mínima del aire; TMA: Temperatura media del aire; PVM: Presión de vapor media.

Sitio de muestreo	NDEA	PP (ml)	HR (%)	TMS10 (°C)	TMaxA (°C)	TMinA (°C)	TMA (°C)	PVM (hPa)
Alejandra	10	3,23	69,1	22,51	30,33	16,6	22,98	18,26
S. Cristóbal	5	0,96	76,6	24,02	29,76	14,3	21,38	18,2
C. del Salado	21	0,64	73,74	25,93	32,69	17,72	24,67	21,99
Romang	5	13,08	84,2	22,7	28,56	16,16	21,9	21,34
Reconquista	33	4,98	75,82	22,66	29,76	16,27	22,8	20,15
Sa Pereira	28	2,24	59,04	24,25	31,9	15,95	23,49	15,85

### III.III.I Análisis de variabilidad morfológica de la región cefálica

En primer lugar, se exploró la variación de la forma mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés: *Principal Component Analysis*). La utilidad del PCA radica en el hecho de que las variables morfométricas (tanto geométricas como caracteres cuantitativos tradicionales) están correlacionadas porque describen características del organismo que están relacionadas funcional, evolutiva o genéticamente, por lo que sus patrones de variación y covariación son a menudo complejos y difíciles de interpretar. En base a esto, el propósito del PCA es simplificar esos patrones y permitir su mejor interpretación, mediante una reducción de las dimensiones a través de combinaciones lineales ortogonales de las variables originales que reproducen de manera más eficiente la variabilidad de la muestra, siendo el primer componente principal (CP1) la combinación lineal que representa la varianza máxima, disminuyendo luego dicha varianza en los sucesivos componentes principales (CP2, CP3, etc.) [247][255][260]. El uso del PCA es particularmente importante en la investigación morfométrica porque el número de variables de forma que se analizan puede ser muy grande y a menudo excede los tamaños de muestra razonables [260].

El PCA construye variables que se utilizan para examinar la variación entre los individuos dentro de una muestra. Además, se puede utilizar como un análisis de ordenación para examinar la disposición de las muestras en el morfoespacio, ya que produce puntuaciones para los individuos en esas variables, y estas se pueden graficar y usar para inspeccionar visualmente los patrones resultantes [247][251]. En el presente trabajo se llevaron a cabo PCA para los seis sitios de muestreo agrupados, tanto para la configuración de *lm* en vista dorsal como para la configuración en vista lateral derecha, es decir que se realizaron dos PCA.

Luego fue realizado un análisis de función discriminante (DFA, por sus siglas en inglés: *Discriminant function analysis*), una técnica clásica de la estadística multivariada que examina la separación entre dos grupos de observaciones que se conocen *a priori*. Funciona extrayendo una combinación lineal de variables que maximiza las diferencias entre las medias de los grupos y permite la identificación de las variables que predicen la pertenencia al grupo a partir de un conjunto de predictores. La adecuación de esta clasificación de grupo “natural” se compara luego con la pertenencia a los grupos de interés [261]. La confiabilidad de la discriminación se evalúa mediante una validación cruzada de exclusión, la cual indica si los grupos se pueden distinguir en forma confiable. Los patrones de variación de forma se pueden comparar entre grupos por correlación entre matrices y evaluar estadísticamente con pruebas de permutación matricial [251]. De este modo, la DFA produce tablas de clasificación con validación cruzada para probar la precisión de la discriminación.

Mediante el DFA, se analizaron las diferencias de forma entre los individuos provenientes de ambos tipos de ambientes (natural y perturbado) para los seis nidos en su conjunto y para ambas configuraciones de *lm*, es decir que se realizó un DFA para la configuración de *lm* en vista dorsal y un DFA para la configuración de *lm* en vista lateral derecha.

### **III.III.II Análisis de asimetría**

Las alteraciones del desarrollo en los organismos, es decir la tendencia a que pequeñas perturbaciones en el desarrollo produzcan cambios morfológicos en el individuo, pueden conducir a sutiles desviaciones en la simetría de las estructuras biológicas y, además, pueden influir en la eficacia biológica de los individuos [262][263]. La asimetría fluctuante es la medida de inestabilidad del desarrollo más comúnmente utilizada, ya que constituye un buen indicador de la inestabilidad causada por alteraciones en el medio ambiente [263]. Un claro ejemplo de tales alteraciones, como se mencionó en capítulos anteriores, es la modificación del hábitat del lagarto overo como consecuencia de las actividades antrópicas, lo cual podría generar estrés en los animales que habitan dichos ambientes y, consecuentemente, inestabilidad en el desarrollo de sus estructuras biológicas [47][263].

Por este motivo, se decidió evaluar la presencia de asimetría fluctuante en la configuración de *lm* de los individuos en vista dorsal, para los dos tipos de ambientes (natural y

perturbado) por separado. Para ello primero se llevó a cabo un ANOVA Procrustes, método propuesto por Klingenberg [251] que, entre otras funciones, permite evaluar la variación asimétrica entre los lados derecho e izquierdo de una estructura considerada simétrica (en este trabajo dicha estructura está representada por la región cefálica en vista dorsal). El programa MorphoJ separa la variación de forma de las estructuras simétricas en componentes de variación simétrica y asimétrica, los cuales proporcionan información relevante para diferentes aspectos biológicos [253]. El componente simétrico representa la variación de forma entre los individuos y es usado en una gran variedad de análisis, mientras que el componente asimétrico tiende a usarse en análisis más especializados, por ejemplo, como una medida de la inestabilidad del desarrollo [251]. Por lo tanto, en caso de detectar asimetría mediante el ANOVA Procrustes, se debe evaluar si existen diferencias en el componente asimétrico entre ambos tipos de ambientes analizados (natural y perturbado), para ello el primer paso es realizar un análisis de regresión para determinar presencia o ausencia de alometría y luego un DFA sobre el componente asimétrico derivado del procedimiento Procrustes.

### **III.III.III Análisis de covariación en la forma de la región cefálica**

El método de mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas del inglés: *Partial Least Squares method*) es un método utilizado para explorar patrones de covariación entre dos o más bloques de variables, para lo cual extrae las combinaciones lineales de dichos bloques que mejor explican el patrón de covariación del conjunto de datos [247][260]. Además, proporciona el coeficiente RV que mide la fuerza general de asociación entre bloques y su valor *p* asociado. El método PLS puede emplearse en la investigación morfológica para examinar la relación entre la morfología y las variaciones no morfológicas (ej: variaciones ambientales, coordenadas geográficas), así como para examinar la covariación entre las formas de diferentes estructuras del mismo organismo [260].

#### **III.III.III.I Covariación de la forma entre ambas configuraciones de *lm***

Se empleó el PLS de dos bloques para evaluar la covariación de la forma de la configuración de *lm* en vista dorsal con respecto a la forma de la configuración de *lm* en vista lateral, con el objetivo de examinar la existencia de asociación morfológica entre ambas configuraciones de la región cefálica. Esto se realizó para los individuos de los seis nidos en su conjunto.

#### **III.III.III.II Covariación de la forma con las variables geográficas**

Luego se evaluó la covariación de la forma con las variables geográficas (latitud y longitud), para lo cual el primer paso fue realizar un análisis de superficie de tendencia (TSA, por sus siglas del inglés: *Trend Surface Analysis*) con el objetivo de evitar la autocorrelación espacial. Dicha autocorrelación se produce cuando las muestras más cercanas en el espacio geográfico tienden a ser más similares o diferentes entre sí para una variable dada, en relación a lo esperado

por azar [264], lo que significa que existe una dependencia de los valores de una variable entre muestras vecinas o próximas [265]. Esto ocurre porque los organismos no se distribuyen de manera aleatoria o uniforme en el entorno natural, como consecuencia de diversos procesos como el crecimiento, la reproducción y la mortalidad, así como las variables físicas que estructuran el medio ambiente [266]. Por lo tanto, debido a que la autocorrelación indica falta de independencia entre las observaciones, se originan problemas al intentar utilizar pruebas de significación estadística que requieran dicha independencia [266].

El TSA es un modelo no lineal que tiene en cuenta las no linealidades en la relación entre variables independientes y dependientes, con el fin de evitar la autocorrelación espacial [266]. Este método aplica una regresión polinomial a datos distribuidos espacialmente, cuyo objetivo es expresar una variable respuesta  $y$  como una función no lineal de las coordenadas geográficas  $X$  e  $Y$  de los sitios de muestreo [267]. Para llevarlo a cabo se empleó el programa Microsoft® Excel (2007). En primer lugar, se realizó una estandarización de los datos de latitud y longitud, y luego se llevó a cabo una regresión polinomial de grado tres de las coordenadas de cada uno de los sitios de muestreo, lo que resultó en que la latitud y la longitud fueran descompuestas en siete variables ( $lat^2$ ,  $lat*long$ ,  $long^2$ ,  $lat^3$ ,  $lat^2*long$ ,  $lat*long^2$ ,  $long^3$ ).

Finalmente, empleando el programa MorphoJ, se realizaron PLS sobre las variables de forma, usando como covariables los resultados antes mencionados para el polinomio de grado tres de latitud y longitud obtenidos mediante el TSA. Los PLS se realizaron para los individuos de los seis nidos juntos en vista dorsal por un lado, y lateral por el otro.

### **III.III.III.III Covariación de la forma con las variables ambientales**

El método PLS de dos bloques fue empleado también para evaluar la covariación de cada una de las configuraciones de  $lm$  (en vista dorsal y en vista lateral derecha) con relación a las variables ambientales registradas en los sitios de muestreo. Se llevó a cabo un análisis para los seis nidos en su conjunto y para ambas configuraciones de  $lm$ , es decir que se realizaron dos PLS diferentes.

### **III.III.IV Análisis de variabilidad en el tamaño de la región cefálica (ANOVA)**

En lo que respecta al tamaño de la región cefálica, en primer lugar, se realizó un análisis de correlación del tamaño centroide (CS) de la configuración en vista dorsal con relación a la configuración en vista lateral derecha para los seis nidos en su conjunto, con el objetivo de evaluar la existencia de algún tipo de relación en el tamaño entre ambas configuraciones. Para llevar a cabo dicho análisis se empleó el programa SPSS versión 22.0.0.0 (<http://www.ibm.com/developerworks/spssdevcentral>).

Luego, se analizaron las diferencias en el tamaño de la región cefálica en función al ambiente al que pertenecen los individuos, para lo cual se llevó a cabo un ANOVA, es decir un análisis de varianzas de los valores del CS obtenidos a través del programa MorphoJ, empleando

también el programa SPSS versión 22.0.0.0 (<http://www.ibm.com/developerworks/spssdevcentral>). Este análisis se realizó para los seis nidos en su conjunto: un ANOVA para el CS de la configuración en vista dorsal y otro para el CS de la configuración en vista lateral derecha.

Además, con el objetivo de visualizar con mayor detalle las características del tamaño centroide en cada tipo de ambiente, se graficaron los resultados de la regresión realizada para detectar alometría en el conjunto de los seis nidos para ambas configuraciones de *lm* (ver sección Materiales y Métodos; inciso III.II), ya que este análisis, como se mencionó previamente, toma como variable independiente el tamaño centroide de la estructura estudiada.

Cabe mencionar que, en el presente trabajo, el tamaño centroide de la región cefálica se utilizó como *proxy* (representante) del tamaño corporal de los individuos en base al supuesto de que una característica particular en estudio puede usarse como un *proxy* de otro rasgo del cual no hay información disponible [268][269][270].

#### **III.IV Análisis de la región cefálica dependiendo de la ecorregión en la cual se hallan los sitios de muestreo**

En base a los resultados obtenidos en el Capítulo III en cuanto a una posible diferenciación genética en los individuos de los sitios localizados hacia el Este de la zona de muestreo, es decir en las ecorregiones más húmedas, con respecto a los individuos de sitios localizados hacia el Oeste, es decir en Ecorregiones más secas, se decidió realizar un análisis comparativo de forma y tamaño de la región cefálica dividiendo a los sitios localizados en la provincia de Santa Fe en dos lotes de datos: por un lado los sitios ubicados dentro o en el límite con la ecorregión Delta e Islas del Paraná: Romang, Alejandra y Reconquista (éste último sitio ubicado en el límite entre el Delta y el Chaco húmedo); y por otro lado los sitios ubicados dentro o en el límite con la ecorregión El Espinal: Costa del Salado (límite con Chaco húmedo), San Cristóbal y Sa Pereira (límite con la Pampa). Para referencias de las ecorregiones ver Figura 26.

##### **III.IV.I Análisis de la forma**

Para la comparación de la forma de la región cefálica de los individuos en función de la ecorregión de pertenencia, se llevaron a cabo DFAs comparando los sitios pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná (Romang, Alejandra y Reconquista) en relación con los sitios pertenecientes a la ecorregión El Espinal (Costa del Salado, San Cristóbal y Sa Pereira). Se realizó un DFA para la vista dorsal y un DFA para la vista lateral derecha.

Como información adicional, se emplearon los resultados del PLS utilizado en la sección anterior para evaluar la covariación de la forma con las variables ambientales, pero en este caso las elipses fueron delimitadas en función de la ecorregión de pertenencia de cada sitio de muestreo, con el fin de analizar la influencia de las variables ambientales sobre los sitios de las diferentes ecorregiones.

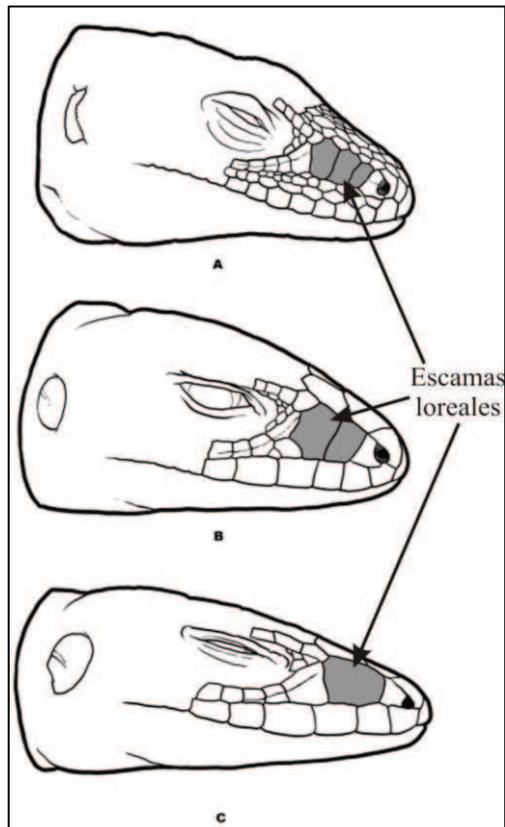
### **III.IV.II Análisis del tamaño centroide**

Para examinar las diferencias en el tamaño de la región cefálica, se realizaron ANOVAs empleando el programa SPSS versión 22.0.0.0 (<http://www.ibm.com/developerworks/spssdevcentral>). Se compararon los tamaños centroides de la región cefálica de los individuos pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná, en relación al tamaño centroide de la región cefálica de los individuos correspondientes a la ecorregión El Espinal. Se llevó a cabo un ANOVA para la vista dorsal y un ANOVA para la vista lateral derecha.

### **III.V Análisis de caracteres con valor taxonómico en la región cefálica del lagarto overo, en base a la hipótesis de la existencia de dos linajes en las poblaciones estudiadas**

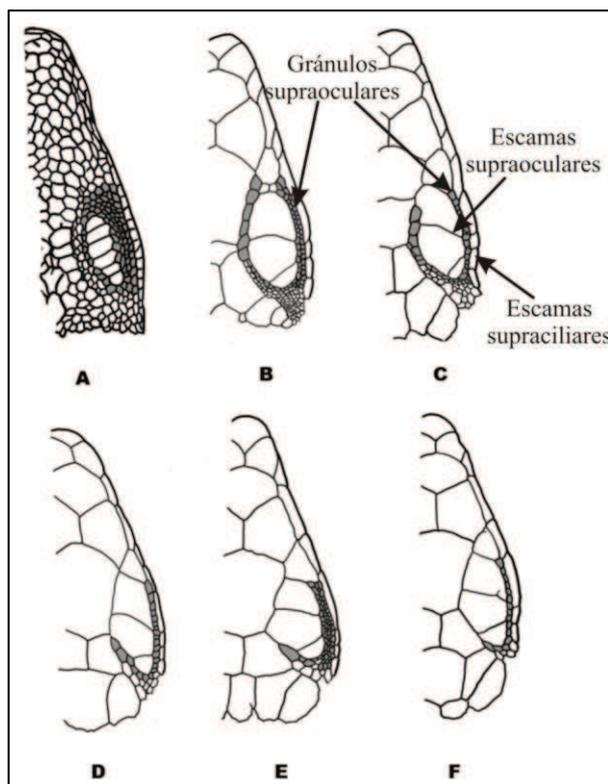
Se realizó un análisis de caracteres taxonómicos en base a lo propuesto por Harvey y col. [5], para tratar de determinar el género al que pertenecería el posible nuevo haplogrupo hallado en el Capítulo II. Para analizar los caracteres se emplearon las imágenes obtenidas, descritas al inicio del presente Capítulo, en las cuales pueden observarse las características de la región cefálica de los individuos en vista dorsal y lateral derecha. Según Harvey y col. [5], los individuos pertenecientes al género *Salvator* poseen una serie de caracteres distintivos con respecto a los del género *Tupinambis*. Aunque no todos los caracteres pudieron ser observados ya que no se dispone de todos los individuos completos sino sólo de muestras de tejidos y de fotos de la región cefálica, pudieron apreciarse algunos caracteres mencionados por Harvey y col. [5] que se detallan a continuación:

a) El género *Salvator* es el único cuyos ejemplares presentan dos escamas loreales, a diferencia de los otros géneros de teñidos, los cuales presentan una única escama loreal (Figura 37).



**Figura 37.** Escamas loreales. A) Tres escamas loreales presentes en *Callopiastes maculatus*. B) Dos escamas loreales presentes en *Salvator merianae*. C) Una escama loreal presente en *Tupinambis teguixin* (Figura modificada a partir del trabajo de Harvey y col. [5]).

b) Los ejemplares del género *Salvator* presentan filas de gránulos supraoculares laterales: pequeñas escamas granulares ubicadas entre las escamas supraciliares y supraoculares. La ubicación de los gránulos supraoculares se observa en la Figura 38 (A a F) y el detalle de su disposición con respecto a las otras escamas cefálicas se muestra específicamente en las imágenes B-C. En los ejemplares del género *Tupinambis* estas filas están ausentes.



**Figura 38.** Presencia de filas de gránulos supraoculares entre las escamas supraciliares y supraoculares en la región cefálica de los ejemplares de diferentes especies de la familia Teiidae. A) *Callopietes flavipunctatus* (cuatro filas), B) *Teius teyou* (dos filas), C) *Ameiva bifrontata divisa* (una fila), D) *Aspidoscelis burti* (una fila), E) *Cnemidophorus ruthveni* (tres filas), F) *C. flavissimus* (una fila) (Figura modificada a partir del trabajo de Harvey y col. [5]).

c) Los ejemplares del género *Salvator* presentan pupila redonda, mientras que en los ejemplares del género *Tupinambis* son reniformes.

### III.VI Heredabilidad de la forma y tamaño

Finalmente, se llevó a cabo el cálculo de la Heredabilidad en sentido amplio para la forma de la región cefálica (distancias Procrustes de forma) y para el tamaño (CS). Los valores de heredabilidad fueron calculados para la configuración de *lm* en vista dorsal y para la configuración en vista lateral derecha en cada uno de los nidos. Para el cálculo de la heredabilidad fue empleado el método de Monteiro y col. [63], quienes utilizaron una combinación del modelo de análisis de varianza de múltiples grupos propuesto por Goodall [271] y el coeficiente de correlación intraclase [272] para obtener los diferentes componentes que contribuyen al cálculo final de la heredabilidad. A continuación, se detallan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la heredabilidad por Monteiro y col. [63]:

Según el modelo de Goodall [271], el estadístico *F* para el análisis de varianza se puede calcular como:

$$F = \frac{L(L-1)M \sum_{i=1}^M d_p^2(\bar{X}_i, \bar{\bar{X}})}{(M-1) \sum_{j=1}^{ML} d_p^2(X_{ij}, \bar{X}_j)} = \frac{MS_{entre}}{MS_{agrupada\ dentro}}$$

Donde  $L$  es el número de individuos en cada nido y  $M$  es el número de nidos. En el numerador se calculan los cuadrados medios entre nidos ( $MS_{entre}$ ), mediante la suma de las distancias Procrustes al cuadrado entre la forma promedio de cada nido  $\bar{X}_j$  y la gran forma media  $\bar{\bar{X}}$  (media global obtenida a partir del conjunto total de datos). Por su parte, en el denominador se calculan los cuadrados medios agrupados dentro de los nidos ( $MS_{agrupada\ dentro}$ ), para lo cual se realiza la suma de las distancias Procrustes al cuadrado entre cada forma individual  $X_{ij}$  y la forma media del nido  $\bar{X}_j$ . Los grados de libertad para este valor  $F$  se pueden calcular como:  $df_1 = (M - 1)m$  y  $df_2 = M(L - 1)m$ , donde  $m$  es la dimensionalidad del espacio de forma  $m = pk - k - 1 - [k(k - 1)]/2$ , donde  $p$  es el número de  $lm$  y  $k$  es el número de dimensiones de coordenadas (dos para estructuras planas o imágenes, y tres para formas tridimensionales).

A partir de estas estimaciones geométricas de los cuadrados medios entre nidos ( $MS_{entre}$ ) y de los cuadrados medios agrupados dentro de los nidos ( $MS_{agrupada\ dentro}$ ), los componentes de la varianza entre nidos se pueden estimar como:

$$s_a^2 = \frac{MS_{entre} - MS_{agrupada\ dentro}}{L}$$

Luego, el componente de varianza del error ( $s_e^2$ ) es igual al cuadrado medio del error ( $MS_{agrupada\ dentro}$ ), y el coeficiente de correlación intraclase de forma intrafamiliar ( $t$ ) se puede expresar como una proporción de la variación de forma total:

$$t = \frac{s_a^2}{s_a^2 + s_e^2}$$

Finalmente, la estimación de heredabilidad de la forma se calculó en base al método de heredabilidad de caracteres univariados [241], para lo cual se divide  $t$  por el grado de parentesco dentro de los grupos de hermanos:  $h^2 = t / r$ , donde  $r$  es el grado de parentesco entre hermanos, que en el presente trabajo fue tomado como  $r = 0,25$  para todos los nidos, ya que, en base a los resultados del capítulo IV, se asumió que los individuos de cada uno de los nidos muestreados son medio hermanos.

## IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### IV.I Resultados

#### IV.I.I Resultado de las pruebas de error

El ANOVA indicó que en ambas configuraciones de  $lm$  la media cuadrada entre individuos (MS individuo vista dorsal= 0,00054; MS individuo vista lateral= 0,0001) fue mayor con respecto al error entre las fotografías replicadas (MS para el Error 1 vista dorsal= 0,00001; MS para el Error 1 vista lateral= 0,000015) y también fue mayor con respecto al error de

colocación de *lm* (MS para el Residuo vista dorsal= 0,0000016); MS para el Residuo vista lateral= 0,0000007) (Tabla 34). Además, se observó que la variación producida durante la captura de las fotografías (MS Error 1) es mayor a la producida durante la colocación de los *lm* (MS Residuos). Estos resultados llevan a concluir que la variación producida por el error humano (toma de fotografías, colocación de *lm*) es menor a la variabilidad real existente entre los individuos, por lo cual se considera que las magnitudes obtenidas de los errores se hallan dentro de valores aceptables para el desarrollo de los análisis.

**Tabla 34.** Procrustes ANOVA para evaluar las magnitudes relativas del error de medición. Individuo: error en la variación individual; Error 1: Error de captura de fotografía; Residuo: error de colocación de *lm*; SS: suma de cuadrados; MS: media cuadrada; df: grados de libertad; F y P: valores estadísticos y paramétricos del ANOVA. La variación entre Individuos debe ser mayor que la variación para el Error 1 y el Residuo.

Efecto	SS	MS	df	F	P
<i>Vista dorsal</i>					
Individuo	0,05164	0,00054	96	17,78	0,0001*
Error 1	0,00468	0,00001	448	6,55	0,0001*
Residuo	0,00107	0,0000016	672		
<i>Vista lateral</i>					
Individuo	0,01336	0,00010	132	6,82	0,0001*
Error 1	0,00457	0,000015	308	20,60	0,0001*
Residuo	0,00033	0,0000007	462		

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

#### IV.I.II Análisis de alometría

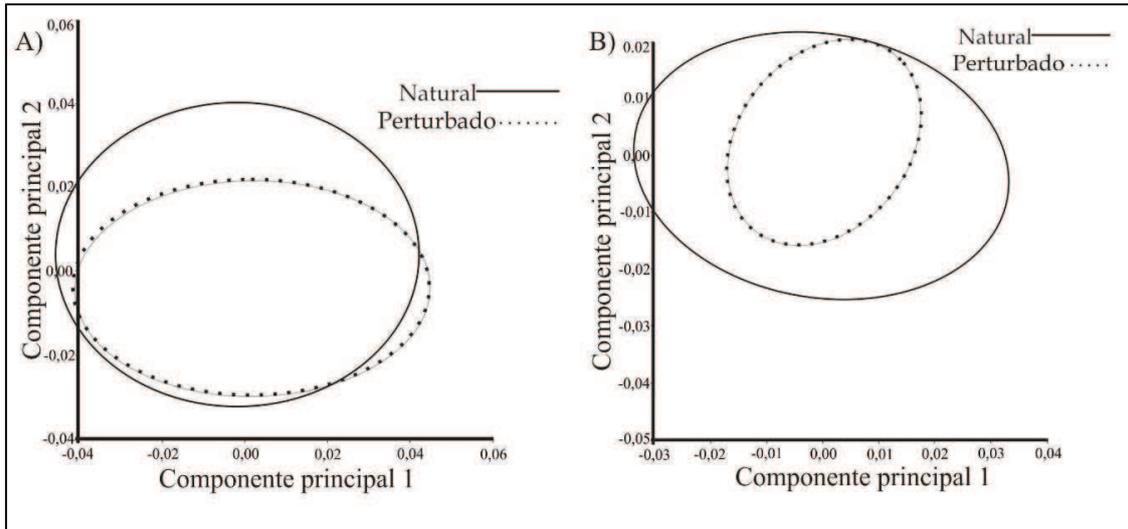
Las regresiones realizadas para los seis sitios en su conjunto resultaron estadísticamente significativas, tanto para la configuración de *lm* en vista dorsal ( $R$ -Cuadrado= 0,1731; valor  $p$ = 0,0001) como para la configuración de *lm* en vista lateral derecha ( $R$ -Cuadrado= 0,1066; valor  $p$ = 0,0001). Estas regresiones estadísticamente significativas indican que existe alometría (el tamaño influye sobre la forma) en los datos. Por este motivo, para evitar los efectos de la alometría, se decidió utilizar los residuos de la regresión como un nuevo conjunto de datos sobre los que se realizaron todos los análisis posteriores, ya que tales residuos son los valores de forma de los que se han eliminado los efectos del tamaño.

#### IV.I.III Análisis de la región cefálica dependiendo del tipo de ambiente (natural o perturbado)

##### IV.I.III.I Análisis de variabilidad morfológica de la región cefálica

EL PCA dio como resultado que, para los seis nidos agrupados y la configuración de *lm* en vista dorsal, los dos primeros componentes principales (CP 1 y 2) explicaron el 52,69 % de la variación total de la forma corregida para el tamaño, mientras que para el conjunto de los seis nidos y la configuración de *lm* en vista lateral derecha los dos primeros componentes explicaron el 39,58 % de la variación total. La Figura 39 muestra cómo se distribuyen los individuos

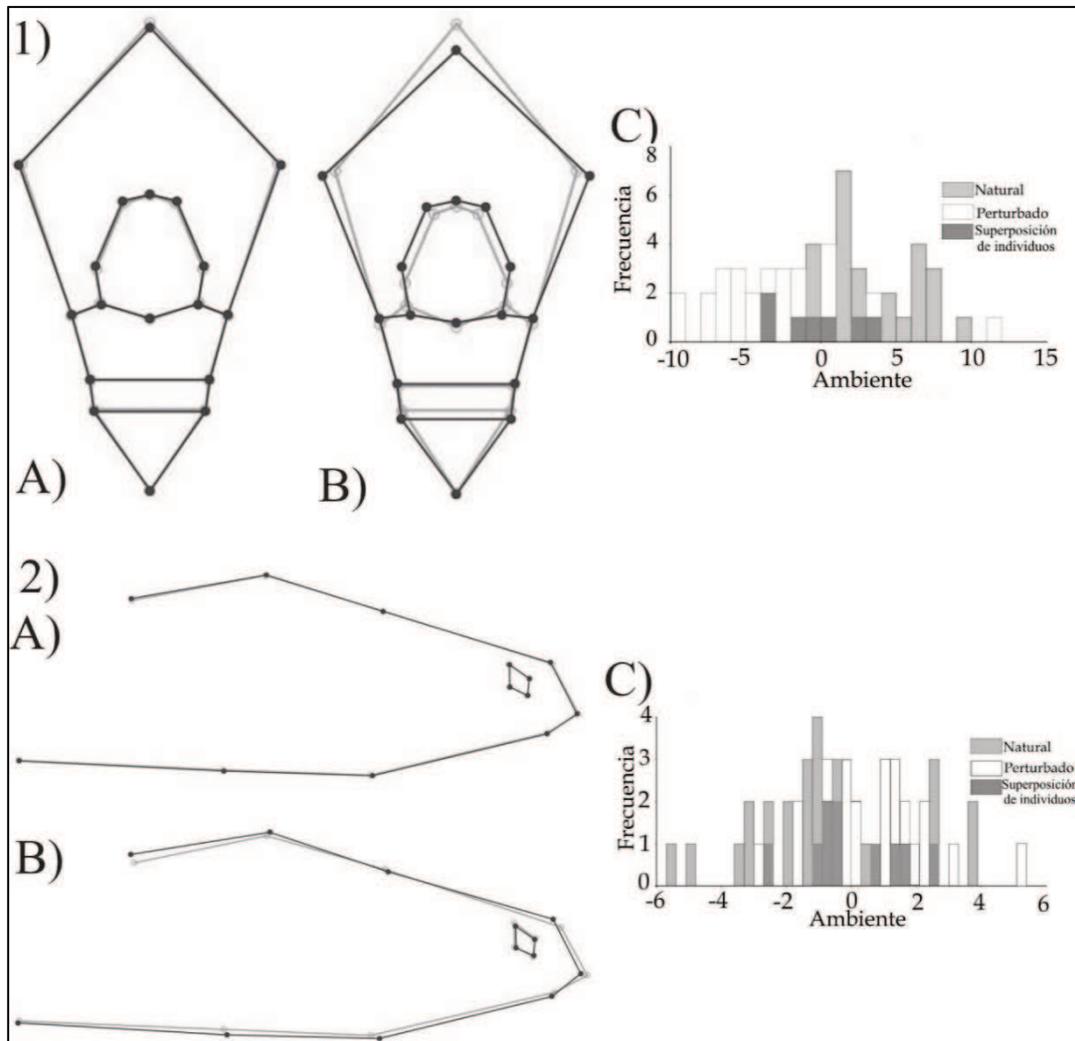
pertenecientes a ambos tipos de ambientes para las dos configuraciones de *lm*. Se observa que en los sitios de ambientes naturales existe una mayor variabilidad morfológica mientras que en ambientes perturbados existe más homogeneidad en la forma. Este resultado se evidencia al observar el tamaño de las elipses correspondientes a los tipos de ambientes: se puede apreciar que la elipse correspondiente al ambiente perturbado es más pequeña que la del ambiente natural, es decir que la forma de la región cefálica de los individuos que integran este ambiente es más homogénea para las dos configuraciones de *lm*.



**Figura 39.** Gráfico de componentes principales para el conjunto de los seis nidos, agrupados según el tipo de ambiente al que pertenecen, en vista dorsal (A) y lateral derecha (B). La elipse con línea continua representa a los individuos pertenecientes al ambiente natural. La elipse con línea punteada representa a los individuos pertenecientes al ambiente perturbado.

A su vez, el análisis discriminante (DFA) indicó una diferencia estadísticamente significativa para la forma media de la configuración de *lm* en vista dorsal entre los individuos de ambiente natural con respecto a los del ambiente perturbado. Ambas pruebas resultaron estadísticamente significativas: distancias de Procrustes,  $p = 0,0010$  y distancias de Mahalanobis,  $p = 0,0001$  (prueba de permutación = 1000). Por el contrario, para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, la diferencia entre las formas medias entre los dos tipos de ambientes resultó no significativa: distancias de Procrustes,  $p = 0,429$ , y distancias de Mahalanobis,  $p = 0,938$  (pruebas de permutación = 1000). El gráfico obtenido a partir del DFA muestra cómo difiere la forma media desde los individuos pertenecientes al ambiente natural, hacia la forma media de los individuos pertenecientes al ambiente perturbado (Figura 40). Cabe mencionar que dicha variación de forma, aunque existe, no se aprecia a simple vista (Figura 40: 1-A y 2-A), por eso fue magnificada 5 veces con el objetivo de mejorar dicha apreciación (Figura 40: 1-B y 2-B). Puede observarse que, luego de la magnificación, en la configuración de *lm* en vista dorsal, cuya

variación de forma resultó estadísticamente significativa según el DFA, la variación de dicha forma es evidente; mientras que, en la vista lateral, cuya variación de forma resultó estadísticamente no significativa según el DFA, la variación de dicha forma es muy leve.



**Figura 40.** Formas medias de la región cefálica de los individuos de los dos tipos de ambientes. 1- Configuración de *lm* en vista dorsal – A) Variación de forma media dorsal- B) Variación de forma media dorsal magnificada cinco veces. 2- Configuración de *lm* en vista lateral derecha- A) Variación de forma media en vista lateral - B) Variación de forma media en vista dorsal magnificada cinco veces. La línea negra corresponde a la forma media de la región cefálica de los individuos pertenecientes al ambiente natural y la línea gris corresponde a la forma media de la región cefálica de los individuos pertenecientes al ambiente perturbado, en las dos configuraciones de *lm*. 1-C) y 2-C): Los histogramas muestran cómo se distribuyen los individuos, teniendo en cuenta el ambiente del que proceden. El eje X muestra las puntuaciones de validación cruzada obtenidas en el DFA y el eje Y representa la frecuencia, es decir el número de individuos. Las barras grises corresponden a los individuos pertenecientes al ambiente natural, las barras blancas corresponden a los individuos que pertenecen al ambiente perturbado, las barras grises oscuras corresponden a la superposición de individuos de ambos tipos de ambientes.

En el histograma 1-C se puede observar que, para la configuración de *lm* en vista dorsal, la mayoría de los individuos pertenecientes al ambiente perturbado se ubican a la izquierda del cero en el eje X y los individuos del ambiente natural se ubican en su mayoría a la derecha del cero, mientras que para la configuración de *lm* en vista lateral derecha las distribuciones de los individuos se superponen considerablemente (2-C). Las características de estas configuraciones se resumen en la Tabla 35.

**Tabla 35.** Descripción de las formas medias para la configuración *lm* en vista dorsal y para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, determinadas por la función discriminante.

Configuración	Forma media de individuos del ambiente natural	Forma media de individuos del ambiente perturbado
Configuración de <i>lm</i> en vista dorsal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forma general ensanchada y más corta.</li> <li>- Conjunto de escamas rostral y nasales más cortas y anchas</li> <li>- Escama frontonasal más grande.</li> <li>- Escama frontal de forma más “rectangular”.</li> <li>- Región posterior de la cavidad craneal más ancha y corta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forma general estrecha y más alargada.</li> <li>- Conjunto de escamas rostral y nasales más alargadas y estrechas</li> <li>- Escama frontonasal más pequeña.</li> <li>- Escama frontal de forma más “piramidal”.</li> <li>- Región posterior de la cavidad craneal más alargada y angosta.</li> </ul>
Configuración de <i>lm</i> en vista lateral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal ligeramente más cóncava y desarrollada.</li> <li>- Narina ligeramente más pequeña.</li> <li>- Escama rostral más desarrollada</li> <li>- Región mandibular ligeramente más corta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal menos desarrollada.</li> <li>- Narina ligeramente más alargada.</li> <li>- Escama rostral menos desarrollada</li> <li>- Región mandibular ligeramente más alargada.</li> </ul>

En lo que respecta a la prueba de validación cruzada realizada para evaluar la confiabilidad del DFA, la misma dio como resultado que, para la configuración de *lm* en vista dorsal, los individuos fueron clasificados con precisión según el tipo de ambiente: 22 individuos de los 30 pertenecientes al grupo 1 (ambiente perturbado) se agruparon correctamente en el grupo 1, y para el grupo 2 (ambiente natural), 23 individuos se agruparon dentro de este grupo y solo 7 dentro del grupo 1. Por otra parte, para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, la variación de forma no clasificó con precisión a los individuos según el tipo de ambiente: 17 individuos pertenecientes al grupo 1 (ambiente perturbado) se agruparon dentro del grupo 2 (ambiente natural) y 21 del grupo 2 se ubicaron en el grupo 1 (Tabla 36). Esto es consistente con los resultados no significativos de las pruebas para la clasificación de la configuración de *lm* en vista lateral derecha.

**Tabla 36.** Tablas de validación cruzada para la configuración de *lm* en vista dorsal y para la configuración de *lm* en vista lateral derecha. El grupo 1 corresponde a los individuos de ambiente perturbado y el Grupo 2 corresponde a los de ambiente natural.

Verdadero Configuración de <i>lm</i> en vista dorsal	Asignado a		
	Grupo 1	Grupo 2	Total
Grupo 1	22	8	30
Grupo 2	7	23	30
Verdadero Configuración de <i>lm</i> en vista lateral derecha	Asignado a		
	Grupo 1	Grupo 2	Total
Grupo 1	13	17	30
Grupo 2	21	9	30

#### IV.I.III.II Análisis de asimetría

El Procrustes ANOVA para detectar asimetría en la vista dorsal indicó una ligera asimetría en individuos de ambos tipos de ambientes. En la Tabla 37 puede observarse que la diferencia entre el lado derecho e izquierdo (Lado) para los individuos de ambos ambientes (natural y perturbado) resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,0001$ ). Además, la media cuadrática de la variación de los lados derecho e izquierdo (Lado) para los individuos del ambiente natural es ligeramente mayor ( $MS = 0,000051$ ) que la media cuadrática de la variación de los lados derecho e izquierdo globales para los del ambiente perturbado ( $MS = 0,00003$ ), lo que indicaría que los individuos del ambiente natural presentan una asimetría ligeramente mayor que los de ambiente perturbado.

**Tabla 37.** Procrustes ANOVA para evaluar la presencia de asimetría entre los lados derecho e izquierdo en la vista dorsal de la región cefálica. Individuo: error en la variación individual; Lado: error de simetría izquierda-derecha global; Ind\*Lado: error de simetría izquierda-derecha por individuo; SS: suma de cuadrados; MS: media cuadrada; df: grados de libertad; F y P: valores estadísticos y paramétricos del ANOVA.

Efecto	SS	MS	df	F	P
<i>Ambiente natural</i>					
Individuo	0,04014	0,000086	464	13,58	0,0001*
Lado	0,00081	0,000051	16	8,03	0,0001*
Ind*Lado	0,00329	0,000006	464	0,00	
<i>Ambiente perturbado</i>					
Individuo	0,04156	0,000089	464	9,81	0,0001*
Lado	0,00048	0,00003	16	3,27	0,0001*
Ind*Lado	0,00423	0,000009	464	0,00	

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Debido a la detección de asimetría, se procedió a realizar el resto de los análisis para determinar si existe variación en la asimetría de la región cefálica en vista dorsal, dependiendo del tipo de ambiente al que se hallan expuestos los individuos. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de regresión multivariada del componente asimétrico sobre el CS de la configuración de *lm* en vista dorsal para los seis sitios: este análisis indicó la ausencia de alometría (R-cuadrado

= 0,014; valor  $p = 0,4502$ ). Por lo tanto, en el siguiente paso, es decir, en el análisis discriminante, se empleó el componente asimétrico en lugar de los residuos de regresión. Dicha función discriminante mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en el componente asimétrico entre los individuos de los dos tipos de ambientes: distancias de Procrustes,  $p = 0,579$ , y distancias de Mahalanobis,  $p = 0,367$  (pruebas de permutación = 1000), lo cual indicaría que el tipo de ambiente (natural o perturbado) no sería el factor causante de la asimetría en la región cefálica de los individuos analizados.

#### IV.I.III.III Análisis de covariación en la forma de la región cefálica

##### IV.I.III.III.I Análisis de covariación para determinar presencia/ausencia de asociación entre la configuración de *lm* en vista dorsal y la configuración de *lm* en vista lateral

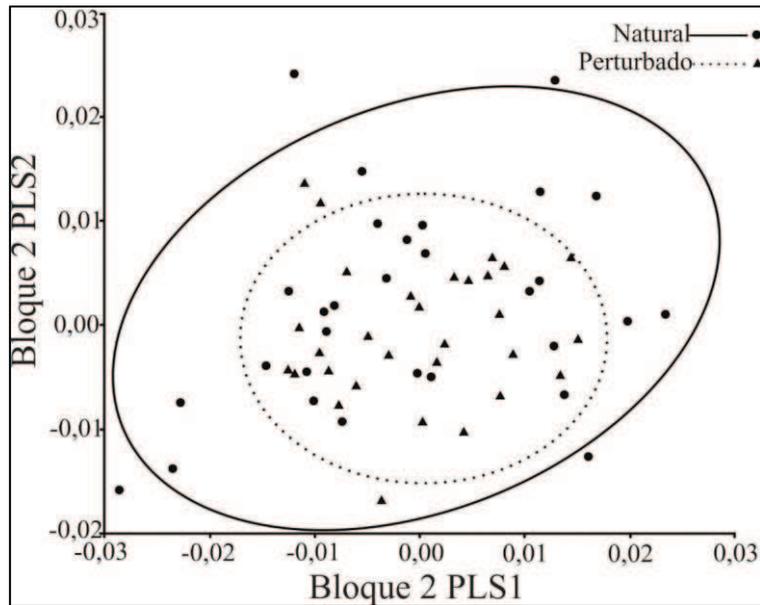
El PLS realizado para analizar la covariación entre la configuración de *lm* en vista dorsal con respecto a la configuración de *lm* en vista lateral derecha, indicó que no hay una covariación estadísticamente significativa entre ambas configuraciones para el conjunto de los seis nidos (coeficiente RV = 0,1305; valor  $p = 0,1402$ ). Aunque existe una correlación estadísticamente significativa en el PLS 1 (valor  $p = 0,0202$ ) (Tabla 38), los resultados indican que no existe asociación entre la configuración de *lm* en vista dorsal y la configuración de *lm* en vista lateral derecha.

**Tabla 38.** Resultados de la regresión de Mínimos cuadrados parciales entre bloques (PLS) que muestran la covariación y correlación entre la vista dorsal y el lado derecho para los seis sitios de muestreo en su conjunto. El valor singular corresponde al valor de los pares correlacionados de combinaciones lineales entre los bloques de variables una vez descompuesta la matriz de covarianza [273].

Número de PLS	Valor singular	Valor $p$ (perm.)	Porcentaje total de covariación	Correlación	Valor $p$ (perm)
PLS1	0.00009	0.1249	53.209	0.5808	0.0202*
PLS2	0.00006	0.1708	23.302	0.3653	0.8555

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Además, en el gráfico obtenido a partir de este PLS (Figura 41), se puede observar que, al igual que en el gráfico resultante del PCA anterior (Figura 39), cuando el lote de datos es dividido según el tipo de ambiente, los individuos pertenecientes a los ambientes perturbados tienen menos variabilidad morfológica y son más similares entre sí (elipse con línea punteada) que los individuos muestreados en ambientes naturales (elipse con línea continua).



**Figura 41.** Gráfico resultante del PLS que evalúa la covariación existente entre la vista dorsal y lateral para el conjunto de los seis sitios de muestreo. El bloque 2 indica la variación de forma en el PLS 1 y 2 respectivamente. La elipse con línea continua representa al conjunto de individuos pertenecientes al ambiente natural y la elipse con línea punteada representa los puntajes PLS (covariación) del conjunto de individuos pertenecientes al ambiente perturbado. Los círculos representan a los individuos que pertenecen al ambiente natural y los triángulos representan a los individuos que pertenecen al ambiente perturbado. El tamaño de las elipses indica que, en individuos de ambientes perturbados, hay menos variación morfológica. Las elipses representan límites de confianza del 95%.

#### **IV.I.III.III.II Análisis de covariación para determinar presencia/ausencia de asociación entre la forma de la región cefálica y las variables variables geográficas (latitud; longitud)**

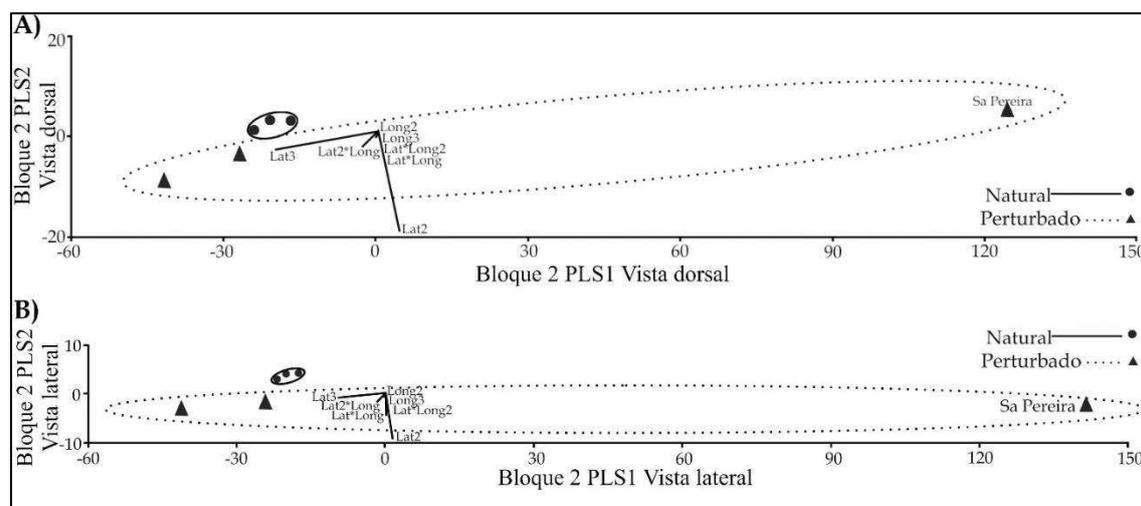
Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para la covariación entre ambas configuraciones de *lm* y las coordenadas geográficas (polinomio de tercer grado de latitud y longitud obtenido mediante el TSA), para los seis sitios de muestreo analizados en forma conjunta (Coeficiente RV configuración dorsal = 0,1104; valor  $p = 0,0135$ ; Coeficiente RV configuración lateral = 0,1269; valor  $p = 0,0045$ ). Además, para ambas configuraciones de *lm*, la covariación explicada por el PLS 1 fue estadísticamente significativa, explicando más del 99% de la covarianza (Tabla 44), es decir que se comprobó la presencia de asociación entre la forma de la región cefálica y las variables geográficas.

**Tabla 39.** Resultados de la regresión de Mínimos cuadrados parciales entre bloques (PLS) que muestran la covariación y correlación entre las variables de forma y las variables geográficas (polinomio de la latitud y longitud). El valor singular de la matriz de covarianza corresponde al valor de los pares correlacionados de combinaciones lineales entre los bloques de variables una vez descompuesta la matriz de covarianza [273].

Configuración de <i>lm</i>	Número de PLS	Valor singular de la matriz de covarianza	Valor <i>p</i> (perm.)	Porcentaje total de covariación	Correlación	Valor <i>p</i> (perm.)
Dorsal	PLS1	0,4289	0,0137*	99,601	0,5638	0,0005*
	PLS2	0,0261	0,0094	0,370	0,5744	0,0001
Lateral	PLS1	0,3031	0,0044*	99,886	0,6612	0,0001*
	PLS2	0,0089	0,7668	0,086	0,3370	0,5333

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Además, en el gráfico resultante (Figura 42) puede observarse que la variable geográfica más influyente en la forma de la cabeza de los individuos es la latitud, por tal motivo, los individuos de Sa Pereira, el sitio de muestreo analizado que se ubica más al sur (Figura 36), resultaron ser los más separados del resto para ambos tipos de configuraciones de *lm*. De todos modos, es importante señalar que, a pesar de la gran influencia de las variables geográficas, en los gráficos se observa que la división entre los individuos se mantiene, según provengan de ambientes naturales o perturbados.



**Figura 42.** Gráfico obtenido a partir del PLS de dos bloques que evalúa la covariación entre la forma de la cabeza de los individuos y las variables geográficas. A) Gráfico para la configuración de *lm* en vista dorsal para los seis sitios de muestreo. B) Gráfico para la configuración de *lm* en vista lateral derecha para los seis sitios de muestreo. El eje X representa cambios en la forma del cráneo en el PLS 1. El eje Y representa los cambios en la forma del cráneo en el PLS 2. La elipse con línea continua representa al conjunto de individuos de los sitios pertenecientes al ambiente natural y la elipse con línea punteada al conjunto de individuos de los sitios pertenecientes al ambiente perturbado. Los círculos representan los individuos en cada uno de los sitios de muestreo de ambientes naturales y los triángulos representan los individuos en cada uno de los sitios de muestreo de ambientes perturbados. Las elipses representan los límites de confianza del 95%.

#### IV.I.III.III.III Análisis de covariación para determinar presencia/ausencia de asociación entre la forma de la región cefálica con las variables ambientales (Temperatura, Humedad, Precipitaciones)

En el análisis para los seis sitios de muestreo agrupados, la covariación de la forma de la región cefálica con las variables ambientales resultó estadísticamente significativa para ambas configuraciones de *lm* (Coeficiente RV dorsal = 0,2187; valor  $p = 0,0001$ ; Coeficiente RV lateral = 0,2508; valor  $p = 0,0001$ ). Es decir que se corroboró la asociación entre la forma de la región cefálica con las variables ambientales consideradas (TMA, TMinA, TMaxA, TMS10, HR, PP, PVM).

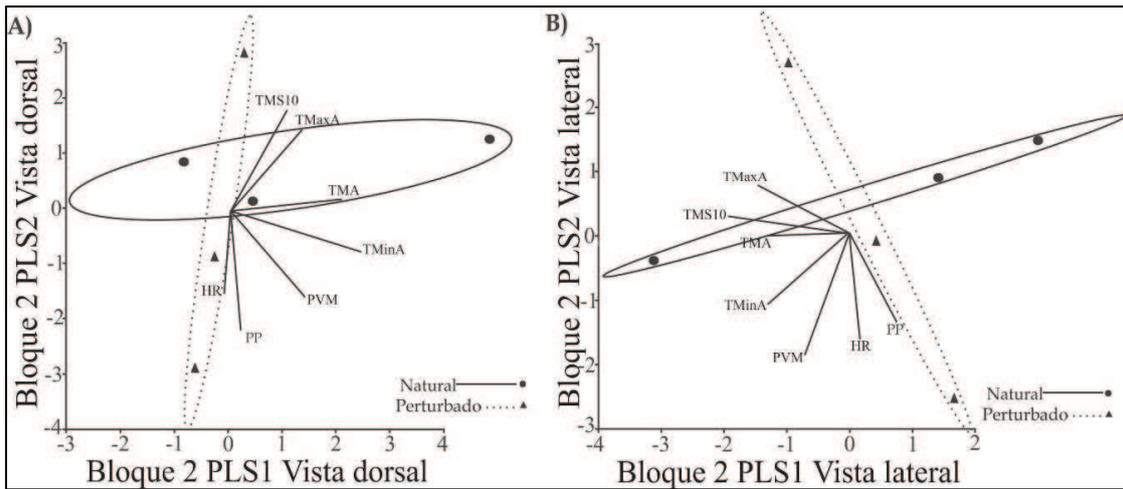
En la Tabla 40 se observa que el porcentaje de varianza explicado por el PLS varió según la configuración de *lm* analizada (dorsal o lateral derecha). Para la configuración de *lm* en vista dorsal, el PLS1 explicó casi el 67% de la variación de forma y PLS2 el 22%, mientras que, para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, el PLS1 explicó casi el 56 % de la variación total y el PLS2 el 33%; es decir, que los PLS1 y PLS2 juntos explicaron los porcentajes más altos de la variación total.

**Tabla 40.** Resultados de la regresión de Mínimos cuadrados parciales (PLS) que muestran la covariación y correlación entre las variables de forma y las variables ambientales. El valor singular corresponde al valor de los pares correlacionados de combinaciones lineales entre los bloques de variables una vez descompuesta la matriz de covarianza [273].

Configuración de <i>lm</i> y ambiente	Número de PLS	Valor singular	Valor $p$ (perm.)	Porcentaje total de covariación	Correlación	Valor $p$ (perm.)
Dorsal	PLS1	0,0184	0,0017*	66,760	0,5785	0,0008*
	PLS2	0,0106	0,0006*	22,166	0,4917	0,0030*
Lateral	PLS1	0,0118	0,0007*	55,665	0,6024	0,0025*
	PLS2	0,0091	0,0001*	33,342	0,6523	0,0001*

\* Probabilidades estadísticamente significativas.

Además, en los gráficos resultantes se observa que, para la configuración de *lm* en vista dorsal (Figura 43-A), las variables que ejercieron una mayor influencia en la forma de la región cefálica de los individuos del ambiente natural fueron: TMinA, TMA y PVM, mientras que en los del ambiente perturbado, las variables más influyentes fueron: PP, HR, TMS10. Por su parte, para la configuración de *lm* en vista lateral (Figura 43-B), las variables más influyentes en la forma de la región cefálica de los individuos del ambiente natural fueron: TMS10 y TMA, mientras que las variables más influyentes en los del ambiente perturbado fueron: TMaxA y PP.

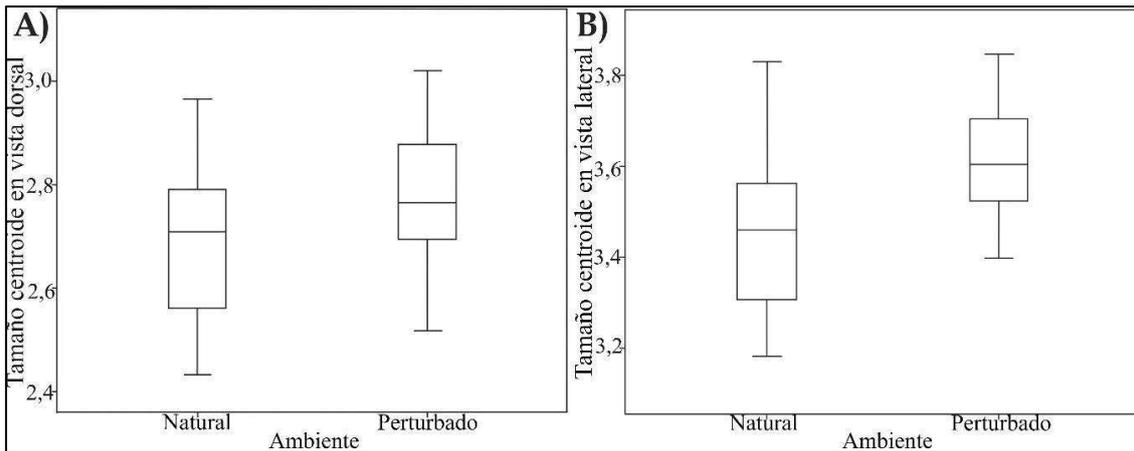


**Figura 43.** Gráficos obtenidos a partir del PLS de dos bloques para evaluar la covariación entre la forma de la región cefálica y las variables ambientales para los seis sitios en su conjunto. A) Configuración de *lm* en vista dorsal. b) Configuración de *lm* en vista lateral derecha. El eje X representa la variación de los datos ambientales en el PLS1. El eje Y representa la variación de los datos ambientales en el PLS 2. Las elipses en el gráfico representan la distribución de los sitios de muestreo correspondientes a los dos tipos de ambientes a lo largo del Bloque 2 y la relación de dicha distribución con las variables ambientales (líneas negras). PP: precipitación, HR: humedad relativa del ambiente, PVM: presión de vapor media, TMaxA: temperatura máxima del aire, TMinA: temperatura mínima del aire, TMA: temperatura media del aire, TMS10: temperatura media del suelo a 10 cm de profundidad. Los círculos representan los individuos de los sitios de muestreo del ambiente natural y los triángulos representan los individuos de los sitios de muestreo del ambiente perturbado. Las elipses representan límites de confianza del 95%.

#### IV.I.III.IV Análisis de variabilidad en el tamaño de la región cefálica (ANOVA)

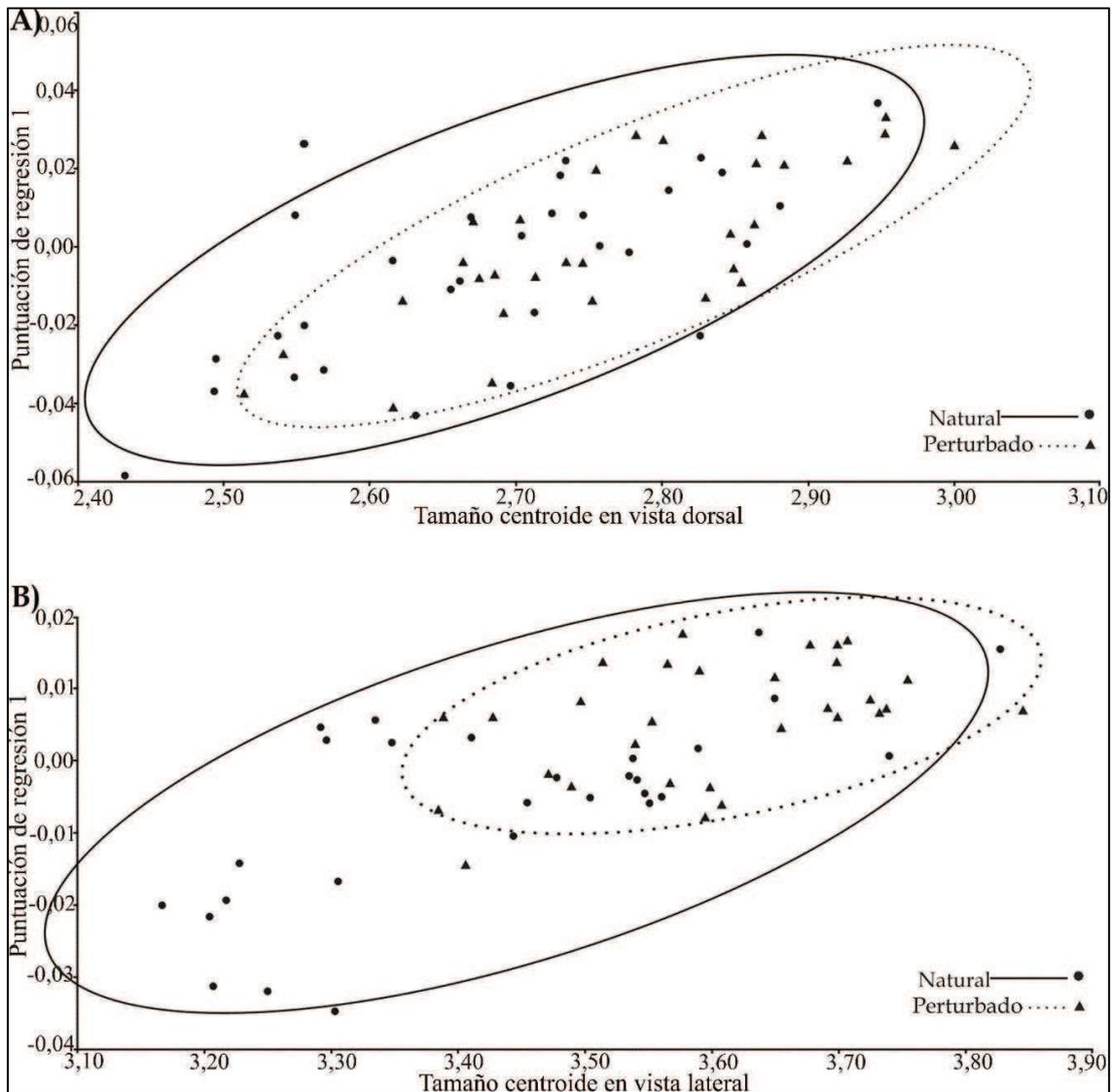
La correlación entre el tamaño centroide (CS) de la configuración en vista dorsal y la configuración en vista lateral derecha resultó estadísticamente significativa, pero el coeficiente de correlación de Pearson fue bajo ( $R = 0,325$ , valor  $p = 0,011$ ), lo cual significa que, más allá de que ambas configuraciones estén relacionadas estadísticamente, aproximadamente el 70% de los datos varía de forma independiente, es decir que las configuraciones son prácticamente independientes.

A su vez, el ANOVA realizado para comparar el CS de la región cefálica de los individuos pertenecientes al ambiente natural en relación a los pertenecientes al ambiente perturbado, indicó diferencias estadísticamente significativas entre las medias (configuración de *lm* en vista dorsal:  $gl = 1$ ,  $F = 20,55$ ,  $p < 0,0001$ ; configuración de *lm* en vista lateral derecha:  $gl = 1$ ,  $F = 9,332$ ,  $p = 0,003$ ). En la Figura 44 (A-B) puede observarse que los individuos pertenecientes a ambientes perturbados presentan CS más grandes que los de ambientes naturales.



**Figura 44.** Distribución de los individuos en relación al tamaño centroide de la región cefálica y al tipo de ambiente del que proceden. A) Configuración de *lm* en vista dorsal. B) Configuración de *lm* en vista lateral derecha.

Del mismo modo, mediante el análisis de alometría (ver sección Materiales y Métodos; inciso III.II), se obtuvieron gráficos que también permiten apreciar claramente las diferencias de forma entre los individuos de ambos tipos de ambiente (Figura 45: A-B). Se puede observar que, para ambas configuraciones de *lm*, los individuos de ambientes perturbados se ubican hacia la derecha a lo largo del eje X; lo que significa que tienen el CS más grande que los individuos del ambiente natural. Además, se puede ver que, para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, hay menos variabilidad del CS en los individuos del ambiente perturbado (elipse más pequeña). Cabe señalar que en ambas gráficas (diagrama de caja y regresión) se puede observar que la diferencia de tamaño se acentúa más en la configuración de *lm* en vista lateral derecha.



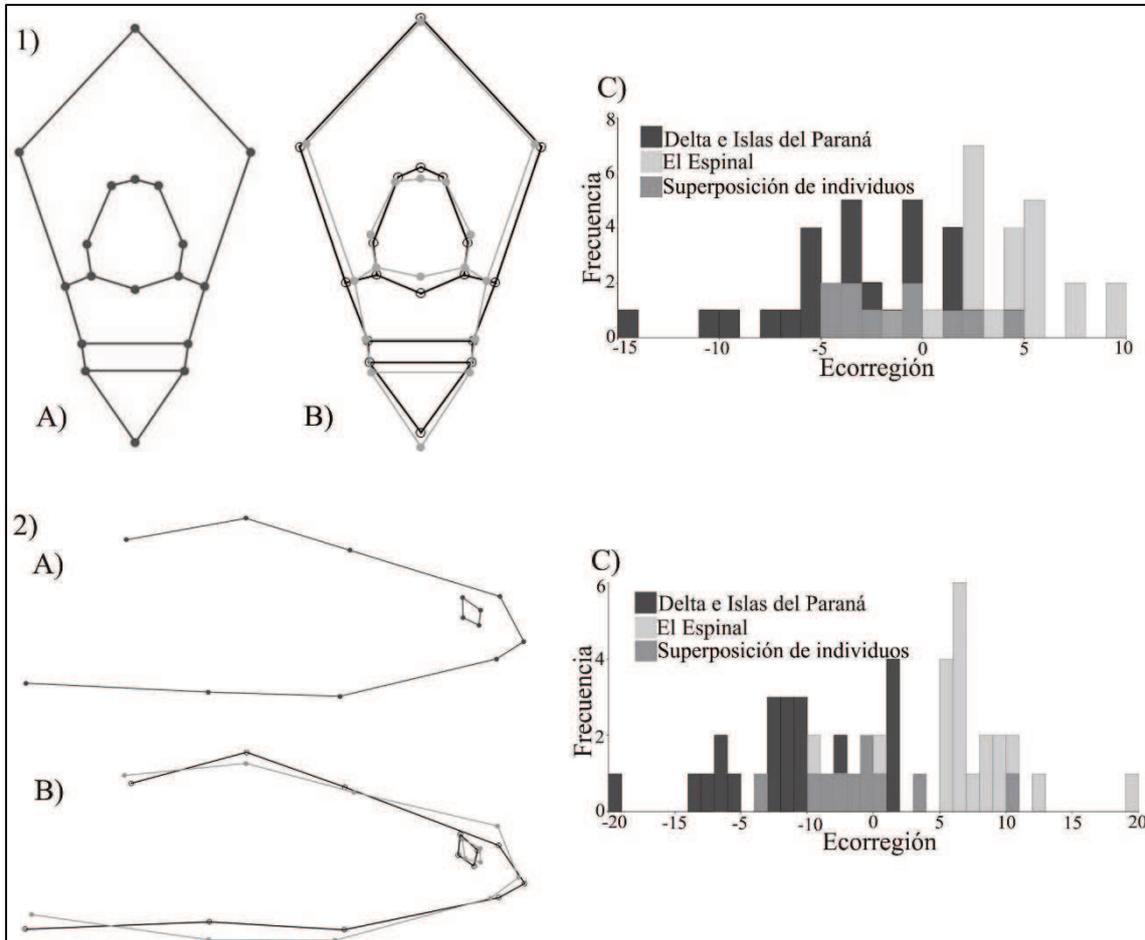
**Figura 45.** Relación alométrica entre el tamaño centroide y la forma de la región cefálica. A) Configuración de *lm* en vista dorsal. B) Configuración de *lm* en vista lateral derecha. La “puntuación de regresión” representa los coeficientes de regresión obtenidos del modelo de regresión de la forma con respecto al tamaño. Los círculos representan a los individuos que pertenecen al ambiente natural y los triángulos representan a los individuos que pertenecen al ambiente perturbado. Las elipses representan los límites de confianza del 95%.

#### IV.I.IV Análisis de la región cefálica dependiendo de la ecorregión en la cual se hallan los sitios de muestreo

##### III.IV.I Análisis de la forma

El DFA realizado para comparar la forma media de la región cefálica de los individuos provenientes de la ecorregión Delta e Islas del Paraná, en comparación con los individuos provenientes de la ecorregión El Espinal, resultó estadísticamente significativo para ambas configuraciones de *lm*. Configuración de *lm* en vista dorsal: distancias de Procrustes,  $p = 0,0070$  y distancias de Mahalanobis,  $p < 0,0001$  (prueba de permutación = 1000). Configuración de *lm* en vista lateral derecha: distancias de Procrustes,  $p < 0,0001$  y distancias de Mahalanobis,  $p <$

0,0001 (prueba de permutación = 1000). El gráfico obtenido a partir del DFA muestra cómo difiere la forma media desde los individuos pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná (línea negra), hacia la forma media de los individuos pertenecientes a la ecorregión El Espinal (línea gris) (Figura 46). La variación de forma fue magnificada 5 veces con el objetivo de mejorar su apreciación (Figura 46: 1-B y 2-B).



**Figura 46.** Formas medias de la región cefálica de los individuos provenientes de las dos ecorregiones muestreadas. 1- Configuración de *lm* en vista dorsal – A) Variación de forma media dorsal- B) Variación de forma media dorsal magnificada cinco veces. 2- Configuración de *lm* en vista lateral derecha- A) Variación de forma media en vista lateral - B) Variación de forma media en vista dorsal magnificada cinco veces. Para ambas configuraciones de *lm*, la línea negra corresponde a la forma media de la región cefálica de los individuos pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná y la línea gris corresponde a la forma media de la región cefálica de los individuos pertenecientes a la ecorregión El Espinal. 1-C) y 2-C): Los histogramas muestran cómo se distribuyen los individuos, teniendo en cuenta la ecorregión de la que proceden. El eje X muestra las puntuaciones de validación cruzada obtenidas en el DFA y el eje Y representa la frecuencia, es decir el número de individuos. Las barras negras corresponden a los individuos pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná, las barras grises corresponden a los individuos que pertenecen a la ecorregión El Espinal, las barras grises oscuras corresponden a la superposición de individuos de ambas ecorregiones.

En los histogramas (Figura 46 1-C y 2-C) se puede observar que, para ambas configuraciones de *lm*, hay una división entre las formas medias de la región cefálica de las dos ecorregiones. Los individuos pertenecientes al Delta e Islas del Paraná se ubican en su mayoría a la izquierda del cero en el eje X, mientras que los individuos provenientes de El Espinal se ubican en su mayoría a la derecha del cero. Las características de estas configuraciones se resumen en la Tabla 41

**Tabla 41.** Descripción de las formas medias para la configuración *lm* en vista dorsal y para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, determinadas por la función discriminante.

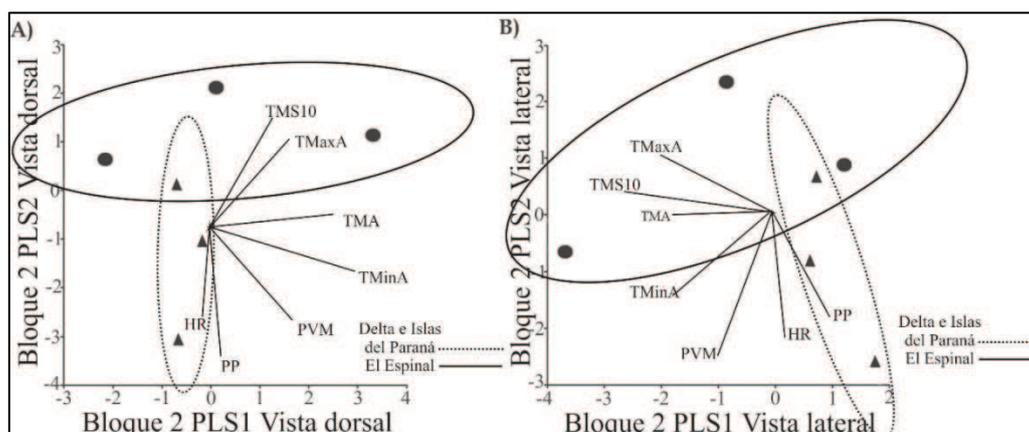
Configuración	Forma media de individuos del Delta e Islas del Paraná	Forma media de individuos de El Espinal
Configuración de <i>lm</i> en vista dorsal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal ensanchada, con hocico más corto.</li> <li>- Conjunto de escamas rostral y nasales más corto.</li> <li>- Escama frontonasal menos desarrollada</li> <li>- Escama frontal más alargada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal más estrecha, con hocico más alargado.</li> <li>- Conjunto de escamas rostral y nasales más alargado.</li> <li>- Escama frontonasal más desarrollada.</li> <li>- Escama frontal más corta y de forma “piramidal”.</li> </ul>
Configuración de <i>lm</i> en vista lateral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal más cóncava, con zona del hocico más aplanada.</li> <li>- Narina ubicada en posición levemente más vertical.</li> <li>- Escama rostral más alargada</li> <li>- Región mandibular menos desarrollada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cavidad craneal más aplanada, con zona del hocico más alta y robusta.</li> <li>- Narina ubicada en posición levemente más horizontal.</li> <li>- Escama rostral más “pequeña”.</li> <li>- Región mandibular más desarrollada.</li> </ul>

En lo que respecta a la prueba de validación cruzada realizada para evaluar la confiabilidad del DFA, la misma dio como resultado que, para ambas configuraciones de *lm*, los individuos fueron clasificados con precisión según la ecorregión de pertenencia. Para la configuración de *lm* en vista dorsal, 24 individuos de los 30 pertenecientes al grupo 1 (Delta e Islas del Paraná) se agruparon correctamente en el grupo 1, y para el grupo 2 (El Espinal), 23 individuos se agruparon dentro de este grupo y solo 7 dentro del grupo 1 (Tabla 42). Del mismo modo, para la configuración de *lm* en vista lateral derecha, 23 individuos pertenecientes al grupo 1 (Delta e Islas del Paraná) se agruparon correctamente en el grupo 1, y para el grupo 2 (El Espinal), 22 individuos se agruparon correctamente dentro de este grupo.

**Tabla 42.** Tablas de validación cruzada para la configuración de *lm* en vista dorsal y para la configuración de *lm* en vista lateral derecha. El grupo 1 corresponde a los individuos del Delta e Islas del Paraná y el Grupo 2 corresponde a los individuos de El Espinal.

Verdadero	Asignado a		
	Grupo 1	Grupo 2	Total
<b>Configuración de <i>lm</i> en vista dorsal</b>			
Grupo 1	24	6	30
Grupo 2	7	23	30
<b>Configuración de <i>lm</i> en vista lateral derecha</b>			
Grupo 1	23	7	30
Grupo 2	8	22	30

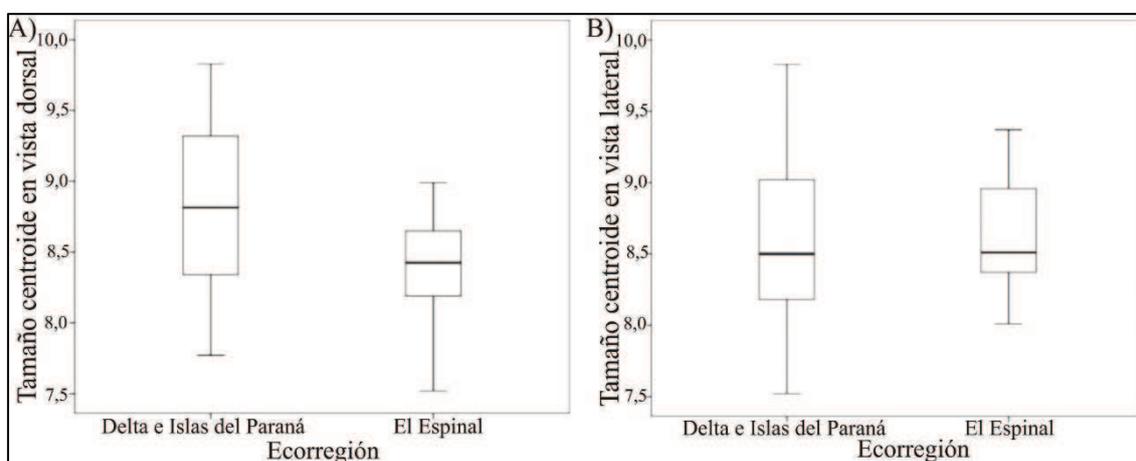
En cuanto a la covariación con las variables ambientales, el PLS realizado en la sección anterior demostró la presencia de una relación estadísticamente significativa entre la forma de la región cefálica y dichas variables para ambas configuraciones de *lm*. En la presente sección, los gráficos resultantes al separar el lote de datos entre las dos ecorregiones muestreadas (Figura 47), permiten corroborar que, para ambas configuraciones de *lm*, las variables que ejercen mayor influencia en la forma de la región cefálica de los individuos pertenecientes a la ecorregión Delta e Islas del Paraná, son las relacionadas con la humedad del ambiente, particularmente HR y PP. Por otro lado, para los individuos pertenecientes a la ecorregión El Espinal, las variables más influyentes son las relacionadas a la temperatura, en particular la TMA y la TMinA.



**Figura 47.** Gráficos obtenidos a partir del PLS de dos bloques para evaluar la covariación entre la forma de la región cefálica y las variables ambientales de las ecorregiones para los seis sitios en su conjunto. A) Configuración de *lm* en vista dorsal. b) Configuración de *lm* en vista lateral derecha. El eje X representa la variación de los datos ambientales en el PLS1. El eje Y representa la variación de los datos ambientales en el PLS 2. Las elipses en el gráfico representan la distribución de los sitios de muestreo correspondientes a las dos ecorregiones a lo largo del Bloque 2 y la relación de dicha distribución con las variables ambientales (líneas negras). PP: precipitación, HR: humedad relativa del ambiente, PVM: presión de vapor media, TMaxA: temperatura máxima del aire, TMinA: temperatura mínima del aire, TMA: temperatura media del aire, TMS10: temperatura media del suelo a 10 cm de profundidad. Los triángulos representan a los individuos de los sitios del Delta e Islas del Paraná y los círculos representan a los individuos de los sitios de El Espinal. Las elipses representan límites de confianza del 95%.

### III.IV.II Análisis del tamaño centroide

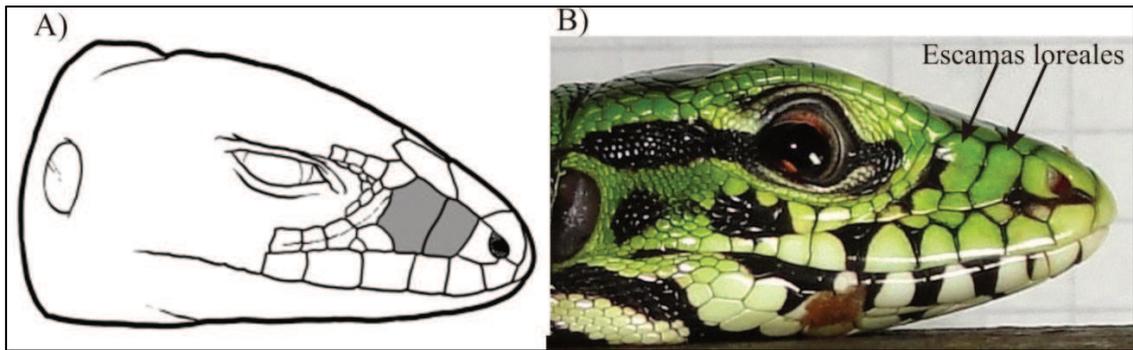
El ANOVA realizado para comparar el CS de la región cefálica de los individuos en función de la ecorregión de la cual provienen (Delta e Islas del Paraná y El Espinal), indicó diferencias estadísticamente significativas entre las medias para la configuración de *lm* en vista dorsal ( $gl = 1$ ;  $F = 9,689$ ;  $p = 0.003$ ). Sin embargo, para la configuración de *lm* en vista lateral, la diferencia entre las medias del CS de la región cefálica resultó estadísticamente no significativa ( $gl = 1$ ;  $F = 0,002$ ;  $p = 0.963$ ). En los gráficos de caja obtenidos (Figura 48), se observa que los individuos provenientes de la ecorregión Delta e Islas del Paraná presentan CS más grandes y con mayor variabilidad de tamaños (caja más grande) para la configuración de *lm* en vista dorsal, mientras que en la configuración de *lm* en vista lateral, los CS de ambas ecorregiones son más similares entre sí, aunque en los individuos provenientes del Delta e Islas del Paraná también existe mayor variabilidad de tamaños (caja más grande).



**Figura 48.** Distribución de los individuos en relación al tamaño centroide de la región cefálica y a la ecorregión de la cual proceden. A) Configuración de *lm* en vista dorsal. B) Configuración de *lm* en vista lateral derecha.

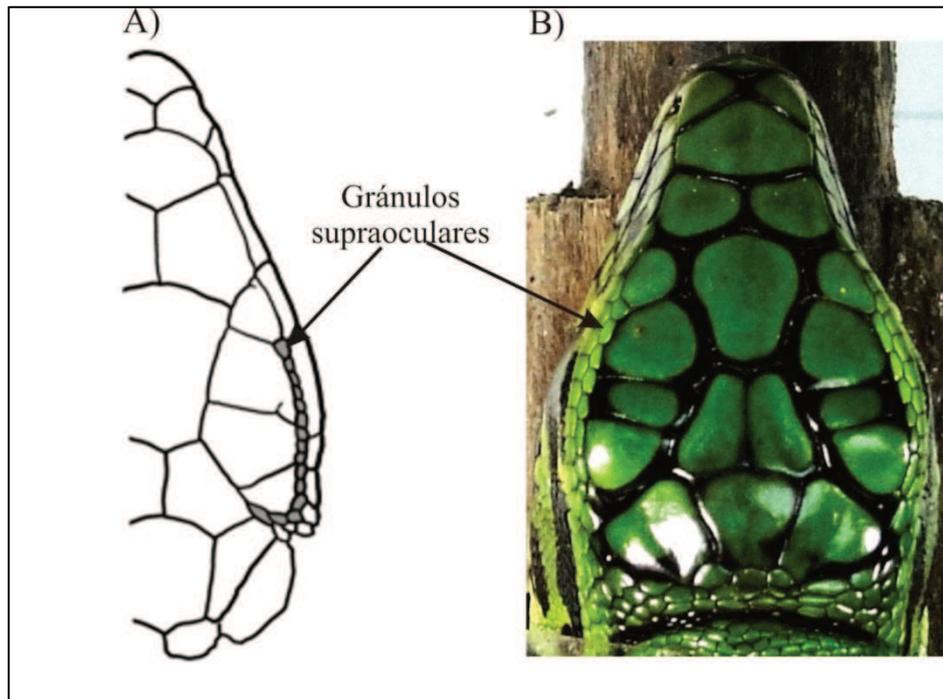
### IV.I.V Análisis de caracteres con valor taxonómico en la región cefálica del lagarto overo

a) Número de escamas loreales: En los individuos clasificados dentro del haplogrupo *Salvator sp.* se pueden observar dos escamas loreales (Figura 49):



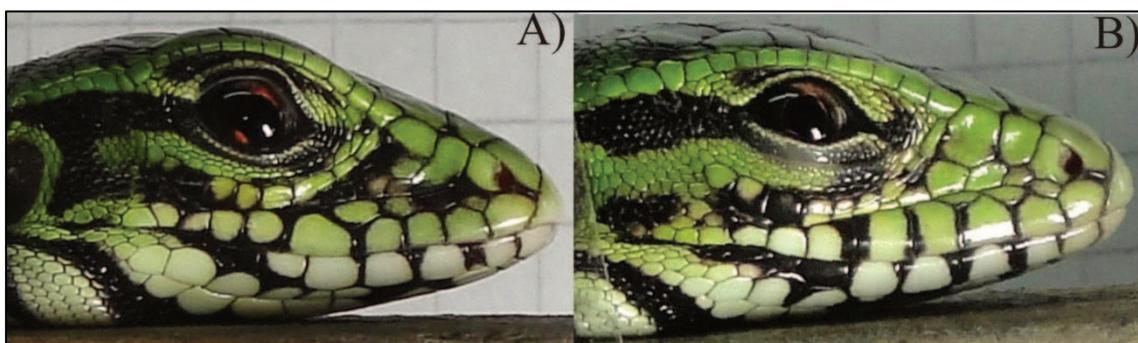
**Figura 49.** Escamas loreales A) Figura modificada a partir del trabajo de Harvey y col. [5] que muestra las dos escamas loreales presentes en los ejemplares analizados pertenecientes al género *Salvator*. B) Fotografía en vista lateral derecha de un individuo clasificado dentro de este haplogrupo (Individuo juvenil N°10, muestreado en el sitio Alejandra, en el norte de la provincia de Santa Fe), el cual también presenta dos escamas loreales.

b) Presencia/ausencia de gránulos supraoculares laterales: En los individuos analizados en este trabajo, clasificados dentro del nuevo haplogrupo se halla presente una fila de gránulos supraoculares (Figura 50):



**Figura 50.** Presencia de gránulos supraoculares. A) Figura modificada a partir de Harvey y col. [5] que muestra una fila de gránulos supraoculares en la región cefálica de los ejemplares en la especie *Cnemidophorus flavissimus*. B) Fotografía en vista dorsal de un individuo clasificado dentro del nuevo haplogrupo (Individuo juvenil N° 2, muestreado en el sitio Alejandra, norte de la provincia de Santa Fe), el cual también presenta una fila de gránulos supraoculares.

c) Forma de la pupila del ojo: Este carácter no se pudo determinar con certeza ya que no todos los individuos analizados presentaban los ojos abiertos al momento de la captura de la fotografía. Además, algunos de los individuos clasificados dentro del nuevo haplogrupo aparentemente mostraban pupila reniforme y otros presentaban pupila redonda (Figura 51):



**Figura 51.** Formas de la pupila observadas en las fotografías en vista lateral de individuos clasificados dentro del nuevo haplogrupo. A) Individuo juvenil N° 5 muestreado en el sitio Alejandra (norte de Santa Fe) que presentaría pupila reniforme. B) Individuo juvenil N° 1 muestreado en el sitio Reconquista (norte de Santa Fe) que presenta pupila redonda.

#### IV.I.VI Heredabilidad de la forma y tamaño

Las estimaciones de heredabilidad para la forma de la región cefálica indicaron valores altos tanto para la configuración de *lm* en vista dorsal como para la configuración de *lm* en vista lateral derecha. Con respecto a la heredabilidad del tamaño de centroide, los valores fueron aún más altos y similares entre sí (Tabla 43).

**Tabla 43.** Valores de heredabilidad de la forma de la región cefálica y del tamaño de centroide de los individuos en cada uno de los sitios de muestreo, para la configuración de *lm* en vista dorsal y para la configuración de *lm* en vista lateral derecha.

Sitio de muestreo	Forma		Tamaño centroide	
	Vista dorsal	Vista lateral	Vista dorsal	Vista lateral
Alejandra	2,1528	2,1606	2,2196	2,2198
C. del Salado	2,1292	2,0892	2,2202	2,2202
San Cristóbal	2,1812	2,1654	2,2198	2,2202
Reconquista	2,1618	2,1728	2,2206	2,2214
Romang	2,1640	2,1906	2,2202	2,1906
Sa Pereira	2,1258	2,1500	2,2206	2,2206

## IV.II Conclusiones

### IV.II.I Análisis de forma de la región cefálica del lagarto overo en función del tipo de ambiente

El resultado más relevante obtenido al analizar la forma de la región cefálica del lagarto overo por tipo de ambiente, fue que los individuos de ambientes naturales presentaron una mayor variabilidad fenotípica, mientras que la forma de la región cefálica de los animales de ambientes perturbados fue más homogénea; como se observa en las Figuras 39 y 41.

La mayor variabilidad fenotípica en la región cefálica en los individuos de ambientes naturales puede ser explicada a través de la “hipótesis de nicho trófico”. Metzger y Herrel [274] demostraron que existe una fuerte relación entre la dieta y la morfología craneal en los lepidosaurios, y que el aparato trófico incluido en el cráneo (mandíbulas y áreas de inserción de la musculatura asociada) muestra una fuerte correlación con el nicho trófico. Se considera que la disponibilidad de alimentos depende de la variación estacional de la flora y la fauna existente en el hábitat [274], lo cual resulta relevante ya que los lagartos del género *Salvator* son considerados forrajeadores activos y oportunistas [35][275]. Posiblemente, en los ambientes naturales, la variedad de alimentos disponibles y el costo de energía involucrado en su obtención podrían conducir a la gran variación de forma encontrada entre los ejemplares de dichos sitios de muestreo, como resultado de la especialización de los individuos a diferentes ítems alimenticios y la consecuente división intraespecífica del nicho trófico, lo que garantizaría la disponibilidad de alimentos para las poblaciones en tales ambientes.

Por su parte, los ambientes perturbados tienden a ser mucho más homogéneos en cuanto a las especies de flora y fauna existente, ya que la agricultura y ganadería modernas implican la simplificación de la estructura del ambiente en grandes áreas, reemplazando la biodiversidad nativa con un pequeño número de especies de plantas cultivadas y animales domesticados, lo que puede afectar directamente a la abundancia y diversidad de especies endémicas [276]. La homogeneidad y abundancia de alimentos disponibles podría reducir la necesidad de dividir el nicho trófico entre los individuos, lo que explicaría la menor variación de forma y tamaño de la región cefálica entre los ejemplares de lagarto overo en dichos ambientes (Figuras 39 y 41). Esta conclusión estaría respaldada por los hallazgos de Barraco [277], quien evaluó el riesgo de invasión de *S. merianae* en el sur de Florida (Estados Unidos de América). El análisis del contenido intestinal indicó que la mayoría de las diferencias en los ítems tróficos entre individuos en áreas naturales y perturbadas se debían al grado de consumo de plantas y gasterópodos. También halló que el rango taxonómico de los elementos de la dieta ingeridos por individuos de ambientes perturbados fue mucho menos variado que el de los individuos en el ambiente natural [277]. A su vez, Winck y col. [35] quienes, como ya se mencionó en otros capítulos, investigaron aspectos de la ecología de una población de *S. merianae* ubicada en una Estación ecológica en el sur de Brasil, no hallaron diferencias en el comportamiento dietario entre los grupos de edad en

esta población, lo cual fue atribuido por los autores a la baja complejidad ecológica de la zona (homogeneidad en alimentos y tipos de refugio), debido a la presencia de plantaciones de arroz, respaldando así la hipótesis antes expuesta respecto a la homogeneidad de alimentos existente en los ambientes perturbados.

Siguiendo con el planteo de la especialización de los individuos a nivel de nicho trófico, debe mencionarse que existe abundante evidencia de que las especies ecológicas generalistas, las cuales utilizan una amplia variedad de recursos, son colecciones heterogéneas de individuos relativamente especializados [278]. Además, se sabe que la competencia por los recursos es una de las principales causas de la dispersión física de los individuos en una población animal [35][279] y se ha demostrado que la diferenciación de la morfología trófica funciona como una forma de evitar dicha competencia [280]. Como ejemplo se puede citar un estudio de González y col. [281], quienes encontraron dos morfotipos que difieren en el ancho de la mandíbula en ejemplares de una población del lagarto *Ameiva ameiva*. Uno de estos morfotipos presenta una mandíbula más estrecha, el otro una mandíbula más ancha y más pronunciada en los machos. Los autores propusieron que esto se debe al mayor tamaño corporal que poseen los machos, y a la mayor actividad de forrajeo que estos presentan en la búsqueda de presas más grandes. Esto podría conducir a diferencias biomecánicas en la mandíbula, sugiriendo una posible divergencia simpátrica en la morfología trófica de individuos como consecuencia de la división del nicho dietario en base al tamaño de presa. A su vez, Huyghe y col. [245] analizaron las diferencias en la fuerza de mordida en el lagarto *Podarcis melisellensis* y hallaron tres niveles de fuerza de mordida correspondientes con diferentes patrones de coloración en los machos; propusieron que esto podría deberse a la selección ecológica que da como resultado una divergencia en la dieta entre los morfotipos de color. Los autores encontraron que los machos anaranjados presentan una fuerza de mordida mayor que los blancos y amarillos, pudiendo los primeros manipular y aplastar presas más duras. De hecho, los machos anaranjados poseían una mayor proporción de presas duras en el estómago que los ejemplares de los otros dos morfotipos.

Se podría decir entonces, que las diferencias en el tipo y disponibilidad de elementos tróficos, dependiendo del ambiente, probablemente sean la causa de las diferencias significativas de forma encontradas en el presente trabajo entre individuos de ambientes naturales con respecto a los de ambientes perturbados. Además, se puede considerar que en ambientes naturales habría una gran variedad de ítems alimentarios que podrían promover la variación individual en la forma de la cabeza, lo que llevaría a disminuir la competencia por el alimento a través de la diferenciación del nicho trófico en este tipo de ambiente. Por su parte, en ambientes perturbados se observa una menor variación morfológica de la región cefálica (elipse más pequeña en las Figuras 39 y 41), lo que lleva a inferir dos posibles causas: a) que existe una menor diversidad de alimentos debido a la homogeneidad del ambiente, lo que promovería una disminución de la variación en la forma de la región cefálica, y b) que los ítems disponibles presentan baja

diversidad, pero se hallan en gran cantidad, reduciendo la necesidad de competir por el alimento y reduciendo así la necesidad de particionar el nicho trófico.

Otra explicación para las diferencias de forma hallada entre los individuos de ambos tipos de ambientes en este trabajo, podría estar relacionada con la asimetría del lado derecho con respecto al izquierdo en la configuración de *lm* en vista dorsal (Tabla 37). La asimetría fluctuante (AF), es decir, las pequeñas desviaciones aleatorias de la simetría bilateral perfecta, se utiliza para evaluar las influencias ambientales sobre el desarrollo, ya que se supone que no tiene un componente hereditario, sino que es una respuesta del desarrollo a las presiones ambientales y se la encuentra en organismos expuestos a algún tipo de estrés ambiental durante su crecimiento ontogénico [282]. Existen varios trabajos que examinan la asociación de las alteraciones ambientales con la AF de los individuos y, por tanto, su eficacia biológica. Algunos han encontrado una asociación directa entre el estrés ambiental y la AF [283][284][285] mientras que, en otros estudios, no se encontró relación alguna [282][286][287]. En el presente trabajo, el análisis de asimetría en los animales muestreados indicó que existe una ligera asimetría tanto en ejemplares del ambiente natural como del perturbado y que no existen diferencias entre los dos tipos de ambientes con respecto a la asimetría (Tabla 37). Sin embargo, es posible que los efectos de las perturbaciones en el hábitat sólo se observen en individuos que se han desarrollado y crecido en tales circunstancias, y debe considerarse que los individuos estudiados aquí todavía se hallaban en la etapa de incubación al momento de la recolección de los huevos y luego fueron sometidos a incubación artificial. Por lo tanto, sería necesario un nuevo estudio para realizar un seguimiento del desarrollo ontogénico de dichos individuos con el objetivo de investigar si existen o no diferencias significativas en la asimetría entre los individuos de mayor edad, provenientes de ambientes naturales en relación a los de ambientes perturbados.

Con respecto a la covariación de la forma con las variables ambientales, se sabe que la variabilidad fenotípica observada en linajes naturales resulta de procesos evolutivos que reflejan las interacciones entre las presiones selectivas ejercidas por el ambiente donde estas poblaciones evolucionan [246]. Como se mencionó en la Introducción del presente capítulo, una característica importante de estos lagartos es que poseen huevos no-cleidoicos. Este tipo de huevos establece un equilibrio dinámico con el ambiente que determina las condiciones en las que se desarrolla el embrión [40]. Muchos estudios experimentales sobre una variedad de saurópsidos han demostrado que, características importantes de la descendencia, dependen de las condiciones físicas que experimenta el embrión antes de la eclosión [62][288][289][290][291]. Por lo tanto, las condiciones ambientales experimentadas durante la ontogenia temprana afectan a los embriones y pueden inducir variaciones fenotípicas [235][288]. Por esta razón, los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de asociación estadísticamente significativa entre la forma de la región cefálica del lagarto overo con las variables ambientales consideradas (Temperatura, Humedad, Precipitaciones), que se observan en la Tabla 40 y Figura 43, indicarían que, aunque

el período de incubación de los individuos analizados no se completó bajo condiciones naturales, los días en que los huevos estuvieron expuestos a las características de cada sitio al inicio del desarrollo ontogénico (un promedio de 12 días para el ambiente natural y 22 días para el perturbado) habrían sido suficientes para ejercer su influencia sobre la forma del rasgo estudiado.

En un trabajo realizado anteriormente en neonatos de yacaré overo (*Caiman latirostris*), se obtuvieron resultados similares a los aquí expuestos en cuanto a la covariación de la forma de la región cefálica con las variables ambientales. En dicho trabajo se estudió, mediante morfometría geométrica, la forma y tamaño de la región cefálica de individuos neonatos de *Caiman latirostris*, cuyo muestreo se realizó también mediante la metodología de ranqueo, por lo que el período de incubación de los huevos se completó en incubadoras artificiales. Aunque algunos de los nidos muestreados fueron expuestos unos pocos días a las condiciones ambientales del sitio de anidación elegido por la hembra, se encontró una covariación estadísticamente significativa entre las variables ambientales del lugar de origen y la forma de la cabeza de los ejemplares, siendo la humedad relativa (HR), la presión atmosférica (PP) y la temperatura del suelo a diez cm de profundidad (TMS10) las variables que más influyeron [62]. Con respecto al lagarto overo, nuestros resultados indicaron que existen diferencias en el tipo de variables ambientales que ejercen mayor influencia sobre la forma de la región cefálica, dependiendo del tipo de ambiente. En los ambientes naturales, las variables más influyentes están relacionadas principalmente con la temperatura (Ej: TMinA, TMA, TMS10) como se observa en la Figura 43. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lanfri y col. [292], quienes estudiaron el nicho ecológico para tratar de explicar las estrategias espaciales de los lagartos *S. merianae* y *S. rufescens*, es decir la diferenciación de nicho y divergencia de los patrones de distribución a escala regional. Los autores concluyeron que la temperatura, precipitación, biomasa vegetal y altitud definen el nicho ecológico de ambas especies, siendo la temperatura ambiente el factor más importante que limita la probabilidad de la presencia de estas especies.

En cuanto a los ejemplares de los ambientes perturbados, las variables que más influyeron sobre la forma de la región cefálica están relacionadas principalmente con la humedad ambiental (Ej: PP, HR) y, en menor medida, con la temperatura (Ej: TMS10, TMaxA) como muestra la Figura 43. Esto puede deberse a las características de los ambientes cultivados, ya que el tipo de cultivo incide fuertemente en el régimen de humedad. Winck y col. [35] señalaron que las características de los sitios de muestreo que seleccionaron para su estudio estaban fuertemente determinadas por el tipo de explotación antrópica de la zona, la cual estaba ubicada en una plantación de arroz con altos niveles de humedad que favorecen el desarrollo de las especies vegetales adaptadas a este tipo de ambiente (*Apiaceae: Eringium sp.*), lo que además resultó en buenos refugios para los lagartos, especialmente para los juveniles, así como para sus presas. En la presente Tesis, los sitios muestreados se hallaban linderos a cultivos de soja y sorgo, los cuales requieren condiciones adecuadas de humedad que, cuando no puede ser obtenida a partir del

ambiente de manera natural, debe ser aportada a los cultivos de forma artificial a través de riegos periódicos, por lo cual, dichas plantaciones también poseen elevados valores de humedad ambiental [293].

Una conclusión importante obtenida a partir del análisis de la región cefálica en base al tipo de ambiente del que fueron muestreados los individuos, es que a pesar del hallazgo de la presencia de covariación estadísticamente significativa entre la forma y las variables geográficas, el tipo de ambiente fue el que ejerció una mayor influencia. Por ejemplo, el sitio de muestreo Sa Pereira, considerado un ambiente perturbado, se halla ubicado muy al sur con respecto a los otros sitios, sin embargo, el PLS (Figura 42) lo agrupó con el resto de los ambientes perturbados, más allá de su ubicación geográfica, lo que significaría que la variación en las condiciones biofísicas a las que se hallaron expuestos los individuos en ambos tipos de ambiente durante la ontogenia temprana, ejercen mayor influencia en la forma de la región cefálica que las variables geográficas de los sitios donde se realizaron los muestreos, llegando así a la conclusión de que el tipo de ambiente (natural o perturbado) tiene mayor influencia sobre la forma de la región cefálica de estos lagartos que las variables geográficas (latitud y longitud).

Otra de las características fenotípicas analizadas en el presente estudio que podría estar influenciada por el nicho trófico, es el tamaño de centroide de la región cefálica, el cual, como se mencionó en Materiales y Métodos, se utilizó como *proxy* (representante) del tamaño corporal de los individuos. Por lo tanto, al hallar en el presente trabajo que los lagartos de ambientes perturbados exhiben un tamaño de centroide medio de la región cefálica más grande que los ejemplares de ambientes naturales (Figura 44: A-B), se podría suponer que también presentan un mayor tamaño corporal.

En relación al tamaño de los ejemplares, Barraco [277] concluyó que el tipo de hábitat influye en la composición de la dieta y la condición corporal general de *Salvator merianae*. Los lagartos con mejor condición corporal se recolectaron de áreas perturbadas (agrícolas), lo cual se atribuyó a la disponibilidad de caracoles en campos agrícolas, lo que, según el autor, resultó en que los lagartos habrían consumido más calorías con menos esfuerzo. Por su parte Al-Hashem & Brain [294], en un estudio de los efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre el tamaño corporal y el peso de ejemplares del lagarto *Acanthodactylus scutellatus* en un campo petrolero en Kuwait, encontraron que los machos adultos eran generalmente más grandes en los sitios contaminados que en los sitios de control. La explicación propuesta por Al-Hashem & Brain [294] fue que los recursos alimenticios se ven afectados por la contaminación por hidrocarburos y solo se hallan disponibles presas con altos niveles de grasa. Esto podría deberse a que los residuos de la contaminación por hidrocarburos son lipofílicos y se acumulan en el tejido adiposo y en el hígado de la presa; funcionando dicha acumulación como un mecanismo de defensa al reducir el riesgo de intoxicación inmediata tanto en la presa como en el depredador. Por lo tanto, los lagartos

tenderían a acumular más tejido adiposo cuando se hallan restringidos a tales presas contaminadas [294].

En base a lo antes mencionado, se puede hipotetizar que, en los ambientes perturbados donde habita el lagarto overo se hallarían algunos tipos de presas que podrían desarrollarse gracias a las condiciones de dichos ambientes: es posible que las presas disponibles sean aquellas que toleren las condiciones de cultivo, como por ejemplo la presencia de agroquímicos. Además, es probable que estas presas se encuentren en gran cantidad y que contengan un alto valor calórico, todo lo cual conduciría a las diferencias de tamaño encontradas entre los ejemplares de lagarto overo de ambientes naturales en comparación con los que ocupan ambientes perturbados.

Para finalizar, es importante mencionar que el éxito reproductivo de los lagartos del género *Salvator* depende de la disponibilidad de alimento en dos temporadas: en la primera temporada la posibilidad de reproducción de una hembra adulta depende de su estado nutricional al momento de iniciar la hibernación, si antes de hibernar no acumula reservas energéticas en sus cuerpos grasos que constituyen el vitelo de los ovocitos, la hembra no se reproducirá. En la segunda temporada es sumamente importante que las crías tengan alimento que les permita acumular reservas para soportar su primera hibernación [40]. De este modo, es posible que en los ambientes perturbados la alta disponibilidad de alimento permita a las hembras de lagarto overo acumular una gran cantidad de reserva energética que será transmitida a la progenie, dando lugar así a individuos de gran tamaño. Además, al nacer, estas crías tendrían acceso a una gran cantidad de alimentos ricos en calorías que les permitirían no solo sobrevivir a la primera hibernación, sino también alcanzar tamaños más grandes que los individuos que viven en ambientes naturales.

#### **IV.II.II Análisis de forma y tamaño de la región cefálica del lagarto overo en función de la ecorregión de la cual provienen los individuos**

El hallazgo más relevante en esta sección fue que, al analizar la forma de la región cefálica del lagarto overo en función de la ecorregión de la cual provienen los individuos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en la configuración en vista dorsal como en la configuración en vista lateral. Los resultados indican que los individuos provenientes de la ecorregión Delta e Islas del Paraná, presentan la zona craneal más ancha y alta, con hocico aplanado, en comparación con los individuos provenientes de la ecorregión El Espinal, los cuales poseen la zona craneal más angosta y baja, con hocico más robusto (Figura 46).

Las diferencias morfológicas halladas en la región cefálica pueden también ser explicadas por la antes mencionada “hipótesis de nicho trófico”, ya que es posible que las diferencias ambientales de las dos ecorregiones muestreadas, lleven a que exista variación en el tipo de ítems alimenticios disponibles. En este punto cabe mencionar la definición de ecorregión realizada por Burkart y col. [8]: “Un territorio geográficamente definido en el que dominan determinadas condiciones geomorfológicas y climáticas relativamente uniformes o recurrentes, caracterizado por una fisonomía vegetal de comunidades naturales y seminatural que comparten un grupo

considerable de especies dominantes, una dinámica y condiciones ecológicas generales y cuyas interacciones son indispensables para su persistencia a largo plazo". Es decir que cada ecorregión se caracteriza por determinadas características que condicionan la presencia de las comunidades vegetales y animales que las habitan.

La ecorregión Delta e Islas del Paraná comprende los valles de inundación de los trayectos medios e inferiores de los ríos Paraná y Paraguay, que recorren la llanura chaco-pampeana, y en la zona más austral incluye el delta del Paraná y el cauce del río de la Plata. Representa en conjunto un paisaje de islas bajas e inundables, delimitadas por los brazos laterales y los cauces principales de los ríos y bajos ribereños, es decir que los ríos son el principal factor modelador de toda la ecorregión. Los picos de grandes lluvias que se producen en las cuencas ocasionan el desborde de los cauces de los ríos y la inundación de las islas vecinas. La presencia permanente de grandes cuerpos de agua genera efectos climáticos locales de alta humedad ambiente y modera los extremos de temperatura diarios y estacionales, lo que permite la presencia uniforme de comunidades y especies típicas de las ecorregiones subtropicales húmedas del noreste del país. La vegetación predominante es la selva en galería y el bosque, que alternan con pajonales y vegetación acuática, y la fauna es particularmente rica comparada con las ecorregiones vecinas, a causa de las influencias biogeográficas, la variedad de ambientes y la presencia de refugios naturales [8][205].

Por su parte, El Espinal es una zona de transición entre las planicies subtropicales del Chaco y las templadas de la Pampa, con un clima extremadamente variable a causa de la extensión de la región: cálido y húmedo en el norte, templado y seco con marcados déficit hídricos, hacia el oeste y el sur. El paisaje predominante es de llanura plana a suavemente ondulada, ocupada por bosques bajos de especies leñosas xerófilas y sabanas, alternando con pastizales puros. En general, las especies vegetales comunes en esta ecorregión se encuentran también en otras provincias fitogeográficas del Dominio Chaqueño, especialmente de la Provincia Chaqueña, de la cual se considera una continuación austral empobrecida. En la provincia de Santa Fe, El Espinal ha sufrido un intenso proceso de transformación como consecuencia de la producción agropecuaria y sus bosques han sido sometidos a un cambio profundo que los alteró en forma total. La fauna es difícil de caracterizar porque comparte especies con las ecorregiones lindantes, y en la actualidad la mayoría de las especies están muy comprometidas debido a la desaparición de hábitats [8][205].

Por lo tanto, es factible hipotetizar que las marcadas diferencias antes descritas entre las ecorregiones muestreadas en cuanto a clima, comunidades vegetales y animales, lleven a que, como se mencionó previamente, exista variación en el tipo de ítems alimenticios que utiliza el lagarto overo, ya sean vegetales o animales, y que estas diferencias lleven a especializaciones y cambios morfológicos en el aparato trófico, tal y como fue demostrado en los trabajos ya citados de Metzger y Herrel [274] y Huyghe y col. [245], lo cual explicaría las diferencias de forma

halladas en la región cefálica, en función de la ecorregión de la cual provienen los individuos analizados, que se observa en la Figura 46.

Además, en relación con las características de cada una de las ecorregiones muestreadas, los gráficos obtenidos a partir del PLS realizado para evaluar la covariación entre la forma de la región cefálica y las variables ambientales (Figura 47), muestran que, al dividir el lote de datos en función de la ecorregión de pertenencia, en los individuos provenientes de El Delta e Islas del Paraná, las variables más influyentes son las relacionadas con la humedad (Humedad relativa y Precipitaciones), lo cual estaría relacionado directamente con sus características ambientales, ya que, como se mencionó previamente, las mismas se hallan determinadas por la dinámica de los cuerpos de aguas presentes en la zona, que llevan a una elevada humedad ambiental y abundantes lluvias [8]. En cambio, en la forma cefálica de los individuos provenientes de El Espinal, las variables ambientales más influyentes no se relacionan con la humedad sino con la temperatura, particularmente la Temperatura media y la Temperatura mínima. Esto podría relacionarse con el hecho de que es una zona más seca, con menor cantidad de cuerpos de agua, por lo que en la ecorregión de El Espinal las condiciones hídricas ya no tendrían tanta relevancia sobre la forma de la región cefálica de los individuos analizados y la Temperatura, que alcanza medias de entre 25 a 27°C en los meses más cálidos [295] en relación a la otra ecorregión analizada, con medias de 23°C en verano [296], pasaría a ejercer una mayor influencia, lo cual posiblemente también se relacione con la variación en los tipos de alimentos disponibles para el lagarto overo en función de la ecorregión donde habitan [8].

En lo que respecta al tamaño centroide, en vista dorsal se encontraron diferencias estadísticamente significativas dependiendo de la ecorregión de la cual provienen los individuos, presentando los de El Delta e Islas del Paraná un CS más grande (Figura 48). Este resultado también puede ser explicado desde el punto de vista del tipo de alimentación, ya que es muy posible que en dicha ecorregión exista una mayor variedad y abundancia de ítems alimenticios disponibles para el lagarto overo debido a que, como se mencionó previamente, las características ambientales de la región permiten que las comunidades vegetales y animales sean más diversas que en El Espinal [8].

#### **IV.II.III Patrón general de forma hallado en la región cefálica del lagarto overo**

Cabe resaltar que, tanto al analizar la forma de la región cefálica de los ejemplares por tipo de ambiente como al analizarla por ecorregión, se halló un patrón general de forma que varía desde un cráneo ancho y más desarrollado, con hocico corto a un cráneo menos desarrollado y alargado con hocico más largo y angosto. En este punto se debe recordar lo mencionado en la sección Materiales y Métodos en cuanto a que las escamas cefálicas son una herramienta importante para estudiar la morfología craneal en lagartos, ya que pueden proporcionar herramientas para el estudio intra e interespecífico de las variaciones morfológicas [238][244].

Bruner y Costantini [244] investigaron las causas subyacentes de la variación morfológica de las escamas cefálicas de dos especies de lacértidos (*Podarcis muralis* y *Podarcis sicula*) y concluyeron que la forma de la cabeza en los ejemplares de ambas especies se caracteriza por poseer un patrón alométrico común, en el cual el crecimiento óseo en la sutura frontoparietal y el desarrollo del sistema muscular occipito-parietal moldean las estructuras dérmicas (escamas), constituyendo el determinante estructural más importante de la morfología de las escamas cefálicas, es decir que la forma de los huesos y los músculos del cráneo moldearían la forma de las escamas cefálicas que los recubren. Además, *P. muralis* muestra un alto grado de variación, y algunas características asociadas con la reducción del área occipital y el alargamiento anterior del área frontoparietal pueden ser específicas de la especie. Según los autores se pueden reconocer dos bloques: un grupo de *lm* anteriores que convergen hacia el centro de la escama frontal y un grupo de *lm* posteriores que involucran la compresión de la superficie posterior. El borde entre ambas regiones cubre la sutura frontoparietal que separa el hueso frontal del hueso parietal y se considera una fuente importante de variación morfogenética de la cabeza de los lagartos. Además, la zona posterior (región interparietal y occipital) está asociada con el sistema muscular, que se caracteriza por el desarrollo de los músculos parietales, las funciones masticatorias y los músculos nucales.

En el presente trabajo, aunque no se estudió específicamente la forma de las escamas cefálicas, el patrón general de la forma de la cabeza obtenido para el lagarto overo es similar al encontrado por Bruner y Costantini [244], ya que se pueden observar los dos bloques de *lm* en las configuraciones analizadas, particularmente en vista dorsal (Figuras 40 y 46). Por lo tanto, se podría suponer que estos bloques son producidos por la división de los huesos frontal y parietal, lo que permitiría que la cabeza del lagarto overo varíe desde una forma con una región anterior corta asociada con una región posterior desarrollada, hacia otra forma con una región anterior alargada asociada con una región posterior menos desarrollada. Esta variación de forma podría indicar una especialización por nicho trófico en estos lagartos. Para aportar sustento a esta hipótesis se puede citar el trabajo de Metzger y Herrel [274], quienes investigaron la presencia de correlación entre la forma craneal general y el nicho dietario en los lagartos lepidosaurios, para lo cual midieron las estructuras craneales y poscraneales de individuos pertenecientes a 104 géneros y 246 especies de lepidosaurios. Los autores postularon que los cráneos más altos y los hocicos más cortos están relacionados con la necesidad de una mayor fuerza de mordida porque tienen mayores áreas de inserción para los músculos aductores; por otro lado, los hocicos más largos permiten la captura y procesamiento más eficiente de presas evasivas. Lo expuesto anteriormente brinda aún más sustento a la hipótesis de partición del nicho trófico en las poblaciones de lagarto overo, ya sea en función del tipo de ambiente (natural o perturbado), así como también en función de la ecorregión de origen (Delta e Islas del Paraná o Espinal).

Otra hipótesis que podría explicar este patrón general de variación de la forma en la región cefálica, que también estaría relacionado con la partición del nicho trófico, es el dimorfismo sexual a nivel del cráneo que se ha reportado en la mayoría de los reptiles saurópsidos [238][239]. Aunque en la presente Tesis no se logró realizar un análisis comparativo entre machos y hembras ya que, durante la etapa juvenil, no se puede distinguir, por su morfología externa, el sexo de los ejemplares de lagarto overo, cabe recordar el trabajo de Fabre y col. [78], quienes, mediante morfometría tradicional y geométrica estudiaron el cráneo y la mandíbula de *S. merianae*, concluyendo que los enfoques morfométricos geométricos resaltaron claramente las diferencias entre los sexos en zonas óseas que incluían áreas de inserción muscular, lo que sugiere que la selección que causa la divergencia entre los sexos puede actuar sobre rasgos funcionales como la fuerza de mordida. Los autores hallaron que el cráneo de los machos se caracteriza por poseer un hocico ligeramente más corto y un área de aductores más grande, mientras que la mandíbula se caracteriza por ser más corta y más alta, lo que la hace más robusta en general. Fabre y col. [78] concluyeron que estas diferencias tienen un efecto directo en la fuerza de la mordida ya que hocicos y mandíbulas más cortos, con áreas de los músculos aductores más grandes, proporcionan espacio adicional para la inserción muscular. Asimismo, es probable que la mandíbula más alta brinde aún más espacio para la inserción muscular y sea más resistente a la deformación mecánica inducida durante la mordida, contribuyendo todo esto al mayor desarrollo de los músculos mandibulares observados en los machos, particularmente durante la época de apareamiento. Además, esta diferencia en la fuerza de mordida, puede favorecer a la diferenciación en la dieta entre ambos sexos [297][298].

Sin embargo, más allá de este patrón general de forma del cráneo, existen otras variaciones de forma más sutiles, algunas de las cuales se hallan descritas en las Tablas 35 y 41, que dan lugar a las diferencias estadísticamente significativas en la forma de la región cefálica del lagarto overo, ya sea que se analicen los individuos según el tipo de ambiente o según la ecorregión de la cual provienen.

#### **IV.II.IV Análisis de caracteres con valor taxonómico**

Para finalizar con las conclusiones de los análisis morfológicos de la región cefálica del lagarto overo, cabe mencionar que, en lo que respecta al análisis de los caracteres con valor taxonómico, principalmente en lo relacionado con la presencia de las dos escamas loreales y la fila de gránulos supraoculares, no se hallaron diferencias entre los individuos clasificados como *S. merianae* y los pertenecientes al supuesto haplogrupo *Salvator sp.* Por lo tanto, se postula que los caracteres morfológicos de los que se dispone no resultan suficientes para determinar si dicho clado pertenece a la especie *S. merianae* o constituye una especie desconocida hasta el momento, por lo que serían necesarios estudios a nivel del cuerpo completo de los individuos con el fin de detectar otros caracteres que permitan llegar a resultados más concluyentes.

#### IV.II.V Heredabilidad de la forma y tamaño de la región cefálica del lagarto overo

La variación en la forma de la cabeza que aquí se documentó debe ser heredable para que tenga un significado evolutivo. Debido a que los individuos especializados compiten con otros individuos de la población a la que pertenecen, la competencia intraespecífica puede conducir a una selección disruptiva que llevará a cambios evolutivos, tales como polimorfismos, dimorfismo sexual o especiación si la variación tiene una base hereditaria [278].

En los últimos años se han realizado una serie de estudios que combinan morfometría geométrica y genética cuantitativa con el fin de evaluar qué fracción de la variación fenotípica es determinada genéticamente [62][68][69][70]. La información obtenida es de suma importancia, ya que la selección promueve la adaptación evolutiva si el rasgo bajo selección tiene suficiente variación genética (es decir, es heredable) sobre la cual la selección puede actuar [299].

Los altos valores de heredabilidad obtenidos en el presente trabajo para la forma de la cabeza del lagarto overo indican que esta especie presenta variación heredable con respecto a estos caracteres, lo que permitiría los cambios evolutivos necesarios para reducir la competencia intraespecífica. Además, esta variación heredable permitiría a estos caracteres de los ejemplares de lagarto overo responder fenotípicamente a la variedad de ambientes con las diferentes características biofísicas que ellos habitan.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sacchi y col. [70], quienes estudiaron patrones de heredabilidad de forma y tamaño de la cabeza en el lagarto modelo *Podarcis muralis*, encontrando altos valores de heredabilidad. Los autores concluyeron que la variabilidad en la forma de la cabeza de los lagartos tiene un gran componente genético y que la diferenciación morfológica dentro y entre especies puede explicarse como resultado de procesos adaptativos impulsados por la selección. Asimismo, Adams [69] evaluó los patrones de variación heredables de la forma de la cabeza de dos especies de salamandras del género *Plethodon*. Según el autor, los altos valores de heredabilidad obtenidos para todas las poblaciones estudiadas sugieren que estas salamandras exhiben suficiente variación genética para responder a las fuerzas ecológicas selectivas, como el uso de recursos tróficos y comportamientos de interacción, que influyen en la forma de la cabeza. En un trabajo previo [62] también encontramos altos valores de heredabilidad para la forma y tamaño del cráneo en el yacaré overo (*Caiman latirostris*) y se propuso que los altos valores obtenidos podrían dar lugar a una gran capacidad para responder rápidamente a las presiones de selección en un entorno cambiante.

Por su parte, es importante mencionar que el impacto humano sobre el medio ambiente afecta a la subsistencia de poblaciones y especies porque a menudo provoca cambios ambientales rápidos. Un recurso que poseen los organismos es la capacidad de responder de manera adaptativa al cambio ambiental, incrementando de este modo la eficacia biológica, el tamaño poblacional y la probabilidad de subsistencia [300].

Como se mencionó anteriormente, el lagarto overo presenta una gran capacidad de adaptación a los cambios del entorno, al menos en lo que respecta a las variaciones en la forma y tamaño de la cabeza. Además, por su condición de generalista y oportunista, sus poblaciones pueden sobrevivir con éxito en una gran variedad de ambientes; y, debido a su gran plasticidad, el impacto de las alteraciones en el ambiente sobre la eficacia biológica de los individuos parecería ser positivo al menos en los sitios estudiados y con respecto a los desafíos ecológicos. A su vez, la variación en la forma y tamaño de la cabeza, como consecuencia de los altos valores de heredabilidad, puede transmitirse rápidamente a las siguientes generaciones, permitiendo una rápida respuesta evolutiva a los cambios abruptos característicos de las perturbaciones resultantes de las actividades humanas. Sin embargo, serían necesarios trabajos futuros para evaluar el impacto a largo plazo de las perturbaciones en estos ambientes (como el uso de plaguicidas) a lo largo del ciclo de vida de los individuos y a través de las sucesivas generaciones.

Para finalizar, cabe recordar que los individuos empleados en el análisis morfométrico fueron muestreados en la provincia de Santa Fe, la cual presenta una gran heterogeneidad de ambientes ya que, como se mencionó previamente, constituye un área de transición entre climas subtropicales y templados y convergen en ella diferentes ecorregiones [205] además, como se ha venido señalando hasta aquí, posee un complejo entramado de ambientes naturales y perturbados. De este modo, los altos valores de heredabilidad obtenidos para la forma y el tamaño de la región cefálica del lagarto overo, permitirían a estos individuos evitar la superposición del nicho trófico en los ambientes donde habitan, facilitado esto por la rápida respuesta fenotípica del lagarto overo a las diferentes presiones de selección desarrolladas en dichos ambientes.

En virtud de los resultados antes expuestos se considera que los objetivos planteados para este capítulo han sido alcanzados.

## **9. CONCLUSIÓN GENERAL**

Para el desarrollo de la presente Tesis fue utilizado un enfoque integrador que incluyó la combinación de metodologías moleculares, análisis morfológicos, y herramientas de la genética cuantitativa con el propósito de estudiar poblaciones argentinas del lagarto overo. Las diferentes herramientas de análisis utilizadas (marcador mitocondrial, marcadores microsatélites, morfometría geométrica) resultaron útiles, e incluso aportaron más información de la esperada al momento de contrastar las diferentes hipótesis propuestas.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del marcador mitocondrial ND4 corroborarían lo propuesto por otros autores para estos teñidos en cuanto a la presencia de un clado norte, correspondiente al género *Tupinambis* y de un clado sur, correspondiente al género *Salvator* [3][6]. Además, los tiempos de divergencia obtenidos entre los linajes estudiados, y la distribución geográfica actual de estos grupos respaldan la hipótesis de que los lagartos teñidos habitaron la Patagonia Argentina durante el Mioceno y luego se expandieron hacia el norte en la medida en que las condiciones climáticas les resultaron favorables. En base a esto fue propuesto un posible escenario para explicar la diversidad actual del lagarto overo: la diversificación en estos lagartos parecería haber sido impulsada por un proceso de vicarianza, favorecida por los eventos orogénicos y los cambios climáticos en el continente, reflejando así el patrón general de diversificación de los animales sudamericanos, el cual está ligado al surgimiento de los Andes [15][25], a las introgresiones marinas [26] y a la aridificación del clima con la consiguiente expansión de hábitats abiertos [17]. Así, es probable que estos procesos hayan favorecido el aislamiento, la diversificación y la recolonización de las zonas del centro sur de Sudamérica por parte de las especies del denominado clado sur.

Por su parte, un resultado llamativo de este trabajo al analizar las secuencias del marcador ND4, fue el hallazgo de un conjunto de secuencias, denominadas aquí "*Salvator sp.*", distantes genéticamente respecto de secuencias pertenecientes a individuos de los géneros *Salvator* o *Tupinambis*, por lo que fueron propuestas diferentes hipótesis con el objetivo de explicar la existencia de tales secuencias altamente divergentes. Una de las hipótesis hace referencia a que dichas secuencias podrían ser no funcionales, es decir que podrían ser pseudogenes o *Numts*. Los análisis descriptivos y estadísticos realizados para detectar presencia/ausencia de selección detallados en el Capítulo II, indicarían que tales secuencias podrían corresponder a genes funcionales, aunque se considera que deberían ser utilizados, complementariamente, otros marcadores mitocondriales que permitan corroborar la gran divergencia de los dos haplogrupos encontrados analizando el gen ND4.

En cuanto a los índices de estructura y diversidad genética obtenidos mediante el estudio del marcador mitocondrial, se halló que la diferenciación genética entre los sitios de muestreo es muy baja y no se observó un patrón claramente influenciado por la distribución geográfica, ya

que el hallazgo de una gran cantidad de haplotipos compartidos entre los sitios de muestreo evidenció la presencia de elevados niveles de flujo génico.

A su vez, la antes mencionada hipótesis de recolonización de regiones más australes de Sudamérica por parte de las especies del clado “sur”, también se ve respaldada por los resultados plasmados en el gráfico bayesiano de líneas de cielo (BSP), en el que se observa que el haplogrupo *S. merianae* se encuentra en un proceso de expansión en la zona muestreada desde hace unos 2500 años. Otra evidencia que también respaldaría dicha hipótesis es el hallazgo realizado por Chamut y col. [221] de un segundo pico espermatogénico a fines del otoño en los machos de dicha especie, lo que, según los autores, derivaría de un patrón bimodal resultante de la presencia ancestral de la especie en ambientes de climas tropicales de latitudes bajas (cercanas al Ecuador), favorables para que la reproducción se produzca varias veces al año. En este contexto, es probable que ejemplares de *S. merianae* en un principio hayan migrado hacia el norte (hacia latitudes más bajas), manteniéndose allí un tiempo considerable como para que las condiciones ambientales del clima tropical favorezcan una segunda reproducción durante el año y que luego, ejemplares de la especie hayan vuelto a migrar hacia el sur, posiblemente debido a que diferentes procesos orogénicos y climáticos produjeron ambientes más propicios.

En lo que respecta al análisis empleando marcadores microsatélites, se observó que la mayor variabilidad genética se encuentra dentro de los sitios de muestreo y que existe una diferenciación genética entre baja y moderada entre ellos. A su vez, es muy posible que las características ambientales de las ecorregiones donde habitan estos lagartos y la localización geográfica de sus hábitats, ejerzan influencia en los niveles de variabilidad genética de los individuos, independientemente de la distancia geográfica existente entre los sitios, ya que no se halló evidencia de un modelo estricto de aislamiento por distancia.

A su vez, los resultados obtenidos mediante el análisis de los datos de microsatélites con el programa STRUCTURE indican, como resultado más probable, la presencia de dos grupos genéticos, lo que dio lugar a que se propusiera la hipótesis de que los sitios se estarían distribuyendo influenciados por un gradiente de humedad longitudinal Este – Oeste, ya que los sitios agrupados en el *cluster* 1 se ubican en ecorregiones con índices elevados de humedad, como la Selva Paranaense, El Delta e Islas del Paraná y La Pampa, mientras que los sitios agrupados en el *cluster* 2 se hallan en ecorregiones que registran menores índices de humedad, como El Espinal y El Chaco. Estos datos constituyen otro indicio de que los ambientes donde se desarrollan las poblaciones de lagarto overo podrían influenciar las características genéticas de los individuos.

Otra información relevante obtenida mediante la aplicación de los marcadores microsatélites, fue la evidencia de que el lagarto overo presenta poligamia como sistema de apareamiento, en base a los resultados que indican que a los nidos analizados les correspondió una única madre y, generalmente, más de un padre, es decir, multipaternidad. Este sistema de apareamiento beneficiaría al lagarto overo ya que el apareamiento múltiple tiende a aumentar la

variabilidad genética y permite a las especies responder a las presiones selectivas del ambiente [209] y, además, la poligamia se considera una estrategia reproductiva que tiende a evitar la endogamia en poblaciones pequeñas resultantes de la fragmentación del hábitat o la sobreexplotación [222].

Por otro lado, las diferencias en forma y tamaño halladas en la región cefálica entre los ejemplares de lagarto overo analizados y los altos valores de heredabilidad obtenidos para dichos caracteres, llevan a la conclusión de que estos lagartos exhiben variabilidad fenotípica heredable en la estructura estudiada, lo cual les permite responder a las condiciones ambientales de los sitios donde habitan. Se hipotetiza que, en las poblaciones analizadas, las variaciones de forma halladas responden a una estrategia evolutiva para evitar el solapamiento del nicho trófico mediante la reducción de la competencia por los ítems alimenticios disponibles, ya que es probable que el tipo y abundancia de las presas tengan influencia sobre la morfología y el tamaño de la región cefálica.

Se concluye que lo expuesto hasta aquí pone en evidencia la utilidad del empleo de enfoques integrales que abarcan diversas técnicas para el análisis de las poblaciones de interés, ya que las diferentes metodologías abordadas en la presente Tesis, como las técnicas moleculares, las herramientas de morfometría geométrica y los análisis de genética cuantitativa, permitieron el hallazgo de información relevante acerca de las poblaciones de lagarto overo estudiadas. Todos los resultados obtenidos en la presente Tesis aportan información inédita en cuanto a las características moleculares y morfológicas del lagarto overo, sin embargo, como resultó evidente durante el desarrollo de los diferentes Capítulos, las hipótesis formuladas a partir de los resultados obtenidos deberían ser contrastadas mediante el incremento del número de marcadores mitocondriales y/o nucleares estudiados, y un análisis morfológico exhaustivo del cuerpo completo de los individuos. Estos datos serían útiles para esclarecer el estatus del grupo de secuencias altamente divergentes halladas aquí, hasta el momento no reportadas para el lagarto overo, ya que es fundamental conocer en profundidad las características biológicas y ecológicas de las especies para poder establecer estrategias de conservación y manejo adecuados, particularmente en especies que han sido históricamente explotadas comercialmente y cuyos hábitats se localizan en regiones altamente perturbadas, como ocurre con el lagarto overo en toda su área de distribución.

## ANEXO A

### Lista de ejemplares de lagarto overo muestreados.

Se incluye: identificación de la muestra (ID); Sitios de Muestreo: 1= Villa del Rosario, provincia de Córdoba/ 2= La Paqueta, provincia de Córdoba/ 3= Brinkmann, provincia de Córdoba/ 4= Apóstoles, provincia de Misiones/ 5= Oberá, provincia de Misiones/ 6= San Ignacio, provincia de Misiones/ 7= La Candelaria, provincia de Misiones/ 8= Leandro Alem, provincia de Misiones/ 9= Costa del Salado, provincia de Santa Fe/ 10= Ceres, provincia de Santa Fe/ 11= Sa Pereira, provincia de Santa Fe/ 12= Romang, provincia de Santa Fe/ 13= San Cristóbal, provincia de Santa Fe/ 14= Alejandra, provincia de Santa Fe/ 15= Reconquista, provincia de Santa Fe/ 16= Las Colonias, provincia de Santa Fe/ 17= La Capital, provincia de Santa Fe/ 18= Rosario, provincia de Santa Fe/ 19= Nuevo Torino, provincia de Santa Fe/ 20= Cañuelas, Provincia de Buenos Aires; coordenadas geográficas de los sitios; edad y sexo de los individuos (Edad-Sexo): Juvenil (J), Adulto (A); condición de los individuos al momento de la toma de la muestra (Condición): en cautiverio en centros de cría (Cau); en estado silvestre (S); hallado muerto en ruta, calle, camino, hábitat natural (M); capturado (Cap). El/los individuos resaltados en gris en la columna ID, son los individuos cuyas muestras fueron amplificadas con el marcador mitocondrial, a partir del cual/de los cuales se infirió el clado del resto de la nidada, luego las secciones de la columna Clado resaltadas en color gris indican los sitios (nidos) completos en los cuales se realizó dicha inferencia. Cabe aclarar que, para los nidos N°18 y N°19, fueron amplificadas las muestras de las madres correspondientes, identificadas como H24 y H23 respectivamente. Las muestras fueron amplificadas utilizando los dos tipos de marcadores (microsatélites y mitocondrial) o solo uno de ellos, por lo tanto, el guion en algunas celdas indica que allí no hay información.

ID	Sitios de Muestreo	Coordenadas		Edad - Sexo	Condición	Clado
		Lat/Long(°)				
cor10	1	-31,57/-63,53		A	Cap	-
cor11	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor16	1	-31,57/-63,53		A	Cap	-
cor17	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor18	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor19	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor21	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor24	1	-31,57/-63,53		A	Cap	-
cor25	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor26	1	-31,57/-63,53		A	Cap	-
cor27	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor28	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor29	1	-31,57/-63,53		A	Cap	S.mer
cor30	1	-31,57/-63,53		A	Cap	-
cor31	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor33	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor35	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor36	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor37	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor38	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor39	2	-30,91/-62,23		A	Cap	-
cor42	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor44	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer
cor45	2	-30,91/-62,23		A	Cap	S.mer

cor46	2	-30,91/-62,23	A	Cap	-
cor49	2	-30,91/-62,23	A	Cap	-
cor52	2	-30,91/-62,23	A	Cap	-
cor53	2	-30,91/-62,23	A	Cap	-
cor54	2	-30,91/-62,23	A	Cap	-
cor56	3	-30,87/-62,03	A	Cap	S.mer
cor57	3	-30,87/-62,03	A	Cap	S.mer
cor58	3	-30,87/-62,03	A	Cap	S.mer
cor59	3	-30,87/-62,03	A	Cap	S.mer
Mis1	4	-27,72/-55,57	A	M	S.mer
Mis2	5	-27,28/-55,22	A	M	S.mer
Mis3	6	-27,18/-55,46	A	M	S.mer
Mis4	7	-27,43/-55,62	A	M	S.mer
Mis5	5	-27,46/-55,22	A	M	S.mer
Mis6	8	-27,53/-55,55	A	M	S.mer
39_1	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_4	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_5	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_6	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_7	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_8	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_9	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_10	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
39_11	9	-29,68/-60,91	J	Cau	S.mer
CS8	9	-29,68/-61,08	A♀	M	S.mer
15_1	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_2	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_3	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_4	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_5	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_6	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
15_7	10	-29,90/-61,93	J	Cau	S.mer
Ig5	10	-29,90/-61,93	A♀	M	S.mer
38_1	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.mer
35_1	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
35_2	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
35_3	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
35_4	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
3_6	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
3_7	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
3_8	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
18_1	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
18_2	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
18_3	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
19_1	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
19_2	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
19_3	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
M.19	11	-31,57/-61,39	A♂	S	S.sp
H.26	11	-31,57/-61,39	A♀	S	S.sp
H.20	11	-31,57/-61,39	A♀	S	S.sp
H23	11	-31,57/-61,39	A♀	S	S.sp
H24	11	-31,57/-61,39	A♀	S	S.sp
H17	11	-31,57/-61,39	A♀	S	S.sp
36_3	11	-31,57/-61,39	J	Cau	S.sp
L1_3	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp
L1_4	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp
L1_5	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp
L1_6	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp
L1_7	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp
L1_9	11	-31,58/-61,38	J	Cau	S.sp

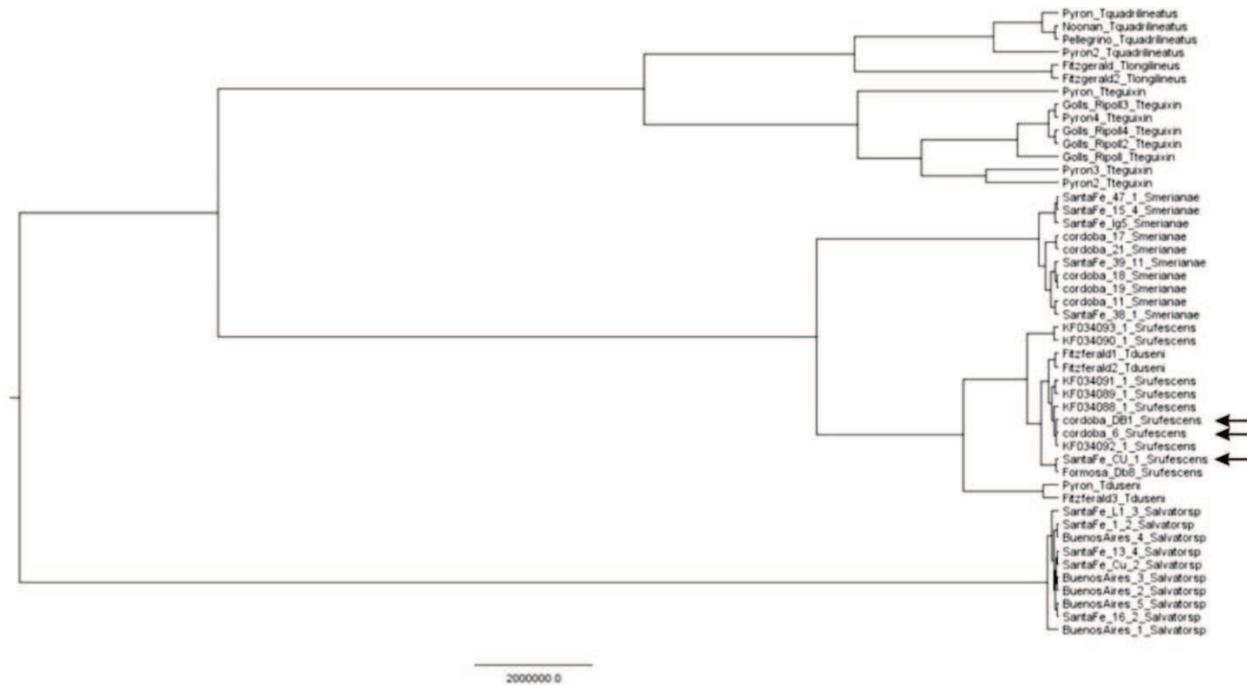
13_1	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_2	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_3	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_4	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_5	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_6	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_7	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_8	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_9	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
13_10	12	-29,50/-59,77	J	Cau	S.sp
17_1	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_2	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_3	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_4	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_5	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_6	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_7	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_8	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_9	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
17_10	13	-30,32/-61,23	J	Cau	S.sp
47_1	13	-29,88/-60,80	J	Cau	S.mer
47_2	13	-29,88/-60,80	J	Cau	S.mer
49_4	13	-29,88/-60,80	J	Cau	S.mer
49_5	13	-29,88/-60,80	J	Cau	S.mer
49_6	13	-29,88/-60,80	J	Cau	S.mer
AG2	13	-30,20/-60,70	A	M	S.mer
Ig1	13	-29,99/-60,86	A♂	M	S.mer
Ig2	13	-30,38/-61,22	A	M	S.mer
Ig12	13	-30,10/-61,13	A	M	S.mer
Ig13	13	-30,10/-61,00	A♀	M	S.mer
1_1	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_2	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_3	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_4	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_5	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_6	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_7	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_8	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_9	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
1_10	14	-29,90/-59,83	J	Cau	S.sp
Ig10	14	-30,11/-59,87	A	M	S.mer
Ig11	14	-30,67/-59,98	A	M	S.mer
WP4	14	-30,45/-59,94	A♀	M	S.mer
16_1	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_2	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_3	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_4	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_5	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_6	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_7	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_8	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_9	15	-29,23/-59,93	J	Cau	S.sp
16_10	15	-29,23/-59,93°	J	Cau	S.sp
CSSF7	16	-31,01/ -60,91	A	M	S.mer
CN	17	-31,62/ -60,60	J	M	S.mer
CU2	17	-31,64/ -60,67	A	M	S.sp
CU3	17	-31,64/ -60,67	A	M	S.sp
Ros	18	-32,83/-60,74	A	M	S.mer
L2_10	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp
L2_11	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp

L2_12	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp
L2_14	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp
L2_15	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp
L2_16	19	-31,34/-61,23	J	Cau	S.sp
BA1	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA2	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA3	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA4	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA5	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA6	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA7	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA8	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA9	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA10	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA11	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA12	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA13	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA14	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp
BA15	20	-35,03/-58,73°	A	Cau	S.sp

---

## ANEXO B

Árbol génico obtenido mediante un análisis exploratorio preliminar realizado con el programa BEAST 1.8. En dicho análisis fueron incluidas secuencias del gen ND4 de diferentes especies obtenidas de GenBank, así como secuencias amplificadas a partir de muestras de lagarto otero analizadas en la presente Tesis. En este caso también fueron incluidas las secuencias del gen ND4 clasificadas como pertenecientes a *S. rufescens*, pero obtenidas a partir de individuos catalogados como lagarto otero. En el gráfico se observa que dichas secuencias (señaladas por flechas) se agrupan junto a otras secuencias obtenidas de GenBank correspondientes a *S. rufescens*. Los alineamientos y análisis realizados llevan a concluir que tales secuencias correspondientes a *S. rufescens*, podrían ser resultado de hibridación introgresiva entre el lagarto otero y el lagarto colorado. La barra corresponde a la escala de tiempo en años.



### ANEXO C

Sección A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir de las secuencias de nucleótidos del gen ND4. El alineamiento y traducción fueron realizados empleando el programa Mega 7.0. Fragmento de 347 pb. Las secuencias pertenecen a las especies *S. merianae* (ID: 1), *S. rufescens* (ID:2), *S. duseni* (ID: 3), *T. quadrilineatus* (ID: 4), *T. teguixin* (ID:5) y *T. longilineus* (ID:6). Los sitios que presentaron cambios de aminoácidos fueron indicados con una X.

ID	Secuencia de aminoácidos
1	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFITLALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLVQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
2	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFIILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLIQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
3	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFIILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLIQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
4	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFIILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
5	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMYPFMILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
6	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMYPFMILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
	<span style="margin-right: 150px;">x xx xx</span> <span style="margin-right: 100px;">x x</span> <span>x</span>

Sección B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir de las secuencias de nucleótidos del gen ND4. El alineamiento y traducción fueron realizados empleando el programa Mega 7.0. Fragmento de 347 pb. Alineamiento de secuencias pertenecientes a las especies *S. merianae* (ID: 1), *S. rufescens* (ID:2), *S. duseni* (ID: 3), *T. quadrilineatus* (ID: 4), *T. teguixin* (ID:5) y *T. longilineus* (ID:6), a las cuales se le adicionó una de las secuencias que poseían menor similitud con *S. merianae* (ID: 7) (secuencia correspondiente al haplogrupo que fue denominado *Salvator sp.*).

ID	Secuencia de aminoácidos
1	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFITLALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLVQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
2	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFIILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLIQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
3	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMLPFIILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISATLIQTQWGLAGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
4	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMYPFMILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
5	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMYPFMILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
6	LKLGGYGIIRILPILPPPNTLMYPFMILALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTGAMLLMIAHGLTSSALFCLANMNYERTHSRALLLLOGAQI
7	LKLGGYGIVRILPILPPPNTLMYPFITLALWGIIMTSLIGLRQDLKALIAYSVGHMGLVISAALIQTQWGLTSTMLLMITHGLTSSALFCLANMNYERTHSRVLLLLKGAQI
	<span style="margin-right: 100px;">x</span> <span style="margin-right: 50px;">x xx xx</span> <span style="margin-right: 100px;">x</span> <span style="margin-right: 100px;">x</span> <span style="margin-right: 100px;">x x</span> <span style="margin-right: 50px;">xxx</span> <span style="margin-right: 50px;">x</span> <span style="margin-right: 50px;">x</span> <span style="margin-right: 50px;">x</span>

Sección C) Resultados de la comparación de a pares de las secuencias de un fragmento de 347 pb del gen ND4, excluyendo la secuencia perteneciente a *Salvator sp.*  
 Ks: número de sustituciones sinónimas o silenciosas por sitio sinónimo o silencioso; Ka: número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (Ka); Ka/Ks: relación entre ambos tipos de sustituciones.

Secuencia 1	Secuencia 2	Ks	Ka	Ka/Ks
<i>S. rufescens</i>	<i>S. merianae</i>	0,3597	0,0164	0,0456
<i>S. rufescens</i>	<i>S. duseni</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>S. rufescens</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	0,7885	0,0413	0,0524
<i>S. rufescens</i>	<i>T. teguixin</i>	1,2282	0,0328	0,0267
<i>S. rufescens</i>	<i>T. longilineus</i>	0,7873	0,0371	0,0471
<i>S. merianae</i>	<i>S. duseni</i>	0,3597	0,0164	0,0456
<i>S. merianae</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	0,9641	0,0455	0,0472
<i>S. merianae</i>	<i>T. teguixin</i>	1,3018	0,0370	0,0284
<i>S. merianae</i>	<i>T. longilineus</i>	0,8573	0,0541	0,0631
<i>S. duseni</i>	<i>T. quadrilineatus</i>	0,7885	0,0413	0,0524
<i>S. duseni</i>	<i>T. teguixin</i>	1,2282	0,0328	0,0267
<i>S. duseni</i>	<i>T. longilineus</i>	0,7873	0,0371	0,0471
<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. teguixin</i>	0,5823	0,0161	0,0276
<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. longilineus</i>	0,2348	0,0080	0,0340
<i>T. quadrilineatus</i>	<i>T. longilineus</i>	0,5152	0,0202	0,0392



### ANEXO D

Arreglo genotípico de los 120 individuos analizados con los 10 marcadores microsatélites. Se incluye identificación de la muestra (ID) y sitios de muestreo (SM): 1= Villa del Rosario, provincia de Córdoba/ 2= La Paqueta, provincia de Córdoba/ 3= Apóstoles, provincia de Misiones/ 4= Oberá, provincia de Misiones/ 5= San Ignacio, provincia de Misiones/ 6= La Candelaria, provincia de Misiones/ 7= Leandro Alem, provincia de Misiones/ 9= Costa del Salado, provincia de Santa Fe/ 10= Ceres, provincia de Santa Fe/ 11= Sa Pereira, provincia de Santa Fe/ 12= Romang, provincia de Santa Fe/ 13= San Cristóbal, provincia de Santa Fe/ 14= Alejandra, provincia de Santa Fe/ 15= Reconquista, provincia de Santa Fe/ 16= Cañuelas, Provincia de Buenos Aires. Las celdas que contienen un guión indican los *loci* en los cuales, luego de un mínimo de tres intentos, no logró amplificarse la muestra.

ID	SM	Locus																			
		Teg7		Teg10		Teg13		Teg14		Teg19		Teg20		Smer23		Smer157		Smer159		Smer240	
cor10	1	215	215	298	298	386	386	301	307	200	200	146	154	400	404	398	446	402	420	164	212
cor11	1	217	221	298	298	386	386	298	304	204	204	150	150	400	404	398	446	426	435	164	164
cor16	1	205	217	298	298	386	386	307	307	184	184	150	150	400	406	398	410	420	429	164	164
cor17	1	213	221	298	298	386	386	292	292	184	184	142	150	400	412	398	413	384	420	164	184
cor18	1	205	215	298	298	386	386	292	298	184	204	150	150	400	406	398	404	426	438	164	184
cor19	1	213	213	272	272	383	386	307	307	184	204	150	150	400	406	398	413	384	435	164	212
cor21	1	207	213	272	298	386	386	292	298	184	184	150	150	400	406	398	404	402	402	168	168
cor24	1	207	215	298	298	386	386	292	307	184	184	150	150	400	406	404	404	402	426	164	164
cor25	1	213	217	298	298	386	386	292	304	184	204	150	150	400	406	398	404	384	384	168	168
cor26	1	215	215	298	306	386	386	307	307	184	204	146	154	400	410	446	446	384	429	168	168
cor27	1	207	207	274	298	386	386	292	301	184	204	150	150	406	410	404	446	423	426	168	168
cor28	1	205	221	298	306	383	386	298	298	184	204	150	150	400	406	398	446	384	420	168	168
cor29	1	207	221	298	298	386	386	298	304	184	184	150	150	400	406	398	446	384	384	168	168
cor30	1	213	215	298	298	386	386	304	307	184	184	150	150	400	406	398	446	420	420	168	168
cor31	2	207	215	298	298	386	386	292	292	204	204	146	150	400	406	398	404	402	426	168	168
cor33	2	205	213	298	298	386	386	292	298	204	204	150	154	400	406	398	413	402	420	164	164
cor35	2	213	215	298	298	386	386	304	307	204	204	150	154	400	406	398	404	420	435	164	204
cor36	2	205	207	272	298	386	386	292	307	184	184	150	154	400	404	398	446	384	450	168	172
cor37	2	205	213	298	300	386	386	292	298	184	204	150	154	400	410	398	446	420	429	168	168
cor38	2	213	215	298	306	386	386	292	298	184	184	146	150	400	406	398	404	-	-	168	168
cor39	2	207	217	298	300	386	386	298	304	204	204	146	150	400	406	398	410	384	420	164	204
cor42	2	207	215	298	298	386	386	307	307	204	204	150	154	400	406	398	413	435	438	164	204

cor44	2	205	215	272	298	386	386	292	301	184	184	150	150	406	406	404	404	384	429	168	168
cor45	2	205	215	272	298	386	386	304	307	184	204	150	150	400	406	398	404	402	420	164	184
cor46	2	207	221	274	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	406	398	446	384	426	164	204
cor49	2	205	207	298	300	386	386	292	307	184	200	150	150	400	406	398	404	384	426	164	204
cor52	2	213	213	272	298	386	386	298	298	184	204	150	154	400	406	-	-	408	426	168	168
cor53	2	213	221	298	298	386	386	292	307	184	204	150	150	400	404	398	446	420	426	168	172
cor54	2	207	227	298	300	386	386	298	301	184	204	150	150	400	406	398	404	426	426	164	164
Mis1	3	205	223	298	304	386	386	304	319	184	184	150	150	400	408	446	449	399	420	168	168
Mis2	4	207	223	296	304	386	386	304	304	200	204	150	154	400	404	-	-	-	-	168	168
Mis3	5	207	213	302	302	386	386	304	304	184	204	150	158	-	-	446	446	402	441	168	168
Mis4	6	215	219	300	304	386	386	304	304	184	200	150	154	400	406	-	-	450	450	168	212
Mis5	4	213	215	300	300	386	407	304	304	184	204	146	150	400	406	-	-	399	432	168	212
Mis6	8	207	215	298	300	386	386	292	301	184	200	150	150	400	406	-	-	-	-	168	168
39_1	9	207	221	272	298	386	386	301	307	184	204	150	154	400	406	446	446	408	408	164	164
39_4	9	207	221	298	304	386	386	301	310	184	184	150	154	400	406	446	446	426	435	212	212
39_5	9	207	207	272	304	386	386	298	310	184	184	150	154	400	408	446	446	384	426	164	164
39_6	9	207	221	298	298	386	386	298	310	184	204	150	150	400	404	446	446	426	435	168	168
39_7	9	221	221	298	304	386	386	301	307	184	184	150	150	410	410	446	446	384	435	164	164
39_8	9	207	221	298	304	386	386	301	310	184	204	150	150	400	406	446	446	426	435	-	-
39_9	9	207	221	298	304	386	386	298	307	184	204	150	154	408	408	446	446	426	435	168	172
39_10	9	207	207	272	304	386	386	301	307	184	204	150	150	400	406	446	446	384	435	164	168
15_1	10	217	219	274	304	386	386	304	307	184	184	146	150	400	406	446	446	390	420	168	184
15_2	10	217	219	272	274	386	386	304	307	184	184	150	150	400	406	446	446	390	420	168	212
15_3	10	215	215	272	300	386	386	310	310	184	184	146	150	400	406	446	446	384	390	168	168
15_4	10	205	213	274	274	386	386	304	307	184	200	146	150	400	406	446	446	384	390	168	168
15_5	10	207	207	272	274	386	386	304	307	184	184	150	150	400	406	446	446	423	447	168	168
15_6	10	205	215	272	274	386	386	304	310	184	200	150	150	400	404	446	446	384	423	168	168
15_7	10	205	205	272	272	386	386	304	307	184	184	146	158	400	404	446	446	390	441	168	168
35_1	11	207	213	272	272	386	386	298	301	184	200	146	150	400	406	446	446	408	435	164	164
35_2	11	205	207	272	298	386	386	307	307	184	184	146	150	400	408	443	446	408	435	164	164
35_3	11	205	215	272	274	386	419	301	301	184	200	146	150	400	406	446	446	408	438	164	212
3_6	11	205	207	298	298	386	386	301	307	184	200	150	150	400	410	443	443	426	429	168	168
3_7	11	205	205	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	406	443	443	426	432	168	212
3_8	11	205	205	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	410	398	446	426	432	168	168

18_1	11	205	219	272	274	386	386	301	307	184	204	150	150	400	412	446	446	408	423	168	212
18_2	11	205	215	272	272	386	386	307	307	184	204	146	150	410	410	446	446	408	426	168	168
18_3	11	205	215	272	272	386	386	295	301	184	200	146	150	400	406	398	446	408	435	168	212
19_1	11	205	207	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	406	412	446	446	411	435	168	168
19_2	11	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	400	406	398	443	384	435	168	168
19_3	11	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	406	412	446	446	384	435	168	168
M.19	11	213	217	272	298	386	386	301	304	184	204	150	154	400	406	443	446	384	423	168	212
H.26	11	207	215	272	274	386	386	301	307	184	200	146	150	400	406	446	446	408	435	212	212
H.20	11	205	207	298	298	386	386	292	307	184	200	150	150	400	406	443	446	426	432	212	212
13_1	12	207	223	298	298	386	419	292	307	184	200	150	154	400	406	434	434	438	438	168	168
13_2	12	207	227	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	406	446	446	384	417	168	168
13_3	12	207	223	298	298	386	386	298	307	184	204	150	154	400	406	434	434	384	408	168	168
13_4	12	205	223	298	300	386	386	298	307	184	204	146	146	400	406	446	446	384	384	168	168
13_5	12	215	223	298	298	386	386	298	307	184	204	146	150	400	410	446	446	384	438	168	168
13_6	12	205	223	298	300	386	386	292	307	184	184	146	146	400	410	434	443	384	438	168	168
13_7	12	207	223	272	298	386	386	298	304	184	204	146	150	400	410	434	446	384	417	168	168
13_8	12	205	227	272	298	386	386	292	307	184	184	146	154	400	410	446	446	438	438	168	168
13_9	12	205	227	272	300	386	386	292	310	184	204	146	146	410	410	446	446	384	438	168	172
13_10	12	205	227	298	300	386	386	292	310	184	204	146	146	400	406	446	446	384	438	168	168
17_1	13	213	217	272	274	386	386	298	298	184	204	150	154	400	406	446	446	429	435	168	168
17_2	13	213	215	274	298	386	386	298	301	184	204	150	150	400	406	446	446	438	447	168	172
17_3	13	213	215	298	298	386	386	298	298	184	184	150	150	400	406	446	446	429	435	168	168
17_4	13	213	215	298	298	386	386	298	298	184	184	150	154	400	406	446	446	435	435	168	168
17_5	13	213	215	272	298	386	386	298	298	184	204	150	150	400	400	446	446	435	447	168	168
17_6	13	213	215	274	298	386	386	298	298	184	204	150	154	400	406	446	446	435	435	168	168
17_7	13	213	215	272	298	386	386	301	301	204	204	150	154	400	406	446	446	429	435	168	168
17_8	13	213	217	274	298	386	386	301	301	204	204	150	154	400	406	446	446	417	438	168	168
17_9	13	213	215	274	298	386	386	298	298	204	204	150	154	400	406	446	446	435	438	168	168
17_10	13	213	217	274	298	386	386	298	301	184	204	150	154	400	406	446	446	438	447	168	172
1_1	14	205	215	298	304	386	386	298	298	184	204	154	158	408	408	410	410	426	441	168	168
1_2	14	207	215	298	304	386	419	307	307	204	204	150	158	406	410	434	434	429	435	168	168
1_3	14	207	215	272	304	386	386	298	307	204	204	150	154	410	410	410	410	429	441	168	168
1_4	14	207	215	298	304	419	419	298	301	184	204	150	158	400	406	446	446	429	441	168	168
1_5	14	205	215	272	304	386	386	301	307	184	184	154	154	406	410	410	410	426	441	168	172

1_6	14	207	215	272	298	386	419	298	307	184	204	154	158	400	406	443	446	426	429	168	168
1_7	14	207	215	272	298	386	386	298	301	184	204	154	154	410	410	434	446	426	429	168	168
1_8	14	207	215	272	298	386	386	298	307	204	204	150	158	410	410	410	410	429	441	168	168
1_9	14	205	215	272	304	386	419	298	307	184	204	154	154	408	408	434	446	429	441	168	168
1_10	14	207	215	272	304	386	419	298	298	204	204	150	154	412	412	413	413	426	441	168	168
16_1	15	205	207	298	304	386	419	307	307	184	204	150	154	400	406	434	446	426	447	168	168
16_2	15	205	205	298	298	386	386	304	304	204	204	150	154	400	406	434	446	432	447	168	168
16_3	15	205	207	298	304	386	386	304	307	184	204	154	154	400	406	446	446	429	447	168	168
16_4	15	207	215	274	298	386	419	292	307	184	204	150	154	400	400	434	434	432	444	168	168
16_5	15	205	215	298	298	386	386	304	304	204	204	150	154	404	406	446	446	408	432	168	168
16_6	15	205	207	274	298	386	419	304	307	184	184	154	154	400	408	446	446	426	444	168	168
16_7	15	205	213	298	298	386	419	307	307	184	184	150	154	400	406	446	446	429	447	168	168
16_8	15	205	215	274	304	386	386	304	307	184	184	150	154	400	406	446	446	438	447	168	168
16_9	15	205	207	298	298	386	386	307	307	184	184	150	154	400	406	434	446	426	444	168	168
16_10	15	207	215	274	304	386	386	307	307	184	184	154	154	400	406	446	446	426	447	168	168
BA1	16	205	207	274	298	386	386	304	307	184	208	150	150	400	408	446	449	444	450	168	176
BA2	16	215	217	298	298	386	386	307	313	184	208	150	150	400	406	446	446	408	408	168	176
BA3	16	213	215	272	298	386	386	304	307	184	200	150	150	400	408	446	449	450	453	168	176
BA4	16	223	225	274	298	386	386	298	304	184	204	154	154	400	418	449	449	450	456	168	176
BA5	16	207	225	272	298	386	386	304	307	184	208	150	150	406	418	449	449	429	456	168	176
BA6	16	205	207	272	274	386	386	307	307	184	204	150	150	400	406	446	446	426	444	168	176
BA7	16	207	215	274	298	386	386	307	307	184	184	150	154	400	406	446	446	408	456	168	176
BA8	16	205	207	274	298	386	386	304	307	184	204	150	150	400	406	446	449	426	438	168	176
BA9	16	205	205	274	274	386	386	304	307	184	204	150	150	400	408	446	446	426	453	168	176
BA10	16	215	215	274	300	386	386	307	307	184	208	150	154	400	406	446	449	408	453	168	176
BA11	16	205	207	298	300	386	386	304	307	184	204	150	150	400	406	446	449	450	453	168	176
BA12	16	205	207	298	298	386	386	298	307	184	204	150	154	400	406	446	446	432	453	168	176
BA13	16	215	215	272	298	386	386	307	307	184	204	150	150	400	408	446	449	408	450	168	176
BA14	16	205	207	298	298	386	386	298	307	184	204	150	150	400	418	446	449	432	444	168	176
BA15	16	205	215	298	304	386	386	307	307	184	204	150	150	400	406	449	449	444	456	168	176

### ANEXO E

A) Tabla con los resultados obtenidos mediante el programa Microchecker para detectar presencia/ausencia de alelos nulos. Los análisis fueron realizados por sitio de muestreo y por cada *locus*. La x indica presencia de alelos nulos. El guión indica ausencia de alelos nulos. N/A: No aplica; indica que, para el sitio Misiones, el número de individuos genotipados con el marcador 157 es muy bajo (debido a la presencia de datos faltantes) y el programa no logró llevar a cabo el análisis.

Sitio de muestreo	<i>Locus</i>									
	<i>Smer23</i>	<i>Smer157</i>	<i>Smer159</i>	<i>Smer240</i>	<i>Teg7</i>	<i>Teg10</i>	<i>Teg13</i>	<i>Teg14</i>	<i>Teg19</i>	<i>Teg20</i>
Misiones	-	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-
Buenos Aires	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alejandra	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
Reconquista	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Romang	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
Vuelta del Salado	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
San Cristóbal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sa Pereira	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
Ceres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Paquita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Villa del Rosario	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-

B) Heterocigosidad observada (Obs.Het.) y esperada (Exp.Het.), y test de probabilidad para el equilibrio de Hardy-Weinberg, estimados para cada uno de los sitios de muestreo. Los valores  $p < 0,05$  muestran los *loci* microsatélites que no están en equilibrio. *Locus* 1: Smer159; *Locus* 2: Smer157; *Locus* 3: Smer240; *Locus* 4: Smer23; *Locus* 5: Teg10; *Locus* 6: Teg13; *Locus* 7: Teg19; *Locus* 8: Teg7; *Locus* 9: Teg14; *Locus* 10: Teg20. Los cálculos fueron realizados empleando el Programa Arlequin. Los asteriscos (\*) indican las probabilidades estadísticamente significativas.

#### Misiones

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	6	0.50000	0.87879	0.01056*
2	6	0.16667	0.53030	0.03015*
3	6	0.33333	0.30303	1.00000
4	6	0.83333	0.78788	0.13905
5	6	0.66667	0.83333	0.55076
6	6	0.16667	0.16667	1.00000
7	6	0.83333	0.68182	1.00000
8	6	1.00000	0.87879	1.00000
9	6	0.33333	0.45455	0.27370
10	6	0.66667	0.56061	1.00000

#### Cañuelas

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	15	0.93333	0.89425	0.95362
2	15	0.46667	0.50805	1.00000
3	15	1.00000	0.51724	0.00020*
4	15	1.00000	0.68736	0.01851*
5	15	0.73333	0.67816	1.00000
6	This locus is monomorphic: no test done.			
7	15	0.93333	0.62759	0.02174*
8	15	0.80000	0.78621	0.04375*
9	15	0.66667	0.55172	0.86348
10	15	0.20000	0.28736	0.32491

Alejandra

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	10	1.00000	0.72632	0.38008
2	10	0.30000	0.76316	0.00091*
3	10	0.10000	0.10000	1.00000
4	10	0.40000	0.77895	0.00159*
5	10	1.00000	0.70000	0.25407
6	10	0.40000	0.44211	1.00000
7	10	0.50000	0.47895	1.00000
8	10	1.00000	0.63684	0.01552*
9	10	0.70000	0.63684	1.00000
10	10	0.70000	0.65789	0.54977

Reconquista

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	10	1.00000	0.85263	0.64698
2	10	0.30000	0.39474	0.48019
3	This locus is monomorphic: no test done.			
4	10	0.90000	0.61579	0.10500
5	10	0.60000	0.58947	0.75530
6	10	0.40000	0.33684	1.00000
7	10	0.30000	0.47895	0.48025
8	10	0.90000	0.70000	0.85940
9	10	0.40000	0.54211	0.67806
10	10	0.70000	0.47895	0.21943

Romang

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	10	0.70000	0.65789	0.67576
2	10	0.20000	0.51053	0.02166*
3	10	0.10000	0.10000	1.00000
4	10	0.90000	0.67895	0.04937*
5	10	0.60000	0.54211	1.00000
6	10	0.10000	0.10000	1.00000
7	10	0.80000	0.54211	0.17303
8	10	1.00000	0.80526	0.16330
9	10	1.00000	0.80526	0.12190
10	10	0.50000	0.61579	0.40499

Costa del Salado

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	8	0.87500	0.75833	0.08954
2	This locus is monomorphic: no test done.			
3	8	0.25000	0.75833	0.00420*
4	8	0.75000	0.79167	0.02117*
5	8	0.87500	0.67500	0.60868
6	This locus is monomorphic: no test done.			
7	8	0.62500	0.45833	0.48633
8	8	0.62500	0.52500	1.00000
9	8	1.00000	0.79167	0.31676
10	8	0.50000	0.40000	1.00000

San Cristóbal

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	10	0.80000	0.74737	0.44171
2	This locus is monomorphic: no test done.			
3	10	0.20000	0.18947	1.00000
4	10	0.90000	0.52105	0.04567*
5	10	0.80000	0.61579	0.77284
6	This locus is monomorphic: no test done.			
7	10	0.50000	0.52105	1.00000
8	10	1.00000	0.63684	0.01684*
9	10	0.20000	0.44211	0.13323
10	10	0.70000	0.47895	0.22043

Sa Pereira

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	15	1.00000	0.86437	0.03925*
2	15	0.40000	0.53563	0.43342
3	15	0.33333	0.61839	0.01506*
4	15	0.93333	0.72414	0.02050*
5	15	0.33333	0.59080	0.00855*
6	15	0.06667	0.06667	1.00000
7	15	0.73333	0.54943	0.26376
8	15	0.86667	0.75632	0.25858
9	15	0.80000	0.73563	0.67886
10	15	0.46667	0.38391	1.00000

Ceres

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	7	1.00000	0.83516	0.65520
2	This locus is monomorphic: no test done.			
3	7	0.28571	0.27473	1.00000
4	7	1.00000	0.64835	0.08960
5	7	0.71429	0.67033	1.00000
6	This locus is monomorphic: no test done.			
7	7	0.28571	0.26374	1.00000
8	7	0.57143	0.86813	0.04043*
9	7	0.85714	0.69231	0.02799*
10	7	0.57143	0.53846	0.32786

La Paquita

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	15	0.86667	0.88046	0.64004
2	15	0.86667	0.73793	0.01375*
3	15	0.53333	0.71954	0.00044*
4	15	0.93333	0.60920	0.00775*
5	15	0.66667	0.53563	0.86808
6	This locus is monomorphic: no test done.			
7	15	0.46667	0.54483	0.60295
8	15	0.93333	0.83218	0.85537
9	15	0.80000	0.78621	0.56220
10	15	0.60000	0.47586	0.58007

Villa del Rosario

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
1	14	0.71429	0.84921	0.38289
2	14	0.85714	0.73810	0.36401
3	14	0.28571	0.63492	0.00018*
4	14	1.00000	0.66931	0.02814*
5	14	0.28571	0.37831	0.32102
6	14	0.14286	0.13757	1.00000
7	14	0.42857	0.51852	0.04985*
8	14	0.71429	0.84656	0.76231
9	14	0.64286	0.79101	0.41024
10	14	0.21429	0.32540	0.01042*

### ANEXO F

Alelos privados hallados en los seis sitios de muestreo mediante el empleo del programa GenAlEx. Se detalla el nombre del sitio, el *locus* al cual corresponde el alelo privado, el tamaño molecular del alelo y la frecuencia en la que se encuentra.

Sitio de muestreo	<i>Locus</i>	Alelo	Frecuencia
Misiones	Smer159	399	0,250
Misiones	Teg10	296	0,083
Misiones	Teg10	302	0,167
Misiones	Teg13	407	0,083
Misiones	Teg14	319	0,083
Cañuelas	Smer159	453	0,167
Cañuelas	Smer159	456	0,133
Cañuelas	Smer240	176	0,500
Cañuelas	Smer23	418	0,100
Cañuelas	Teg19	208	0,133
Cañuelas	Teg7	225	0,067
Cañuelas	Teg14	313	0,033
Sa Pereira	Smer159	411	0,033
Sa Pereira	Teg14	295	0,033
Ceres	Smer159	390	0,357
La Paquita	Smer240	204	0,167
Villa del Rosario	Teg13	383	0,071
Villa del Rosario	Teg20	142	0,036

### ANEXO G

Arreglo genotípico de los 101 individuos analizados con los 10 marcadores microsatélites en el Capítulo IV. Se incluye: Número de nido al cual pertenece cada individuo; identificación de cada individuo del nido y, si existiera, de la hembra identificada como probable madre de la progenie (ID); sitios de muestreo (SM): 1= Alejandra / 2= Romang / 3= Reconquista / 4= San Cristóbal / 5= Costa del Salado / 6= Sa Pereira; y nombre de cada uno de los *loci* amplificados. Las celdas que contienen un guión indican los *loci* en los cuales, luego de un mínimo de tres intentos, no logró amplificarse la muestra. La tabla se dividió diferenciando los nidos que no presentaban madre candidata con respecto de los que sí se disponía de muestras de dicha hembra.

---

#### Nidos sin madre candidata

---

#### *Locus*

---

Nº de Nido	ID individuo	SM	Teg7		Teg10		Teg13		Teg14		Teg19		Teg20		Smer23		Smer157		Smer159		Smer240	
Nido 1	1_1	1	205	215	298	304	386	386	298	298	184	204	154	158	408	408	410	410	426	441	168	168
	1_2	1	207	215	298	304	386	419	307	307	204	204	150	158	406	410	434	434	429	435	168	168
	1_3	1	207	215	272	304	386	386	298	307	204	204	150	154	410	410	410	410	429	441	168	168
	1_4	1	207	215	298	304	419	419	298	301	184	204	150	158	400	406	446	446	429	441	168	168
	1_5	1	205	215	272	304	386	386	301	307	184	184	154	154	406	410	410	410	426	441	168	172
	1_6	1	207	215	272	298	386	419	298	307	184	204	154	158	400	406	443	446	426	429	168	168
	1_7	1	207	215	272	298	386	386	298	301	184	204	154	154	410	410	434	446	426	429	168	168
	1_8	1	207	215	272	298	386	386	298	307	204	204	150	158	410	410	410	410	429	441	168	168
	1_9	1	205	215	272	304	386	419	298	307	184	204	154	154	408	408	434	446	429	441	168	168
	1_10	1	207	215	272	304	386	419	298	298	204	204	150	154	412	412	413	413	426	441	168	168

---

Nido 13	13_1	2	207	223	298	298	386	419	292	307	184	200	150	154	400	406	434	434	438	438	168	168
	13_2	2	207	227	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	406	446	446	384	417	168	168
	13_3	2	207	223	298	298	386	386	298	307	184	204	150	154	400	406	434	434	384	408	168	168
	13_4	2	205	223	298	300	386	386	298	307	184	204	146	146	400	406	446	446	384	384	168	168
	13_5	2	215	223	298	298	386	386	298	307	184	204	146	150	400	410	446	446	384	438	168	168
	13_6	2	205	223	298	300	386	386	292	307	184	184	146	146	400	410	434	443	384	438	168	168
	13_7	2	207	223	272	298	386	386	298	304	184	204	146	150	400	410	434	446	384	417	168	168
	13_8	2	205	227	272	298	386	386	292	307	184	184	146	154	400	410	446	446	438	438	168	168
	13_9	2	205	227	272	300	386	386	292	310	184	204	146	146	410	410	446	446	384	438	168	172
	13_10	2	205	227	298	300	386	386	292	310	184	204	146	146	400	406	446	446	384	438	168	168
Nido 16	16_1	3	205	207	298	304	386	419	307	307	184	204	150	154	400	406	434	446	426	447	168	168
	16_2	3	205	205	298	298	386	386	304	304	204	204	150	154	400	406	434	446	432	447	168	168
	16_3	3	205	207	298	304	386	386	304	307	184	204	154	154	400	406	446	446	429	447	168	168
	16_4	3	207	215	274	298	386	419	292	307	184	204	150	154	400	400	434	434	432	444	168	168
	16_5	3	205	215	298	298	386	386	304	304	204	204	150	154	404	406	446	446	408	432	168	168
	16_6	3	205	207	274	298	386	419	304	307	184	184	154	154	400	408	446	446	426	444	168	168
	16_7	3	205	213	298	298	386	419	307	307	184	184	150	154	400	406	446	446	429	447	168	168
	16_8	3	205	215	274	304	386	386	304	307	184	184	150	154	400	406	446	446	438	447	168	168

	16_9	3	205	207	298	298	386	386	307	307	184	184	150	154	400	406	434	446	426	444	168	168
	16_10	3	207	215	274	304	386	386	307	307	184	184	154	154	400	406	446	446	426	447	168	168
Nido 17	17_1	4	213	217	272	274	386	386	298	298	184	204	150	154	400	406	446	446	429	435	168	168
	17_2	4	213	215	274	298	386	386	298	301	184	204	150	150	400	406	446	446	438	447	168	172
	17_3	4	213	215	298	298	386	386	298	298	184	184	150	150	400	406	446	446	429	435	168	168
	17_4	4	213	215	298	298	386	386	298	298	184	184	150	154	400	406	446	446	435	435	168	168
	17_5	4	213	215	272	298	386	386	298	298	184	204	150	150	400	400	446	446	435	447	168	168
	17_6	4	213	215	274	298	386	386	298	298	184	204	150	154	400	406	446	446	435	435	168	168
	17_7	4	213	215	272	298	386	386	301	301	204	204	150	154	400	406	446	446	429	435	168	168
	17_8	4	213	217	274	298	386	386	301	301	204	204	150	154	400	406	446	446	417	438	168	168
	17_9	4	213	215	274	298	386	386	298	298	204	204	150	154	400	406	446	446	435	438	168	168
	17_10	4	213	217	274	298	386	386	298	301	184	204	150	154	400	406	446	446	438	447	168	172
Nido 39	39_1	5	207	221	272	298	386	386	301	307	184	204	150	154	400	406	446	446	408	408	164	164
	39_4	5	207	221	298	304	386	386	301	310	184	184	150	154	400	406	446	446	426	435	212	212
	39_5	5	207	207	272	304	386	386	298	310	184	184	150	154	400	408	446	446	384	426	164	164
	39_6	5	207	221	298	298	386	386	298	310	184	204	150	150	400	404	446	446	426	435	168	168
	39_7	5	221	221	298	304	386	386	301	307	184	184	150	150	410	410	446	446	384	435	164	164
	39_8	5	207	221	298	304	386	386	301	310	184	204	150	150	400	406	446	446	426	435	-	-

39_9	5	207	221	298	304	386	386	298	307	184	204	150	154	408	408	446	446	426	435	168	172
39_10	5	207	207	272	304	386	386	301	307	184	204	150	150	400	406	446	446	384	435	164	168

Nidos con madre candidata

*Locus*

N° de Nido	ID individuo	SM	Teg7		Teg10		Teg13		Teg14		Teg19		Teg20		Smer23		Smer157		Smer159		Smer240	
Nido 3	H20 (Madre Nido 3)	6	205	207	298	298	386	386	292	307	184	200	150	150	400	406	443	446	426	432	212	212
	3_1	6	205	207	298	298	386	386	292	307	184	200	150	154	-	-	-	-	-	-	168	168
	3_2	6	205	207	298	298	386	386	292	307	184	200	150	150	410	410	446	446	420	420	168	168
	3_3	6	205	205	298	298	386	386	292	307	184	200	150	150	400	406	398	446	426	432	168	168
	3_4	6	207	213	298	298	386	386	292	307	184	184	150	150	400	406	398	446	384	426	168	168
	3_5	6	207	207	298	298	386	386	301	307	184	204	150	150	400	406	398	443	429	432	168	172
	3_6	6	205	207	298	298	386	386	301	307	184	200	150	150	400	410	443	443	426	429	168	168
	3_7	6	205	205	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	406	443	443	426	432	168	212
	3_8	6	205	205	298	298	386	386	292	301	184	204	150	150	400	410	398	446	426	432	168	168
Nido 18	H24 (Madre Nido 18)	6	205	205	272	298	386	386	295	307	184	204	150	150	400	406	446	446	408	408	-	-

	18_1	6	205	219	272	274	386	386	301	307	184	204	150	150	400	412	446	446	408	423	168	212
	18_2	6	205	215	272	272	386	386	307	307	184	204	146	150	410	410	446	446	408	426	168	168
	18_3	6	205	215	272	272	386	386	295	301	184	200	146	150	400	406	398	446	408	435	168	212
	18_4	6	205	207	272	272	386	386	298	307	184	204	150	150	400	406	398	404	408	429	168	168
	18_5	6	205	215	274	298	386	386	295	301	184	204	150	150	400	404	404	446	408	423	168	172
	18_6	6	205	219	272	298	386	386	295	301	184	204	150	150	400	412	398	446	408	429	168	172
	18_7	6	205	215	272	272	386	386	307	307	184	204	150	150	400	400	398	446	408	435	168	168
	18_8	6	205	219	274	298	386	386	301	307	184	204	150	150	406	406	404	446	408	435	168	168
	18_9	6	205	207	272	274	386	386	307	307	184	204	150	150	400	406	404	446	408	426	168	168
	18_10	6	205	219	272	272	386	386	295	301	184	204	150	150	400	400	398	446	408	423	168	168
	H23 (Madre Nido 19)	6	207	207	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	400	406	446	446	384	411	-	-
Nido 19	19_1	6	205	207	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	406	412	446	446	411	435	168	168
	19_3	6	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	400	406	398	443	384	435	168	168
	19_4	6	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	406	412	446	446	384	435	168	168
	19_5	6	205	207	298	298	386	386	298	298	184	184	150	150	400	406	398	446	384	435	164	168
	19_6	6	207	213	298	298	386	386	301	301	184	184	150	150	400	406	398	443	384	435	168	168
	19_7	6	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	406	412	443	446	384	435	168	168

	19_8	6	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	400	406	398	446	384	435	168	168
	19_9	6	207	213	298	298	386	386	301	301	184	184	150	150	406	412	404	443	411	435	168	172
	19_10	6	207	213	298	298	386	386	298	301	184	184	150	150	400	412	398	443	411	435	168	168
	19_11	6	205	207	298	298	386	386	298	298	184	184	150	150	400	406	446	446	384	435	164	164
	H26 (Madre Nido 35)	6	207	215	272	274	386	386	301	307	184	200	146	150	400	406	446	446	408	435	-	-
Nido 35	35_1	6	207	213	272	272	386	386	298	301	184	200	146	150	400	406	446	446	408	435	164	164
	35_2	6	205	207	272	298	386	386	307	307	184	184	146	150	400	408	443	446	408	435	164	164
	35_3	6	205	215	272	274	386	419	301	301	184	200	146	150	400	406	446	446	408	438	164	212
	35_4	6	213	215	272	274	386	419	301	307	184	184	146	150	400	406	446	446	408	435	164	164
	35_5	6	207	213	272	272	386	419	301	301	184	200	150	150	400	406	446	446	408	408	164	164
	35_6	6	213	215	272	272	386	419	301	301	184	200	146	150	400	412	398	398	408	408	164	164
	35_7	6	207	213	272	272	386	419	298	301	184	200	146	150	400	406	446	446	408	435	164	164
	35_8	6	207	213	272	272	386	419	301	301	184	184	146	150	400	410	446	446	408	408	164	164
	35_9	6	207	213	272	274	386	419	298	307	184	200	150	154	400	406	-	-	408	435	168	212
	35_10	6	205	207	272	272	386	386	298	301	184	204	146	150	400	406	398	404	408	408	168	168
Nido 38	H22 (Madre Nido 38)	6	207	215	272	298	386	386	292	307	184	184	150	150	400	406	446	446	408	411	-	-

38_1	6	205	205	272	300	386	386	292	292	184	184	150	154	400	406	446	446	408	426	-	-
38_2	6	205	217	272	298	386	386	295	307	184	184	150	150	400	406	446	446	408	435	-	-
38_3	6	205	217	298	300	386	386	292	298	184	184	150	150	400	406	443	446	408	435	-	-
38_4	6	205	217	272	298	386	386	298	307	184	184	150	150	400	406	446	446	384	408	-	-
38_5	6	205	217	272	298	386	386	292	295	184	200	150	150	400	406	446	446	-	-	-	-
38_6	6	205	217	272	300	386	386	292	295	184	184	150	150	-	-	443	446	408	435	-	-
38_7	6	207	217	272	298	386	386	298	307	184	184	150	150	-	-	443	446	408	435	168	168
38_8	6	205	217	298	298	386	386	292	298	184	184	150	150	400	406	443	446	411	435	168	176
38_9	6	205	205	274	298	386	386	304	307	184	204	150	154	400	406	-	-	384	411	-	-
38_10	6	205	217	298	300	386	386	298	307	184	184	150	150	400	406	446	446	411	435	-	-

### ANEXO H

Combinaciones posibles de arreglos genotípicos estimadas utilizando el programa GERUD 2.0 para las posibles madres de los nidos que no presentaban madre candidata. Se detalla el número de arreglos de genotipos estimados para la madre en cada uno de los nidos.

Nido	N° de arreglo genotípico	Arreglos genotípicos posibles para las madres
1		Teg7- Teg10- Teg13- Teg19- Teg20- Smer159
	1	205/215-298/304-386/419-184/204-154/158-426/429
	2	205/215-298/304-386/419-184/204-154/158-441/429
	3	205/215-298/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	4	205/215-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	5	205/215-304/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	6	205/215-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	7	205/207-298/304-386/419-184/204-154/158-426/429
	8	205/207-298/304-386/419-184/204-154/158-441/429
	9	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	10	205/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	11	205/207-304/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	12	205/207-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	13	215/215-298/304-386/419-184/204-154/158-426/429
	14	215/215-298/304-386/419-184/204-154/158-441/429
	15	215/215-298/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	16	215/215-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	17	215/215-304/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	18	215/215-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	19	215/207-298/304-386/419-184/204-154/158-426/429
	20	215/207-298/304-386/419-184/204-154/158-441/429
	21	215/207-298/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	22	215/207-298/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	23	215/207-304/272-386/419-184/204-154/158-426/429
	24	215/207-304/272-386/419-184/204-154/158-441/429
	25	205/215-298/304-386/419-184/204-154/150-426/429
	26	205/215-298/304-386/419-184/204-154/150-441/429
	27	205/215-298/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	28	205/215-298/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	29	205/215-304/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	30	205/215-304/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	31	205/207-298/304-386/419-184/204-154/150-426/429
	32	205/207-298/304-386/419-184/204-154/150-441/429
	33	205/207-298/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	34	205/207-298/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	35	205/207-304/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	36	205/207-304/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	37	215/215-298/304-386/419-184/204-154/150-426/429
	38	215/215-298/304-386/419-184/204-154/150-441/429
39	215/215-298/272-386/419-184/204-154/150-426/429	

	40	215/215-298/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	41	215/215-304/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	42	215/215-304/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	43	215/207-298/304-386/419-184/204-154/150-426/429
	44	215/207-298/304-386/419-184/204-154/150-441/429
	45	215/207-298/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	46	215/207-298/272-386/419-184/204-154/150-441/429
	47	215/207-304/272-386/419-184/204-154/150-426/429
	48	215/207-304/272-386/419-184/204-154/150-441/429
		Teg7- Teg10- Teg13- Teg19- Teg20- Smer23
13	1	223/227-298/300-386/386-184/184-150/146-400/410
	2	223/227-298/272-386/386-184/184-150/146-400/410
	3	223/227-298/300-386/419-184/184-150/146-400/410
	4	223/227-298/272-386/419-184/184-150/146-400/410
	5	223/227-298/300-386/386-184/200-150/146-400/410
	6	223/227-298/272-386/386-184/200-150/146-400/410
	7	223/227-298/300-386/419-184/200-150/146-400/410
	8	223/227-298/272-386/419-184/200-150/146-400/410
	9	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-400/410
	10	223/227-298/272-386/386-184/204-150/146-400/410
	11	223/227-298/300-386/419-184/204-150/146-400/410
	12	223/227-298/272-386/419-184/204-150/146-400/410
	13	223/227-298/300-386/386-184/184-150/146-406/410
	14	223/227-298/272-386/386-184/184-150/146-406/410
	15	223/227-298/300-386/419-184/184-150/146-406/410
	16	223/227-298/272-386/419-184/184-150/146-406/410
	17	223/227-298/300-386/386-184/200-150/146-406/410
	18	223/227-298/272-386/386-184/200-150/146-406/410
	19	223/227-298/300-386/419-184/200-150/146-406/410
	20	223/227-298/272-386/419-184/200-150/146-406/410
	21	223/227-298/300-386/386-184/204-150/146-406/410
	22	223/227-298/272-386/386-184/204-150/146-406/410
	23	223/227-298/300-386/419-184/204-150/146-406/410
	24	223/227-298/272-386/419-184/204-150/146-406/410
		Teg7- Teg10- Teg13- Teg19- Teg20- Smer159
16	1	205/207-298/304-386/386-184/204-150/154-447/444
	2	205/207-298/274-386/386-184/204-150/154-447/444
	3	205/207-298/304-386/419-184/204-150/154-447/444
	4	205/207-298/274-386/419-184/204-150/154-447/444
	5	205/215-298/304-386/386-184/204-150/154-447/444
	6	205/215-298/274-386/386-184/204-150/154-447/444
	7	205/215-298/304-386/419-184/204-150/154-447/444
	8	205/215-298/274-386/419-184/204-150/154-447/444
	9	205/207-298/304-386/386-184/204-154/154-447/444
	10	205/207-298/274-386/386-184/204-154/154-447/444
	11	205/207-298/304-386/419-184/204-154/154-447/444
	12	205/207-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444
	13	205/215-298/304-386/386-184/204-154/154-447/444
	14	205/215-298/274-386/386-184/204-154/154-447/444
	15	205/215-298/304-386/419-184/204-154/154-447/444
	16	205/215-298/274-386/419-184/204-154/154-447/444

		Teg7- Teg10- Teg13- Teg19- Teg20- Smer23- Smer159
17	1	213/213-272/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	2	213/213-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	3	213/213-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	4	213/213-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	5	213/217-272/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	6	213/217-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	7	213/217-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	8	213/217-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	9	213/215-272/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	10	213/215-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	11	213/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	12	213/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	13	217/215-272/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	14	217/215-272/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	15	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/400-435/438
	16	217/215-274/298-386/386-184/204-150/150-400/406-435/438
	17	213/213-272/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	18	213/213-272/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	19	213/213-274/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	20	213/213-274/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	21	213/217-272/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	22	213/217-272/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	23	213/217-274/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	24	213/217-274/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	25	213/215-272/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	26	213/215-272/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	27	213/215-274/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	28	213/215-274/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	29	217/215-272/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	30	217/215-272/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
	31	217/215-274/298-386/386-184/204-150/154-400/400-435/438
	32	217/215-274/298-386/386-184/204-150/154-400/406-435/438
39		Teg7- Teg10- Teg13- Teg19- Teg20- Smer23- Smer159
	1	207/221-272/298-386/386-184/184-150/150-400/410-408/435
	2	207/221-298/304-386/386-184/184-150/150-400/410-408/435
	3	207/221-272/298-386/386-184/204-150/150-400/410-408/435
	4	207/221-298/304-386/386-184/204-150/150-400/410-408/435
	5	207/221-272/298-386/386-184/184-150/154-400/410-408/435
	6	207/221-298/304-386/386-184/184-150/154-400/410-408/435
	7	207/221-272/298-386/386-184/204-150/154-400/410-408/435
8	207/221-298/304-386/386-184/204-150/154-400/410-408/435	

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] RM Lima dos Santos (2007) Estudios evolutivos em espécies de lagartos da Família Teiidae (Squamata), com base em dados citogenéticos e moleculares. Tese (Doutorado). Instituto de Biociencias da Universidad de Sao Paulo. Departamento de Biología e Genética evolutiva.
- [2] DB Tucker, GR Colli, LG Giugliano, SB Hedges, CR Hendry, EM Lemmon, AR Lemmon, JW Sites Jr, RA Pyron (2016) Methodological congruence in phylogenomic analyses with morphological support for teiid lizards (Sauria: Teiidae). *Mol Phylogenet Evol* 103: 75-84.
- [3] LA Fitzgerald, JA Cook, AL Aquino (1999) Molecular Phylogenetics and Conservation of *Tupinambis* (Sauria: Teiidae). *Copeia* 1999(4): 894-905.
- [4] CP Basso, GM Perez Camargo, CM Vieites (2005) Estado actual del marco legal argentino para la caza, producción y comercialización del Lagarto overo (*Tupinambis spp.*). *InVet* 7(1): 147-162.
- [5] MB Harvey, GN Ugueto, RL Gutberlet Jr (2012) Review of teiid morphology with a revised taxonomy and phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata). *Zootaxa* 3459 (1): 1-156.
- [6] JC Murphy, MJ Jowers, RM Lehtinen, SP Charles, GR Colli, AK Peres Jr, CR Hendry, RA Pyron (2016) Cryptic, sympatric diversity in tegu lizards of the *Tupinambis teguixin* Group (Squamata, Sauria, Teiidae) and the description of three new species. *PloS One* 11(8): e0158542.
- [7] AL Cabrera (1971) Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14 (1-2): 1-42.
- [8] RN Burkart, O Bárbaro, RO Sanchez, DA Gomez (1999) Ecorregiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales y Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina. p. 1-43.
- [9] G Cardozo, S Naretto, M Zak, M Chiaraviglio (2012), Chapter 7. The role of landscape in contact zones of sister species of lizards, En: Perspectives on nature conservation – patterns, pressures and prospects. (Ed: J Tiefenbacher), IntechOpen, p. 161–176.
- [10] I Cabaña, M Chiaraviglio, V Di Cola, A Guisan, O Broennimann, CN Gardenal, PC Rivera (2020) Hybridization and hybrid zone stability between two lizards explained by population genetics and niche quantification. *Zool J Linn Soc* 2(190): 757–769.
- [11] N Scott, N Pelegrin, R Montero, F Kacoliris, L Fitzgerald, S Carreira, P Cacciali, J Moravec, DF Cisneros-Heredia, J Aparicio, TCS Avila-Pires (2016) *Salvator merianae*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T178340A61322552. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T178340A61322552.en>. Último acceso: 16 de noviembre de 2020.
- [12] LA Fitzgerald (1992) La historia natural de *Tupinambis*. *Rev UNA, Univ Nac Asunción, Paraguay* 3(3): 71-72.

- [13] MC Kiefer, I Sazima (2002) Diet of juvenile tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in southeastern Brazil. *Amphib Reptil* 23(1):105-108.
- [14] Ministerio de ambiente y Desarrollo sostenible (2020). Conservación de la biodiversidad. Fauna silvestre en proyectos de uso sostenible. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/ambiente>. Último acceso: 22 de octubre de 2020.
- [15] AC Turchetto-Zolet, F Pinheiro, F Salgueiro, C Palma-Silva (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Ecol* 22(5): 1193-1213.
- [16] FP Werneck, RN Leite, SR Geurgas, MT Rodrigues (2015) Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicoduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evol Biol* 15(1): 94.
- [17] E Ortiz-Jaureguizar, GA Cladera (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *J Arid Environ* 66(3): 498–532.
- [18] J Zachos, M Pagani, L Sloan, E Thomas, K Billups (2001) Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292(5517): 686-693.
- [19] AM Albino, S Brizuela (2015) Avances en el conocimiento de los reptiles escamosos fósiles continentales de América del Sur. En: Reptiles Extintos - Volumen en Homenaje a Zulma Gasparini. (Eds: M Fernández, Y Herrera) Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina 15(1): 31–39.
- [20] S Brizuela, AM Albino (2016) First Tupinambinae teiid (Squamata, Teiidae) from the Palaeogene of South America. *Hist Biol* 28(4): 571-581.
- [21] LG Giugliano, RG Collevatti, GR Colli (2007) Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Mol Phylogenet Evol* 45(1): 168-179.
- [22] S Brizuela, A Albino (2004) The Earliest Tupinambis Teiid from South America and Its Palaeoenvironmental Significance. *J Herpetol* 38(1): 113–119.
- [23] A Albino (2011) Evolution of Squamata Reptiles in Patagonia based on the fossil record. *Biol J Linn Soc* 103(2): 441–457.
- [24] E Ortiz-Jaureguizar (1998) Paleoecología y evolución de la fauna de mamíferos de América del Sur durante la «edad de las planicies australes» (Mioceno superior-Plioceno superior). *Estud Geol* 54(3-4): 161-169.
- [25] M Donato, P Posadas, DR Miranda-Esquivel, EO Jaureguizar, G Cladera (2003) Historical biogeography of the Andean region: evidence from *Listroderina* (Coleoptera: Curculionidae: Rhytirrhini) in the context of the South American geobiotic scenario. *Biol J Linn Soc* 80(2): 339-352.

- [26] RM Hernández, TE Jordan, AD Farjat, L Echavarría, BD Idleman, JH Reynolds (2005) Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in southern Bolivia and Argentina. *J South Am Earth Sci* 19(4): 495-512.
- [27] R Pascual, P Bondesio (1982) Un roedor Cardiatheriinae (Hydrochoeridae) de la Edad Huayqueriense (Mioceno tardío) de La Pampa. Sumario de los ambientes terrestres en la Argentina durante el Mioceno. *Ameghiniana* 19(1-2): 19-35.
- [28] V Rull (2008) Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol Ecol* 17(11): 2722-2729.
- [29] MM Yoke, M Morando, LJ Avila, JW Sites (2006) Phylogeography and Genetic Structure in the *Cnemidophorus Longicauda* Complex (Squamata, Teiidae). *Herpetologica* 62(4): 420–434.
- [30] ME Fuchs, JA Johnson, DP Mindell (2012) Molecular systematics of the caracaras and allies (Falconidae: Polyborinae) inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. *Ibis* 154(3): 520-532.
- [31] TCS Avila-Pires (1995) Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zool Verh* 299(1): 1–706
- [32] WF Presch (1973) A review of the tegu, lizard genus *Tupinambis* (Sauria: Teiidae) from South America. *Copeia* 1973(4): 740–746.
- [33] C Mercolli, AA Yanosky (1994) The diet of adult *Tupinambis teguixin* (Sauria: Teiidae) in the eastern chaco of Argentina. *Herpetol J* 4: 15–19.
- [34] T Araújo-Farria (2005) Análise comportamental da preferência e consumo de rações comerciais em Teiús *Tupinambis merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata, Teiidae) mantidos em cativeiro. Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em zoología. Ilhéus, Bahia.
- [35] GR Winck, CC Blanco, SZ Cechin (2011) Population ecology of *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae): home-range, activity and space use. *Anim Biol* 61(4): 493-510.
- [36] NI Filoramo, K Schwenk (2009) The mechanism of chemical delivery to the vomeronasal organs in squamate reptiles: A comparative morphological approach. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 311A(1): 20–34.
- [37] WE Cooper (1993) Strike-induced chemosensory searching by a teiid lizard, the golden tegu (*Tupinambis nigropunctatus*). *Chemoecology* 4(2): 79-85.
- [38] ER De Castro, M Galetti (2004) Frugivory and seed dispersal by the tegu lizard *Tupinambis merianae* reptilia: Teiidae. *Pap Avulsos Zool* 44(6): 91–97.
- [39] GJ Tattersall, CA Leite, CE Sanders, V Cadena, DV Andrade, AS Abe, WK Milsom (2016) Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. *Sci Adv* 2(1): e1500951.

- [40] MG Quintana (2000) Incubación de la puesta de la ‘iguana colorada’ (*Tupinambis rufescens*, Sauria, Teiidae): evolución y consecuencias del peso inicial de los huevos. *Rev Mus Argentino Cienc Nat* 2(2): 161–169.
- [41] WH Burt (1943) Territoriality and home range concepts as applied to mammals. *J Mammal* 24(3): 346–352.
- [42] ML Bolkovic, D Ramadori (2006) Manejo de fauna silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires. p. 1-168.
- [43] A Saadoun (2007) Recursos genéticos nativos y producción de carne en sistemas de producción familiar. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, Montevideo, Uruguay, 14-16 de noviembre. p. 73-76.
- [44] GM Porini (2006) Proyecto Tupinambis. Una Propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. En: *Manejo Fauna Silvestre en la Argentina. Programas Uso Sustentable*, (Ed: ML Bolkovic, D Ramadori) p. 65–75.
- [45] LA Fitzgerald, G Porini, V Lichtschein (1994) El manejo de Tupinambis en Argentina: historia, estado actual y perspectivas futuras. *Interciencia* 19(4): 166–170.
- [46] LG Schaumburg, GL Poletta, PA Siroski, MD Mudry (2012) Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicol Environ Saf* 84: 99–103.
- [47] PA Siroski, GL Poletta, MD Mudry (2017) Chapter 11- The Lizard *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) as a Valid Indicator in Toxicological Studies. En: *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models*, (Ed: M Larramendy), p. 228–251.
- [48] I Cabaña, CN Gardenal, M Chiaraviglio, PC Rivera (2014) Natural hybridization in lizards of the genus *Tupinambis* (Teiidae) in the southernmost contact zone of their distribution range. *Ann Zool Fennici* 3(51): 340-348.
- [49] C Moritz (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst Biol* 51(2): 238–254.
- [50] RA Pyron, FT Burbrink, JJ Wiens (2013) A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolut Biol* 13(1): 1-54.
- [51] N Goicoechea, DR Frost, I De la Riva, KC Pellegrino, J Sites Jr, MT Rodrigues, JM Padial (2016) Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment. *Cladistics* 32(6): 624-671.
- [52] D Bickford, DJ Lohman, NS Sodhi, PKL Ng, R Meier, K Winker, KK Ingram, I Das (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22(3): 148-155.

- [53] JA Noriega, AM Santos, SC Aranda, J Calatayud, I de Castro, VR Espinoza, JL Hórreo, NG Medina, ML Peláez, J Hortal (2015) ¿Cuál es el alcance de la crisis de la Taxonomía? Conflictos, retos y estrategias para la construcción de una Taxonomía renovada. *Revista IDE@-SEA* 9: 1-16.
- [54] JA Peters, R Donoso-Barros (1970) Catalogue of the Neotropical Squamata. Part II. lizards and amphisbaenians. *US Natl Mus Bull* 297(3): 293.
- [55] PR Manzani, AS Abe (1997) A new species of *Tupinambis* Daudin, 1802 (Squamata, Teiidae) from central Brazil. *Boletim do Museu Nacional. Nova Série. Zoologia* 328: 1-10.
- [56] PR Manzani, AS Abe (2002) A new species of *Tupinambis* Daudin, 1803 from southeastern Brazil (Squamata, Teiidae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 60(4): 295–302.
- [57] GR Colli, AK Péres Jr., HJ da Cunha (1998) A new species of *Tupinambis* (Squamata: Teiidae) from central Brazil, with an analysis of morphological and genetic variation in the genus. *Herpetologica* 54(4): 477–492.
- [58] AK Péres Jr., GR Colli (2004) The taxonomic status of *Tupinambis rufescens* and *T. duseni* (Squamata: Teiidae), with a redescription of the two species. *Occasional Papers, Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History* 15: 1–12.
- [59] J Mallet (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20(5): 229–237.
- [60] P Amavet, JC Vilardi, E Rosso, B Saidman (2009) Genetic and morphometric variability in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), reptilia, alligatoridae. *J Exp Zool Part A Ecol Genet. Physiol* 311(4): 258–269.
- [61] AD Leaché, MS Koo, CL Spencer, TJ Papenfuss, RN Fisher, JA McGuire (2009) Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (Phrynosoma). *Proc Natl Acad Sci USA* 106(30): 12418–12423.
- [62] C Imhoff, F Giri, P Siroski, P Amavet (2016) Phenotypic variability and heritability of the cephalic region of *Caiman latirostris*. *J Morphol* 277(3): 370–378.
- [63] LR Monteiro, JAF Diniz-Filho, SF Dos Reis, ED Araujo (2002) Geometric Estimates of Heritability in Biological Shape. *Evolution* 56(3): 563–572.
- [64] DC Adams, FJ Rohlf, DE Slice (2004) Geometric morphometrics: Ten years of progress following the ‘revolution’. *Ital J Zool* 71(1): 5–16.
- [65] IMV Toro, SG Manriquez, GI Suazo (2010) Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *Int J Morphol* 28(4): 977-990.
- [66] A Kaliontzopoulou (2011) Geometric morphometrics in herpetology : modern tools for enhancing the study of morphological variation. *Basic Appl Herpetol* 25(2011): 5–32.

- [67] LR Monteiro, LC Duarte, SF Dos Reis (2003) Environmental correlates of geographical variation in skull and mandible shape of the punaré rat *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). *J. Zool London* 261(1): 47–57.
- [68] EM Myers, FJ Janzen, DC Adams, JK Tucker (2006) Quantitative Genetics of Plastron Shape in Slider Turtles (*Trachemys scripta*). *Evolution* 60(3): 563–572.
- [69] DC Adams (2011) Quantitative genetics and evolution of head shape in Plethodon salamanders. *Evol Biol* 38(3): 278.
- [70] R Sacchi, M Mangiacotti, S Scali, M Ghitti, B Bindolini, MA Zuffi (2016) Genetic and phenotypic component in head shape of common wall lizard *Podarcis muralis*. *Amphib Reptil* 37(3): 301-310.
- [71] D Navia, CBS Ferreira, AC Reis, MGC Gondim (2015) Traditional and geometric morphometrics supporting the differentiation of two new *Retracrus* (Phytoptidae) species associated with heliconias. *Exp Appl Acarol* 67(1): 87–121.
- [72] P Gaubert, PJ Taylor, CA Fernandes, MW Bruford, G Veron (2005) Patterns of cryptic hybridization revealed using an integrative approach : a case study on genetids ( Carnivora, Viverridae , *Genetta spp.*) from the southern African subregion. *Biol J Linn Soc* 86(1): 11-33.
- [73] A Lalis, A Evin, C Denys (2009) Morphological identification of sibling species : the case of West African *Mastomys* ( Rodentia : Muridae ) in sympatry. *Comptes Rendus-Biol* 332(5): 480-488.
- [74] P Fontoura, P Morais (2011) Assessment of traditional and geometric morphometrics for discriminating cryptic species of the *Pseudechiniscus suillus* complex (Tardigrada, Echiniscidae). *J Zool Syst Evol Res* 49(1): 26–33.
- [75] T Karanovic, S Lee, W Lee (2018) Instant taxonomy: Choosing adequate characters for species delimitation and description through congruence between molecular data and quantitative shape analysis. *Invertebr Syst* 32(3): 551-580.
- [76] LR Monteiro, AS Abe (1997) Allometry and morphological integration in the skull of *Tupinambis meriana* (Lacertilia: Teiidae). *Amphib Reptil* 18(4): 397–405.
- [77] AC Fabre, DV Andrade, K Huyghe, R Cornette, A Herrel (2014) Interrelationships Between Bones, Muscles, and Performance: Biting in the Lizard *Tupinambis meriana*. *Evol Biol* 41(4): 518–527.
- [78] AC Fabre, R Cornette, K Huyghe, DV Andrade, A Herrel, (2014) Linear versus geometric morphometric approaches for the analysis of head shape dimorphism in lizards. *J Morphol* 275(9): 1016–1026.
- [79] C Schlötterer (2004) The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5(1): 63–69.

- [80] A Azofeifa-Delgado (2006) Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agron Mesoam* 17(2): 221–242.
- [81] H Kirk, JR Freeland (2011) Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *Int J Mol Sci* 12(6): 3966–3988.
- [82] JR Freeland, H Kirk, S Petersen (2012) *Molecular Ecology: Second Edition*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. p. 1-458
- [83] B Rischkowsky, D Pilling (2010) Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponible en [www.fao.org/3/a-a1250s.pdf](http://www.fao.org/3/a-a1250s.pdf). Último acceso: 20 de noviembre de 2020.
- [84] KA Selkoe, RJ Toonen (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9(5): 615–629.
- [85] JA Aranguren-Méndez, R Román-Bravo, W Isea, Y Villasmil, J Jordana (2004) Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch Latinoam Prod Anim* 13(1): 30–42.
- [86] E Guichoux, L Lagache, S Wagner, P Chaumeil, P Léger, O Lepais, C Lepoittevin, T Malausa, E Revardel, F Salin, RJ Petit (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11(4): 591–611.
- [87] PM Abdul-Muneer (2014) Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genet Res Int* 2014: 1-11.
- [88] JP Wood, TS Campbell, RB Page (2015) Characterization of 14 novel microsatellite loci in the Argentine black and white tegu (*Salvator merianae*) via 454 pyrosequencing. *Amphib Repti* 36(4): 1–6.
- [89] JP Wood (2016) Insights into the introduction histories and population genetic dynamics of the Nile monitor (*Varanus niloticus*) and Argentine black and white Tegu (*Salvator merianae*) in Florida. Tesis Doctoral. University of Louisville.
- [90] GA Olson, JR Hessler, RE Faith (1975) Technics for blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab Anim Sci* 25(6): 783-786.
- [91] PS White, LD Densmore (1992) Mitochondrial DNA isolation. En: *Molecular Genetic Analysis of Populations*. (Ed: AR Hoelzel). IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford. p. 29-58.
- [92] MG Murray, WF Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8(19): 4321–4326.
- [93] PS Amavet, EL Rosso, RM Markariani, A Larriera (2007) Analysis of the population

structure of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD technique. *J Herpetol* 41(2): 294–300.

[94] GN Ojeda, PS Amavet, EC Rueda, PA Siroski (2012) DNA extraction from skins of wild (*Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) species using a novel protocol. *Genet Mol Res* 11(1): 672–678.

[95] L Espinosa Asuar (2007) Capítulo 17- Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología Molecular* (Ed: LE Eguiarte, V Souza, X Aguirre), INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México, D.F., p. 517-540.

[96] WS Martins, DCS Lucas, KF de Souza Neves, DJ Bertoli (2009) WebSat- A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics* 3(6): 282-283.

[97] S Rozen, H Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology™* (Ed: S Misener, SA Krawetz) Humana Press, Totowa p.365–386.

[98] DJ Korbie, JS Mattick (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3(9): 1452-1456.

[99] NG Crawford, J Zaldívar-Rae, C Hagen, A Schable, E Bree-Rosenblum, JA Graves, TW Reeder, MG Ritchie, T Glenn (2008) Thirteen polymorphic microsatellite DNA loci from whiptails of the genus *Aspidoscelis* (Teiidae: Squamata) and related cnemidophorine lizards. *Mol Ecol Resour* 8(1): 219–223.

[100] BJ Bassam, G Caetano-Anollés, PM Gresshoff (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196(1): 80–83.

[101] CE Holleley, PG Geerts (2009) Multiplex Manager 1.0: A cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* 46(7): 511–517.

[102] MR Forstner, SK Davis, E Arévalo (1995) Support for the hypothesis of anguimorph ancestry for the suborder Serpentes from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Mol phylogenet evol* 4(1): 93–102.

[103] C Pinho, N Ferrand, DJ Harris (2006) Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Mol Phylogenet Evol* 38(1): 266–273.

[104] S Kumar, G Stecher, K Tamura (2016) MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874.

[105] JD Thompson, DG Higgins, TJ Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673–4680.

- [106] SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403–410.
- [107] C Imhoff, E Rueda, P Amavet (2015). Marcadores microsatélites desarrollados para *Salvator merianae* aplicables a estudios genético-poblacionales. XVI Congreso Argentino de Herpetología. Tucumán, Argentina, 28 de septiembre-1 de octubre de 2015. p. 130.
- [108] L Martínez Castilla (2007) Capítulo 4- Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En: *Ecología Molecular* (Ed: LE Eguiarte, V Souza, X Aguirre), INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México, D.F., p. 87-160.
- [109] AM Vandamme (2009). Chapter 1- Basic concepts of molecular evolution. En: *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. (Ed: P Lemey, M Salemi, AM Vandamme), Cambridge University Press, p. 3-28.
- [110] Z Yang, B Rannala (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* 13(5): 303–14.
- [111] M Holder, PO Lewis (2003) Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nat. Rev Genet* 4(4): 275–284.
- [112] F Ronquist, P Van der Mark, JP Huelsenbeck (2009). Chapter 7- Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. En: *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. (Ed: P Lemey, M Salemi, AM Vandamme), Cambridge University Press, p. 210-266.
- [113] M Clement, D Posada, KA Crandall (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9(10): 1657–1659.
- [114] R Nielsen (2005) Molecular Signatures of Natural Selection. *Annu Rev Genet* 39: 197-218.
- [115] DH Huson, R Rupp, C Scornavacca (2010) Phylogenetic networks: concepts, algorithms and applications. Cambridge University Press. p 1-362
- [116] BA Schaal, KM Olsen (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proc Natl Acad Sci* 97(13): 7024-7029.
- [117] E Vázquez-Domínguez, S Castañeda-Rico, T Garrido-Garduño, TA Gutiérrez-García (2009) Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev Chil Hist Nat* 82(2): 277–297.
- [118] SYW Ho, B Shapiro (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour* 11(3): 423–434.
- [119] F Perfectti, FX Picó, JM Gómez (2009) La huella genética de la selección natural. *Rev Ecosistemas* 18(1): 10–16.
- [120] DL Hartl, AG Clark (2007) Principles of population genetics, fourth edition. (Ed: A Sinauer),

Sinauer and Associates Publishing. Sunderland MA, USA. p. 1-278.

[121] S Barahona (2017) Patrones filogeográficos de dos moluscos intermareales a lo largo de un gradiente biogeográfico en la costa norte del Perú. Tesis para optar el grado de Maestro en Cs. del Mar. Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

[122] P Lemey, D Posada (2009) Chapter 11- Basic concepts of molecular evolution. En: *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. (Ed: P Lemey, M Salemi, AM Vandamme), Cambridge University Press, p. 362-377.

[123] AJ Drummond, RR Bouckaert (2015) Bayesian evolutionary analysis with BEAST. Cambridge University Press, United Kingdom, p.1-244.

[124] MJ Landis (2017) Biogeographic dating of speciation times using paleogeographically informed processes. *Syst Biol* 66(2): 128–144.

[125] H de Rochambeau, F Fournet-Hanocq, J Vu Tien Khang (2000) Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann Zootech* 49(2): 77–93.

[126] T Garrido-Garduño, E Vázquez-Domínguez (2013) Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Rev Mex Biodivers* 84(3): 1031-1054.

[127] W Amos, J Harwood (1998) Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philos Trans R Soc London. Ser B Biol Sci* 353(1366): 177–186.

[128] A Sethuraman (2013) On inferring and interpreting genetic population structure-Applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Tesis Doctoral, Iowa State University.

[129] LE Eguiarte, E Aguirre-planter, E Scheinvar, A González (2010) Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010: 1-30.

[130] S Wright (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15(1): 323-354.

[131] PW Hedrick (2005). *Genetics of populations*, 3rd ed Boston. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, p. 1-737.

[132] D Zheng, MB Gerstein (2006) A computational approach for identifying pseudogenes in the ENCODE regions. *Genome Biol* 7(1): 1-10.

[133] EC Rouchka, IE Cha (2009) Current trends in pseudogene detection and characterization. *Curr Bioinform* 4(2): 112-119.

[134] NT Perna, TD Kocher (1996) Mitochondrial DNA: molecular fossils in the nucleus. *Curr Biol* 6(2): 128-129.

[135] A Flores-Bello (2014) Análisis de la variación genómica y la evolución del grupo FC1 de

retrovirus endógenos humanos. Tesis de Doctorado, Universidade da Coruña.

- [136] LD Hurst (2002) The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends genet* 18(9): 486-486.
- [137] D Posada, KA Crandall (2001) Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. *Syst Biol* 50(4): 580–601.
- [138] D Posada (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25(7): 1253–1256.
- [139] D Darriba, GL Taboada, R Doallo, D Posadan (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9(8): 772-772.
- [140] F Ronquist, M Teslenko, P van der Mark, DL Ayres, A Darling, S Höhna, B Larget, L Liu, MA Suchard, JP Huelsenbeck (2012) Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61(3): 539–542.
- [141] M Hasegawa, H Kishino, T Yano (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22(2): 160–174.
- [142] A Rambaut (2014) FigTree 1.4.2 software. Institute of Evolutionary Biology, Univ. Edinburgh. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Último acceso: 20 de noviembre de 2019.
- [143] JN Baskin, EE Williams (1966) The Lesser Antillean *Ameiva* (Sauria, Teiidae) re-evaluation, zoogeography and the effects of predation. *Stud Fauna Curaçao other Caribb Islands* 23(1): 144–176.
- [144] SM Funk, JE Fa (2011) Phylogeography of the endemic St. Lucia whiptail lizard *Cnemidophorus vanzoi*: conservation genetics at the species boundary. *Conserv Genet* 7(5): 651–663.
- [145] YE Tsai (2011) PhyloGeoViz: A web-based program that visualizes genetic data on maps. *Mol Ecol Resour* 11(3): 557–561.
- [146] GE Sherman, T Sutton, R Blazek, S Holl, O Dassau, B Morely, T Mitchell, L Luthman (2014) QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Disponible en <http://www.qgis.org/>. Último acceso: 15 de octubre 2018.
- [147] J Rozas (2009) DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. En: *Bioinformatics for DNA sequence analysis* (Ed: D Posada), Springer, p. 337–350.
- [148] P Librado, J Rozas (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451–1452.
- [149] L Excoffier, PE Smouse, JM Quattro (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479-491.
- [150] L Excoffier, HEL Lischer (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform

- population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10(3): 564–567.
- [151] HJ Bandelt, P Forster, A Röhl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1): 37–48.
- [152] M Nei, T Gojobori (1986) Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3(5): 418–426.
- [153] TH Jukes, CR Cantor (1969) Evolution of protein molecules. En: Mammalian Protein Metabolism, (Ed: HN Munro), Academic Press, New York, U.S.A, p. 21–123.
- [154] M Kimura (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2): 111–120.
- [155] JLC Gravenhorst (1838) Beiträge zur genauern Kenntniss einiger Eidechsen-gattungen. *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldina-Carolinae Germinicae Naturae Curiosorum* 18(2): 712–784.
- [156] Y Kumazawa (2004) A nearly complete mitochondrial DNA sequence of the spotted false monitor, *Callotistes maculatus*. Disponible en GenBank: [www.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB176924.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB176924.1) Último acceso: 4 de diciembre de 2019.
- [157] A Gols Ripoll, EA Herrera, J Arrivillaga (2015) Genetic structure of *Tupinambis teguixin* (Squamata: Teiidae), with emphasis on Venezuelan populations. *Rev Biol Trop* 63(4): 1235–1249.
- [158] KCM Pellegrino, MT Rodrigues, Y Yonenaga-Yassuda, JW Sites Jr (2001) A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biol J Linn Soc* 74(3): 315–338.
- [159] BP Noonan, JB Pramuk, RL Bezy, EA Sinclair, K de Queiroz, JW Sites Jr. (2013) Phylogenetic relationships within the lizard clade Xantusiidae: using trees and divergence times to address evolutionary questions at multiple levels. *Mol Phylogenet Evol* 69(1): 109–122.
- [160] AJ Drummond, MA Suchard, D Xie, A Rambaut (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29(8): 1969–1973.
- [161] SH Eo, JA Dewoody (2010) Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proc R Soc B Biol Sci* 277(1700): 3587–3592.
- [162] ME Gifford, A Larson (2008) In situ genetic differentiation in a Hispaniolan lizard (*Ameiva chrysoleama*): A multilocus perspective. *Mol Phylogenet Evol* 49(1): 277–291.
- [163] A Rambaut, M Suchard, W Xie, A Drummond (2014) Tracer v. 1.6: MCMC trace analysis package. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK.
- [164] AJ Drummond, A Rambaut, B Shapiro, OG Pybus (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22(5): 1185–1192.
- [165] RSC Cooke, TC Gilbert, P Riordan, D Mallon (2018) Improving generation length estimates

for the IUCN Red List. *PloS One* 13(1): e0191770.

[166] SYW Ho, MJ Phillips, A Cooper, AJ Drummond (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol Biol Evol* 22(7): 1561–1568.

[167] SY Ho, U Saarma, R Barnett, J Haile, B Shapiro (2008). The effect of inappropriate calibration: three case studies in molecular ecology. *PLoS One* 3(2): e1615.

[168] F Tajima (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123(3): 585-595.

[169] YX Fu (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2): 915–925.

[170] JM Rumbo (2016). Análisis genético de *Donax vittatus* mediante marcadores moleculares. Tesis de grado. Universidad da Coruña.

[171] AR Rogers, H Harpending (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9(3): 552-569.

[172] HC Harpending (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66(4): 591–600.

[173] WS Grant (2015) Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *J Hered* 106(4): 333–346.

[174] JH Gillespie (2000) Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics* 155(2): 909-919.

[175] E Bazin, S Glémin, N Galtier (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312(5773): 570–571.

[176] N Galtier, B Nabholz, S Glémin, GDD Hurst (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol ecol* 18(22): 4541-4550.

[177] JE McCormack, J Heled, KS Delaney, AT Peterson, LL Knowles (2011) Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* jays. *Evol Int J Org Evol* 65(1): 184-202.

[178] K Angelis, M Dos Reis (2015) The impact of ancestral population size and incomplete lineage sorting on Bayesian estimation of species divergence times. *Curr Zool* 61(5): 874-885

[179] B Fang, J Merilä, M Matschiner, P Momigliano (2020) Estimating uncertainty in divergence times among three-spined stickleback clades using the multispecies coalescent. *Mol Phylogenet Evol* 142(106646): 1-5.

[180] OE Donadío (1984) Los lacertilios fósiles de la Provincia de Córdoba (Sauria, Teiidae) y sus implicancias paleoambientales. *III Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía*, p. 217–223.

- [181] JM Cei, JA Scolaro (1982) A population of *Tupinambis* from northern Patagonia South of the Rio Negro, Argentina. *Herpetol Rev* 13(1): 26-29.
- [182] CE Burt, MD Burt (1931) South American lizards in the collection of the American Museum of Natural History. *Bull Am Mus Nat Hist* 61(7): 227-395.
- [183] VJ Fulfaro (1996) Geología del Paraguay Oriental. En: Magmatismo Alcalino en Paraguay Central-Oriental Relaciones con Magmatismo Coeval en Brasil. (Ed: Comin-Chiaramonti P, Gomes CB) Edusp/Fapesp, p. 17-29.
- [184] LJ Oakley, DE Prado (2011) El dominio de los bosques secos estacionales neotropicales y la presencia del arco Pleistocénico en la República del Paraguay. *Rojasiana*, 10(1): 55-75.
- [185] ME Quattrocchio, AM Borromei, CM Deschamps, SC Grill, CA Zavala (2008) Landscape evolution and climate changes in the Late Pleistocene–Holocene, southern Pampa (Argentina): evidence from palynology, mammals and sedimentology. *Quat Int* 181(1): 123-138.
- [186] FP Werneck (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quat Sci Rev* 30(13-14): 1630-1648.
- [187] R Brooker (2019) Concepts of Genetics, third edition. McGraw-Hill Education, New York. p. 1-608.
- [188] EF Herrera-Paz (2013) La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Rev Med Hond* 81(1): 40-45.
- [189] A Barbadilla (2012) Genética de Poblaciones. Universidad Autónoma de Barcelona. Disponible en: <http://biologia.uab.es/divulgacio/genpob>. Ultimo acceso: 15 de abril de 2021.
- [190] M Slatkin (1994) Gene flow and population structure. En: *Ecological genetics*. (Ed: LA Real), Princeton, Princeton University Press. p. 3–17.
- [191] R Frankham, SEJD Ballou, DA Briscoe, JD Ballou (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge university press. p. 1-607
- [192] ST Kalinowski (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv genet* 5(4): 539-543.
- [193] E Aguirre-Planter (2007) Capítulo 2- Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: *Ecología Molecular* (Ed: LE Eguiarte, V Souza, X Aguirre), INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México, D.F., p. 49–62.
- [194] C Van Oosterhout, WF Hutchinson, DPM Wills, P Shipley (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3): 535–538.
- [195] AW Nolte, Z Gompert, CA Buerkle (2009) Variable patterns of introgression in two sculpin hybrid zones suggest that genomic isolation differs among populations. *Mol Ecol* 18(12): 2615–2627.

- [196] JK Pritchard, M Stephens, P Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- [197] L Porras-Hurtado, Y Ruiz, C Santos, C Phillips, Á Carracedo, M Lareu (2013) An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Front Genet* 4: 1-13.
- [198] DA Earl, M Bridgett (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv genet resour* 4(2): 359-361.
- [199] G Evanno, S Regnaut, J Goudet (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14(8): 2611–2620.
- [200] M Jakobsson, NA Rosenberg (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.
- [201] R Peakall, PE Smouse (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1): 288–295.
- [202] N Mantel (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27(2 Part 1):209-220.
- [203] MP Miller (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96(6): 722-724.
- [204] M Vellend M (2005) Species diversity and genetic diversity: parallel processes and correlated patterns. *Am Nat* 166(2): 199-215.
- [205] NR Biasatti, JC Rozzatti, B Fandiño, A Pautaso, E Mosso, G Marteleur, N Algarañaz, A Giraud, C Chiarulli, M Romano, P Ramírez Llorens, L Vallejos (2016) Las ecoregiones, su conservación y las Áreas Naturales Protegidas de la provincia de Santa Fe. Ministerio de Medio Ambiente, Santa Fe, p. 1-244.
- [206] M Olsson, E Wapstra, T Schwartz, T Madsen, B Ujvari, T Uller (2011) In hot pursuit: Fluctuating mating system and sexual selection in sand lizards. *Evol Int J Org Evol* 65(2): 574–583.
- [207] M Cuadrado (2002) Sistemas de apareamiento en reptiles: una revisión. *Rev Española Herpetol* 2002: 61–69.
- [208] AG Jones, CM Small, KA Paczolt, NL Ratterman (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol Ecol Resour* 10(1): 6–30.
- [209] T Uller, M Olsson (2008) Multiple paternity in reptiles: Patterns and processes. *Mol Ecol* 17(11): 2566–2580.
- [210] S Naretto, G Cardozo, CS Blengini, M Chiaraviglio (2015) Importance of reproductive biology of a harvest lizard, *Tupinambis merianae*, for the management of commercial harvesting.

*Wildl Res* 42(8): 697–704.

[211] A Herrel, DV Andrade, JE De Carvalho, A Brito, A Abe, C Navas (2009) Aggressive behavior and performance in the tegu lizard *Tupinambis meriana*. *Physiol Biochem Zool* 82(6): 680–685.

[212] ME Manes, MA Ibañez, A Manlla (2003) Factores físicos y conductas de nidificación de lagartos *Tupinambis meriana* en cautiverio. *Rev Arg Prod Anim* 23(2): 119–126.

[213] LO Cifuentes, EH Martínez, MP Acuña, HG Jonquera (2006) Probability of exclusion in paternity testing: Time to reassess. *J Forensic Sci* 51(2): 349–350.

[214] AM Sifuentes-Rincón, GM Parra-Bracamonte, XF de la Rosa-Reyna (2006) Importancia de las pruebas de paternidad basadas en microsatélites para la evaluación genética de ganado de carne en empadre múltiple. *Rev Mex Ciencias Pecu* 44(3): 389–398.

[215] Campos, J., Vargas, B., Camacho, J. & Cruz, A. (2018) Pruebas de identidad y paternidad en ganado brahman registrado de Costa Rica. *Agron. Costarric.* 42(1), 49–62.

[216] EM Myers, KR Zamudio (2004) Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: The effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Mol Ecol* 13(7): 1951–1963.

[217] AG Jones (2005) GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol Ecol Notes* 5(3): 708–711.

[218] AG Jones (2005). GERUD2.0 and GERUDsim2.0 – Programs for the reconstruction of parental genotypes from multi-locus progeny array data. En <https://github.com/JonesLabTAMU/Gerud2/Manual>. Último acceso: 15 de abril de 2020.

[219] M Manes, T Noriega, F Campos Casal, S Apichela (2007) Ovarian changes during the reproductive cycle of the *Tupinambis meriana* lizard raised in a temperate environment. *Cuad Herpetol* 21(1): 21–29.

[220] MG Valdez, S Chamut, GV Jaen, O Arce, M Manes (2011) Dynamics of ovarian follicles in *Tupinambis meriana* lizards. *Acta Herpetol* 6(2): 303–313.

[221] S Chamut, GA Jahn, O Arce, M Manes (2012) Testosterone and reproductive activity in the male Tegú Lizard, *Tupinambis meriana*. *Herpetol Conserv Biol* 7(3): 299–305.

[222] GN Ojeda, PS Amavet, EC Rueda, PA Siroski, A Larriera (2017) Mating system of *Caiman yacare* (Reptilia: Alligatoridae) described from microsatellite genotypes. *J Hered* 108(2): 135–141.

[223] S Naretto, CS Blengini, G Cardozo, M Chiaraviglio (2016) Pre- and Postcopulatory Traits of *Salvator* Male Lizards in Allopatry and Sympatry. *Scientifica* 2016: 1–9.

[224] CS Blengini, S Naretto, G Cardozo, LC Giojalas, M Chiaraviglio (2016) Relationship between pre- and post-copulatory traits in *Salvator rufescens* (Squamata: Teiidae). *Biol J Linn Soc*

119(4): 932–942.

[225] FL Bookstein (1991) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

[226] IL Dryden, KV Mardia (1998) *Statistical shape analysis: Wiley series in probability and statistics*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

[227] DG Kendall (1977) The diffusion of shape. *J Appl Probab* 9(3): 428-430.

[228] FJ Rohlf, LF Marcus (1993) A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* 8(4): 129-132.

[229] S Torcida, SI Perez (2012) Análisis de Procrustes y el estudio de la variación morfológica. *Rev argentina Antropol biológica* 14(1): 131-141.

[230] DE Slice (2006) *Modern morphometrics in physical anthropology*. Springer Science & Business Media, New York, p. 1-382.

[231] FC Barros, A Herrel, T Kohlsdorf (2011) Head shape evolution in Gymnophthalmidae: does habitat use constrain the evolution of cranial design in fossorial lizards? *J Evol Biol* 24(11): 2423-2433.

[232] AT Laugen, A Laurila, K Räsänen, J Merilä (2003) Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates—evidence for local adaptation. *J Evol Biol* 16(5), 996-1005.

[233] M Medina, J Gutierrez, A Scolaro, N Ibarzüengoytía (2009) Thermal responses to environmental constraints in two populations of the oviparous lizard *Liolaemus bibronii* in Patagonia, Argentina. *J Therm Biol* 34(1): 32-40.

[234] GC Packard, MJ Packard (1988) The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. En: *Biology of the Reptilia. Vol. 16. Ecology B. Defense and life history*. (Ed: C Gans, RB Huey). Alan R Liss, Inc., New York. p. 523-605.

[235] G Arnqvist, F Johansson (1998). Ontogenetic reaction norms of predator-induced defensive morphology in dragonfly larvae. *Evolution* 79(6): 1847–1858.

[236] CT Stayton (2005) Morphological evolution of the lizard skull: a geometric morphometrics survey. *J Morphol* 263(1): 47-59.

[237] A Kaliontzopoulou, MA Carretero, GA Llorente (2008) Head shape allometry and proximate causes of head sexual dimorphism in *Podarcis* lizards: Joining linear and geometric morphometrics. *Biol J Linn Soc* 93(1): 111–124.

[238] E Bruner, D Costantini, A Fanfani, G Dell’Omo (2005) Morphological variation and sexual dimorphism of the cephalic scales in *Lacerta bilineata*. *Acta Zool* 86(4): 245-254.

[239] A Kaliontzopoulou, MA Carretero, GA Llorente (2007) Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *J Morphol* 268(2):

152-165.

- [240] MM Lazić, MA Carretero, J Crnobrnja-Isailović, A Kaliontzopoulou (2015) Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: an integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in lizard head shape. *Am Nat* 185(1): 44-58.
- [241] DS Falconer, TFC Mackay (1996) Introduction to Quantitative Genetics, fourth edition. Wiley & Sons, Inc. Essex, England, p. 1-464.
- [242] J Chaves-Campos, LM Coghill, MA Al-Salamah, TJ DeWitt, SG Johnson (2012) Field heritabilities and lack of correlation of snail shell form and anti-predator function estimated using Bayesian and maximum likelihood methods. *Evol Ecol Res* 14(6): 743-755.
- [243] LR Monteiro (1999) Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Syst Biol* 48(1):192–199.
- [244] E Bruner, D Costantini (2007) Head morphological variation in *Podarcis muralis* and *Podarcis sicula*: a landmark-based approach. *Amphib Reptil* 28(4): 566-573.
- [245] K Huyghe, A Herrel, D Adriaens, Z Tadić, R Van Damme (2009) It is all in the head: morphological basis for differences in bite force among colour morphs of the Dalmatian wall lizard. *Biol J Linn Soc* 96(1): 13-22.
- [246] A Kaliontzopoulou, MA Carretero, GA Llorente (2010) Intraspecific ecomorphological variation: Linear and geometric morphometrics reveal habitat-related patterns within *Podarcis bocagei* wall lizards. *J Evol Biol* 23(6): 1234–1244.
- [247] M Zelditch, D Swiderski, DH Sheets, W Fink (2004) Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer: Elsevier Academic Press. Waltham, MA, p. 1-407
- [248] FJ Rohlf (2008) TpsUtil, ver. 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.
- [249] FJ Rohlf (2015) Tps Software Series. *Hystrix* 26(1): 9-12.
- [250] F Rohlf (2007) TpsRelw version 1.45. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook.
- [251] CP Klingenberg (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11(2): 353-357.
- [252] CP Klingenberg, GS McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52(5): 1363– 1375.
- [253] CP Klingenberg, M Barluenga, A Meyer (2002) Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56(10): 1909–192.
- [254] FJ Rohlf, D Slice (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition

of landmarks. *Syst Biol* 39(1): 40–59.

[255] CP Klingenberg (1996) Multivariate allometry. En *Advances in morphometrics*. Springer, Boston, MA, p. 23-49.

[256] AG Drake, CP Klingenberg (2008) The pace of morphological change: Historical transformation of skull shape in St. Bernard dogs. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 275(1630): 71–76.

[257] FL Bookstein (1986) Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Stat Sci* 1(2): 181-242.

[258] SIGA-INTA (2016) Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Disponible en [www.siga2.inta.gov.ar](http://www.siga2.inta.gov.ar). Último acceso: 15 de octubre de 2016.

[259] DC Adams, FJ Rohlf (2000) Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proc Natl Acad Sci* 97(8): 4106-4111.

[260] DE Slice (2007) Geometric morphometrics. *Annu Rev Anthropol* 36: 261-281.

[261] SDS Ramos, RSJ Liow (2012) Discriminant Function Analysis. En *The Encyclopedia of Applied Linguistics*. (Ed: CA Chapelle), John Wiley and Sons, Inc.

[262] CP Klingenberg (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. En *Developmental Instability: Causes and Consequences* (Ed: M Polak), New York: Oxford Univ. Press, p. 14–34.

[263] RC Laia, MP Pinto, VA Menezes, CFD Rocha (2015) Asymmetry in reptiles: What do we know so far? *Springer Sci Rev* 3(1): 13-26.

[264] A Cardini, JAF Diniz Filho, PD Polly, S Elton (2010) Biogeographic analysis using geometric morphometrics: clines in skull size and shape in a widespread African arboreal monkey. En *Morphometrics for nonmorphometricians*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 191-217.

[265] DA Griffith (2009). Spatial autocorrelation. En *International encyclopedia of human geography*. (Ed: R Kitchin y N Thrift), Elsevier, Oxford, p. 308-316.

[266] P Legendre, L Legendre (1998) Numerical ecology, second edition. Elsevier Science, Amsterdam, p. 1-853.

[267] P Legendre, L Legendre (2012) Numerical ecology, third edition. Elsevier Science, Amsterdam, p. 1-990.

[268] AD Gordon (2004) Evolution of body size and sexual size dimorphism in the order primates: Rensch's rule, quantitative genetics, and phylogenetic effects. Doctoral dissertation. The University of Texas at Austin.

[269] A Cardini, AU Jansson, S Elton (2007) A geometric morphometric approach to the study of ecogeographical and clinal variation in vervet monkeys. *J Biogeogr* 34(10): 1663-1678.

- [270] MN Coleman (2008) What does geometric mean, mean geometrically? Assessing the utility of geometric mean and other size variables in studies of skull allometry. *Am J Phys Anthropol* 135(4): 404-415.
- [271] CR Goodall (1991) Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J R Stat Soc B* 53(2): 285-339.
- [272] RR Sokal, FJ Rohlf (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, third edition. WH Freeman and Co, New York.
- [273] FJ Rohlf, M Corti (2000) The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Syst Biol* 49(4):740-53.
- [274] KA Metzger, A Herrel (2005) Correlations between lizard cranial shape and diet: A quantitative, phylogenetically informed analysis. *Biol J Linn Soc* 86(4): 433-466.
- [275] CF Rocha, M Van Sluys, D Vrcibradic, MC Kiefer, VA de Menezes, C da Costa Siqueira (2009) Comportamento de termorregulação em lagartos brasileiros. *Oecologia Bras* 13(1): 115-131.
- [276] MA Altieri (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 74: 19-31.
- [277] LA Barraco (2015) Risk assessment of the nonnative Argentine black and white tegu, *Salvator merianae*, in South Florida. *Ecosystems* 7(8): 437-444.
- [278] DI Bolnick, R Svanbäck, MS Araújo, L Persson (2007) Comparative support for the niche variation hypothesis that more generalized populations also are more heterogeneous. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(24): 10075-10079.
- [279] MA McPeck, RD Holt (1992) The evolution of dispersal in spatially and temporally varying environments. *Am Nat* 140(6): 1010-1027.
- [280] D Verwajen, R van Damme, A Herrel (2002) Relationships between head size, bite force, prey handling efficiency and diet in two sympatric lacertid lizards. *Funct Ecol* 16(6): 842-850.
- [281] LA González, H López-Rojas, A Bonilla-Rivero, A Prieto, J Velásquez (2007) Variación morfológica de la región cefálica del lagarto *Ameiva ameiva* (Linnaeus 1758) (Sauria: Teiidae) en un bosque húmedo del Parque Nacional EL Avila, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* 19(2): 130-136.
- [282] CG Longson, KM Hare, CH Daugherty (2007) Fluctuating asymmetry does not reflect environmental stress during incubation in an oviparous lizard. *New Zeal J Zool* 34(2): 91-96.
- [283] N Cadée (2000) Genetic and environmental effects on morphology and fluctuating asymmetry in nestling barn swallows. *J Evol Biol* 13(3): 359-370.
- [284] G Herczeg, K Szabó, Z Korsós (2005) Asymmetry and population characteristics in dice snakes (*Natrix tessellata*): an interpopulation comparison. *Amphib Reptil* 26(3): 422-426.

- [285] JC Tull, PF Brussard (2007) Fluctuating asymmetry as an indicator of environmental stress from off-highway vehicles. *J Wildl Manage* 71(6): 1944–1948.
- [286] M Bellaagh, E Lazányi, Z Korsós (2010) Calculation of fluctuating asymmetry of the biggest Caspian whipsnake population in Hungary compared to a common snake species. *Biologia (Bratisl)* 65(1): 140–144.
- [287] G Velo-Antón, CG Becker, A Cordero-Rivera (2011) Turtle carapace anomalies: The roles of genetic diversity and environment. *PLoS One* 6 (4): e18714.
- [288] F Braña, X Ji (2000) Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *J Exp Zool* 286(4): 422–433.
- [289] DT Booth (2006) Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. *Physiol Biochem Zool* 79(2): 274-281.
- [290] DA Warner, R Shine (2007) Fitness of juvenile lizards depends on seasonal timing of hatching, not offspring body size. *Oecologia* 154(1): 65-73.
- [291] CI Piña, A Larriera, M Medina, GJ Webb (2007) Effects of incubation temperature on the size of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) at hatching and after one year. *J Herpetol* 41(2): 205-210.
- [292] S Lanfri, V Di Cola, S Naretto, M Chiaraviglio, G Cardozo (2013) Understanding the ecological niche to elucidate spatial strategies of the southernmost *Tupinambis* lizards. *Amphib Reptil* 34(4): 551-565.
- [293] RAR Padrón, P Cánepa, M Burgos, GE Martinol (2017) Necesidades hídricas y programación de riego en los cultivos de maíz, soya y sorgo en la localidad de Salto, Uruguay. *Acta Iguazu* 6(1): 23-32.
- [294] M Al-Hashem, PF Brain (2009) Effects of oil pollution on body size and weight of the sand lizard *Acanthodactylus scutellatus* at the Greater Al-Burgan oil field in Kuwait. *Res J Environ Toxicol* 3(1): 56-59.
- [295] Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (2007). Primer inventario nacional de bosques nativos. Inventario de campo de la región espinal distritos Caldén y Ñandubay: informe regional espinal, segunda etapa, primera edición. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Buenos Aires. p. 1-154.
- [296] Ministerio de ambiente y Desarrollo sostenible (2021). Parques Nacionales. Región Centro. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/parquesnacionales/islasdesantafe/biodiversidad>. Último acceso: 23 de julio de 2021.
- [297] CI Piña, A Larriera, P Siroski, LM Verdade (2007) Cranial sexual discrimination in hatchling

broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Iheringia Série Zool* 97(1): 17–20.

[298] A Herrel, V Schaerlaeken, JJ Meyers, KA Metzger, CF Ross (2007) The evolution of cranial design and performance in squamates: consequences of skull-bone reduction on feeding behavior. *Integr Comp Biol* 47(1): 107-117.

[299] R Lande (1979) Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33(1): 402-416.

[300] E Crispo, JD Dibattista, C Correa, X Thibert-planté, AE Mckellar, AK Schwartz, D Berner, LF De León, AP Hendry (2010) The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evol Ecol Res* 12(1): 47–66.