PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FILOGEOGRAFÍA COMPARATIVA DE CINCO TAXONES DE FELINOS NEOTROPICALES (JAGUAR, *Panthera onca*; JAGUARUNDI, *Puma yagouaroundi*; OCELOTE, *Leopardus pardalis*; MARGAY, *Leopardus wiedii* y EL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS; FELIDAE, CARNIVORA, MAMMALIA) MEDIANTE ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL.

MYREYA OMAYRA ZORAIDA PINEDO CASTRO

DIRECTOR: MANUEL RUIZ-GARCÍA Ph. D.

Bogotá D.C., Colombia, 2017

FILOGEOGRAFÍA COMPARATIVA DE CINCO TAXONES DE FELINOS NEOTROPICALES (JAGUAR, *Panthera onca*; JAGUARUNDI, *Puma yagouaroundi*; OCELOTE, *Leopardus pardalis*; MARGAY, *Leopardus wiedii* y EL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS; FELIDAE, CARNIVORA, MAMMALIA) MEDIANTE ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL.

MYREYA OMAYRA ZORAIDA PINEDO CASTRO

APROBADO

Manuel Ruiz García Ph. D.
Director

MARIA IGNACIA CASTILLO Ph. D.
Jurado

ROCÍO DEL P. RUEDA Z Ph. D.
Jurado

JAIRO PÉREZ-TORRES Ph. D.
Jurado

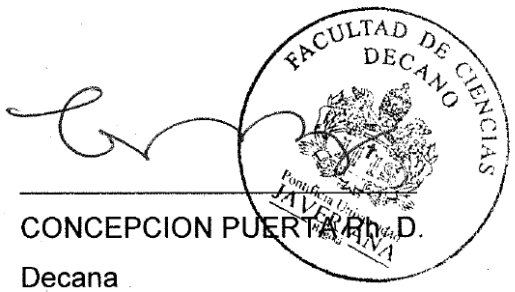
MIGUEL PINTO Ph. D.
Jurado

NICOLA SIAN FLANAGAN Ph. D.
Jurado

FILOGEOGRAFÍA COMPARATIVA DE CINCO TAXONES DE FELINOS NEOTROPICALES (JAGUAR, *Panthera onca*; JAGUARUNDI, *Puma yagouaroundi*; OCELOTE, *Leopardus pardalis*; MARGAY, *Leopardus wiedii* y EL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS; FELIDAE, CARNIVORA, MAMMALIA) MEDIANTE ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL.

MYREYA OMAYRA ZORAIDA PINEDO CASTRO

APROBADO



CONCEPCION PUERTA Ph. D.
Decana
Facultad de Ciencias

ALBA TRESPALACIOS Ph. D.
Directora de Posgrados
Facultad de Ciencias

ADVERTENCIA: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en su tesis de grado”, Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946”

A MIS PADRES, MI HERMANO Y MI TÍA QUIENES ME HAN BRINDADO APOYO DE TODAS LAS FORMAS POSIBLES.

A LOS AMIGOS QUE NUNCA FALLAN.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Manuel Ruiz – García por la confianza en mí depositada.

A la Universidad Javeriana por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A Claudia, Ingrid, Sofía, Fabio, Néstor, Diana, Lucía, Javier, Jhon y Rubén que siempre estuvieron en el momento preciso para colaborarme.

A mis compañeros de laboratorio, quienes hicieron aún más agradable las jornadas de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 16

ABSTRACT 17

INTRODUCCIÓN 3

OBJETIVO GENERAL 16

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

1. MARCO TEÓRICO 17

1.1. ESPECIES DE FELINOS NEOTROPICALES ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO 17

1.1.1. Jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). 17

1.1.2. Jaguarundi, *Puma yagouarondi* (Lacépéde 1809). 24

1.1.3. Ocelote, *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758). 27

1.1.4. Margay, *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821). 32

1.1.5. Oncilla, *Leopardus* tigrinus. (Schreber, 1775) 35

1.2. FILOGEOGRAFÍA 39

1.3. ADN MITOCONDRIAL 40

2. METODOLOGIA 41

2.1. TRABAJO DE CAMPO 41

2.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO 46

2.3. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD MOLECULAR 48

2.4. CAMBIOS DEMOGRÁFICOS 48

2.5. ANÁLISIS ESPACIAL 49

2.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO 50

3. RESULTADOS 54

3.1. ESTADÍSTICOS DE DIVERSIDAD MOLECULAR 54

3.2. POSIBLES CAMBIOS DEMOGRÁFICOS 55
3.2.1. Análisis bayesiano (Bayesian skyline plot). 55
3.2.2. Distribución mismatch. 57
3.3. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL.....57
3.3.1. Prueba de mantel logaritmizada - Patrones de aislamiento por distancia. 59
3.3.2. Análisis de autocorrelación espacial. 61
3.3.3. Geneland. 65
3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA.....71
3.4.1. Jaguar, *Panthera onca*. 71
3.4.2. Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*. 83
3.4.3. Ocelote, *Leopardus pardalis*. 94
3.4.4. Margay, *Leopardus wiedii*. 112
3.4.5. Complejo de especies de tigrillos. 122
3.5. REDES DE HAPLOTIPOS.....136
3.5.1. Jaguar, *Panthera onca.* 136
3.5.2. Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*. 138
3.5.3. Ocelote, *Leopardus pardalis*. 140
3.5.4. Margay, *Leopardus wiedii*. 143
3.5.5. Complejo de especies de tigrillos. 145
4. DISCUSIÓN 151
4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA.....151
4.2. DIVISIONES TEMPORALES EN EL SENO DE LAS ESPECIES DE FELINOS ANALIZADAS Y CAMBIOS DEMOGRÁFICOS EN LAS MISMAS...160
4.3. ESTRUCTURA ESPACIAL EN LAS ESPECIES DE FELINOS ESTUDIADAS 168
4.4. ¿EXISTE CORRESPONDENCIA ENTRE LAS SUBESPECIES MORFOLÓGICAS DESCRITAS PARA EL JAGUAR, OCELOTE, MARGAY Y JAGUARUNDI RESPECTO A LOS RESULTADOS MOLECULARES OBTENIDOS? 171

4.5. EL CASO DEL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS 179
5. CONCLUSIONES.....193
RECOMENDACIONES.....195
LITERATURA CITADA 196

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rango de distribución actual de la especie *Panthera onca* y estado de conservación..…..20

Figura 2. Rango de distribución de la especie *Puma yagouaroundi* y estado de conservación..…..26

Figura 3. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus pardalis* y estado de conservación.…..30

Figura 4. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus wiedii* y estado de conservación..…..34

Figura 5. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus tigrinus* y estado de conservación.…..37

Figura 6. “Bayesian skyline plot” (BSP) obtenido para cada una de las especies de felinos y grupo de datos trabajados. 56

Figura 7. Distribución de diferencias entre pares de secuencias bajo un modelo de expansión poblacional para cada una de las especies de felinos y grupos de datos trabajados.. 58

Figura 8. Diagramas de dispersión obtenidas para la prueba de Mantel para cada una de las especies y grupos de datos trabajados 60

Figura 9. Correlogramas para cada una de las especies y complejo de especies de tigrillos para cada grupo de datos trabajados 64

Figura 10. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Panthera onca*.....65

Figura 11. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Puma yagouaroundi* 66

Figura 12. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Leopardus pardalis*.....67

Figura 13. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Leopardus wiedii* 68

Figura 14. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos ATP8-16S del complejo de especies de tigrillos. 69

Figura 15. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos ND5 del complejo de especies de tigrillos.....70

Figura 16. Mapa de las poblaciones detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos del complejo de especies de tigrillos.....71

Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca.* Tres genes.....73

Figura 18. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Tres genes.....76

Figura 19. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca.* Mitogenomas 80

Figura 20. Árbol bayesiano para *Panthera onca.* Mitogenomas.....82

Figura 21. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi.* Tres genes..

.....85

Figura 22. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi*. Tres genes 87

Figura 23. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi.* Mitogenomas.. 90

Figura 24. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi.* Mitogenomas.....92

Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes...
.....95
Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis.* Tres genes.....101
Figura 27. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis.* Mitogenomas.
.....108
Figura 28. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis.* Mitogenomas.. 110
Figura 29. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii*. Tres genes ...114
Figura 30. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii.* Tres genes.....117
Figura 31. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii.* Mitogenomas..
.....120
Figura 32. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii.* Mitogenomas.....121
Figura 33. Árbol de máxima verosimilitud con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA 123
Figura 34. Árbol bayesiano con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA.....125
Figura 35. Árbol de máxima verosimilitud con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5.....128
Figura 36. Árbol bayesiano con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5 130
Figura 37. Árbol de máxima verosimilitud con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos mediante el análisis de mitogenomas completos 133
Figura 38. Árbol bayesiano con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos mediante el análisis de mitogenomas completos.....135

Figura 39. Red de haplotipos de *Panthera onca* mediante tres genes mitocondriales.....136

Figura 40. Red de haplotipos de *Panthera onca* mediante mitogenomas.....137

Figura 41. Red de haplotipos de *Puma yagouaroundi* mediante tres genes mitocondriales.....138

Figura 42. Red de haplotipos de *Puma yagouaroundi* mediante mitogenomas... 139

Figura 43. Red de haplotipos de *Leopardus pardalis* mediante tres genes mitocondriales.....140

Figura 44. Red de haplotipos de *Leopardus pardalis* mediante mitogenomas....142

Figura 45. Red de haplotipos de *Leopardus wiedii* mediante tres genes mitocondriales.....143

Figura 46. Red de haplotipos de *Leopardus wiedii* mediante mitogenomas. 144

Figura 47. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con los genes mitocondriales ATP8 + 16S rRNA.....145

Figura 48. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con el marcador ND5.....147

Figura 49. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con mitogenomas 148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen y número de muestras de las especies *Panthera onca, Puma yagouaroundi, Leopardus pardalis* y *Leopardus wiedii* de las cuales se obtuvieron secuencias para cada uno de los análisis en este trabajo. 43

Tabla 2. Número de muestras analizadas para el complejo de especies de *L. tigrinus*, para cada conjunto de datos 45

Tabla 3. Primers utilizados para la obtención del mitogenoma de las muestras de las especies de felinos trabajados. 47

Tabla 4. Estadísticos de diversidad genética para las cuatro especies de felinos y el complejo de especies de tigrillos trabajados, para cada agrupación de secuencias. 54

Tabla 5. Valores del estadístico r y su probabilidad para cuatro especies de felinos y para los tigrillos hibridizados con margay-ocelote mayoritariamente colombianos y por grupos de datos 57

Tabla 6. Valores de la correlación del test de Mantel entre las distancias genéticas y distancias geográficas para las cinco especies de felinos y grupos de datos trabajados 61

Tabla 7. Coeficientes de autocorrelación espacial para cinco clases de distancia y valores de probabilidad de cada correlograma global para cada especie y grupo de datos 62

Tabla 8. Tiempos de divergencia entre diferentes haplogrupos de tigrillos y otros taxones y especies del género *Leopardus*.....149

FILOGEOGRAFÍA COMPARATIVA DE CINCO TAXONES DE FELINOS NEOTROPICALES (JAGUAR, *Panthera onca*; JAGUARUNDI, *Puma yagouaroundi*; OCELOTE, *Leopardus pardalis*; MARGAY, *Leopardus wiedii* y EL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS; FELIDAE, CARNIVORA, MAMMALIA) MEDIANTE ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL

RESUMEN

Los estudios con ADN para las especies de felinos silvestres del Neotrópico se han basado en números reducidos de muestras y de marcadores moleculares, en áreas geográficas específicas y en la mayoría de los casos, con muestras de animales con orígenes geográficos inciertos. En este trabajo, se analizaron la filogeografía, sistemática molecular y algunas características de la evolución genética de cinco especies de felinos neotropicales (*Panthera onca, Puma yagouaroundi, Leopardus pardalis, Leopardus wiedii y Leopardus tigrinus*), mediante las secuencias de tres genes mitocondriales: *ATP8*, *16S rRNA* y *NADH5* y mitogenomas para un número significativo de muestras obtenidas directamente de la naturaleza.

Mediante el análisis de diversidad genética, se encontró que, para las cinco especies, los niveles son elevados. En cuatro especies, el número de acervos genéticos es menor que el de las subespecies morfológicas consideradas por los zoólogos excepto para el tigrillo. Se confirmó a *L. guttulus* como especie y se revela la existencia de dos posibles especies de tigrillos para Colombia y Ecuador. Los análisis bayesiano y distribución mismatch mostraron evidencias de que las cuatro especies de mayor porte y el complejo de especies de tigrillos, pasaron por expansiones poblacionales durante el pleistoceno lo cual significa que los mismos procesos afectaron la evolución genética de estos organismos. Además, se demuestra que el análisis de un gran número de ejemplares con la mayor diversificación geográfica posible, es necesario para detectar agrupaciones regionales de trascendencia sistemática (por ejemplo, por debajo del nivel de especie), aunque el número de marcadores sea bajo.

ABSTRACT

The DNA's studies for Neotropical wild cat species have been traditionally based on a reduced number of samples and molecular markers as well as in restricted geographical areas and, in many cases, with animals whose geographical origins are uncertain. This work analyzed the phylogeography, the molecular systematics and some traits of the evolutionary genetics of five Neotropical cat species (*Panthera onca, Puma yagouaroundi, Leopardus pardalis, Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*), by means of three mitochondrial genes (*ATP8*, *16S rRNA* and *NADH5*) and by mitogenomes for large simple sizes directly coming from wild.

The genetic diversity analyses yielded high levels for all the species studied. In four of these species, the significant number of gene pools were lower than the putative morphological subspecies traditionally recognized, with the exception of the tigrina. In this case, our study detected the posible existence of different species within the traditional tigrina. *L. guttulus* was confirmed in southern-eastern Brazil and several different species were detected in Colombia and Ecuador. The Bayesian and mismatch procedures showed evidences that all the species analyzed crossed by population expansions during the Pleistocene, which agrees quite well with the possibility that the same Pleistocene events affected in a similar way all these species. Furthermore, it was shown that large simple sizes with very diversified geographical origins are needed to detect some regional clusters of relevant systematic meaning, although the number of molecular markers should be limited.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento constante de las poblaciones humanas, el desconocimiento acerca del papel que cumplen las especies en el equilibrio de los ecosistemas, su tráfico ilegal para utilizarlas como mascotas o el uso de subproductos de las mismas (pieles, entre otros), la destrucción y/o fragmentación del hábitat ocasionada por la necesidad de ampliar áreas para cultivos, y la cacería directa son factores que han incidido significativamente en la disminución del tamaño poblacional y /o la extinción de especies silvestres (Frankham *et al*. 2010).

La presencia o ausencia de especies silvestres en los ecosistemas son un indicador del estado de conservación de los mismos, pero la presencia o ausencia de las denominadas "especies sombrilla" permiten de manera indirecta, entender el estado no solo de los ecosistemas sino de otras especies que interactúan con ellas, por ende, comparten el mismo hábitat. Los félidos, por ejemplo, se encuentran en la cima de la pirámide trófica, son considerados especies sombrilla, de manera que, al reducir sus poblaciones, o en un caso extremo extinguirse, se verá perjudicado el resto de la cadena, causando variaciones en sus poblaciones, en sus dinámicas y estructura de las mismas (Payán & Soto 2012). Los félidos han sido calificados también como especies focales, ya que se consideran amenazados, varias de sus poblaciones se encuentran en riesgo de extinción, presentan rangos de distribución restringida, presentan altos requerimientos de presas, necesitan de grandes áreas y ecosistemas bien conservados, de manera que han sido utilizados en planes de conservación y manejo de ecosistemas (Avise & Hamrick 1996). Su presencia en los ecosistemas indica buenas condiciones de los mismos y en las áreas protegidas, el resultado de acciones de conservación. No existen estudios suficientes sobre la biología de las especies de félidos, haciendo prioritaria y urgente la investigación en estos taxones.

Uno de los factores que hacen que una estrategia de conservación sea exitosa o no, se basa en la clasificación sistemática de las especies amenazadas y de sus poblaciones diferenciadas por debajo del nivel de especies (subespecies o unidades evolutivas significativas – ESUs) (Moritz 1994). La incertidumbre sobre las unidades de conservación guía tanto a la confusión en el establecimiento de planes de manejo como a errores en el establecimiento de prioridades (O'Brien 1994).

La taxonomía en la familia Felidae ha sufrido varios cambios a través de la historia principalmente, a lo que se refiere a géneros y especies. Aunque actualmente se reconocen dos subfamilias (Felinae y Pantherinae), 14 géneros y 38 especies (Grisolia *et al.* 2012), se considera que las subespecies deben someterse a revisión ya que es la variación intraespecífica la que se encuentra más amenazada.

En la siguiente tabla se muestran cronológicamente los cambios en la taxonomía de los félidos.

Linnaeus (1758)	Nombra al género *Felis*
Kerr (1792)	Nombra al género *Lynx* a partir de caracteres morfológicos
Oken (1816)	Nombra a los géneros *Panthera*, *Tigris* y *Leo*
Gray (1821)	Divide la familia en Géneros y subgéneros
Jardine (1834)	Diferenció los géneros *Leo, Puma, Cynailurus, Lynchus* y *Felis.*
Severtzow (1857)	Dividió la familia en cinco géneros y 27 subgéneros.
Gray (1867)	Separó a los panterinos en los géneros *Uncia, Leo, Tigris y Leopardus*. Definió el género *Neofelis, Pardalina, Catolynx, Viverriceps* y *Pajeros.*
Pockok (1917)	Separó la familia en tres subfamilias: Felinae, Pantherinae y Acinonychinae.

Hemmer (1878)	Agrupó a los gatos de Suramérica en los géneros *Leopardus, Lynchailurus, Oreailurus y Oncifelis*. El género Panthera queda igual que Pockok (1917). Consideró estrechamente relacionados a *Puma concolor* con *Herpailurus yagouaroundi*
Collier & O´Brien (1985)	Primer estudio sistemático molecular en félidos, dividiéndolos en tres grupos: *Leopardus, Felis sensu stricto y Lynx*
Herrington (1986)	Sus resultados se separan fuertemente de la división propuesta por Pockok (1917)
Salles (1992)	Reconoce dos grupos: *Felis sensu estricto* y los Panterinos
Wozencraft (1993)	Reconoce tres supragéneros: Acinonychinae, Felinae y Pantherinae.
O´Brien 1996, Johnson *et al* 1996 y otros	La evolución del grupo se resuelve en tres linajes: el de los gatos suramericanos, el de los parientes cercanos al gato doméstico y el de los gatos medianos y grandes.
Mattern & McLennan (2000)	Apoyan los linajes monofiléticos tradicionales *Panthera, Lynx,* el grupo del ocelote (pequeños felinos suramericanos), puma, caracal, gato leopardo y gato doméstico

En la actualidad, se han registrado 38 especies de felinos silvestres, los cuales se encuentran en todos los continentes excepto en Australia, Nueva Guinea, Nueva Zelanda, Japón, Madagascar, Oceanía, y algunas islas del Caribe (Nowak 1999, Johnson *et al.* 2006).

La más reciente revisión de la familia Felidae en Suramérica está representada en tres linajes diferentes (Johnson *et al.* 2006): el linaje de los ocelotes, *Leopardus* (*L. pardalis, L geoffroyii, L. colocolo, L. tigrinus, L wiedii, L guigna, L. jacobitus,* y *L.*

guttulus), el linaje del puma (*P. concolor* y *P. yagouaroundi*) y el linaje de los Pantherinae con el jaguar (*Panthera onca*).

Aunque son múltiples los trabajos que se han realizado intentando resolver la sistemática y la filogenia de los félidos, son mucho más limitados los trabajos que han intentado resolver la estructura genética, filogenia, sistemática subespecífica y filogeografía en las especies de felinos neotropicales. Estos trabajos por especies han sido los siguientes, excluyendo al puma que no es objeto del presente estudio:

1. Para el jaguar, existen once trabajos publicados (Eizirik *et al.* 2001, Ruiz-García, 2001, Ruiz-García *et al.* 2003, Moreno *et al.* 2006, Ruiz-García *et al.* 2006, Soares *et al.* 2006, Ruiz-García *et al.* 2007, Eizirik *et al.* 2008, Haag *et al.* 2010, Ruiz-García *et al.* 2013 y Wultsch *et al.* 2016). El primero, con 40 individuos procedentes de zoológicos representado gran parte del área de distribución, fueron analizados con 29 microsatélites y secuencias de la región control mitocondrial (715pb) para determinar heterogeneidad genética entre diversas zonas de Latinoamérica. Hallaron el tiempo de coalescencia de los linajes del jaguar, detectaron eventos de expansión poblacional recientes y cuatro zonas parcialmente aisladas a lo largo del rango de distribución de la especie separadas por el Río Amazonas y por el Tapón del Darién. El segundo trabajo con 196 muestras de las seis especies de felinos presentes básicamente en Colombia y en países vecinos (*P. onca*: 24 muestras; además de *L. pardalis*: 68 muestras; *L. wiedii*: 12 muestras; *L. tigrinus*: 24 muestras; *P. yagouaroundi*: 16 muestras; y *P. concolor*: 52 muestras) a los que se les analizó cinco *loci* microsatélites para determinar la variabilidad genética, posible equilibrio Hardy Weinberg, posibles contracciones poblacionales y se estimó el tamaño efectivo. El tercer trabajo analizó 49 jaguares de Colombia y 16 jaguares de otros países (Guatemala, Paraguay, Perú, Bolivia y Brasil) con 18 microsatélites. Encontraron alelos privados, valores de heterogeneidad genética, valores de flujo génico entre las poblaciones. Los resultados obtenidos revelaron que las supuestas subespecies morfológicas de jaguar no se ratifican a nivel

molecular. En el cuarto trabajo se analizaron 39 jaguares, 36 yaguarundis y 18 pumas de zoológicos de Brasil mediante cuatro microsatélites. Se encontró que, aunque las tres especies se encuentran amenazadas, presentan valores altos de diversidad genética en términos de PIC (contenido de información de polimorfismos). En el quinto trabajo, con un total de 84 muestras de jaguar analizadas con 12 microsatélites, se encontraron altos niveles de diversidad genética. Las probables dos subespecies que se encuentran en Colombia (*P. o. centralis* y *P. o. onca*) exhibieron diferenciación baja, aunque significativa, y valores elevados de flujo génico entre ellas. Obtuvieron el tamaño efectivo poblacional de los jaguares en territorio colombiano y no detectaron cuellos de botella recientes en las poblaciones colombianas. En el sexto trabajo se realizó una prueba de paternidad con siete microsatélites en dos individuos de *P. onca* con el fin de detectar el individuo que asesinó a dos infantes en una población monitoreada en un Parque Nacional en el área central de Brasil. En el séptimo trabajo se caracterizaron mediante 12 microsatélites a 107 jaguares y 133 ocelotes. En el caso de los jaguares, la diversidad alélica de las muestras colombianas presentó un valor más alto que las muestras de Perú y Bolivia. Los valores de heterocigocidad esperada para los tres países analizados, fue muy similar. En cuanto a las subespecies; *P. o. onca* presentó más diversidad genética que *P. o. centralis.* Para el caso de la dinámica poblacional, el jaguar presentó evidencias de expansión. En el octavo trabajo se validaron 12 nuevos microsatélites tri/tetranucleótidos desarrollados para gatos domésticos en 23 muestras de jaguares en la región del pantanal, específivamente en el Refugio Ecológico El caimán y el Rancho San Francisco. Con estos nuevos microsatélites, calcularon el número de alelos, información de contenido polimórfico (PIC), heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He), desviaciones del equilibrio HW. No se detectaron desviaciones significativas del equilibrio H-W ni por regiones ni entre la población como un todo. La totalidad de las muestras, mostraron valores moderados a altos de diversidad genética. No se encontró soporte para diferentes subespecies morfológicas. El principal patrón que se detectó en ese trabajo fue la partición filogeográfica entre la

porción norte y sur del rango de distribución del jaguar probablemente en función del flujo génico reducido por el Río Amazonas. Se detectaron valores altos de diversidad genética y flujo génico a larga escala a lo largo del rango de distribución de la especie. Se detectaron también cuatro grupos moderadamente diferenciados que, aunque aún detectaban cierta separación por el Río Amazonas, no fueron fuertemente diferenciados por estos marcadores como si lo hicieron los marcadores mitocondriales en trabajos anteriores. El noveno trabajo presentó resultados de 13 microsatélites, con 50 muestras de jaguares provenientes de cuatro fragmentos remanentes de la ecorregión del Paraná superior (Brasil), un área fuertemente fragmentada. Encontraron valores de heterogeneidad genética entre fragmentos, algunas poblaciones mostraron pérdida de alelos, además de tamaños efectivos pequeños. Investigaron la distribución espacial de la diversidad genética, valoraron la diferenciación genética entre fragmentos y midieron la conectividad demográfica. Sus resultados indican una rápida diferenciación genética por efecto de la fragmentación y tamaños poblacionales pequeños. El décimo trabajo analizó 250 jaguares de diferentes países (Colombia, Perú, Bolivia, Brasil, Guatemala, Costa Rica, Venezuela y Paraguay) para 12 microsatélites. Una pequeña fracción de esos animales fue secuenciada para tres genes mitocondriales. La diversidad genética global con los microsatélites fue elevada. Cuando se consideró el Río Amazonas como barrera geográfica no se detectó una fuerte influencia de éste. Para el gen mitocondrial NADH5 (506 pb) y 37 jaguares, los valores de diversidad genética también fueron elevados. Consideraron también tres áreas geográficas, de las cuales, la zona amazónica colombiana y peruana presentó los valores más elevados de diversidad genética. Cuando se consideraron los grupos al norte del Río Amazonas y al sur del Río Amazonas, el lado norte presentó valores más elevados de diversidad genética que el del lado sur. En general, la diferenciación entre países fue mayor que la diferenciación entre subespecies. El decimoprimer estudio analizó la diversidad genética y estructura en 530 muestras entre Jaguares (65), pumas (54) y ocelotes (30) en Mesoamérica, mediante 14 microsatélites. Estas especies presentaron valores moderados de diversidad genética: el ocelote presentó el valor

más alto de diversidad genética, seguido por el puma y por el jaguar. Aunque dividieron las muestras en cinco regiones geográficas para el jaguar y el ocelote, los valores de diversidad no mostraron diferencias significativas; los pumas presentaron diferencias únicamente al nivel de riqueza alélica. En cuanto a la diferenciación genética encontraron valores de FST positivos (bajos y moderados) y significativos para las tres especies. Los tres tipos de análisis dieron como resultado valores bajos pero significativos de diferenciación genética para las tres especies y las regiones geográficas. Análisis de componentes principales y con los programas STRUCTURE y GENELAND, les permitió obtener información sobre las posibles agrupaciones geográficas para las tres especies.

2. Para el jaguarundi, se han publicado cinco estudios: el primero (Ruiz-García, 2001) con una pequeña muestra de 16 animales obtenidos en Colombia (*P. y. panamensis* y *P. y. melantho*), Perú, Venezuela (*P. y. yagouaroundi*) y del sur del Brasil (*P. y. eyra*) analizados con microsatélites con los cuales se encontraron valores altos de variabilidad genética, no se detectaron desviaciones del equilibrio Hardy Weinberg, ni cuellos de botella y las estimas de los tamaños poblacionales fueron elevadas. El segundo trabajo (Moreno *et al.* 2006), analizaron muestras de jaguarundi de zoológicos en Brasil mediante cuatro *loci* microsatélites obteniendo valores de PIC (contenido de información polimórfica) bastante altos indicando un alto nivel de diversidad genética de esta especie. El tercer trabajo (Monterrubio-Rico *et al.* 2012), combinando métodos de campo y genética confirmaron la presencia del jaguarundi en tres regiones del estado de Michoacán (México). Obtuvieron secuencias del gen mitocondrial Citocromo b, con las cuales detectaron dos haplotipos diferentes para estas tres regiones. El cuarto trabajo (Holbrook *et al.* 2013), encontró valores moderados de diversidad genética en las 11 muestras obtenidas en Tamaulipas (México) mediante 12 microsatélites y solo un haplotipo de ADNmt, la diversidad adaptativa en la coloración del pelaje en la que la frecuencia del alelo gris fue baja comparada con la del color rojizo y suministraron recomendaciones sobre

marcadores para estudios no invasivos. El último trabajo (Ruiz-García & Pinedo-Castro, 2013) analizó 44 jaguarundis de México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil mediante tres genes mitocondriales (ATP8, 16S rRNA y NADH5). La diversidad genética exhibió valores altos, las supuestas subespecies morfológicas presentaron valores de heterogeneidad genética muy pequeños al igual que cuando se compararon por países, en los árboles filogenéticos no se detectaron subespecies moleculares que coincidieran con las morfológicas, las redes de haplotipos y el procedimiento bayesiano revelaron tres eventos de divergencia, los cuales están asociados a cambios climáticos durante el pleistoceno. Se encontró evidencia de expansión poblacional y de contracción poblacional reciente.

3. En el caso del ocelote, ocho trabajos han sido publicados (Eizirik *et al.* 1998, Ruiz-García 2001, Grisolia *et al.* 2007, Ruiz-García *et al.* 2007, Janecka *et al.* 2007, Ruiz-García *et al.* 2013, Janecka *et al.* 2014 y Wultsch *et al.* 2016). El primero, con 39 ejemplares provenientes de una gran parte del rango de distribución y utilizando un fragmento de la región de control del ADN mitocondrial analizaron la divergencia entre *L. pardalis* y *L. wiedii*. Encontraron gran diversidad genética además de algunas particiones filogenéticas coincidentes para las dos especies. A partir de los resultados ofrecieron algunos lineamientos para la conservación de estas especies. El segundo trabajo de Ruiz-García (2001) ya fue relacionado en la parte correspondiente al jaguar. En el tercer trabajo, determinaron la diversidad genética de 148 individuos del género *Leopardus* (*L. pardalis*, *L. tigrinus* y *L. wiedii*) en cautiverio mediante cuatro microsatélites. Estimaron el número de alelos, la heterocigocidad, contenido de información polimórfica, número de alelos exclusivos y número de alelos compartidos. En el cuarto trabajo se analizó mediante 12 microsatélites, 133 ocelotes muestreados directamente en la naturaleza, representando 7 subespecies morfológicas. Se encontró valores altos de variabilidad genética, se determinaron desviaciones del equilibrio H-W por exceso de homocigotos, el

grado de heterogeneidad genética fue bajo, indicando que las supuestas subespecies (*L. p. maripensis* y *L. p aequatorialis*) en realidad serían una sola, lo cual se apoya en los niveles altos de flujo génico. No se detectó fuerte evidencia de cuellos de botella, sin embargo, si se detectó cuando se analizaron solamente las muestras de Perú. En el quinto trabajo, mediante la región control mitocondrial, se estudiaron 9 ocelotes del sur de Texas y el norte de México. Encontraron que éstos se agruparon formando un conjunto que correspondía a la subespecie *L. p. albescens* al compararlas con las secuencias obtenidas por Eizirik *et al.* (1998). En el sexto trabajo, se analizaron 294 ocelotes de gran parte del área de distribución de esta especie, mediante 10 microsatélites además de 118 cráneos para estudios biométricos. Encontraron que las subespecies morfológicas *L. p. albescens* y *L. p. pardalis* también lo son a nivel molecular, no ocurrió lo mismo para *L. p. aequatorialis, L. p. pseudopardalis, L. p. melanura,* y *L. p. steinbachi*, las cuales, proponen pertenecen a la subespecie *L. p. pseudopardalis*. Con los análisis craneométricos, detectaron que posiblemente *L. p. mitis* pertenecería al conjunto *L. p. aequatorialis*, *L. p. pseudopardalis*, *L. p. melanura*, y *L. p. steinbachi*, de ser así, la subespecie resultante sería *L. p. mitis*. En el séptimo trabajo, se estudiaron los niveles históricos de diversidad genética de ocelotes en Texas (USA) entre los años 1853 y 2005, mediante una porción de la región control mitocondrial (436 pb) y 11 *loci* microsatélites. Obtuvieron como resultado que los valores de diversidad genética son más bajos en la actualidad que los históricos para los dos tipos de marcadores, la reducción en este valor obedece principalmente a la fragmentación inducida del hábitat en el siglo XX. Proponen que la translocación de individuos entre Texas y México o viceversa, es una estrategia para mitigar la reducción en la variabilidad genética. En el octavo estudio, analizaron muestras de ocelotes de Belice con 14 *loci* microsatélites. Obtuvieron valores moderados de diversidad genética al igual que de diversidad genética y valores altos de flujo génico teniendo en cuenta tanto individuos como poblaciones. Detectaron subdivisión a escala fina causada

por la fragmentación del hábitat, la cual será más marcada en caso de no tomar acciones de conservación en esta zona.

4. Para el margay, tres trabajos han sido publicados (Eizirik *et al.* 1998, Ruiz-García 2001 y Grisolia *et al.* 2007). En el primero se analizaron 24 ejemplares representantes del rango de distribución de la especie para un fragmento de la región de control del ADN mitocondrial. Se detectaron elevadísimos niveles de variabilidad genética y una cierta estructura genética (sur de Suramérica, norte de Suramérica, oriente de Suramérica y Centroamérica) inducida por el Río Amazonas y eventos en Centroamérica. En el segundo, mediante cinco *loci* microsatélites se analizaron 12 muestras de la amazonía de Colombia (*L. w. amazonicus* y *L. w. boliviae*) en las que encontraron valores de diversidad genética altos. El tercer trabajo, con 4 *loci* microsatélites analizaron 25 muestras de *L. wiedii* obtenidas en diferentes zoológicos de Brasil. Observaron valores altos de número de alelos promedio y alelos privados al igual que valores de heterocigocidad.

5. Para el tigrillo u oncilla se han publicado pocos trabajos, el primero de Johnson *et al.* (1999) se estudiaron 32 individuos de Centroamérica (4) y del sur y centro de Brasil (28) mediante tres genes mitocondriales (ATP8, 16S rRNA y ND5). Detectaron hibridación natural entre *L. tigrinus* y *L. colocolo* en Brasil central, región en donde sus distribuciones se sobrelapan. Detectaron 9 individuos *de L. tigrinus* con mitocondrias de *L. colocolo*, tres de ellos eran machos que presentaron el haplotipo ZFY de un *L. tigrinus* del sur del Brasil, claramente diferenciado del haplotipo ZFY de *L. colocolo* por siete nucleótidos. Esto pone de manifiesto que los tres machos son híbridos de machos de *L. tigrinus* y hembras de *L. colocolo*. *L. tigrinus* formó dos agrupaciones diferenciadas correspondientes a *L. t. oncilla* (de Costa Rica) y *L. t. guttula* (del sur y centro del Brasil) con valores de distancias genéticas comparables a los valores interespecíficos entre las especies del linaje de los ocelotes. El segundo trabajo

(Trigo *et al.* 2008), con secuencias del gen mitocondrial ND5 y nueve microsatélites, detectaron y caracterizaron una zona de hibridación entre el gato de Geoffroy, *L. geoffroyi* y *L. tigrinus* en el sur del Brasil. Estas especies están bien establecidas y divergieron aproximadamente hace un millón de años, son alopátricas a lo largo de sus rangos con una estrecha zona de contacto que incluye el sur del Brasil. Detectaron también 14 individuos (más de los originarios de la zona de contacto) que exhibieron signos de introgresión genómica interespecífica de *L. geoffroyi* dentro de *L. tigrinus* del sur del Brasil con un gradiente de diferenciación de *L. geoffroyi* correlacionado con la distancia de la zona de contacto. Además, corroboraron lo encontrado por Johnson *et al.* 1999 en cuanto a la hibridación entre *L. tigrinus* del sur y centro del Brasil y *L. colocolo*, llegando a la conclusión que es una situación inusual para un mamífero, ya que *L. tigrinus* contiene introgresados linajes de ADNmt de dos distintas especies de *Leopardus*. El tercer trabajo, (Trigo *et al.* 2013) amplió el análisis de la hibridación entre *L. tigrinus* y *L. colocolo* y *L. geoffroyi*. Obtuvieron fuerte evidencia de una antigua hibridación e introgresión entre *L. colocolo* y una población al noreste del Brasil de *L. t. tigrinus*, lo que conduce a una notable discordancia cito-nuclear en ese taxón de tigrina. Por el contrario, las poblaciones de tigrina del sur de Brasil tuvieron una hibridación reciente y continua con *L. geoffroyi*, dando lugar a niveles extremos de mezcla interespecífica en su zona de contacto. Es de destacar que dos poblaciones de tigrina de Brasil aparentemente continuas (*L. t. guttulus* y *L. t. tigrinus*) no mostraron ninguna evidencia de flujo genético, lo que puede apoyar que se trate de dos especies separadas, a saber, *L. tigrinus* en el nororiente de Brasil y *L. guttulus* en el sur y centro de Brasil. Por lo tanto, concluyeron que incluso entre grupos supuestamente bien conocidos, queda mucho por aclarar en términos de delimitación a nivel de especie y la relevancia evolutiva de fuerzas como la hibridación y la introgresión genómica. Este hecho fue detectado en primer lugar por Leyhausen (1963), basado en observaciones morfológicas y de comportamiento. Igualmente, Leyhausen y Falkena (1966) detectaron cierto

grado de incompatibilidad reproductiva en la cría en cautiverio de diferentes tigrinas de diferentes partes de Brasil. El cuarto trabajo, también de Trigo *et al.* (2014), ampliaron sus análisis genético moleculares y el número de individuos analizados de *L. guttulus* y *L. geoffroyi* en el sur de Brasil además de analizar datos morfológicos. Detectaron que, a pesar de un alto nivel de hibridación, las muestras recogidas en el sur de Brasil (94 individuos de *L. guttulus* y 74 individuos de *L. geoffroyi*), conformaban dos grupos reconocibles (genética y morfológicamente). Estos dos grupos correspondían a los individuos "puros" de cada una de las dos especies (34 individuos para *L. guttulus* y 20 para *L. geoffroyi*). Estos individuos "puros" fueron principalmente muestreados en regiones más alejadas de la zona de contacto, mientras que los híbridos se concentraron en la interfase entre los dos biomas, que en cada uno viven principalmente cada una de ambas especies. Los datos morfológicos también revelaron una estructura espacial fuerte, que concuerda con los resultados moleculares, pero mostraron una separación aún más marcada entre las dos agrupaciones "puras". Los híbridos a menudo no presentaban tamaños de cuerpo intermedios y no podían distinguirse morfológicamente de las formas parentales. Esto podría estar relacionado con alguna presión selectiva que actúa sobre los híbridos, limitando su dispersión lejos de la zona híbrida y favoreciendo combinaciones genómicas que mantienen características fenotípicas adaptativas de una u otra especie parental en sus respectivos biomas. El último trabajo (Li *et al.* 2016), detectó señales de discordancia filogenética en los genomas de los gatos modernos, en muchos casos indicó la hibridación como la causa más probable. La mayor cantidad de discordancia filogenética se observó dentro del linaje del ocelote. Este estudio mostró que *L. t. tigrinus* del noreste de Brasil poseía ADNmt de *L. colocolo* dentro de un fondo de ADN nuclear de tigrina, tal como se había observado previamente (Trigo *et al.* 2013), pero también contenía marcas nucleares de hibridación antigua con *L. geoffroyi*, lo que sugiere una larga historia de mezcla entre las tres especies. También analizaron una muestra de tigrina centroamericana, que mostró altos niveles de

diferenciación para los genomas mitocondrial y nuclear de tigrina del noreste brasileño (11,0% -15,3% y 0,5% -0,6%, respectivamente). Los autores afirmaron que existe una posible especie de tigrina de Centroamérica adicional, actualmente no reconocida.

6. Para otras cuatro especies pequeñas de felinos manchados, que no se distribuyen en Colombia, también se han publicado algunos datos. Para *Leopardus geoffroyi* (n = 38), *Leopardus guigna* (n = 6) y *Leopardus colocolo* (n = 22), Johnson *et al.* (1999) publicaron el primer trabajo analizando tres genes mitocondriales para esas especies. Igualmente, Johnson *et al.* (1998) publicaron el primer estudio para el elusivo y raro gato andino (*Leopardus jacobita*) (n = 9) con la secuenciación de tres genes mitocondriales. Sin embargo, más recientemente varios trabajos han aportado resultados genéticos contundentes para tres de esas cuatro especies. Es el caso de *L. colocolo* (Cossíos *et al.* 2009; Ruiz-García *et al.* 2013) con más de 230 muestras analizadas para microsatélites y para secuencias mitocondriales procedentes de Perú, Bolivia, Chile y Argentina y para el elusivo *L. jacobita* (Cossios *et al.* 2012; Ruiz-García *et al.* 2013) con unas 115 muestras analizadas también procedentes de Perú, Bolivia y Argentina. Otros estudios: El trabajo de Napolitano *et al.* (2008), con *L. colocolo* y *L. jacobita* en Chile y los trabajos de Napolitano (2012) y Napolitano *et al.* (2014) con *L. guigna* en Chile, han sido aportes importantes para conocer la historia evolutiva, la clarificación sistemática y propuestas de conservación de esas especies de pequeños felinos neotropicales.

Por lo tanto, es importante poder analizar intraespecíficamente la filogeografía de cinco especies de felinos que se encuentran en el Neotrópico (jaguar, ocelote, margay, tigrillo y jaguarundi) utilizando importantes tamaños muestrales, abarcando toda la distribución geográfica de cada una de ellas, y analizando el más completo

conjunto de datos mitocondriales que se han utilizado hasta la fecha para esas especies.

OBJETIVO GENERAL

Reconstruir la filogeografía al interior de cinco especies de felinos neotropicales (jaguar, jaguarundi, ocelote, margay y tigrillo) mediante marcadores mitocondriales individuales y mediante mitogenómica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de variabilidad genética mitocondrial en el interior de esas cinco especies de felinos neotropicales.
- Detectar posibles cambios demográficos a través de la historia natural de las especies de felinos analizadas.
- Determinar la posible existencia de estructura espacial (aislamiento por distancia y autocorrelación espacial) entre los individuos de las cinco especies de felinos consideradas para secuencias mitocondriales.
- Reconstruir las relaciones filogeográficas entre los posibles diferentes taxones detectados en el interior de cada una de las cinco especies de felinos analizados.
- Estimar la divergencia temporal entre los diferentes taxones en cada una de las especies de felinos analizadas y correlacionar esas divisiones temporales con posibles cambios climáticos y geológicos durante el Plioceno y el Pleistoceno.
- Determinar si existe correspondencia entre los diferentes acervos genéticos encontrados al interior de cada especie y las subespecies morfológicas definidas tradicionalmente.

A continuación, se brinda información relevante sobre las especies de felinos objetivo de este trabajo y de los marcadores moleculares empleados al respecto.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ESPECIES DE FELINOS NEOTROPICALES ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO

1.1.1. Jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758).

Nombres comunes: Jaguar (francés); Jaguar (alemán); tigre, tigre real, yaguar (español); onca, onca pintada, onca cangucu (Brasil); tig marque (Guyana Francesa); yaguareté (guaraní); zac-bolay (Maya); jaguareté (Paraguay); otorongo (Perú); penitigri (Surinam); yaguar (Venezuela); onqa negra, yaguara pichuna, yagua-hu (jaguar negro).

1.1.1.1. Descripción y comportamiento.

El jaguar es el más grande de los gatos en América y el único representante del género *Panthera* en el nuevo mundo. Su longitud total puede superar los 2 metros y pesar más de 120 Kg (Kitchener 1991). El patrón del jaguar difiere del leopardo por tener rosetas cortadas en el margen alrededor de puntos negros. Cabeza grande y masiva, con miembros relativamente más cortos que otros de su género (Gonyea 1976). El melanismo es frecuente en el jaguar y se hereda de forma monogénica dominante a la forma normal dorada (Deutsch 1975, Dittrich 1979). Los jaguares de selva son en su mayoría oscuros y considerablemente más pequeños en tamaño que los que habitan en áreas más abiertas. El peso tanto de machos como hembras dependen de las áreas en donde se encuentren; en espacios cerrados como selvas, 13 machos promediaron 57 kg y 7 hembras 42 kg (Rabinowitz & Nottingham 1986, Aranda 1990), mientras que en zonas pantanosas

o abiertas los machos promediaron 100 kg (n=24) y las hembras 76 kg (n=16) (de Almeida 1990).

Más de 85 especies han sido registradas en la dieta del jaguar (Seymour 1989). Presas grandes como pecaríes, tapires y ciervos son sus preferidos, pero puede comer prácticamente todo lo que cace. Emmons (1987) sugiere que la enorme cabeza y los caninos sólidos del jaguar son una adaptación a “abrir cajas” de presas como reptiles (tortugas y caimanes).

Aunque el jaguar ha sido caracterizado como nocturno, la telemetría ha demostrado que son activos durante el día con picos de actividad durante el amanecer y atardecer. Los jaguares son activos durante el 50-60% de las 24 horas (Schaller & Crawshaw 1980, Rabinowitz & Nottingham 1986, Crawshaw & Quigley 1991). Crawshaw & Quigley (1991) encontraron que la distancia media diaria recorrida fue significativamente más larga en machos (3.3 $\pm$ 1.8 km) que las hembras (1.8 a 2.5 km). Ambos sexos tienden a viajar más durante la estación seca.

1.1.1.2. Biología.

Estación reproductiva: durante el año, pero Rabinowitz & Nottingham (1986) reportaron que los infantes nacen en la estación de lluvias cuando las presas son más abundantes. Así, el pico de nacimientos reportados en otras áreas: enero a abril en Venezuela (Hoogesteijn & Mondolfi 1992) puede correlacionarse con la disponibilidad de presas.

Estro: 6-17 días

Ciclo estral: 37 días en promedio, rango de 22-65 días (Sadleir 1966, Stehlik 1971, Leal 1979).

Gestación: 101 días en promedio, rango entre 91 - 111 días (Hemmer 1979).

Tamaño de la camada: 1-4, moda 2 (Hoogesteijn & Mondolfi 1992).

Edad de independencia: 1.5-2 años.

Edad de madurez sexual: 2-3 años en las hembras; 3-4 años, en los machos (Hoogesteijn & Mondolfi 1992).
Longevidad: 11- 12 años (Swank & Teer 1989); Más de 20 años (Green 1991).

1.1.1.3. Hábitat y distribución.

El jaguar nada muy bien por lo que está estrechamente asociado al agua. Se encuentra desde selvas lluviosas hasta ciénagas inundables (pantanos y llanos), praderas, matorrales (Chaco) y bosques deciduos secos. En Belice, Rabinowitz (1986) encontró que el jaguar es más abundante en tierras bajas relativamente densas con permanente recurso de agua que en áreas abiertas y estacionalmente secos. En los pantanos de Brasil, los bosques riparios son preferidos a las áreas herbáceas abiertas (Crawshaw & Quigley, 1991). Aunque los jaguares han sido reportados en elevaciones de 3.800 m (Costa Rica: Vaughan 1983), los jaguares típicamente evitan los bosques de montaña (Emmons 1991) y no han sido encontrados en las mesetas altas de México (Leopold 1959) o arriba de los 2.700 m en Los Andes (Guggisberg 1975, Olrog & Lucero 1981).

El rango histórico del jaguar se extiende desde Arizona, Nuevo México y Texas hasta el sur de Brasil y norte de Argentina (Arra 1974, Carman 1984). Antes, ocupaba hábitats al norte de su rango incluidos los bosques de robles, matorrales y bosques riparios (Brow 1991). En el norte, el rango del jaguar se ha desplazado hacia el sur cerca de 1.000 km y ha sido reducido en área cerca del 67%. En Suramérica, el rango del jaguar se ha desplazado hacia el norte cerca de 2.000 km y ha sido reducido en un 38% de su área (Swank & Teer 1989). Ver Figura 1.

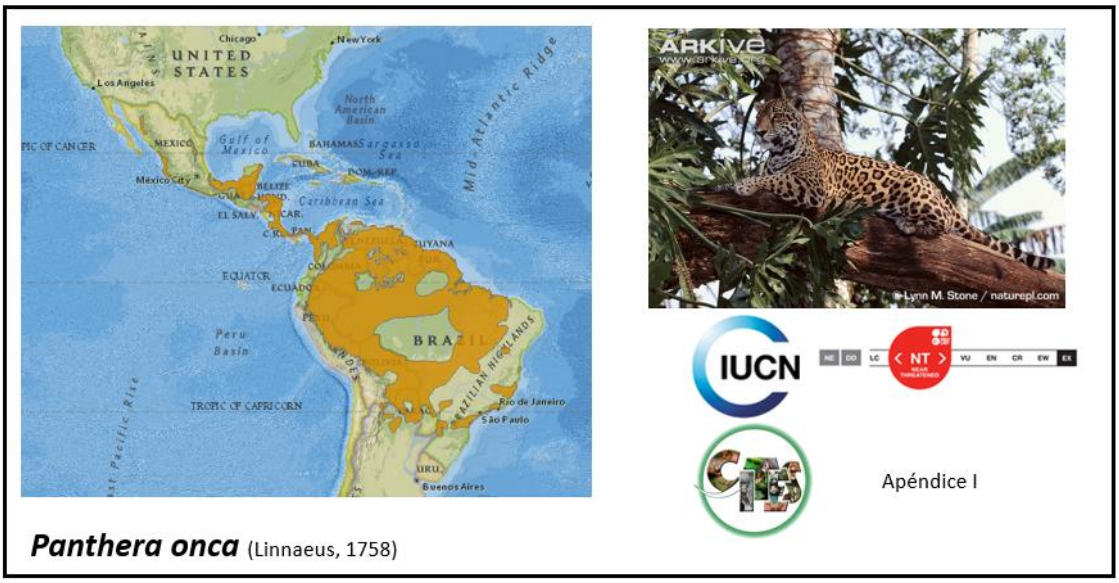


Figura 1. Rango de distribución actual de la especie *Panthera onca* y estado de conservación. IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 December 2016.

1.1.1.4. Estado poblacional.

La selva lluviosa del Amazonas, de aproximadamente 6 millones de km2 de extensión (Collins 1990), es la fortaleza de la especie y las densidades pueden ser tan altas como de 1 residente por 15 km^2 al igual que en Belice (Rabinowitz 1986). Ha sido prácticamente eliminado de gran parte de la parte norte de su rango en los Estados unidos y México (Brown 1983) así como en las pampas de Argentina y Uruguay (Swank & Teer 1987). La especie, probablemente ya ha perdido elementos significativos de su diversidad intraespecífica, y la tendencia continúa.

Aunque existen reportes para poblaciones como las de Yucatán y norte de Guatemala y Belice, en las cuales se reporta una densidad de 1 residente adulto por 15 km^2, Rabinowitz (1986) estimó una población entre 600 a 1000. Aranda (1990) estimó una población entre 125-180 jaguares por 4.000 km^2 basándose en una estima de densidad de 1 jaguar por 26-32 km^2 en el área de reserva Biósfera

Calakmul (México) y de 465-550 jaguares en un área de 15.000 km^2 en Petén Guatemala. En Chiapas (México) Aranda (1990) estimó entre 350 ± 65 jaguares basándose en una densidad de 1 animal por 15-40 km^2. En El Pantanal, el área inundable más grande del mundo (Alho *et al.* 1988) con una extensión de 100.000 km^2 sobre los bordes de Brasil, Bolivia y Paraguay y las sabanas húmedas como los llanos de Venezuela representan óptimos hábitats para el jaguar. Sin embargo, la economía y la cultura que giran alrededor del ganado hacen que el número de jaguares se reduzca. Crawshaw & Quigley (1991) estimaron la densidad del jugar a solo 1,4 residentes adultos por 100 km^2 en el pantanal brasilero, donde existen poblaciones intactas solamente en el centro norte y extremo suroriente de la región separados por 150 km. En el Gran Chaco (Paraguay) probablemente es el lugar donde los jaguares se presentan en números significativos en un medio árido. Redford *et al*. (1990) estimó que 176.000 km^2 de hábitat viable permanece en el Chaco paraguayo, una pérdida histórica del 45% con la aceleración de la deforestación. Esos estudios estiman entre un jaguar por 25 km^2 a uno por 75 km^2 (Swank & Teer 1987). En Uruguay y El Salvador se declaró regionalmente extinto (Caso *et al.* 2008).

1.1.1.5. Estado de protección.

CITES apéndice I.

Caza prohibida: Argentina, Brasil, Colombia, Guyana Francesa, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Surinam, Estados Unidos, Uruguay, Venezuela.

Caza restringida en: Brasil, Costa Rica, Guatemala, México, Perú.

Caza permitida: Bolivia.

Sin proyección legal: Ecuador, Guyana (Swank & Teer 1987, Fuller *et al.* 1987).

1.1.1.6. Principales amenazas.

Tasas de deforestación en Latinoamérica (FAO 1993) y la fragmentación del hábitat aíslan al jaguar, de manera que lo exponen a la predación del hombre. La competencia con el hombre por las presas (Jorgenson & Redford 1993), la

disminución en la disponibilidad de las presas y la persecución humana (Sanderson *et al.* 2002, Zeller 2007). La demanda de pieles desde los inicios del siglo XX hasta los años 60s y 80s por parte de Europa, Estados unidos, Alemania y Gran Bretaña fue la causa de que países al sur del rango de distribución del jaguar, cazaran y exportaran un gran número de pieles (Cabrera & Yepes 1940, Doughty & Myers 1971, Smith 1976, Swank & Teer 1989).

1.1.1.7. Paleontología.

Panthera onca pertenece a uno de los linajes moleculares monofiléticos en la familia Felidae (Jonhson & O'Brien 1997, Pecon-Slatterry & O'Brien 1998). Las cinco especies del género *Panthera* divergieron del ancestro común hace 3.5 millones de años - Plioceno (Ruiz-García *et al.* 2013). Se ha propuesto que el actual jaguar (*Panthera onca*) derivó de *P. gombaszoegensis*, que cruzó desde Asia a Europa a través del estrecho de Bering hace aproximadamente un millón de años – Pleistoceno Glacial Günz o Nebraska (Kurten 1965 & Kurten 1973). El registro fósil más antiguo en América, fue hallado en Nebraska y data de hace 820 a 850 mil de años, mientras que los más, recientes se han encontrado tanto en Estados Unidos en Arkansas (600 mil años) y Florida (700.000 a 500.000 años) como en Suramérica (Kurten 1965, Seymour 1989). El jaguar se distribuyó por todo el continente durante el Pleistoceno. Los fósiles de Argentina y Puerto Consuelo (Chile) fueron clasificados como *P. o. palustris* y *P. o. mesembrina*, respectivamente (Cabrera 1934). Hoffstetter (1952) determinó otra subespecie cuyo fósil fue hallado en el Ecuador del Pleistoceno: *P. o. andina*. Un fósil hallado en Tarija (Bolivia pleistocénica) parece ser la forma intermedia entre *P. o. mesembrina* y *P. o. palustris*. El jaguar de Norteamérica, de tamaño similar a *P. o. palustris* fue nombrado como *P. o. augusta* por Simpson (1941). La reducción del área de distribución hacia el sur de Norteamérica sucedió durante el Holoceno (aproximadamente 10.000 años).

1.1.1.8. Subespecies consideradas.

Se han reconocido ocho subespecies de jaguares (Pocock 1939, Seymour 1989):

- *P. o. arizonensis* (Goldman 1932). Oriente de Arizona al Gran Cañón, Nuevo México y noreste de Sonora. Se le ha considerado la más grande de las subespecies de jaguar en el norte del continente.
- *P. o. hernandesii* (Gray 1857). México occidental desde Sinaloa hasta el golfo de Tehuantepec y desde Sinaloa a Louisiana y el sur de Guatemala. El cráneo es más pequeño que el de *P. o. arizonensis*, similar al de *P. o. centralis* y más grande que el de *P. o. goldmani* según Nelson & Goldman (1933) y Pockok (1939).
- *P. o. veraecruscis* (Nelson & Goldman 1933). Se distribuye en el oriente de México desde Tabasco hasta Veracruz y desde Tamaulipas al centro de Texas.
- *P. o. goldmani* (Mearns 1901). Se distribuye en Belice, norte de Guatemala hasta Campeche y Yucatán en México. Los cráneos son similares a *P. o. centralis*, pero de menor tamaño. (Mearns 1901, Nelson & Goldman 1933 y Pockok 1939).
- *P. o. centralis* (Mearns 1901). Desde Honduras pasando por Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Norte, centro y pacífico de Colombia. Es similar a *P. o. hernandessi*, pero con nasales menos deprimidas (Nelson & Goldman 1933).
- *P. o. onca* (Linnaeus 1758). Cuencas de los ríos Orinoco - Venezuela y Amazonas incluyendo Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y Brasil, desde Pernambuco y Rio Grande do Sul en el Sur del Brasil y desde el norte del Matto Grosso, Brasil hasta el Departamento de Santa Cruz en Bolivia. Esta es la subespecie más grande junto con *P. o. paraguensis*, pero con un cráneo ligeramente más pequeño, región frontal menos elevada y dentición pesada (Larson 1997). Pocock (1939) reconoció esta subespecie por sus longitudes cóndilo-basales distintivas.
- *P. o. peruviana* (De Blainville 1843) Costa norte de Perú – Tumbes; Costa tropical de Ecuador. Hay dudas sobre su estatus debido a las pocas muestras (cráneos) que han sido estudiados (Nelson & Goldman 1933, Pockok 1939).

- *P. o. paraguensis* (Hollister, 1914). Sur de Brasil – Sur del Matto Grosso. Paraná y estado de Sao Paulo hasta la pampa central de Argentina y Paraguay. También en Sureste de Bolivia.

Seymour (1989) agrupó estas posibles subespecies en tres subespecies geográficas: Un grupo centroamericano, *P. o. centralis*, conformado por *P. o. goldmani, P. o. centralis, P. o. arizonensis, P.o. veraecruscis* y *P. o. hernandesii*; el segundo grupo en el norte de Suramérica, *P. o. onca*, constituido por las subespecies *P. o. onca* y *P.o. peruviana* y el tercer grupo del sur de Suramérica por *P. o. paraguayensis*.

1.1.2. Jaguarundi, *Puma yagouaroundi* (Lacépéde 1809).

Nombres comunes: Otter cat (inglés); jaguarondi (francés); Jaguarundi, Wieselkatze, Eyra (alemán); yaguarundí, onza, gato moro, gato eyra (español); halari (Belice); maracaja-preto, gato-preto, gato mourisco (Brasil, Uruguay); gato gris (Bolivia); gato pardo, gato servante, ulama (Colombia); león brefiero (Costa Rica, Perú); jaguarondi, chat noir (Guyana Francesa); tejón, mbaracaya-eira (Guatemala); gato cerban (Honduras); kakicoohish (Kekchi); ekmuch (Maya); tigrillo congo, tigrillo negro (Panamá); leoncillo, anushi-puma (Perú); boesikati (Surinam); gato Cervantes (Venezuela).

1.1.2.1. Descripción y comportamiento.

Parecido a la comadreja, de apariencia delgada y fina, patas cortas y pelaje brillante sin patrón de manchas, cabeza elongada. El peso de los adultos oscila entre los 2 a 9 kg (Guggisberg 1975, Mondolfi 1986). Hay diferentes formas de coloración los cuales se presentan en la misma área como en la misma camada (Konecny 1989, Brooks 1992); negro, café grisáceo y rojo. Los colores oscuros están asociados con los hábitats de selva lluviosa, mientras que los pálidos en los medios secos (Emmons 1991). La dieta del jaguarundi se compone de roedores, conejos, reptiles,

artrópodos, aves, entre otros (Bisbal 1986, Mondolfi 1986). Hábitos diurnos con picos de actividad entre las 4:00 a las 11:00, ocasionalmente nocturnos. Se les encuentra viajando en pares (Guggisberg 1975, McCarthy 1992).

1.1.2.2. Biología.

Estro: 3.17 ± 0.75 días (n = 6).

Ciclo estral: 53.63 ± 2.41 días (n = 8; Mellen 1993).

Gestación: 70-75 días (Hulley 1976).

Tamaño de la camada: 1.83 ± 0.24 (n = 12: Mellen 1989); rango l-4 (Hulley 1976).

Edad de la madurez sexual: 2-3 años (Hulley 1976).

Longevidad: pueden superar los 15 años (Prator *et al.* 1988).

1.1.2.3. Hábitat y distribución.

De tierras bajas, no se encuentra por encima de los 2.000 m (Vaughan 1983). Ocupa hábitats abiertos y cerrados. En Venezuela se ha registrado en bosque tropical seco (Bisbal 1989), se ha reportado la preferencia por los bordes de los bosques y comunidades secundarias (Bourliere 1955, Mondolfi 1986). En Belice se encuentra más frecuentemente asociado con el bosque ripario. En general, este félido se caracteriza por su flexible habilidad para ocupar diversos medios. Ver Figura 2.

Figura 2. Rango de distribución actual de la especie *Puma yagouaroundi* y estado de conservación. IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 December 2016.

En cuanto al rango hogareño de los machos, éstos fueron mucho más grandes que los reportados para los jaguares, siendo 10 veces mayores (Konecny 1989). Para las hembras, el rango estuvo entre los 13-20 km^2.

1.1.2.4. Estado de protección.

Caza prohibida: Argentina, Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Guyana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Paraguay, Surinam, Uruguay, Estados Unidos, Venezuela.

Caza regulada: Perú.

Sin protección: Brasil, Nicaragua, Ecuador, El Salvador, Guyana (Fuller *et al.* 1987).

1.1.2.5. Principales amenazas.

No ha sido explotado para tráfico comercial. Sin embargo, son capturados para disminuir la captura de aves de corral (Rengger 1830, Álvarez del Toro 1952, Leopold 1959, Hall & Dalquest 1963, Goodwyn 1970, Koford 1976, Ferrari *et al.* 1984, Bisbal 1986, McCarthy 1992).

1.1.2.6. Subespecies consideradas.

Se han reconocido ocho subespecies morfológicas (Cabrera 1957, de Oliveira 1998):

- *P. y. tolteca* (Thomas 1898). Desde el sur de Arizona en USA (Cochise, Pima y Santa Cruz) y Pacífico mexicano hasta Sinaloa y Guerrero.
- *P. y. cacomitli* (Berlandier 1859). Sur de Texas, USA (Camero, Hidalgo, Starr y Wilacy) y costa oriental de México (Tampico y Tamaulipas) hasta Veracruz.
- *P. y. fossata* (Meanrs 1901). Sur y oriente de Oaxaca hasta Veracruz en México, Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador y Nicaragua.
- *P. y. panamensis* (Allen 1904). Costa Rica, Panamá, costa pacífica y norte de Colombia y occidente de Ecuador.
- *P. y. yagouaroundi* (Geoffroy 1803). Oriente de Venezuela, Guyanas y noreste de Brasil.
- *P. y. melantho* (Thomas 1914). Valle andino y occidente de la amazonía peruana.
- *P. y. eyra* (Fischer 1814). Sur de Brasil, Paraguay y noreste de Argentina, probablemente Bolivia.
- *P. y. ameghinoi* (Holmberg 1898). Zona montañosa baja en el occidente de Argentina desde Jujuy al norte de la Patagonia.

1.1.3. Ocelote, *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758).

Nombres comunes: Ocelot (Francia); Ozelot (Alemania); tigrillo, ocelote, gato onza (español); tirica (Argentina); gato onza (Argentina, Bolivia, Perú); chivi-guazu

(Argentina, Paraguay); cunaguaro (Argentina, Venezuela); tigrezillo, gato bueno (Bolivia); maracaju-acu, gato mourisco, jaguatirica (Brasil); gato maracaja (Brasil, Paraguay); maracaya, maracaja (Colombia); manigordo (Costa Rica, Nicaragua, Panamá, Venezuela); chat tig (Guyana Francesa); yagua-tirica (guaraní); zac-xicin (Maya); gato tigre, tigre Chico (Panamá); pumillo, tigrillo (Perú); hetigrikati (Surinam).

1.1.3.1. Descripción y comportamiento.

Es el gato pequeño mejor conocido de las Américas. Su pelaje es corto, denso, marcado con rosetas y puntos las cuales tienden a recorrerlo en cadenas paralelas a lo largo de los lados del cuerpo.

El promedio del peso de los machos adultos es de 10 a 11,5 kg (n=8: Enders 1935, Emmons 1988, Sunquist *et al.* 1989), y el de hembras adultas 8,8 (n=5: Mondolfi 1986) a 9,4 kg (n=l 1: Husson 1978, Emmons 1988, Crawshaw & Quigley 1989, Konecny 1989, Sunquist *et al.* 1989). Su dieta se basa en roedores terrestres y nocturnos, al igual que zarigüeyas y armadillos (Konecny 1989). También toman grandes presas como tortugas, paca, agutí. Basados en un extenso análisis Sunquist *et al.* 1989, encontraron que la dieta del ocelote consiste en un 65% de pequeños roedores, 18% de reptiles (en su mayoría iguanas), 7% crustáceos y peces, 6% mamíferos medianos y 4% de aves. Los ocelotes son nocturnos, descansan sobre los árboles en el día. Son activos por más de la mitad de las 24 horas. Recorren distancias entre 1.8 a 7.6 km. Emmons (1988) calculó que el ocelote caza 0.9 presas por km caminado o una presa capturada por 3.1 horas de camino.

1.1.3.2. Biología.

Estación reproductiva: Probablemente a lo largo del año, con picos de actividad hacia el otoño (octubre a enero).

Estro: 4,63 ± 0,63 días

Ciclo estral: 25,11 ± 4,33 días (n=9; Mellen 1989).

Gestación: 79-85 días (Mondolfi 1986).

Tamaño de la camada: 1,64 ± 0,21 (n=28; Mellen 1989); rango l- 3, moda 1 (Cisin 1967).

Edad de independencia: aproximadamente un año (Ludlow & Sunquist 1987, Emmons 1988, Crawshaw & Quigley 1989).

Edad de la primera reproducción: Hembras de 18-22 meses. Aparición de la espermatogénesis en los machos alrededor de los 2.5 años (Mondolfi 1986)

Longevidad: 7- 10 años; pueden superar los 20 años (Sunquist 1992).

1.1.3.3. Hábitat y distribución.

Los ocelotes se encuentran en todos los países al sur de los Estados Unidos excepto en Chile y ocupan un amplio espectro de hábitats, aunque típicamente se presentan a elevaciones por debajo de los 1.200 m (Bisbal 1989, Mondolfi 1986, Eisenberg 1989). Su presencia correlaciona con cubiertas vegetativas densas y alta disponibilidad de roedores. Se aventuran a recorrer zonas abiertas durante la noche o días nublados (Ludlow & Sunquist 1987, Emmons *et al.* 1989).

Históricamente, se distribuye desde Arkansas en Norte América hasta el norte de Argentina en Sur América. También en las Islas de Trinidad y Margarita, excepto Chile y la meseta peruana. El rango actual del ocelote se extiende a los 350 km hacia el sur del Uruguay. En la terminación norte de su rango, persisten solo dos de sus poblaciones en la esquina suroeste de Texas. Los ocelotes han sido extirpados de Arkansas, Louisiana, oeste de Texas y Arizona, aunque algunos individuos cruzan de Arizona a México. Ver Figura 3.

Figura 3. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus pardalis* y estado de conservación. IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 December 2016.

1.1.3.4. Estado poblacional.

El ocelote fue el gato moteado más fuertemente explotado por el tráfico de pieles desde 1960 a 1970. Al principio de los 80s, Mondolfi (1986) reportó que la caza comercial redujo las poblaciones de ocelotes en Venezuela, pero R. Hoogesteijn (in Zitt. 1991) notó que la presión de caza se ha reducido y que hay signos de recolonización. Emmons (1993) notó que las estimas bajas de densidad (un animal por 5 km^2) deberían ser de aproximadamente 800.000 ocelotes en la selva suramericana y sugiere que el número real es de aproximadamente entre 1.5 a 3 millones.

1.1.3.5. Estado de protección.

Elevado al apéndice I de CITES en 1989.

Legislación Nacional: protegido en la mayoría de su rango.

Caza prohibida: Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Guyana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Surinam, Trinidad, Estados Unidos, Uruguay, Venezuela.
Caza regulada: Perú.
Sin protección: Ecuador, El Salvador, Guyana (Fuller *et al.* 1987).

1.1.3.6. Principales amenazas.

Aunque es altamente tolerante a la intervención de los hábitats, se cree que le será difícil reproducirse donde las presas estén bajo presión por la misma pérdida del hábitat.

1.1.3.7. Subespecies consideradas.

Se considera morfológicamente la existencia de 10 subespecies debido a los estudios de Goldman (1943), Cabrera (1957), Wozencraft (1993) y Murray & Gadner (1997):

- *L. p. aequatorialis* (Mearns 1903). Región andina de Colombia, Ecuador y Perú hasta Panamá.
- *L. p. albescens* (Pucheran 1855). Arkansas. Louisiana, occidente y sur de Texas – Estados Unidos, La Marina en Tamaulipas, México.
- *L. p. melanura* (= *maripensis*) (Ball 1844). Venezuela, Guyanas, Surinam, norte de Brasil y oriente de Colombia.
- *L. p. mitis* (Cuvier 1820). Desde Rio Grande do Sul y Norte de Argentina, cruzando Paraguay hasta la amazonía sur brasilera.
- *L. p. nelsoni* (Goldman 1925). Desde Oaxaca hasta Sinaloa en México.
- *L. p. pardalis* (Linneo, 1758). Veracruz, México, y de Guatemala a Honduras.
- *L. p. pseudopardalis* (Boltard 1842). Norte de Colombia y zona occidental y norte de Venezuela.
- *L. p. pusaea* (Thomas 1914). Costa pacífica ecuatoriana.
- *L. p. sonoriensis* (Goldman 1925). Desde la Sierra Madre y norte de Sinaloa hasta Arizona.

- *L. p. steinbachi* (Pocock 1941). Buenavista, Santa Cruz, Bolivia.

1.1.4. Margay, *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821).

Nombres comunes: Margay (francés); Langschwanzkatze (Alemania); tigrillo, gato tigre (español); gato pintado (Argentina, Perú, Venezuela); tigrillito (Belice); gato mantés, gato de month (Bolivia, Uruguay); gato maracaja mirim peludo (Brasil); pichigueta (Centro América.); caucel (Costa Rica, Honduras); burricon (Ecuador); mbaracaya (Guatemala); kuichua (Guyana); chat tig. chat margay (Guyana Francesa); chulul (Maya); huamburushu (Perú, Venezuela); cunaguaro (Venezuela); tigrikati, boomkat, tree cat (Surinam).

1.1.4.1. Descripción y comportamiento.

El margay se confunde fácilmente con el ocelote y la oncilla. Es difícil distinguirlo por su pelaje el cual tiene un patrón de rosetas negras y manchas elongadas sobre un fondo leonado. Su piel es delgada y sedosa. El margay pesa en promedio 3.2 kilogramos (Redford & Eisenberg 1992). Tiene la habilidad de rotar sus patas 180 grados (Leyhausen 1963), por lo cual presenta la virtud de bajar los árboles de frente. Estos gatos pueden saltar a una distancia de dos metros con las patas delanteras y las uñas extendidas. La cola del margay es proporcionalmente más larga que el cuerpo, en promedio un 70% de la longitud cabeza cuerpo (TL=36.4 cm; n=6: Redford & Eisenberg 1992). Su dieta comprende mamíferos arbóreos pequeños, ardillas, artrópodos, zarigüeyas, aves pequeñas y frutas (Konecny 1989). Son estrictamente nocturnos, con altos niveles de actividad entre la 1:00 y 5:00 am tanto en campo como en cautiverio. Durante el día, lo pasan en los árboles (Petersen 1977, Konecny 1989).

1.1.4.2. Biología.

Estro: 4-10 días.

Ciclo estral: 32-36 días (Petersen 1977b, Paintiff & Anderson 1980, Mellen 1989).

Gestación: 76 – 84 días (Paintiff & Anderson 1980, Mellen 1989, P. Quillen in Zitt., 1993).

Tamaño de la camada: uno (n= 17: Mellen 1989), algunas veces dos (Mondolfi 1986).

Edad de madurez sexual: Primer estro para las hembras 6-10 meses (Petersen & Petersen 1978).

Longevidad: Pueden superar los veinte años (Prator *et al.* 1988).

1.1.4.3. Hábitat y distribución.

Está fuertemente asociado a bosques tanto deciduos como siempre verdes (Bisbal 1989). Caza por las riveras de los bosques de galería puede ser encontrado en los hábitats de sabana (Eisenberg 1990). Parece ser menos tolerante a los asentamientos humanos y a los hábitats alterados, aunque ha sido reportado fuera de áreas boscosas (Vaughan 1983, Tello 1986), como en plantaciones de cocoa y café en Venezuela (Mondolfi 1986). El margay se encuentra en raras ocasiones a elevaciones de 1.200 m. Ver Figura 4.

1.1.4.4. Estado poblacional.

Poco se sabe sobre el estado de las poblaciones del margay y su abundancia a lo largo de su rango de distribución. La cuenca del Amazonas es su fortaleza. Se ha reportado pocas veces al noroccidente de Argentina (Mares *et al.* 1981) y Uruguay (A. Ximenez in Zitt. 1990). Un macho subadulto, en un bosque de sucesión, en Brasil, presentó un rango hogareño de 11 km^2 (Konecny 1989). Un macho adulto en Brasil, monitoreado por 18 meses, se mantuvo en un rango hogareño de 16 km^2, Crawshaw (1995).

Figura 4. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus wiedii* y estado de conservación. IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 December 2016.

1.1.4.5. Estado de protección.

Fue elevado al apéndice I de CITES en 1989.

Caza prohibida: Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Guyana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela.

Sin protección: Ecuador, Guyana, El Salvador (Fuller *et al.* 1987).

1.1.4.6. Principales amenazas

Es uno de los félidos más fuertemente explotados en Latinoamérica, con un tráfico anual neto promedio de 13.934 pieles entre 1976 y 1984 reportado por CITES (Broad 1987). La caza ilegal para los mercados domésticos y el tráfico de pieles, siguen siendo reportados en algunas áreas a pesar de su estado de protección (Melquist 1984, Paz & Miño 1988, Walton 1991). Sin embargo, la deforestación es ahora la principal amenaza que reduce las poblaciones.

1.1.4.7. Subespecies consideradas

Se considera morfológicamente la existencia de 10 subespecies a partir de los estudios de Cabrera (1957), Hall (1981) y de Oliveira (1998):

- *L. w. amazonica* (Cabrera, 1917; Cuenca del alto Amazonas).
- *L. w. boliviae* (Pocock, 1941; Bolivia).
- *L. w. glaucula* (Thomas, 1903; Jalisco, México).
- *L. w. nicaraguae* (Allen, 1919; Nicaragua).
- *L. w. oaxacensis* (Nelson & Goldman, 1931; Oaxaca, México).
- *L. w. pirrensis* (Goldman, 1914; Darién, Panamá, Pacífico colombiano).
- *L. w. salvinia* (Pockock, 1941; Guatemala).
- *L. w. vigens* (Thomas, 1904; desembocadura del Amazonas, Pará-Brasil).
- *L. w. wiedii* (Schinz, 1821; Este de Brasil).
- *L. w. yucatanica* (Nelson & Goldman, 1931; Yucatán, México).

1.1.5. Oncilla, *Leopardus* tigrinus. (Schreber, 1775)

Nombres comunes: Little tiger cat, little spotted cat (inglés); chat tigre, oncille, (francés); Onzille, Kleinflekenkatze, Ozelotkatze, Zwergtigerkatze (alemán); tigrillo, tirica, gato tigre (español); gato tigre Chico, gato onza Chico, gato pintado Chico (Argentina); gato do mato (Brasil); chivi (Argentina, Guyana, Perú); tigrillo peludo, tigre gallinero (Colombia); caucel (Costa Rica); tigrillo Chico (Ecuador); chat tigre tachete, chat tig (Guyana Francesa); ocelot-cat, tigrikati (Surinam); tigrito (Venezuela).

1.1.5.1. Descripción y comportamiento

La oncilla es pequeña con un peso promedio de 2,2 kg (Redford & Eisenberg 1992), los machos son ligeramente más largos que las hembras (Guggisberg 1975). Es muy parecido al margay por lo que se dificulta su diferenciación en campo (Vaughan

1983). El patrón de rosetas en la oncilla tiende a ser menos oscura y punteada, su cuerpo es más delgado y su cola no tan larga (TL=26.9 cm, 56% de la longitud de cabeza-cuerpo (Redford & Eisenberg 1992). Sus presas consisten en mamíferos pequeños (roedores y musarañas) (Gardner 1971, Mondolfi 1986) y pequeños primates en Brasil.

1.1.5.2. Biología

Estro: 3-9 días, (Foreman 1988).

Gestación: 55-60 días (Widholzer *et al.* 1991) 75-78 días (Leyhausen & Falkena 1966).

Tamaño de la camada: 1-3 (Leyhausen & Falkena 1966).

Longevidad: 11 años en promedio, pero pueden llegar a superar los 17 años (Prater *et al.* 1988).

1.1.5.3. Hábitat y Distribución

La oncilla muestra una fuerte preferencia por el bosque montano de niebla (Mondolfi 1986), es decir, se encuentra a superiores elevaciones que el ocelote y el margay. Melquist (1984) reporta su presencia en alturas superiores a 1.500 m en Colombia, y ha sido encontrado por encima de los 4.500 m. En el bosque subtropical en Brasil, se encuentra en bosques secundarios a unos 600 m de altitud. Oliveira (1994) reportó oncillas en matorrales espinosos semiáridos al noreste de Brasil. Bisbal (1989) también los registra en bosques deciduos secos en el norte de Venezuela. Se cree que se encuentre en las tierras bajas del Amazonas, pero no ha sido confirmado. El registro más al norte es del norte de Costa Rica. Se ha encontrado al norte de Panamá, pero no en el resto del país (Eisenberg 1990). Ver Figura 5.

1.1.5.4. Estado de las poblaciones

Esta especie no ha sido estudiada en campo y poco se sabe sobre sus requerimientos de hábitat, densidad y coexistencia con otros gatos pequeños. Es cazado para traficar con su piel. En 1971, 28.000 pieles fueron encontradas en

hogares de Brasil. En 1983, 84.500 pieles fueron exportadas únicamente desde Paraguay (Broad, 1988).

Figura 5. Rango de distribución actual de la especie *Leopardus tigrinus* y estado de conservación. IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 December 2016.

1.1.5.5. Estado de Protección

Elevado al apéndice I de CITES en 1989.

La caza está prohibida en: Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Guyana Francesa, Paraguay, Surinam, Venezuela. Sin protección: Ecuador, Guyana, Nicaragua, Panamá, Perú (Fuller *et al.* 1987).

1.1.5.6. Principales amenazas

Aunque no se tienen registros, las plantaciones de café se establecen en bosques nublados (Melquist 1984), donde habita esta especie. Aunque el tráfico internacional cesó después 1985 (WCMC datos no publicados), 675 pieles de gatos moteados,

principalmente de oncillas, fueron incautados en Brasil provenientes de Paraguay a principios de los noventa.

1.1.5.7. Subespecies consideradas

Los zoólogos han definido tradicionalmente cuatro subespecies dentro de tigrina (Cabrera 1957, Cabrera 1963, Wilson & Reeder 2005):

- *L. t. oncilla* (Costa Rica y Panamá, posiblemente en Nicaragua).
- *L. t. pardinoides* (En la zona andina del occidente de Venezuela, Colombia, Ecuador y posiblemente al norte del Perú).
- *L. t. tigrinus* (Oriente de Venezuela, Guyanas y nororiente de Brasil).
- *L. t. guttulus* (Centro y sur de Brasil, Paraguay y nororiente de Argentina desde Misiones al noroccidente de Argentina en las provincias de Salta y Jujuy (Diaz & Bárquez, 2002). Sin embargo, Cabrera (1957) sólo citó a *L. t. guttulus* para Misiones, pero los individuos de tigrina del noroccidente de Argentina nunca fueron clasificados exactamente dentro de alguna de estas cuatro subespecies.

En el 2001 (Pacheco *et al.* 2001), dos individuos de *L. tigrinus* fueron por primera vez reportados para Bolivia y fueron capturados en el Parque Nacional Cotapata en el Departamento de La Paz; más adelante un tercer espécimen fue reportado en la provincia de la Florida en el departamento de Santa Cruz (Azurduy 2005). Éstos tigrinas no fueron clasificados dentro de ninguna subespecie putativa. Sin embargo, a partir de los estudios de Trigo *et al.* (2008), Trigo *et al.* (2013) y Trigo *et al.* (2014) y tal como se mostrará en esta Tesis Doctoral, aquello a lo que se le llama tigrillo u oncilla (*L. tigrinus*) es probablemente un complejo de especies bien diferenciado incluso polifilético que deberá considerarse como tal para poder diseñar estrategias de conservación efectivas de esas diferentes especies.

1.2. FILOGEOGRAFÍA

Se considera a la filogeografía como la disciplina que estudia los factores que han incidido en la distribución geográfica actual de los linajes genealógicos al interior de una determinada especie (Avise *et al.* 1987). Se asume de esta manera, que las especies presentan en su interior algún nivel de estructura genética que corresponde a conjuntos de condiciones particulares dentro de su área de distribución, es decir, presentan estructura filogeográfica. Este tipo de estructura es la conjunción de procesos geográficos, genealógicos, geológicos o climáticos en los que se encuentran implicados factores como el flujo génico, deriva génica, dinámicas de reducción y expansión poblacional, fragmentación, eventos de colonización, extinción, entre otros (Hardy *et al.* 2002). Por otra parte, la filogeografía comparada provee información sobre eventos históricos comunes que han influenciado la distribución de especies que tienen un rango de distribución actual similar, partiendo del supuesto que en el pasado también lo compartieron, por ende, fueron afectadas por los mismos procesos (Arbogast & Kenagy 2001, Lanteri & Confalonieri 2003).

Para reconstruir la filogeografía de las especies se utilizan marcadores mitocondriales debido a que su tasa de mutación es alta, no hay recombinación y su herencia es de tipo matrilineal. Secuencias de ADNmt idénticas entre sí forman haplotipos, en ellos se pueden evidenciar eventos mutacionales, los cuales pueden representarse en un filograma o árbol de genes (Avise 2008) cuyas líneas representan linajes y los nodos los puntos de divergencia o eventos coalescentes. Sin embargo, es preferible trabajar con varios genes con el fin de evitar problemas de ligamiento a selección, introgresión o problemas etológicos (Avise 2008, Vázquez–Domínguez *et al.* 2009). Es aconsejable hacer reconstrucciones de más de un gen de manera que se incremente la probabilidad de que la filogeografía sea de la especie y no del gen y realizar comparaciones entre más de una especie codistribuida (Avise 2000). La filogeografía se puede analizar de dos formas: una

gráfico-descriptiva en árboles donde las ramas son estudiadas bajo una o varias hipótesis de la historia biogeográfica de los organismos sustentado en árboles de genes o en la construcción de redes de haplotipos. Otra forma está fundamentada en demografía y estructura poblacional basado en la teoría de la coalescencia, fenómenos estocásticos y estadística computacional, donde los modelos de análisis incluyen hipótesis que se ponen a prueba utilizando métodos basados en verosimilitud o en la inferencia bayesiana (Nielsen & Beaumont 2009).

La filogeografía también puede ser usada como una herramienta de análisis en estudios taxonómicos, informando sobre las fronteras entre especies y poblaciones. El concepto filogenético de especie se define como el agrupamiento mínimo de individuos, de poblaciones o grupos de poblaciones que son diagnosticables por un número de caracteres compartidos y dentro de los cuales hay un patrón claro de ancestría-descendencia.

1.3. ADN MITOCONDRIAL

El análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta útil en el discernimiento de la evolución de las especies, debido a que presenta un alto número de copias por célula, una alta tasa de mutación en comparación con el genoma nuclear, lo cual permite mayor resolución en escalas cortas de tiempo, es heredado exclusivamente por línea materna y se asume una recombinación nula (Taanman 1999). Éstas características permiten discriminar y cuantificar la relación genética entre individuos y poblaciones diferentes. En la familia Felidae, los polimorfismos del ADN mitocondrial han sido excelentes herramientas para inferir relaciones filogenéticas, y la historia evolutiva de sus especies (Menotti-Raymond & O'Brien 1993, Janczeswski *et al.* 1995, Masuda *et al.* 1996, Johnson *et al.* 1996, Johnson & O'Brien 1997, Johnson *et al.* 1998).

Muchos análisis mitogenómicos han demostrado ser útiles para determinar las relaciones filogenéticas y para estimar los tiempos de divergencia en diferentes grupos de organismos. Ejemplos de éstos son los peces (Miya *et al.* 2003, Inoue *et al*. 2010), anfibios (Zhang *et al.* 2005, Zhang & Wake 2009), aves (Pereira & Baker 2006, Slack *et al.* 2007) y mamíferos (Arnason *et al.* 2002, Arnason *et al.* 2004, Matsui *et al.* 2007, Arnason *et al.* 2008, Hodgson *et al.* 2009, Chiou *et al.* 2011, Finstermeier *et al.* 2013, Pozzi *et al.* 2014, Ruiz García *et al.* 2016a, Ruiz García *et al.* 2016).

Los árboles génicos mitocondriales son más precisos al reconstruir la historia de la divergencia entre especies que otros marcadores moleculares (Moore 1995). Cummings *et al.* (1989) mostraron que los genomas mitocondriales tienen mayor contenido de información por base que el ADN nuclear. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la variación específica del linaje en la tasa evolutiva del ADN mitocondrial individual se ha determinado previamente (Gissi *et al.* 2000). Esta variación ha estado ligada a las diferencias en las tasas de mutación y está bastante de acuerdo con la longevidad en mamíferos para Cyt-b, por ejemplo (Nabholz *et al.* 2008). Es por esta razón que el reloj mitocondrial de los mamíferos para los genes individuales puede estar errado (Nabholz *et al.* 2013). También, usando modelos de reloj relajado se puede tener en cuenta las variaciones de la tasa de sustitución entre linajes (Thorne *et al.* 1998). Los análisis de genomas mitocondriales podrían superar este problema.

2. METODOLOGIA

2.1. TRABAJO DE CAMPO

Desde el año 1996, el investigador principal ha recolectado muestras de los felinos estudiados procedentes de gran parte de su área de distribución. No todas ellas

lograron procesarse para obtener su secuencia, a continuación, se relaciona el número de secuencias obtenidas por especie y las subespecies morfológicas que representan. 157 muestras de *Panthera onca* procedentes de Guatemala, Costa Rica, Guyana Francesa, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y Paraguay, representando 5 de las 8 subespecies morfológicamente definidas; 80 muestras de *Puma yagouaroundi* obtenidas en México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Guyana Francesa, Ecuador, Perú, Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay (representando 7 de las 8 subespecies determinadas para este felino). 309 muestras de *Leopardus pardalis* obtenidas en Costa Rica, Panamá, Venezuela, trinidad y Tobago, Guyana Francesa, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Argentina y Paraguay (representando 6 de las 10 subespecies morfológicas definidas para esta especie); 118 muestras de *Leopardus wiedii* procedentes de México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Guyana Francesa, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (representando 7 de las 10 subespecies morfológicas definidas para esta especie).

En la Tabla 1 se relaciona el número de muestras a las cuales se les pudo obtener la secuencia para las especies *P. onca*, *P. yagouaroundi*, *L. pardalis* y *L. wiedii* trabajadas con su origen geográfico (país) con las cuales se realizaron los diferentes análisis para este trabajo.

En el caso del tigrillo, como se mostrará más adelante, la situación es compleja porque puede representar varias especies diferentes. Por ello, se analizaron tres conjuntos de datos mitocondriales y se adicionaron secuencias del GenBank tal como se detallan a continuación.

Tabla 1. Origen y número de muestras de las especies *Panthera onca, Puma yagouaroundi, Leopardus pardalis* y *Leopardus wiedii* de las cuales se obtuvieron secuencias para cada uno de los análisis en este trabajo.

Origen geográfico	*Panthera onca*		*Puma yagouaroundi*		*Leopardus pardalis*		*Leopardus wiedii*	
	3 genes	Mitogenómica	3 genes	Mitogenómica	3 genes	Mitogenómica	3 genes	Mitogenómica
Argentina	-	-	9	9	3	-	-	-
Bolivia	30	12	6	2	33	3	27	12
Colombia	73	43	22	14	125	14	31	15
Peru	33	18	19	15	86	22	32	17
Ecuador	5	-	9	5	31	16	2	1
Guyana francesa	2	-	3	2	4	2	3	-
Guatemala	3	2	1	-	-	-	9	-
Brasil	7	1	2	2	14	4	7	4
Costa Rica	2	1	3	3	3	1	1	2
Mexico	-	-	1	-	-	-	3	2
Nicaragua	-	-	-	-	-	-	1	1
Panamá	-	-	1	1	5	4	2	1
Paraguay	1	1	1	1	1	-	-	-
Trinidad y Tobago	-	-	-	-	2	-	-	-
Venezuela	1	-	3	2	2	-	-	-
Total	157	78	80	56	309	66	118	55

Se analizaron tres conjuntos de datos mitocondriales de individuos probables tigrina, así como secuencias mitocondriales de diferentes especies de *Leopardus* disponibles en el GenBank. El primer conjunto de datos constó de secuencias de los genes mitocondriales ATP-8 + 16S rRNA de 75 individuos colectados y analizados. Las muestras representan los nueve taxones siguientes: **1.** cuarenta y una tigrinas (39 muestras realizadas en Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, noroeste y noreste de Argentina y sureste de Brasil y dos secuencias obtenidas en GenBank (Johnson & O´Brien 1996, Li *et al*. 2016); **2.** Tres margays (*L. wiedii*, dos de Colombia y uno de Ecuador); **3.** Seis ocelotes (*L. pardalis*, dos de Colombia, uno de Perú, dos de Brasil y una secuencia obtenida en el GenBank, (Li *et al*. 2016)); **4.** Cuatro gatos andinos (*L. jacobita*, dos de Bolivia y dos secuencias obtenidas de GenBank (Li *et al*. 2016)); **5.** Cuatro gatos de Geoffroy (*L. geoffroyi*, uno de Bolivia y tres secuencias obtenidas de GenBank (Johnson & O´Brien 1996,

Li *et al*. 2016); **6.** Cinco kodkods (*L. guigna*, las cinco secuencias obtenidas de GenBank (Johnson & O´Brien 1996, Li *et al*. 2016, Napolitano *et al*. 2008); **7.** Tres gatos colocolo (*L. colocolo*), dos *L. c. bracattus* de Brasil y *L. c. colocolo* de Chile, todos de GenBank (Johnson & O´Brien 1996, Li *et al*. 2016); **8.** Tres gatos domésticos (*Felis catus*, todos de Colombia) y **9.** Seis jaguarundis (*Puma yagouaroundi*, uno de Perú, uno de Colombia, uno de Ecuador y tres secuencias de GenBank (Johnson & O´Brien 1996, Li *et al*. 2016).

Para el segundo conjunto, se analizaron secuencias del gen mitocondrial ND5 de 81 individuos colectados. Los siguientes taxones están representados: **1.** Treinta tigrinas (17 muestreadas por nosotros en Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador, Nordeste de Argentina y Sudeste de Brasil y 13 secuencias de GenBank obtenidas del norte, centro y sur de Brasil (Trigo *et al*. 2013, Johnson & O´Brien 1996, Li *et al*. 2016); **2.** Tres margays; **3.** Seis ocelotes; **4.** Cuatro gatos andinos; **5.** nueve gatos de Geoffroy (el mismo que en el primer grupo de datos más cinco secuencias adicionales de GenBank (Trigo *et al*. 2008); **6.** Cinco kodkods; **7.** 19 gatos colocolo (cuatro *L. c. garleppi* de Perú, tres *L. c. wolffshoni* de Chile, tres *L. c. pajeros* de Argentina, cuatro *L. c. budini* de Argentina , cuatro secuencias de *L. c. braccatus* obtenidas de GenBank (Trigo *et al*. 2008, Li *et al.* 2016) y un *L. c. colocolo* de GenBank (Johnson & O´Brien 1996); **8.** Dos gatos domésticos y **9.** Seis jaguarundis.

El tercer conjunto consistió en muestras que se amplificaron con éxito para el genoma mitocondrial completo y genomas mitocondriales completos de GenBank. El total de ambas fuentes fue 44 e incluyó los siguientes taxones: **1.** Dieciocho tigrina (17 muestreados, uno de GenBank, Li *et al.* 2016); **2.** Tres margays; **3.** Cinco ocelotes; **4.** Cuatro gatos andinos (dos de GenBank, Li *et al.* 2016); **5.** Tres gatos de Geoffroy (GenBank, Li *et al.* 2016); **6.** Dos kodkods (GenBank, Li *et al.* 2016); **7.** Dos *L. c. braccatus* (GenBank, Li *et al.* 2016); **8.** Dos gatos domésticos y **9.** Cinco jaguarundis. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Número de muestras analizadas para el complejo de especies de *L. tigrinus*, para cada conjunto de datos (ATP-8 y 16S rRNA, ND5 y mitogenomas).

Conjunto de datos	ATP-8 y 16S rRNA	ND5	Mitogenoma
tigrina y (GenBank)	39 (2)	17 (13)	17 (1)
***L. wiedii* y (GenBank)**	3	3	3
***L. pardalis* y (GenBank)**	5 (1)	6	5
***L. jacobita* y (GenBank)**	2 (2)	4	2 (2)
***L. geoffroyi* y (GenBank)**	1 (3)	1 (8)	(3)
***L. guigna* y (GenBank)**	(5)	5	(2)
***L. colocolo* y (GenBank)**	(4)	18 (1)	(2)
***P. yagouaroundi* y (GenBank)**	3 (3)	6	5
Felis catus	3		2

Para todas las especies analizadas, algunas muestras (trozos de pieles) se han obtenido por colaboración de diferentes instituciones latinoamericanas (especialmente, el Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos en Lima-Perú, Museo de Historia Natural de Arequipa-Perú, la Colección Boliviana de Fauna en La Paz-Bolivia, la colección de Mastozoología del Instituto Alexander von Humboldt en Villa de Leyva-Colombia). Sin embargo, la mayor parte de las muestras, consistieron en sangre, manchas de sangre, saliva, pelos con bulbo, trozos de pieles o de músculo, huesos o dientes de animales cazados y recolectados en comunidades indígenas de los países citados. Esas muestras se consiguieron gracias a las siguientes comunidades indígenas en Perú (Bora, Ocaina, Shipigo-Comibo, Capanahua, Angoteros, Orejón, Cocama, Kishuarana y Alamas), Bolivia (Sirionó, Canichana, Cayubaba y Chacobo), Colombia (Jaguas, Ticunas, Huitoto, Cocama, Tucano, Nonuya, Yuri y Yucuna), Brasil (Marubos, Matis, Mayoruna, Kanaimari, Kulina, Maku y Waimiri-Atroari) y Ecuador (Kichwa, Huaorani, Shuar y Achuar). Adicionalmente, se contó con la ayuda de A. Bracho (Venezuela), H. Restrepo y E. Payán (Colombia), A. Castellanos, L. Albuja, A. Laguna (Ecuador), R. Wallace y J. Vargas (Bolivia) y H. Gálvez, H. Plenge, H. Zeballos (Perú) en la obtención de muestras de felinos en esos países.

2.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO

Con las muestras de sangre, piel y músculo se extrajo el ADN con dos métodos diferentes: inorgánica con resinas quelantes (Cheelex 100 TM, Walsh *et al.* 1991) y orgánica con fenol – cloroformo (Sambrook *et al.* 1989). Las extracciones a partir de las células que envuelven la raíz del pelo y de dientes se llevaron a cabo con la resina Cheelex, mientras que las correspondientes a músculo, piel, sangre o mancha de sangre, con el método orgánico. Una vez el ADN fue extraído se procedió a la amplificación del mismo utilizando la técnica del PCR para tres genes; el gen NADH-5 (par de cebadores, ND5.1F: GTGCAACTCCAAATAAAAG y ND5.2R: GGGTCTGAGTTTATATATC, Johnson *et al.* 1998, 350 pb), el gen ATP-8 (par de cebadores, ATP8.1F: GCATTAACCTTTTAAGTTAAAG y ATP8.2R: GGCGAATAGATTTTCGTTCA, Johnson *et al.* 1998, 180 pb) y el gen mitocondrial 16S (par de cebadores, 16S.1F: GTGCAAAGGTAGCATAATCA; 16S.4R: TGTCCTGATCCAACATCGAG, Hoelzel & Green 1992; 364 pb). Las condiciones de amplificación fueron: volúmenes de reacción de 25 µl, conteniendo MgCl2 1 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.1 µM de cada cebador y una unidad de Taq Polimerasa con 100-200 ng de ADN molde. Las temperaturas de la PCR fueron: 95 °C por 5 minutos seguidos de 10 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 64 °C y 1.5 minutos a 72 °C, 25 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 1.5 minutos a 72 °C y una extensión final de 15 minutos a 72 °C. Una vez obtenidos los productos de la PCR, se procedió a su secuenciación en Macrogen USA.

Para el análisis mitogenómico, el ADN se extrajo utilizando QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Inc.) siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Para las extracciones a partir de músculo se siguió el protocolo ‘‘DNA Purification from Tissues.” Los genomas mitocondriales fueron secuenciados por long-template PCR, el cual minimiza la posibilidad de amplificar pseudogenes mitocondriales del genoma nuclear (numts) (Thalmann *et al.* 2004, Raaum *et al.* 2005). La amplificación

del ADN mitocondrial se realizó utilizando el kit LongRange PCR (Qiagen, Inc.), con un volumen de reacción de 25 µl y un mix de 2.5 µl de LongRange PCR Buffer 10X, 500 µM de cada dNTP, 0.6 µM de cada primer, 1 unidad de la enzima Long-Range PCR y entre 50 y 250 ng de ADN. Las condiciones para la PCR fueron: 94 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, hibridación del primer entre 50 y 57 °C (dependiendo del par de primers) por 30 s, y una extensión a 72 °C por 8 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 93 °C por 30 s, hibridación de primers entre 45–52 °C (dependiendo del par de primers) por 30 s, y extensión a 72 °C por 5 min, con una extensión final a 72 °C por 8 min. Cuatro pares de primers (Tabla 3) generaron secuencias sobrelapantes de 3.680 a 5.011 pb, permitiendo una prueba de calidad para la circularidad del genoma (Bensasson *et al.* 2001, Thalmann *et al.* 2004).

Tabla 3. Primers utilizados para la obtención del mitogenoma de las muestras de las especies de felinos trabajados.

Primer	Secuencia (5´a 3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Genes contenidos en el amplicón
LT1F	ATGACTAATCAGCCCATGAT	5.011	Región control, tRNA-Phe, 12S rRNA, tRNA-Val, 16S rRNA, tRNA-Leu, ND1
LT1R	AAGCATCCCACCTCAAACAT		
LT2F	AAGAAATATGTCTGACAAAA	4.015	tRNA-Ile, tRNA-Gln, tRNA-Met, ND2, tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, COI, tRNA-Ser, tRNA-Asp y COII
LT2R	TGATCTGCATCTATACTGA		
LT3F	CATTAAGAAGCTAAATAAGC	4.050	tRNA-Lys, ATP-8, ATP-6, COIII, tRNA-Gly, ND3, tRNA-Arg, ND4L, ND4, tRNA-His, tRNA-Ser y tRNA-Leu.
LT3R	GTGCAACTCCAAATAAAAGT		
LT4F	TAAAAGTAATAAACCTATTT	3.680	ND5, ND6, tRNA-Glu, Cyt-b, tRNA-Thr and tRNA-Pro.
LT4R	TGGGACATCTCGATGGACTA		

Ambas hebras fueron secuenciadas usando BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Inc.), cuyos productos fueron analizados en un ABI 3730 (Applied Biosystems, Inc.). Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa Sequencher 4.7 (Gene Codes, Corp., Ann Arbor, MI).

Las secuencias obtenidas con los cuatro pares de primers fueron c*onca*tenadas con el programa SequenceMatrix v1.7.6 (Vaidya *et al.* 2011) después de remover regiones con alineamientos pobres con el programa Gblocks 0.91 (Talavera & Castresana 2007). Los análisis se realizaron en dos grupos de datos para cuatro de las especies trabajadas; uno con las secuencias c*onca*tenadas de los genes individuales y el segundo grupo corresponde al genoma mitocondrial (16.756 pb). Mientras que, para cuatro de las especies estudiadas, se analizaron dos grupos de datos (3 genes y mitogenómica), para el caso del complejo de especies de *Leopardus tigrinus*, se trabajó con tres grupos de datos: ATP8-16S, ND5, y mitogenómica.

2.3. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD MOLECULAR

La diversidad genética es una medida de la variabilidad genética de una población. Para el caso de las secuencias se utilizaron los siguientes estadísticos: S (número de sitios polimórficos), π (diversidad nucleotídica), H_d (diversidad haplotípica), k (número promedio de diferencias nucleotídicas) y θ (estadístico theta por secuencia). Estos estadísticos fueron obtenidos a través del programa DNAsp 5.10 (Librado & Rozas 2009).

2.4. CAMBIOS DEMOGRÁFICOS

Para entender los patrones de variación genética de una población, es necesario conocer su historia demográfica (cuellos de botella, expansiones poblacionales, tamaño constante), la cual se interpretó mediante dos métodos: **1.** la distribución de

desemparejamientos (Mismatch distribution) obtenida por el procedimiento de Rogers & Harpending (1992) y Rogers *et al.* (1996). Para ésta se obtienen dos curvas teóricas: una de tamaño poblacional constante y la otra en expansión. La distribución observada se compara con las dos curvas teóricas, determinando la similitud entre ellas, mediante el uso del estadístico raggedness rg (Harpending *et al.* 1993, Harpending 1994); **2.** Otro procedimiento es el Bayesian Skyline Plot mediante BEAST v. 1.8.1. y TRACER v1.6. La opción "Coalescence-Bayesian skyline" fue seleccionada con cuatro pasos con 40.000.000 de generaciones (las primeras 4.000.000 se descartaron por burn-in), con una función kappa con log Normal (1, 1.25) y el tamaño poblacional "Skyline" siguiendo una distribución uniforme (0, infinito; valor inicial 80). Con Tracer v1.5 (Rambaut *et al.* 2013), se analizaron las densidades marginales de las divisiones temporales y se seleccionó la opción de reconstrucción "Bayesian Skyline". Se utilizó una variante constante (de un paso) en el "Bayesian Skyline" con el tiempo máximo en el gráfico como la densidad posterior del 95%.

2.5. ANÁLISIS ESPACIAL

Se realizaron tres tipos de análisis espacial: **1.** Aislamiento por distancia (IBD Isolation by distance) en el que se compara una matriz de distancias genéticas entre individuos contra la correspondiente a la de distancias geográficas mediante una prueba de Mantel utilizando el programa Alleles In Space (Miller 2005) con las distancias logaritmizadas y 10.000 permutaciones para valorar la significancia del coeficiente de correlación. **2.** Análisis de autocorrelación espacial con el estadístico Ay (Miller 2005) para cada clase de distancia (DC), donde $A_y = \Sigma_{i = 1, n} \Sigma_{j > i, n} (D_{ij}W_{yij}) / \Sigma_{i = 1, n} \Sigma_{j > i, n} W_{yij}$, donde n es el número de individuos en el conjunto de datos, D_{ij} es la distancia genética entre las observaciones i y j. Los elementos de una matriz binaria, W_{yij}, toman valores de 1 si la distancia geográfica entre la observación i y j están dentro de los límites especificados para un DC especificado y son 0 en el caso contrario. Ay se puede interpretar como la distancia genética promedio entre pares

de individuos que caen dentro de una DC especificada. A_y toma un valor de 0 cuando todos los individuos dentro de una DC son genéticamente idénticos y asume un valor de 1 cuando todos los individuos dentro de una DC son completamente diferentes. La probabilidad para cada DC se obtuvo utilizando 10.000 aleatorizaciones. Para jaguares, ocelotes, margay y jaguarundi se hicieron análisis de autocorrelación con dos conjuntos de datos (genes ATP8 + 16S rRNA + ND5 para el primer conjunto y el mitogenoma completo en el segundo conjunto). Para el complejo de especies de tigrillos se analizaron tres conjuntos de datos (genes ATP8-16S rRNA, ND5, y mitogenómica). Para ello se definieron 5 clases de distancias (CD). Este análisis se llevó a cabo con el programa AIS (Miller 2005). **3.** Se realizó también un análisis bayesiano usando el paquete Geneland 1.0.7 en R (Guillot *et al.* 2005), cuyos parámetros fueron: un millón de iteraciones (MCMC), una tasa máxima del proceso de Poisson fijado en 100, incertidumbre de las coordenadas espaciales fijadas a 5 km y el número máximo de nuclei en la teselación Poisson-Voronoi fijado a 300. Con estos parámetros se realizaron 10 corridas diferentes para determinar los valores k (número significativo de poblaciones en los datos), oscilando entre 1 a 20 poblaciones. Las corridas con los valores más elevados de máxima verosimilitud se emplearon para obtener las figuras donde se muestra la posible estructura espacial en cada una de las especies analizadas.

2.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis de secuencias de ADN permite inferir la historia evolutiva de las especies o una aproximación de los cambios que sufrieron a través del tiempo, especificando cuáles, cuándo y sus causas a la vez que establece relaciones de parentesco. Abascal (2007) afirmó que las secuencias de los genes existentes hoy son un espejo del pasado. Las inferencias se expresan en forma de árbol, cuya topología refleja las relaciones de parentesco entre grupos de individuos y la longitud de las ramas, la distancia entre ellos.

Mediante los programas MrModeltest v2.3 (Nylander 2004) y MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013) se determinó el mejor modelo mutacional para los grupos de secuencias que se analizaron. Con el criterio de información Akaike (AIC; Akaike1974, Posada & Buckley 2004) se determinó el mejor modelo nucleotídico en cada grupo de secuencias.

Los árboles filogenéticos se obtuvieron con los procedimientos de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano (BI). Para el primer caso, se utilizó el programa RAxML v7.2.6 (Stamatakis 2006); para escoger el modelo que más se ajustaba, se corrieron 50 iteraciones independientes utilizando tres particiones de datos (codón 1, codón 2, codón 3). Adicionalmente, se corrieron otras 50 iteraciones utilizando dos particiones de datos (la combinación de los codones 1 + 2, codón 3). Para cada grupo de secuencias se utilizó el modelo GTR+G (modelo de tiempo general reversible + distribución gamma de la tasa de variación entre sitios; Lanave *et al.* 1984, Tavaré 1986) con el cual se buscó el árbol y el soporte de la topología se estimó con 500 réplicas de boostrap usando GTR (Stamatakis 2006).

Para el caso del análisis bayesiano, los árboles, para cada uno de los grupos de secuencias, se obtuvieron con el programa BEAST v. 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012). Se corrieron cuatro iteraciones independientes usando tres particiones de datos (codón 1, codón 2, codón 3) con seis cadenas MCMC muestreadas cada 10.000 generaciones para 40 millones de generaciones después de un periodo de burn-in de 4 millones de generaciones. La convergencia se verificó utilizando Tracer v1.6 (Rambaut *et al.* 2013). Se representó la probabilidad contra las generaciones y se estimó el tamaño efectivo de la muestra (ESS> 200) de todos los parámetros a través de cuatro análisis independientes para determinar la convergencia y resultados óptimos. Los resultados de las diferentes corridas se combinaron mediante el programa LogCombiner v1.8.0 (Rambaut & Drummond 2012) y TreeAnnotator v1.8.0 (Rambaut & Drummond 2012). Se utilizó un modelo de

especiación de Yule y un reloj molecular relajado con una tasa de distribución log-normal no correlacionada (Drummond *et al.* 2006). Los valores de probabilidad posterior proporcionaron una evaluación del grado de apoyo de cada nodo en el árbol. Los árboles fueron visualizados en el programa FigTree v. 1.4 (Rambaut 2012). A partir de los árboles bayesianos se obtuvieron los tiempos de divergencia del ancestro común más reciente (TMRCA) para los diferentes nodos que coincidían con los nodos significativos de los árboles ML. En el caso de las especies del género *Leopardus* (ocelote, margay y el complejo de especies de tigrillos), el tiempo prior para el inicio de la diversificación en el género *Leopardus* de 3.05 + 1.1 millones de años (MA) (97,5% intervalo de confidencia: 0.894 – 5.206 MA). Este valor es la media aritmética de los valores temporales propuestos para la diversificación de los taxones actuales de *Leopardus* estimados por Johnson *et al.* (2006) (valor medio = 2.91 MA, valor mínimo= 2.02 MA, valor máximo= 4.25 MA) y el propuesto por Li *et al.* (2016) (valor medio = 3.14 MA, valor mínimo= 1.64 MA, valor máximo= 5.03 MA). Aunque lo ideal al emplear priores en los árboles filogenéticos es utilizar información del registro fósil, el registro para el género *Leopardus* es escasa y fragmentada, aunque los fósiles encontrados no entran en conflicto con los datos moleculares. Para el jaguar, el tiempo prior utilizado fue de 2.8 MA que es el tiempo promedio obtenido a partir de los estudios de Johnson *et al.* (2006) (valor medio = 2.87 MA, valor mínimo= 1.81 MA, valor máximo= 4.63 MA) y por Li *et al.* (2016) (valor medio = 2.73 MA, valor mínimo= 1.48 MA, valor máximo= 5.71 MA). Finalmente, para el jaguarundi, el tiempo prior utilizado fue de 3.9 MA que es el tiempo promedio obtenido a partir de los estudios de Johnson *et al.* (2006) (valor medio = 2.87 MA, valor mínimo= 1.81 MA, valor máximo= 4.63 MA) y por Li *et al.* (2016) (valor medio = 2.73 MA, valor mínimo= 1.48 MA, valor máximo= 5.71 MA).

De acuerdo con Pennington & Dick (2010), las estimas anteriores corresponden a una de las aproximaciones para inferir los tiempos de divergencia: las filogenias calibradas con el registro fósil. La segunda aproximación es la llamada: “relojes moleculares prestados” en la que se emplea tasas de sustitución nucleotídica

directas inferidas en otros taxones. Para este caso, en este trabajo se utilizó una red de haplotipos (MJN – median joining network) con el programa Network 4.6.10 de Fluxus Technology Ltda. (Bandelt *et al.* 1999). El estadístico ρ (Morral *et al.* 1994) fue estimado y transformado en años de divergencia entre los haplotipos estudiados. Para determinar las divisiones temporales se estimó la tasa de mutación por secuencia y por millón de años. Para la secuencia c*onca*tenada de los tres genes, la tasa de mutación promedio utilizada fue 1.18×10^{-6}, que equivale a una mutación cada 260.213 años (Johnson & O'Brien1997, Culver *et al.* 2000) y para el mitogenoma, la tasa de mutación promedio utilizada fue 1.15×10^{-6}, lo que equivale a una mutación cada 5.500 años. Las redes son más apropiadas para las filogenias intraespecíficas que los algoritmos de árboles cladogenéticos debido a que permiten la coexistencia de haplotipos ancestrales y descendientes, mientras que los árboles tratan todas las secuencias como taxones terminales (Posada & Crandall 2001).

3. RESULTADOS

3.1. ESTADÍSTICOS DE DIVERSIDAD MOLECULAR

La diversidad genética obtenida a nivel de secuencias en términos de diversidad haplotípica (H_d), diversidad nucleotídica (π), entre otros, mostraron altos valores en todos y cada uno de los taxones estudiados y para cada grupo de secuencias (Tabla 4). El análisis filogenético, que se presentará más adelante, muestra que en lo que *a priori* se creía que era una única especie, *L. tigrinus*, en realidad, está integrada por diferentes especies, algunas de ellas probablemente ignoradas por la ciencia hasta el momento. Por lo tanto, algunos de los estadísticos obtenidos para esta *a priori* supuesta especie pueden estar sobreestimados.

Tabla 4. Estadísticos de diversidad genética para las cuatro especies de felinos y el complejo de especies de tigrillos trabajados, para cada agrupación de secuencias.

	Panthera onca **3 genes**	***Panthera onca*** **Mitogenoma**	***Puma yagouaroundi*** **3 genes**	***Puma yagouaroundi*** **Mitogenoma**	***Leopardus pardalis*** **3 genes**	***Leopardus pardalis*** **Mitogenoma**	***Leopardus wiedii*** **3 genes**	***Leopardus wiedii*** **Mitogenoma**	**Complejo de especies de tigrillos ATP-8 y 16S**	**Complejo de especies de tigrillos ND5**	**Complejo de especies de tigrillos Mitogenoma**
Secuencias analizadas	157	78	66	56	309	66	118	55	40	30	18
Número de sitios (pb)	559	1116	534	835	546	826	546	859	364	315	862
Número de haplotipos	130	73	59	53	191	53	85	54	24	16	17
Diversidad haplotípica (Hd)	0.9950 +/- 0.0020	0.998 +/- 0.003	0.995 +/- 0.004	0.998 +/- 0.004	0.9738 +/- 0.0049	0.990 +/- 0.005	0.976 +/- 0.009	0.999 +/- 0.004	0.949 +/- 0.020	0.943 +/- 0.022	0.993 +/- 0.021
Diversidad nucleotídica (π)	0.03541 +/- 0.00256	0.02913 +/- 0.00300	0.04728 +/- 0.00432	0.06607 +/- 0.01012	0.03056 +/- 0.00335	0.02359 +/- 0.00307	0.03504 +/- 0.00327	0.07360 +/- 0.00688	0.05874 +/- 0.01133	0.08868 +/- 0.01102	0.09353 +/- 0,00829
Número promedio de diferencias nucleotídicas (k)	19.796 +/- 8.80	32.418 +/- 14.29	25.199 +/- 11.20	55.169 +/- 24.20	16.470 +/- 7.35	19.464 +/- 8.72	19.133 +/- 8.53	63.220 +/- 27.70	21.382 +/- 9.63	27.846 +/- 12.54	80.438 +/- 36.33
θ por secuencia	46.712 +/- 10.73	83.815 +/- 21.41	47.066 +/- 12.57	79.240 +/- 21.57	71.010 +/- 14.51	52.319 +/- 13.93	44.913 +/- 10.823	79.774 +/- 21.80	26.566 +/- 7.98	23.727 +/- 7.60	66.288 +/- 23.17

Los valores de diversidad haplotípica (H_d) fueron muy parecidos en todos los taxones estudiados, oscilando entre 0.943 (complejo de especies de tigrillos – ND5) y 0.999 (*L. wiedii* - mitogenoma). Todos estos valores son muy elevados si se tiene en cuenta que el valor máximo para este estadístico es 1.

En cuanto a la diversidad nucleotídica (π) los valores, además de ser elevados, presentaron diferencias entre las especies y entre grupos de datos. Para el grupo de datos de tres genes, los valores más elevados los presentó el complejo de especies de tigrillos con 0.058 para ATP8-16S y 0.088 para ND5, seguido del 0.047 para *P. yagouaroundi*, 0.035 para *L. wiedii* y *P. onca* y el menor valor de 0.030 para *L. pardalis*. El grupo de datos de mitogenomas con un número menor de secuencias para cada una de las especies, nuevamente presentó el valor más alto: 0.093 en el complejo de especies de tigrillos, seguido por *L. wiedii* con 0.073, *P. yagouaroundi* con 0.066, *P. onca* con 0.029 y finalmente *L. pardalis* con 0.023.

Claramente, se observa que lo que se creía que era una única especie (*L. tigrinus*) presentó reiteradamente mayores valores de diversidad genética, lo cual concuerda con los análisis filogenéticos posteriores donde se detectan posibles diferentes especies dentro de lo que tradicionalmente se han denominado tigrillos.

3.2. POSIBLES CAMBIOS DEMOGRÁFICOS

3.2.1. Análisis bayesiano (Bayesian skyline plot).

Para cada una de las especies y grupo de datos, los gráficos indican expansiones poblacionales en su mayoría pronunciadas y solo una moderada para los tigrillos hibridizados con margay-ocelote mayoritariamente colombianos (ver análisis filogenéticos) (tres genes). Hay que resaltar que para ningún grupo de tigrillos del complejo detectado con mitogenoma no se pudo realizar este análisis debido al escaso número de muestras.

Las expansiones poblaciones para todas las especies dieron inicio entre los 150.000 y 700.000 años atrás, lo que coincide con la última etapa de la época geológica del Pleistoceno. Para cada especie entre grupos de datos, se presentaron diferencias

entre 150.000 y 500.000 años excepto para *L. wiedii*, cuyos gráficos son casi idénticos y el inicio de la expansión coincide en los 300.000 años atrás (Figura 6).

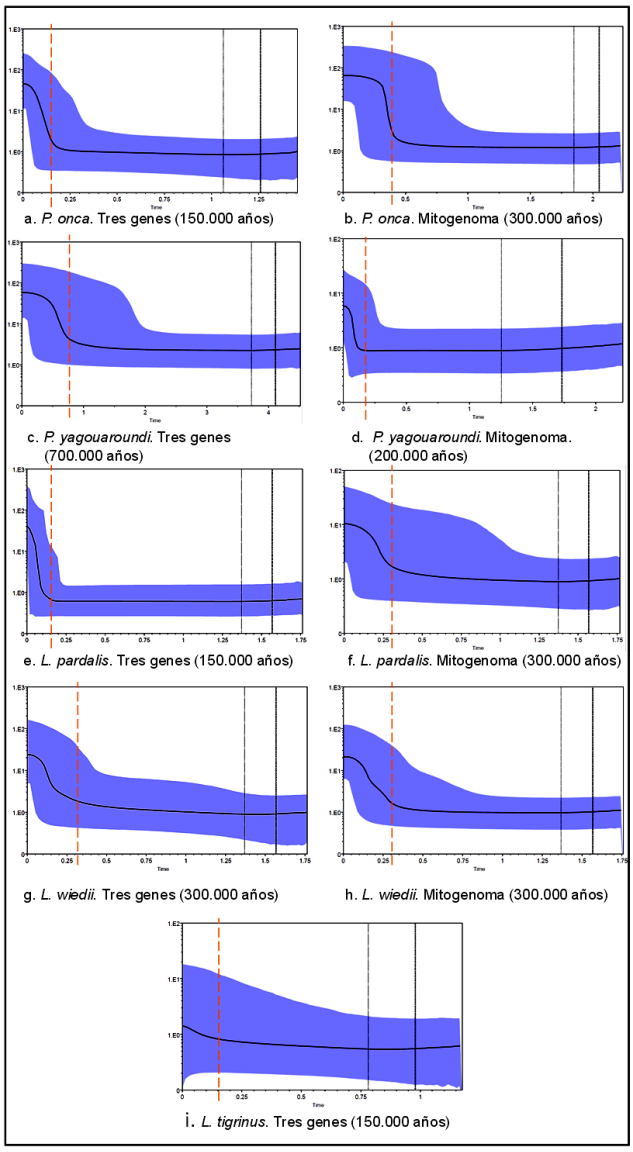


Figura 6. "Bayesian skyline plot" (BSP) obtenido para cada una de las especies de felinos y grupo de datos trabajados. En paréntesis los años atrás en los que se inició la expansión. Para el caso de los tigrillos, únicamente se muestra el resultado para los tigrillos hibridizados con margay-ocelote mayoritariamente colombianos (ver análisis filogenéticos).

3.2.2. Distribución mismatch.

Para este análisis se obtuvo el valor de r (Raggedness) y su probabilidad P[r] para todas las especies y para los diferentes grupos de datos (Tabla 5), con su gráfico correspondiente o distribución de desemparejamientos (distribución mismatch).

Tabla 5. Valores del estadístico r y su probabilidad para cuatro especies de felinos y para los tigrillos hibridizados con margay-ocelote mayoritariamente colombianos (ver análisis filogenéticos) y por grupos de datos. (*) valor de probabilidad significativa.

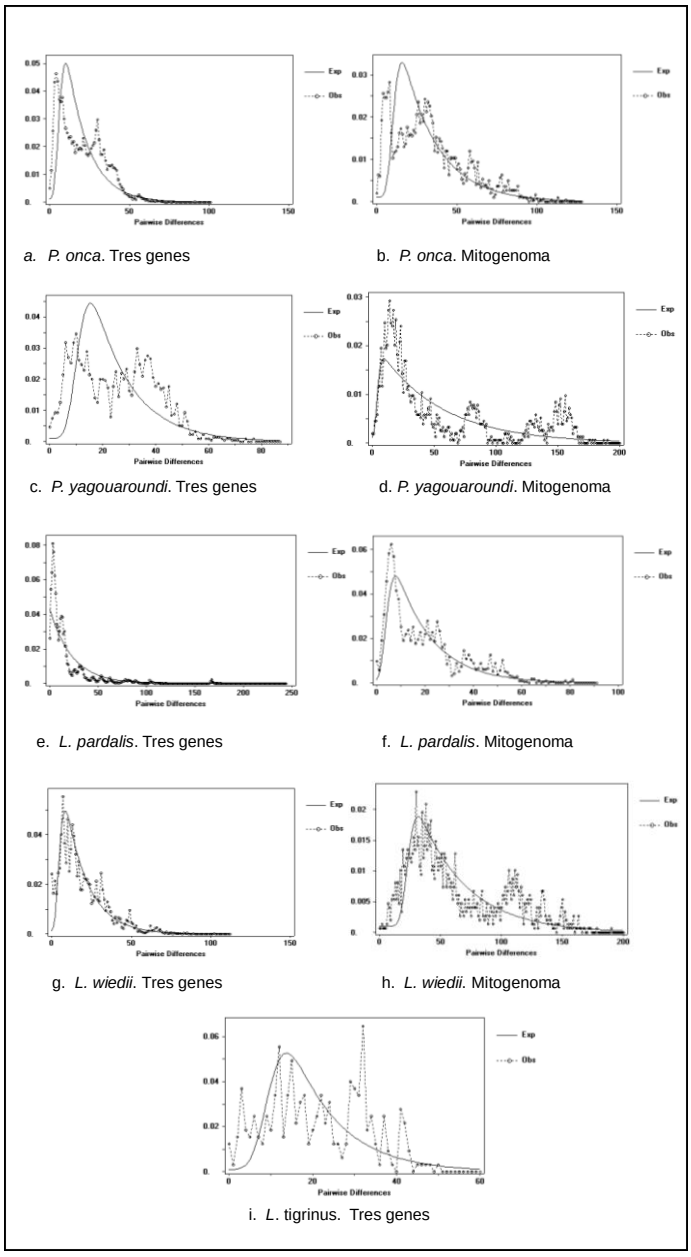
	Panthera onca **3 genes**	***Panthera onca*** **Mitogenoma**	***Puma yagouaroundi*** **3 genes**	***Puma yaguaroundi*** **Mitogenoma**	***Leopardus pardalis*** **3 genes**	***Leopardus pardalis*** **Mitogenoma**	***Leopardus wiedii*** **3 genes**	***Leopardus wiedii*** **Mitogenoma**	***Leopardus tigrinus*** **3 genes**
r	0.0009	0.0010	0.0015	0.0013	0.0023	0.0022	0.0028	0.0015	0.0124
P[r]	0.00001*	0.00001*	0.00001*	0.00070*	0.00150*	0.00080*	0.00740*	0.00750*	0.23320

Todos los valores de r para todas las especies y grupos de datos presentaron valores muy pequeños y significativos, lo cual significa que jaguares, ocelotes, margays y jaguarundis han pasado históricamente por expansiones poblacionales, existiendo una elevada correlación entre lo obtenido con las técnicas BSP y las distribuciones mismatch. Únicamente el grupo de tigrillos hibridizados con margay-ocelote no presentó una distribución mismatch significativa (P[r]= 0.23320).

En la Figura 7, se presentan los gráficos correspondientes a cada especie, con los dos grupos de datos.

3.3. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL

Se llevaron a cabo diferentes pruebas:



a. *P. onca*. Tres genes

b. *P. onca*. Mitogenoma

c. *P. yagouaroundi*. Tres genes

d. *P. yagouaroundi*. Mitogenoma

e. *L. pardalis*. Tres genes

f. *L. pardalis*. Mitogenoma

g. *L. wiedii*. Tres genes

h. *L. wiedii*. Mitogenoma

i. *L*. tigrinus. Tres genes

Figura 7. Distribución de diferencias entre pares de secuencias bajo un modelo de expansión poblacional para cada una de las especies de felinos y grupos de datos trabajados. Para los tigrillos hibridizados con margay-ocelote mayoritariamente colombianos (ver análisis filogenéticos) no se detectó ninguna expansión poblacional significativa.

3.3.1. Prueba de mantel logaritmizada - Patrones de aislamiento por distancia.

Para cada una de las especies y grupos de datos se realizó esta prueba. Para el complejo de especies de tigrillos se utilizaron tres grupos de datos, como se explicó en Materiales y Métodos; para las demás especies se utilizaron dos grupos de datos (tres genes y mitogenoma).

Los valores de r para todos los casos fueron positivos, es decir, existe una relación directa entre las dos variables: a mayor distancia geográfica, hay mayor diferenciación genética, relación que se puede observar en las gráficas correspondientes a esta prueba (Figura 8). Sin embargo, no todas las probabilidades para esos valores de correlación fueron significativas: *P. onca* – mitogenoma, *L. wiedii* para tres genes y para mitogenoma y *P. yagouaroundi* – tres genes, presentaron valores de probabilidad no significativos.

Es decir, la distancia geográfica no explica significativamente la diferenciación genética encontrada entre los ejemplares de esas especies para esos grupos de genes (Tabla 6). Sin embargo, *P. onca* – tres genes, *P. yagouaroundi* – mitogenoma y *L. pardalis* (tres genes y mitogenoma) mostraron que la distancia geográfica causa una cierta estructuración espacial, aunque moderada o muy pequeña (1.71%, 4%, 0.76%, 7.12%, respectivamente). Para el complejo de especies de tigrillos se presentó una marcada y significativa estructura espacial para cada uno de los grupos de datos, a diferencia de los casos anteriores (34.7% para ND5, 22.9% para ATP8-16S y 57.22% para el mitogenoma). En el más óptimo de los casos, el 57.22% de las distancias genéticas en el complejo de especies de los tigrillos son explicadas por las distancias geográficas entre los individuos.

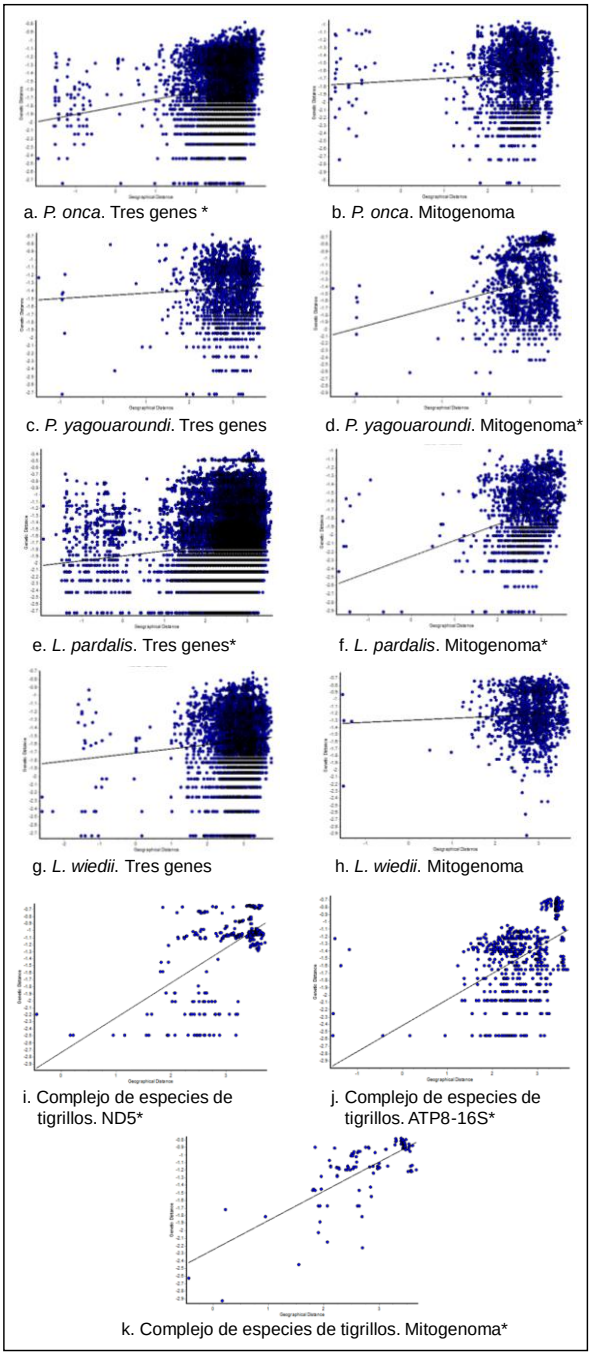


Figura 8. Diagramas de dispersión obtenidas para la prueba de Mantel para cada una de las especies y grupos de datos trabajadas. (*) relaciones significativas.

Tabla 6. Valores de la correlación (r) del test de Mantel entre las distancias genéticas y distancias geográficas para las cinco especies de felinos y grupos de datos trabajados. P (probabilidad), r^2 (correlación al cuadrado), % (porcentaje de la diferencia genética que se explica por la distancia geográfica), * (valor significativo).

	Panthera onca 3 genes	*Panthera onca* Mitogenoma	*Puma yagouaroundi* 3 genes	*Puma yagouaroundi* Mitogenoma	*Leopardus pardalis* 3 genes	*Leopardus pardalis* Mitogenoma	*Leopardus wiedii* 3 genes	*Leopardus wiedii* Mitogenoma
r	0,131	0,051	0,050	0,200	0,087	0,267	0,074	0,045
P	0.005*	0.182	0,232	0,009*	0,001*	0,002*	0,054	0,244
r^2	0,017	0,003	0,002	0,040	0,008	0,071	0,005	0,002
%	1,719	0,256	0,247	3,994	0,763	7,143	0,545	0,202

	Complejo de especies de tigrillos* ND5	Complejo de especies de tigrillos* ATP8-16S	Complejo de especies de tigrillos* Mitogenoma
r	0,589	0,478	0,756
P	0,001*	0,001*	0,001*
r^2	0,347	0,229	0,572
%	34,721	22,874	57,218

La fuerte estructuración espacial encontrada en los tigrillos, con respecto a las otras cuatro especies de felinos, aboga en favor de la inexistencia de flujo génico entre las poblaciones de tigrillos de diferentes áreas geográficas de Latinoamérica debido a que constituyen probablemente diferentes especies tal como se muestra en el análisis filogenético.

3.3.2. Análisis de autocorrelación espacial.

Se obtuvieron los correlogramas de la autocorrelación espacial con cinco CD (clases de distancia) de igual tamaño geográfico con un número desigual de comparaciones en cada CD.

De los once correlogramas obtenidos, seis fueron significativos: *P. onca* – tres genes (P = 0.004), *L. pardalis* – mitogenoma (P = 0.034), *P. yagouaroundi* - mitogenoma (P = 0.049) y el complejo de especies de tigrillos para los tres grupos de datos (P = 0.025, 0.003, 0.0006, respectivamente). Únicamente *L. wiedii* no

mostró un correlograma significativo, lo cual se traduce en ser la única especie que no presentó ningún indicio de estructura genética (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de autocorrelación espacial para cinco clases de distancia (Ay CD) y valores de probabilidad (P) de cada correlograma global (V) para cada especie y grupo de datos. (*) Probabilidad significativa.

	Panthera onca 3 genes	*Panthera onca* Mitogenoma	*Puma yagouaroundi* 3 genes	*Puma yagouaroundi* Mitogenoma	*Leopardus pardalis* 3 genes	*Leopardus pardalis* Mitogenoma	*Leopardus wiedii* 3 genes	*Leopardus wiedii* Mitogenoma
V	0.01817	0.00214	0.01449	0.02665	0.01188	0.01129	0.00360	0.00338
P	0.004*	0.93880	0.11040	0.04910*	0.08460	0.03490*	0.68890	0.968
Ay CD1	0.033*	0.029	0.054	0.055*	0.030	0.020*	-0.035	0.072
Ay CD2	0.035	0.028	0.053	-0.078	-0.034	-0.025	0.034	-0.075
Ay CD3	- 0.053*	-0.032	-0.059	-0.099*	-0.036	-0.034*	0.034	-0.079
Ay CD4	-0.054*	0.029	0.041	0.057	-0.050	-0.038*	-0.042	0.069
Ay CD5	-0.066*	-0.032	0.024*	0.022*	-0.050	-0.040	-0.038	-0.743

	Complejo de especies de tigrillos* ND5	Complejo de especies de tigrillos* ATP8-16S	Complejo de especies de tigrillos* Mitogenoma
V	0.02090	0.05732	0.03176
P	0.02530*	0.00310*	0.00060*
Ay CD1	0.058*	0.029*	0.059*
Ay CD2	-0.092	0.041*	0.076
Ay CD3	-0.122*	-0.150*	-0.143*
Ay CD4	-0.101*	-0.137*	-0.119*
Ay CD5	0.095	0.033	0.071

En cuanto a los correlogramas (Figura 9), se pueden observar dos tipos de estructura: clina más o menos monotónica para las especies, *P. onca* (Figuras 9a y 9b) y *L. pardalis* (Figuras 9e y 9f) y una clina circular en los casos de *P. yagouaroundi* (Figuras 9b y 9c) y el complejo de especies de tigrillos (Figuras 9i, 9j y 9k). Esto significa para los casos de jaguares y ocelotes que cuanto más aumenta la separación geográfica más aumenta la diferenciación genética entre los individuos. En el caso del jaguarundi y del complejo de especies de tigrillos, la situación es diferente. En la primera especie, los individuos separados entre 0 y 3.000 km de distancia disminuyen su similitud genética, pero los individuos alejados entre 3.000 km y 4.500 km de distancia vuelven a aumentar su parecido genético. En este caso concreto, un grupo importante de jaguarundis del Chaco y Misiones de Argentina está altamente relacionado con parte de los individuos muestreados

en el norte de Colombia (Chocó, Cesar, Bolívar), lo que hace que los ejemplares más alejados geográficamente son también los más parecidos genéticamente. En el caso del complejo de especies de tigrillos, la clina circular (diferenciación genética de 0 a 2.500 km aproximadamente, mientras que el parecido genético vuelve a darse entre las poblaciones distanciadas aproximadamente a 4.500 km) es fácilmente explicada por el hecho de que el tigrillo centroamericano, y que también se extiende por la zona pacífica de Colombia y Ecuador, (tradicionalmente *L. tigrinus oncilla*, en este trabajo lo denominaremos *L. oncilla*, (ver la Discusión) y el tigrillo de sur, y parte del centro, de Brasil (tradicionalmente *L. tigrinus guttulus*, actualmente *L. guttulus sensu* Trigo *et al.* 2013) son molecularmente más parecidos entre sí que con los diferentes grupos de tigrillos que detectamos en la zona intermedia andina (Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y noroeste de Argentina), que muestran una diferenciación genética altamente marcada con respecto a esos dos grupos.

En resumen, *L. wiedii* no presentó ninguna estructura espacial con ninguno de los dos grupos de datos analizados, mientras que dos especies presentaron clinas circulares (*P. yagouaroundi* y el complejo de especies de tigrillos) y otras dos especies, *P. onca* y *L. pardalis*, presentaron clinas monotónicas. El complejo de especies de tigrillos fue, con mucha diferencia estadística, el que más estructura espacial presentó, seguida de la estructura genética más leve en *L. pardalis*. La extremada estructura genética en el complejo de los tigrillos es una prueba más en favor de que el tradicional *L. tigrinus* es, en realidad, un complejo de pequeñas especies de felinos manchados genéticamente bien diferenciados.

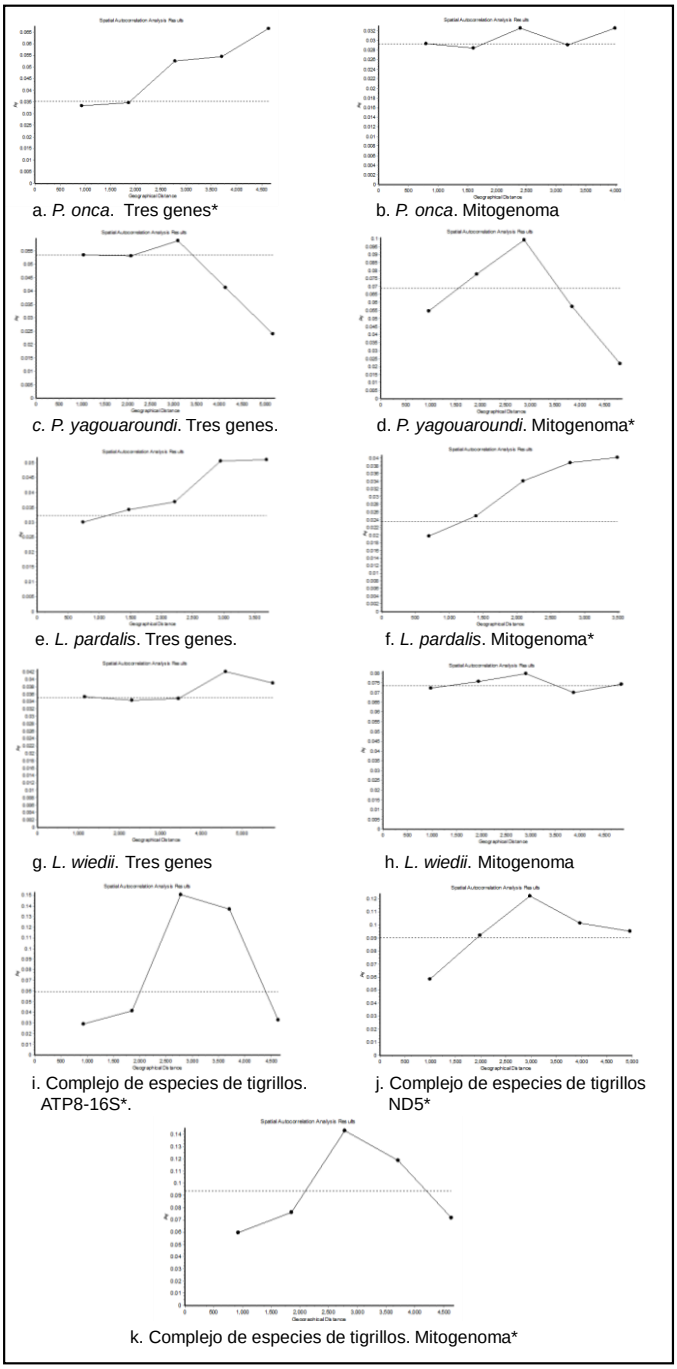


Figura 9. Correlogramas para cada una de las especies y complejo de especies de tigrillos para cada grupo de datos trabajados. (*) Correlogramas globales significativos.

3.3.3. Geneland.

El grupo de datos mitogenómicos para el jaguar detectó siete grupos genéticos diferentes (k=7). **1.** Conformado por los individuos de Guatemala; **2.** por el individuo de Costa Rica; **3.** El individuo de Apartadó (Antioquia); **4.** Los individuos de Cauca, Valle del Cauca y Chocó (Pacífico colombiano) + individuos del norte y nororiente de Bolivia; **5.** Los individuos del Huila y uno de Meta en Colombia + los individuos de Loreto (Perú); **6.** El más extenso, formado por los individuos del norte, centro-oriente y sur-oriente de Colombia + individuos del centro-sur de Perú + individuos del nororiente de Bolivia y **7.** Por un individuo de Brasil. Ver Figura 10.

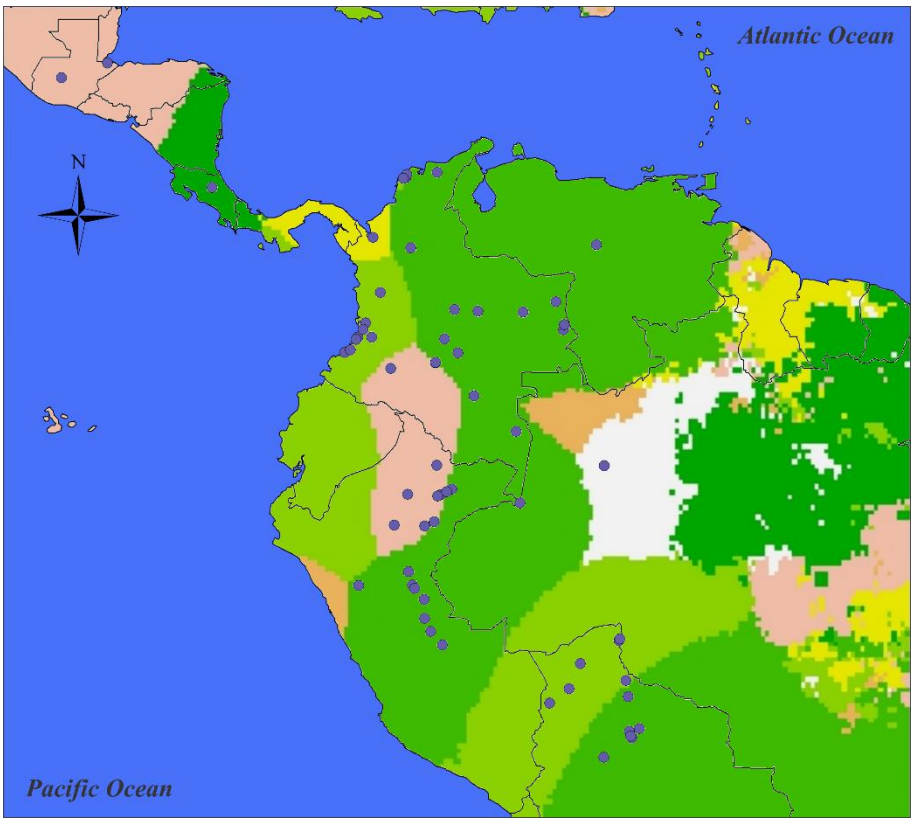


Figura 10. Mapa de las poblaciones (k=7) detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Panthera onca*.

Para el jaguarundi, Geneland detectó 5 acervos genéticos diferentes (k=5). **1.** Los individuos de Costa Rica, Panamá, Pacífico de Colombia, norte de Ecuador, centro

y norte de Perú, oriente de Bolivia, noroccidente y centro de Argentina; **2.** Individuos de la costa atlántica de Colombia y Venezuela; **3.** Individuos del centro y oriente de Colombia + el centro oriente, centro occidente y suroccidente de Argentina. **4.** El individuo del centro occidente de Bolivia y **5.** Los individuos del sur de Brasil, Paraguay, y Nororiente de Argentina. Ver Figura 11.

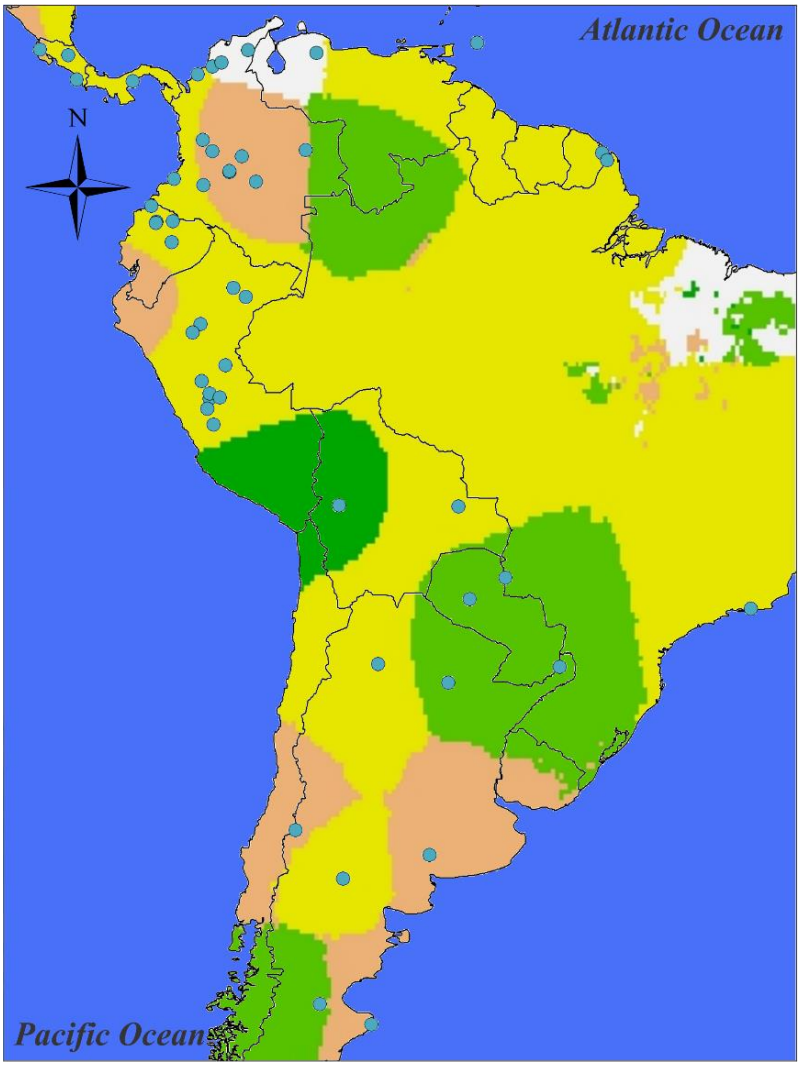


Figura 11. Mapa de las poblaciones (k=5) detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Puma yagouaroundi*.

Para el ocelote, el análisis de Geneland detectó ocho poblaciones diferentes (k=8). **1.** Individuos de Centroamérica, occidente de Ecuador + los del centro occidente de Brasil; **2.** Individuos de Colombia excepto una de Chocó + oriente de Ecuador + norte de Perú; **3.** Un individuo del Valle del Cauca (Colombia); **4.** Un individuo de Esmeraldas (Ecuador); **5.** Un individuo de la Guyana Francesa; **6.** Individuos del centro de Perú; **7.** Individuos del centro oriente de Brasil y 8. Individuos del centro de Bolivia. Ver Figura 12.

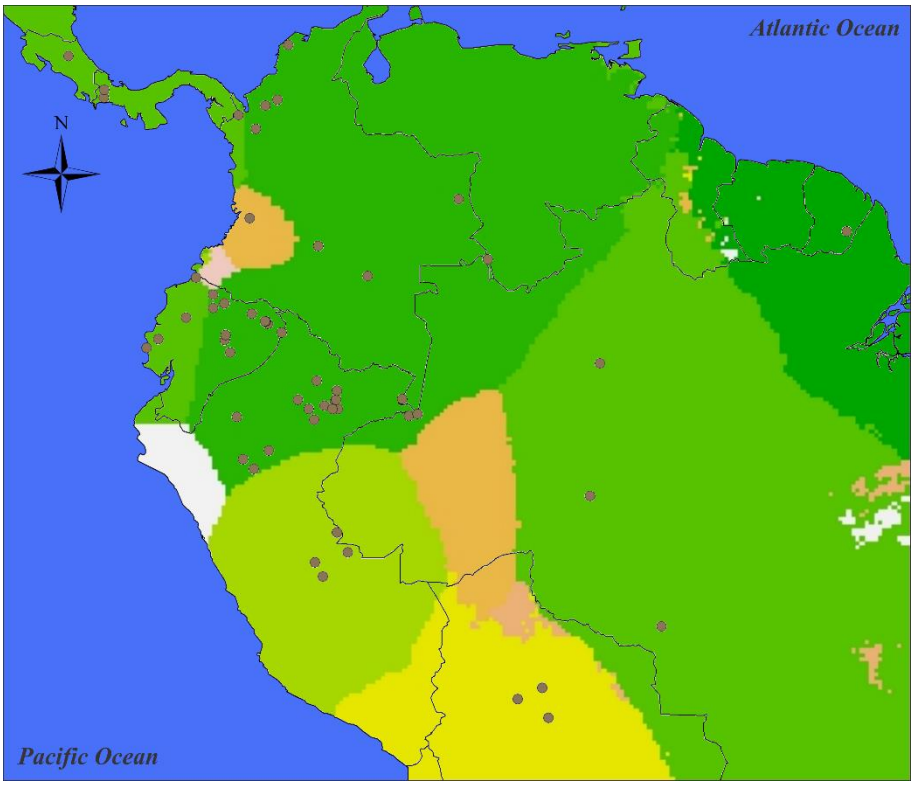


Figura 12. Mapa de las poblaciones (k=8) detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Leopardus pardalis*.

Para la especie *Leopardus wiedii*, margay, Geneland reveló siete acervos génicos diferentes (k=7). **1.** Dos individuos de México; **2.** Individuos de Centroamérica (Panamá, Costa Rica y Nicaragua) + individuos del centro y sur de Colombia, un individuo de Ecuador y un individuo del noroccidente de Perú + dos individuos del

centro-norte de Brasil; **3.** Individuos del norte de Colombia + Sur de Colombia Amazonas) y centro oriente de Perú + centro oriente de Bolivia; **4.** Individuos de Vichada (Colombia); **5.** Individuos del centro norte de Perú; **6.** Individuos del nororiente de Brasil, Norte, centro occidente y suroriente de Bolivia, y **7.** Un individuo del sur oriente de Bolivia. Ver Figura 13.

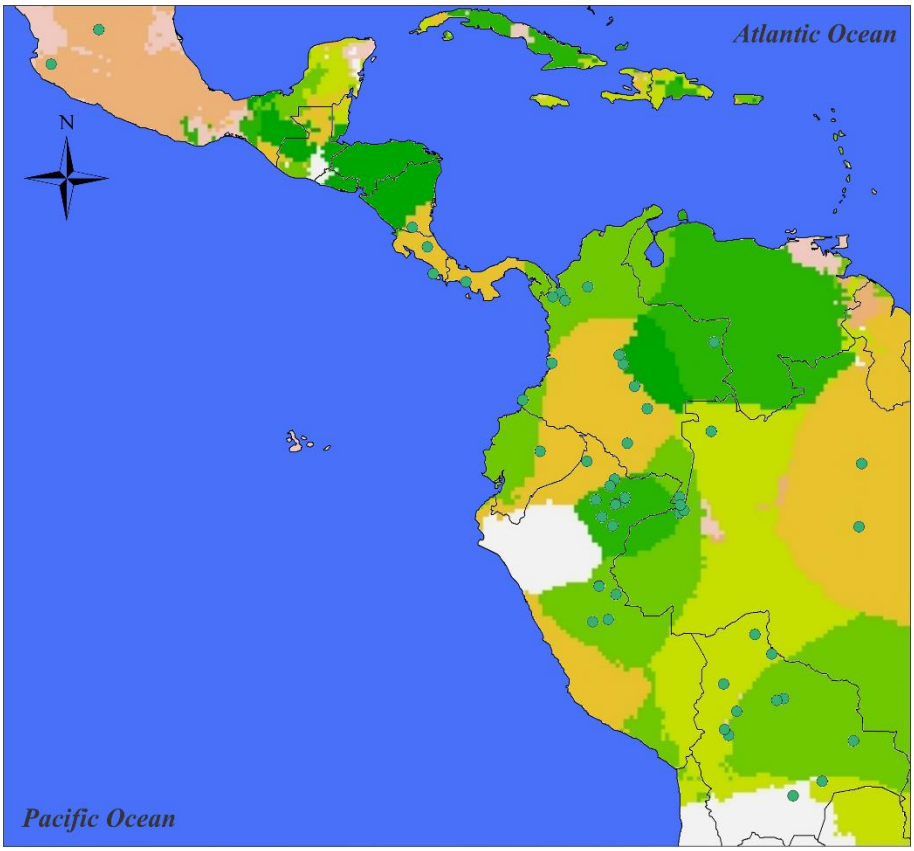


Figura 13. Mapa de las poblaciones (k=7) detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos de *Leopardus wiedii*.

Para el complejo de especies de tigrillos y el grupo de datos ATP-8 + 16SrRNA, el análisis Geneland (Figura 14) reveló dos poblaciones diferentes (k = 2; -1,077.008). Una de ellas, conformada por individuos de América Central y Transandinos colombianos y ecuatorianos + los del noreste de Argentina + los de Brasil suroriental y centro-oriental (*L. guttulus*). El segundo constituido por todos los restantes

morfotipos de tipo tigrina con haplotipos mixtos de margays y ocelotes (colombiano, ecuatoriano, peruano, boliviano y argentino argentino). También se incluyeron las tigrinas colombianas y ecuatorianas sin compartir haplotipos con margays y ocelotes + el otro grupo diferenciado de tigrinas peruano y colombiano sin compartir haplotipos con margays y ocelotes.

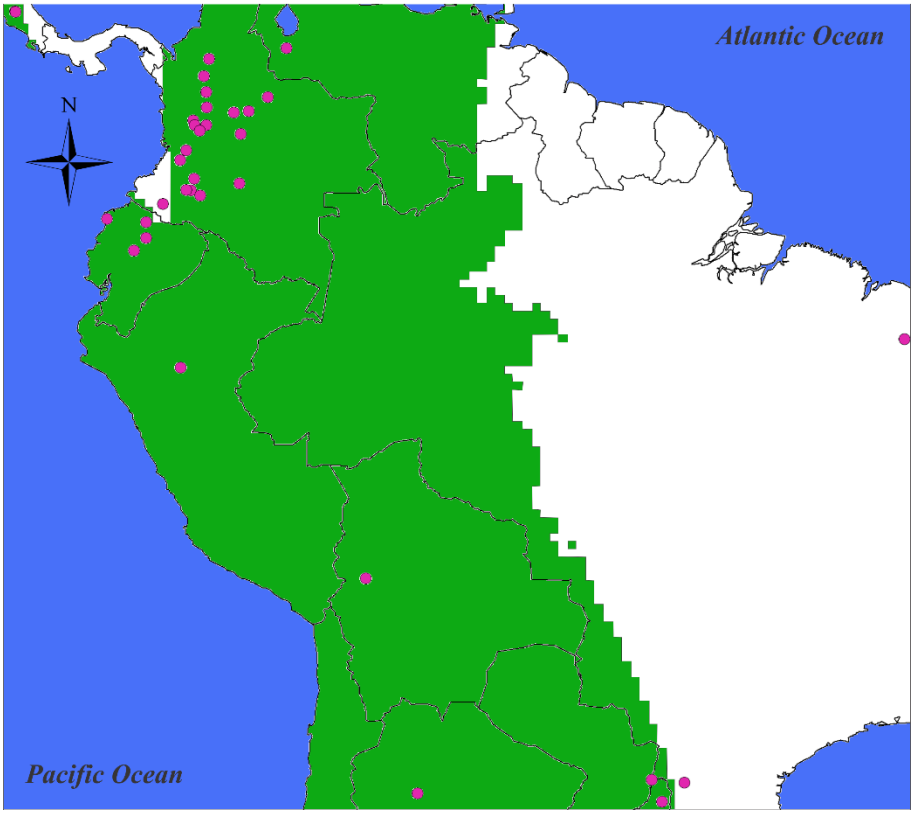


Figura 14. Mapa de las poblaciones (k=2) detectadas por Geneland para el grupo de datos ATP8-16S del complejo de especies de tigrillos.

El análisis de Geneland (Figura 15) para el grupo de datos ND5 detectó cuatro acervos genéticos diferentes (k = 4; -996.046): **1.** Todas los tigrina del noreste de Brasil + todas las tigrinas del sur y centro de Brasil (salvo un espécimen) + los tigrina de Centroamérica y Ecuador transandino; **2.** Los tigrina colombianos y ecuatorianos sin haplotipos mezclados con margay y ocelote + un individuo del sureste de Brasil;

3. Los tigrina colombianos con haplotipos mezclados con margay y ocelote y **4.** los tigrina del noreste argentino (Misiones).

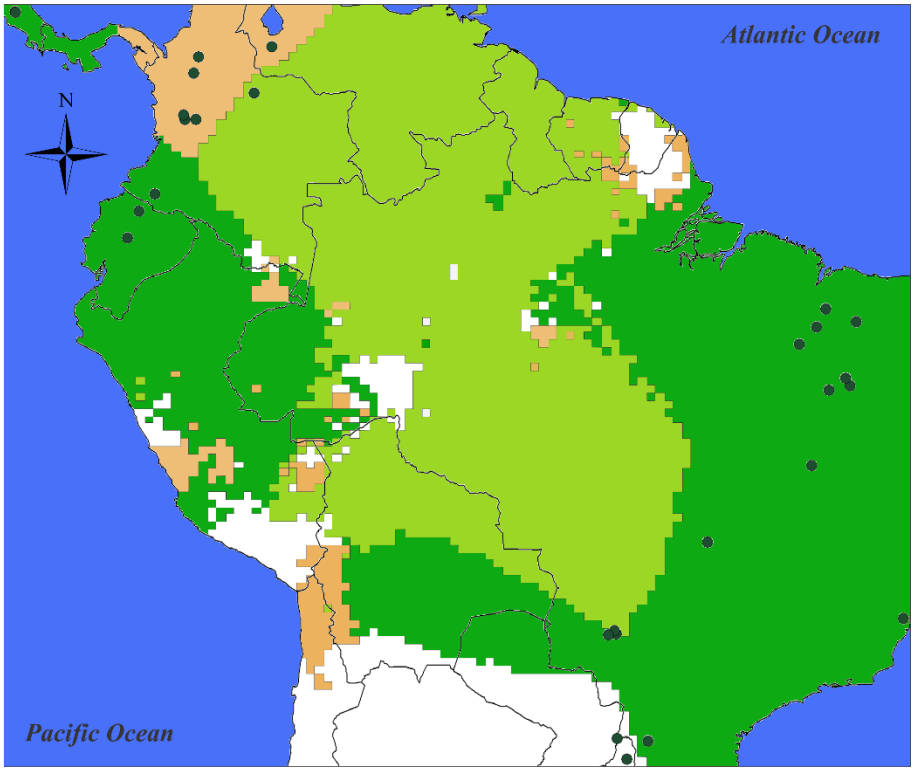


Figura 15. Mapa de las poblaciones (k=4) detectadas por Geneland para el grupo de datos ND5 del complejo de especies de tigrillos.

El análisis de Geneland para los mitogenomas (Figura 16) detectó tres grupos genéticos diferentes para los individuos del fenotipo similar a los tigrina (k = 3; -16.584.900): **1.** el noreste de Argentina y el sureste de Brasil (*L. guttulus*); **2.** los dos individuos de Boyacá (Colombia) y Cotopaxi (Ecuador); y **3.** los restantes ejemplares de tigrina estudiados (tigrina colombiana con haplotipos entremezclados de margays y ocelotes + los tigrina de Centroamérica y Ecuador transandino + tigrinas del noreste de Brasil).

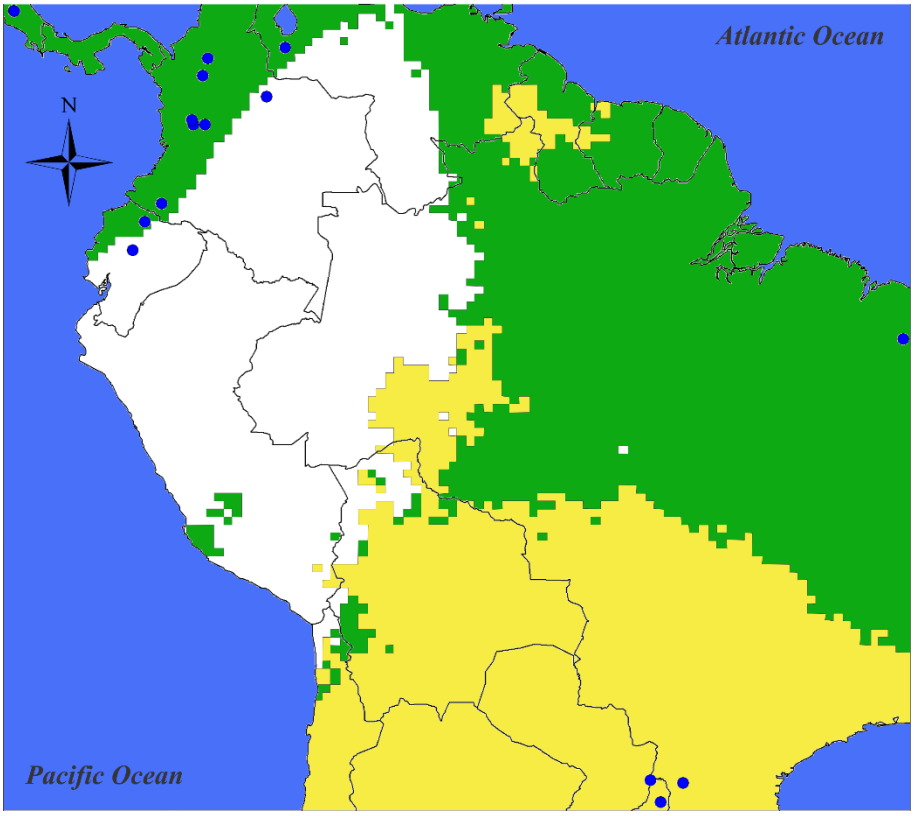


Figura 16. Mapa de las poblaciones (k=3) detectadas por Geneland para el grupo de datos mitogenómicos del complejo de especies de tigrillos.

En el caso de los análisis de Geneland, las secuencias del nuevo morfotipo del sur de Colombia y de todas las otras especies de *Leopardus* no fueron incluidas y esto redujo el número de diferentes grupos de genes de tigrina detectados en los tres conjuntos de datos analizados, lo que justifica la importancia de encerrar todos los taxones del género *Leopardus* para estimar el número correcto de linajes o especies de tigrinas.

3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA

3.4.1. Jaguar, *Panthera onca*.

Para los análisis con tres genes, los árboles de máxima verosimilitud (Figura 17) y bayesiano (Figura 18), contaron con secuencias de las siguientes subespecies

morfológicas: *P. o. centralis*, *P. o. onca*, *P. o. goldmani*, *P. o. paraguensis* y *P. o. peruviana*. En estos análisis, al igual que para las siguientes especies, las subespecies se han tomado como punto de referencia para formar agrupaciones con niveles de bootstrap (B) igual o superiores al 40 % y probabilidades a posteriori de 0.5 (PP). Aunque esos valores son bajos, se eligieron porque, de otra manera, prácticamente no se podrían determinar pequeñas agrupaciones geográficas para ninguna de las 4 especies analizadas (excluyendo el complejo de especies de tigrillos).

Se identificaron 12 agrupaciones en el árbol de máxima verosimilitud y 17 en el bayesiano (6 diferentes comparados con el de máxima verosimilitud), los cuales corresponden a zonas geográficas determinadas más que a los rangos geográficos atribuidos a las subespecies morfológicas tradicionalmente definidas (Figuras 17 y 18). Algunos pequeños clados pueden coincidir limitadamente con el rango geográfico parcial de ciertas subespecies: de *P. o. onca* – Ecuador (B=99%, PP=0.82), *P. o. goldmani* – Guatemala (B=96%, PP=1), *P. o paraguensis* (B=98%, PP=1), *P. o. onca* – Ecuador y Perú (B=86%). El clado de *P. o. onca* con secuencias de Colombia, Brasil, Ecuador y Perú (B= 55%) es lo más parecido a un clado correspondiente a una de las subespecies morfológicas definidas. En el caso de *P. o. paraguensis*, las dos únicas secuencias se agruparon y de las tres secuencias de *P. o. goldmani*, dos se agruparon, mientras que la tercera, también de Guatemala, estuvo más relacionada a secuencias de *P. o. onca* y *P. o. centralis*, al igual que la única secuencia de *P. o. peruviana*. (Figuras 17 y 18)

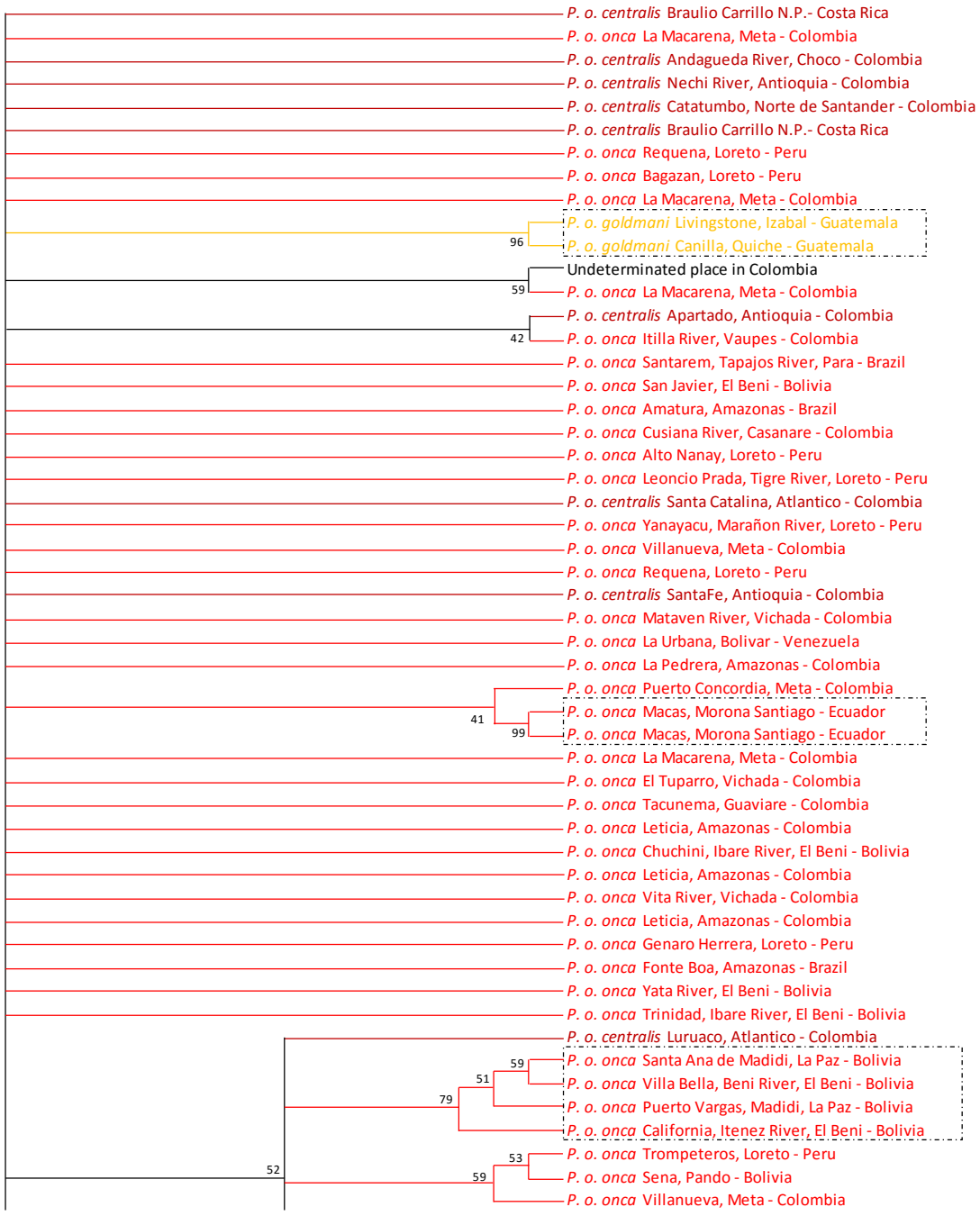


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

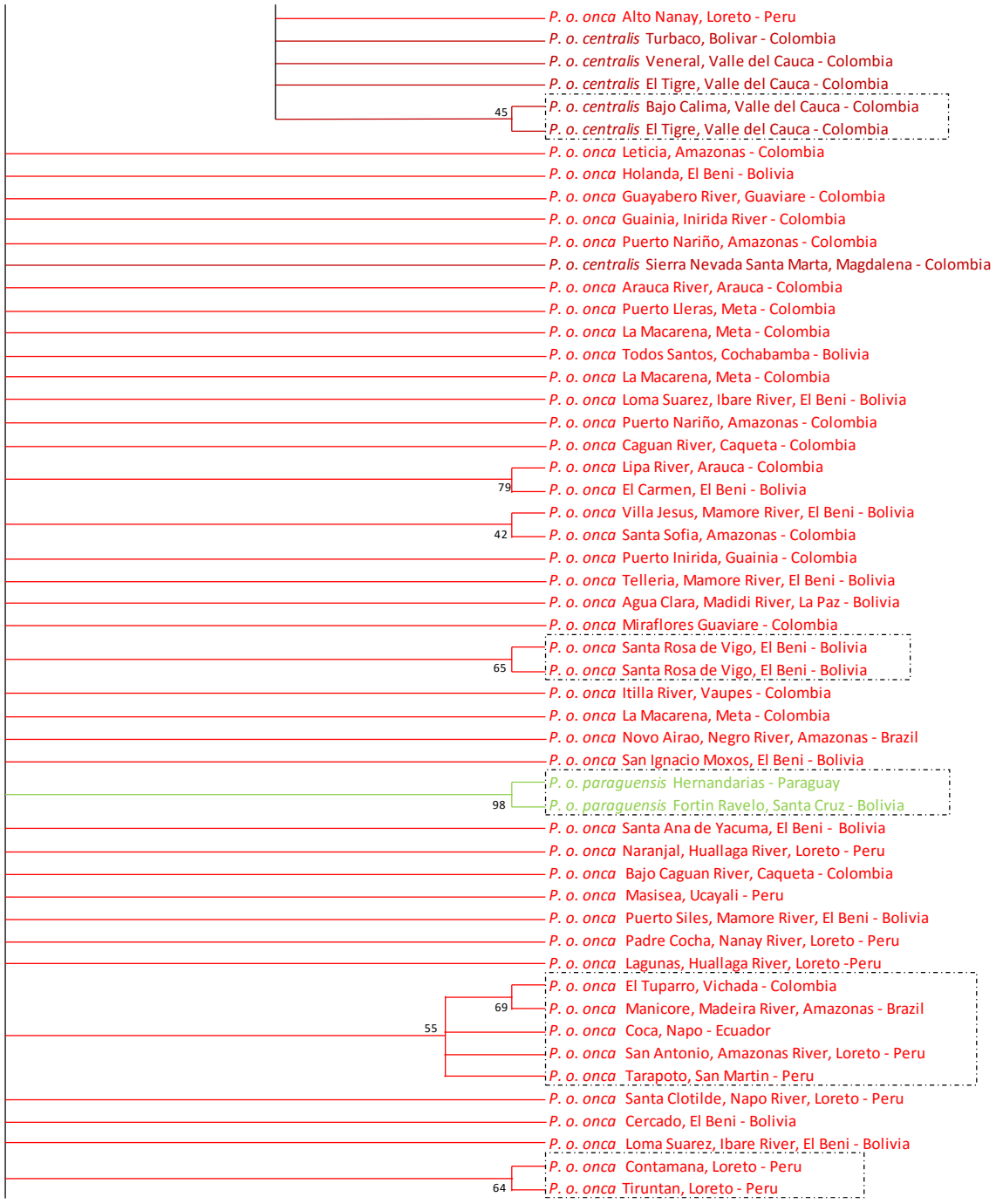


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

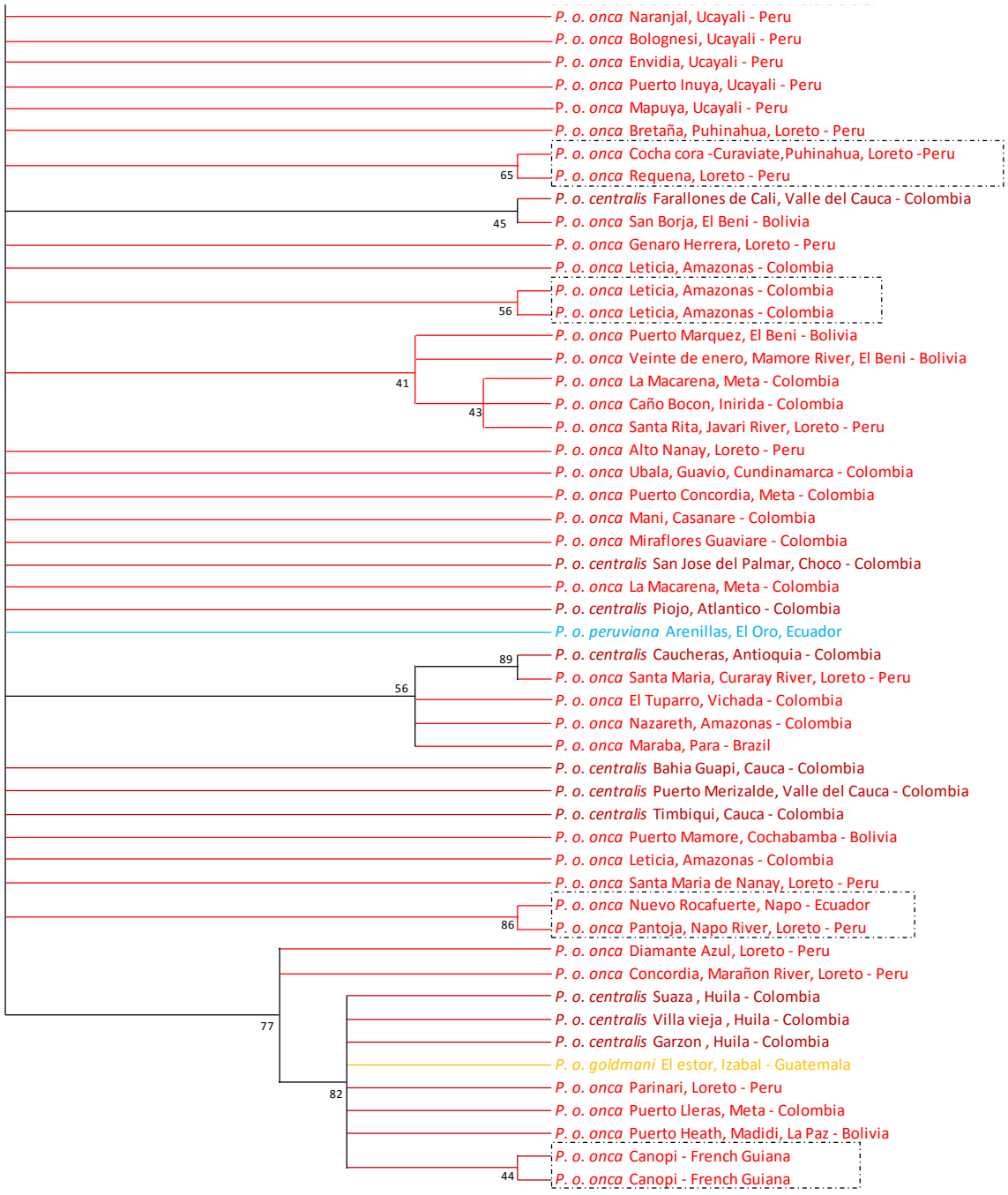


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

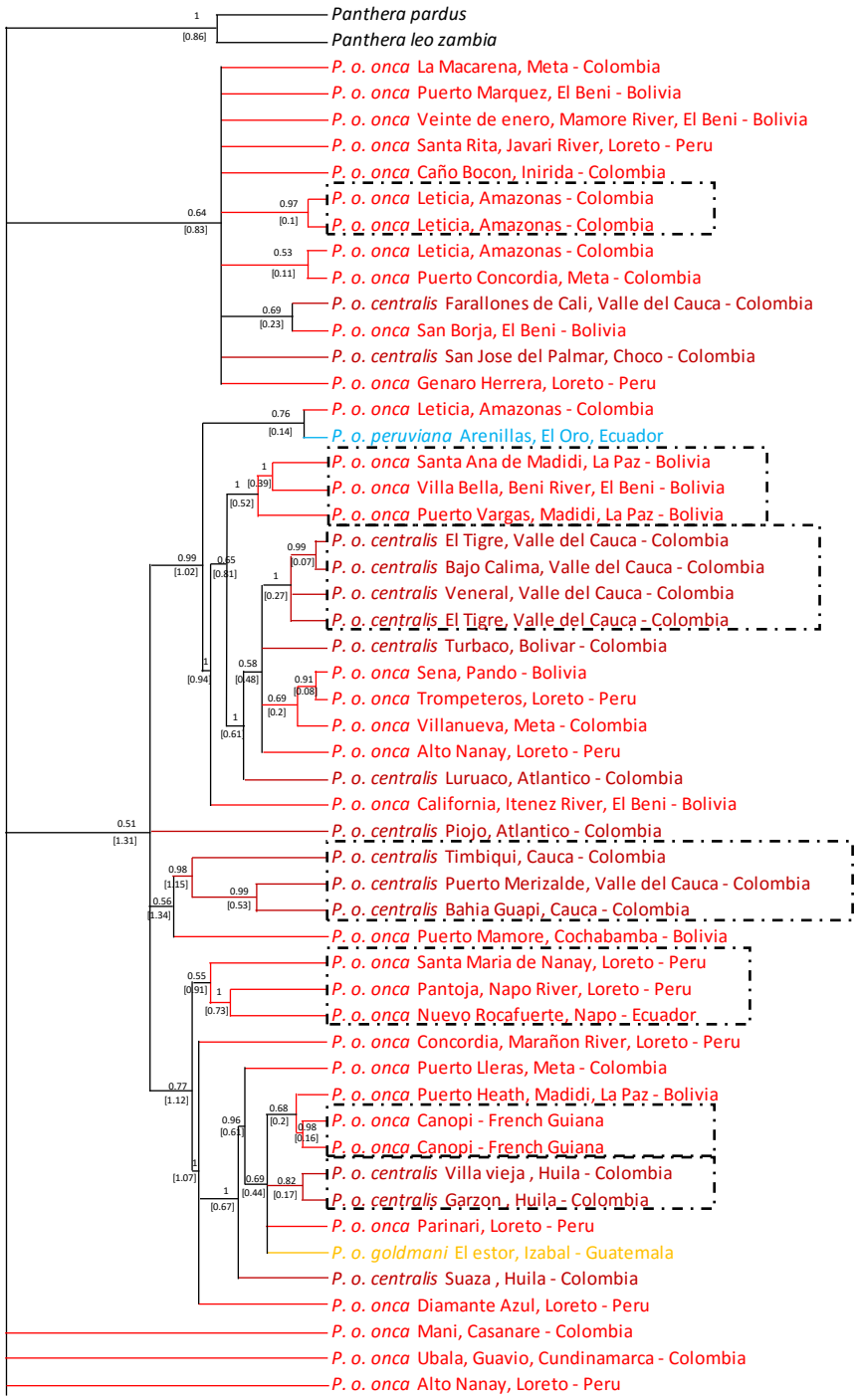


Figura 18. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

Figura 18. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

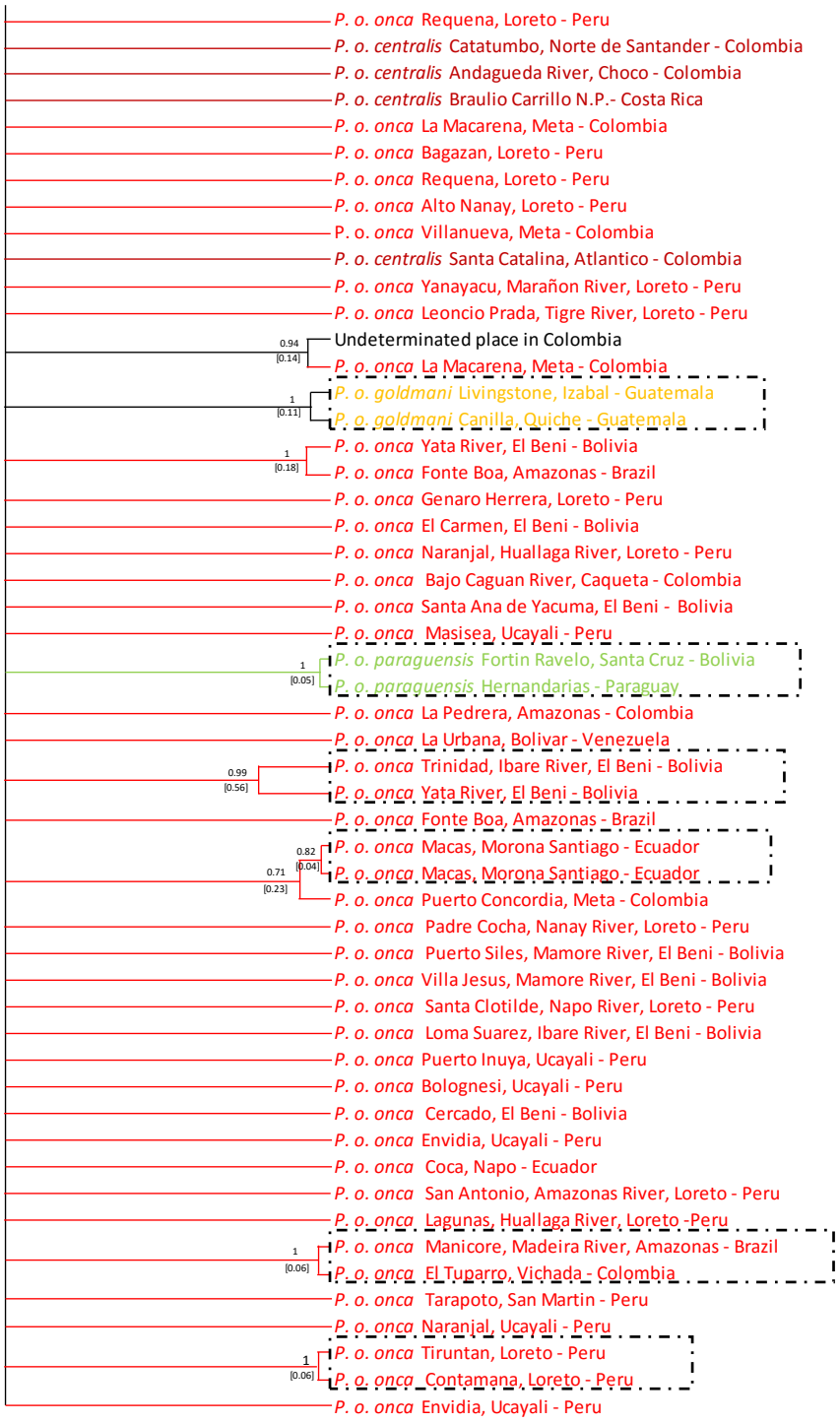


Figura 18. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

Para los árboles construidos con los datos de mitogenómica, se trabajó con secuencias clasificadas *a priori* como *P. o. centralis*, *P. o. onca*, *P. o. goldmani* y *P. o. paraguensis.* El comportamiento fue muy similar al anteriormente descrito, es decir, el árbol bayesiano detectó más agrupaciones geográficas, pero ninguna de ellas correspondió a agrupaciones consolidadas de subespecies morfológicas. Algunos ejemplos fueron el clado de *P. o. onca* – Colombia (B=88%, PP=1), *P. o. onca* – Perú (B=43%, PP=0.8), *P. o. onca* – Colombia (B=70%, PP= 0.92). Lo que expone que dentro del rango geográfico que *a priori* posee la subespecie morfológica *P. o. onca* se detectaron pequeñas agrupaciones geográficas locales significativas, aunque en principio pertenecen a la misma subespecie. Eso significa que son más relevantes esas pequeñas asociaciones geográficas que la pretendida agrupación subespecífica que no muestra la existencia de ningún tipo de monofilia. Para el caso de *P. o. paraguensis*, al disponer solamente de una secuencia, ésta no se agrupó con otras secuencias, aunque sí estuvo más relacionada a secuencias de *P. o. onca* en los dos árboles. Diferente fue la situación de *P. o. goldmani*, en la que las dos secuencias disponibles se agruparon en el árbol bayesiano, pero no en el de máxima verosimilitud. (Figuras 19 y 20), mostrando, en este caso, una cierta correspondencia entre el clado bayesiano a nivel molecular con la subespecie morfológica descrita para esa parte de Centro América. Todo ello revela que existe muy limitada correspondencia entre pequeñas agrupaciones geográficas detectadas a nivel mitocondrial y las supuestas subespecies morfológicas de jaguares descritas tradicionalmente.

La proliferación de los diferentes haplotipos mitocondriales en el jaguar comenzó alrededor de 1.69 millones de años (MA), haciendo caso de los resultados mitogenómicos. En las pequeñas agrupaciones que se detectaron, algunos tiempos de divergencia interesantes de citar son los que siguen. Un clado que contenía secuencias de animales *a priori* pertenecientes a las dos subespecies morfológicas *P. o. onca* y *P. o. centralis* empezó su proceso de diversificación hace 1.04 MA. En el interior de este grupo, un clado consistente de *P. o. centralis* comenzó su

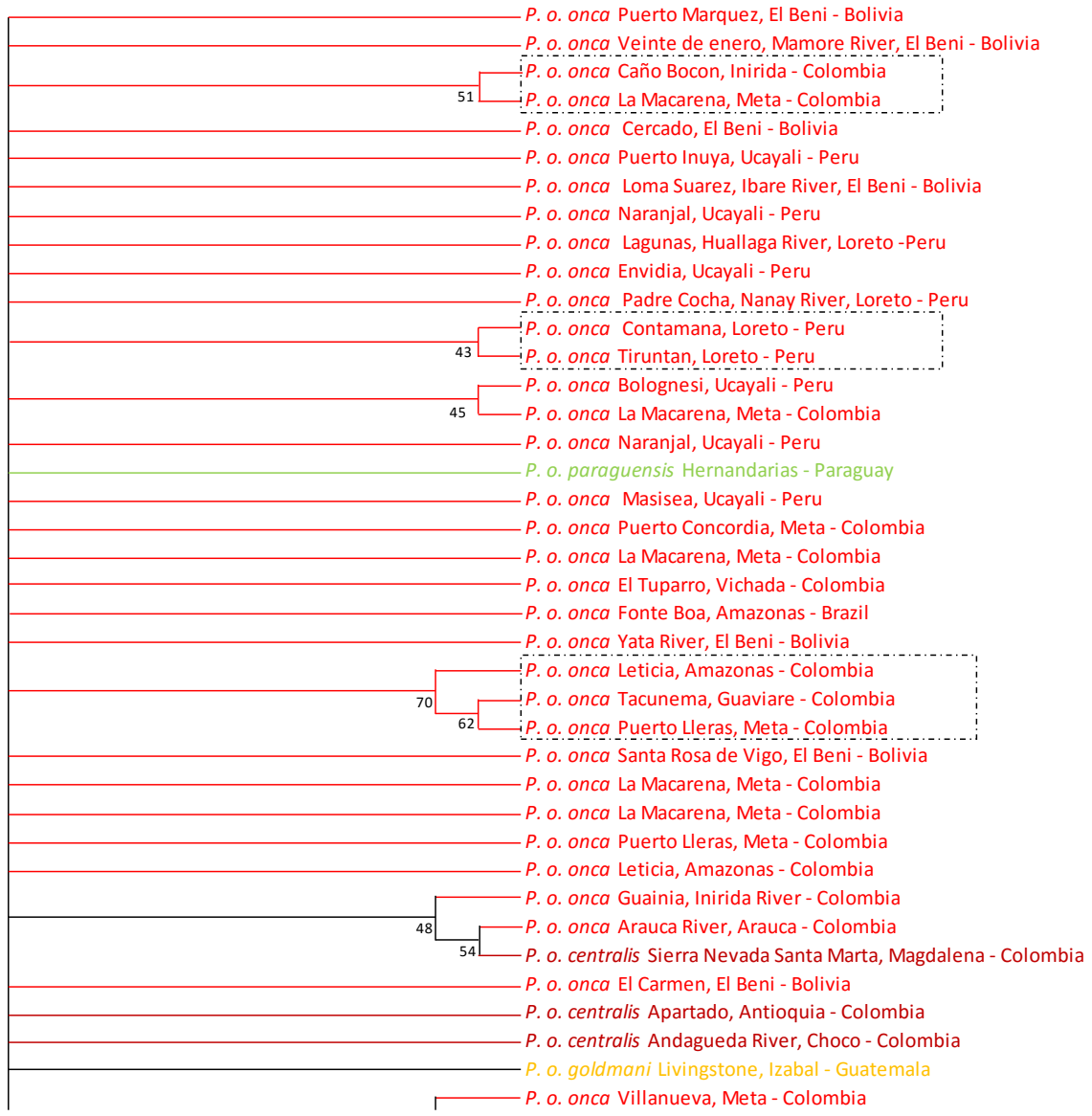


Figura 19. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

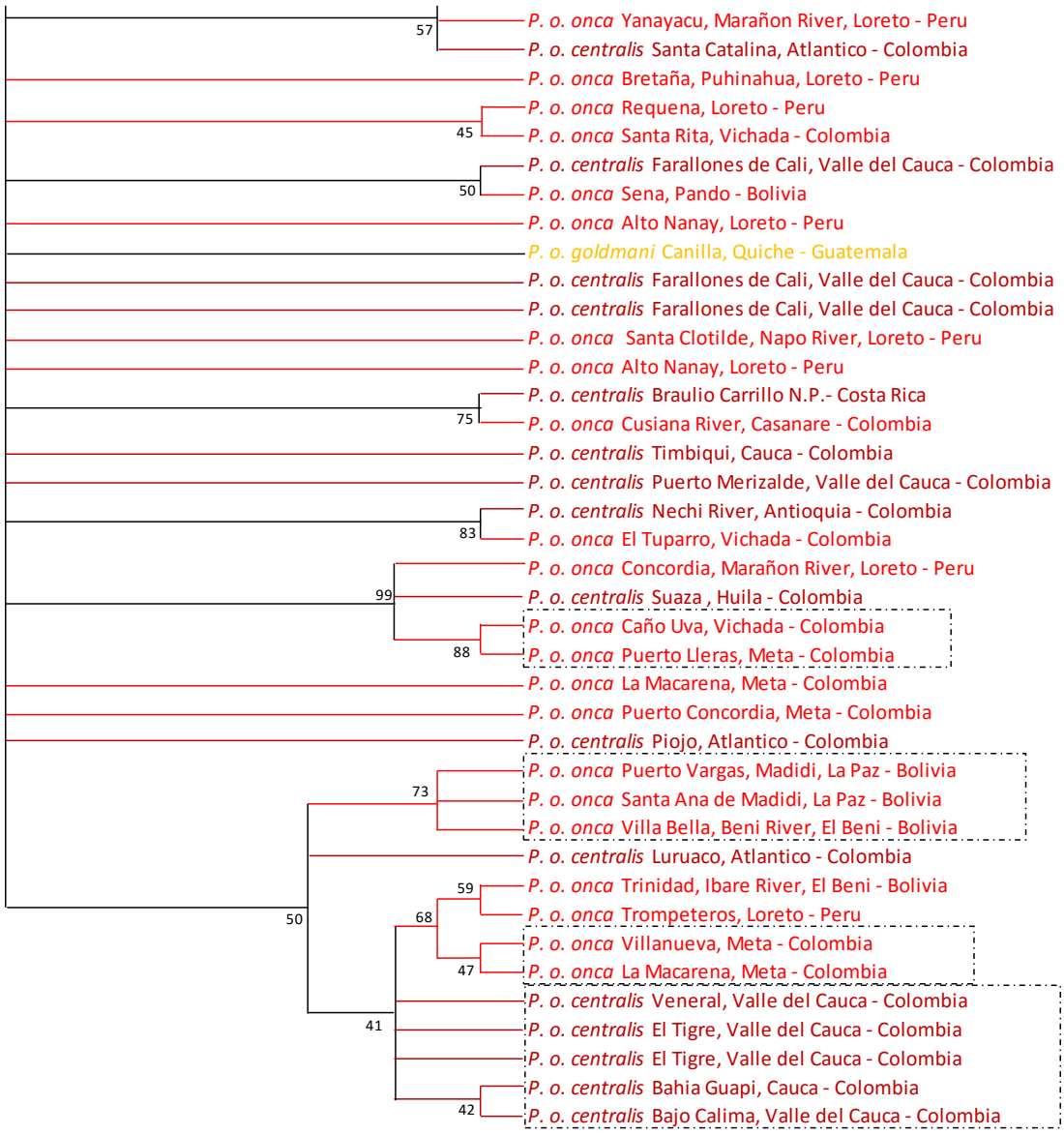


Figura 19. Árbol de máxima verosimilitud para *Panthera onca*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

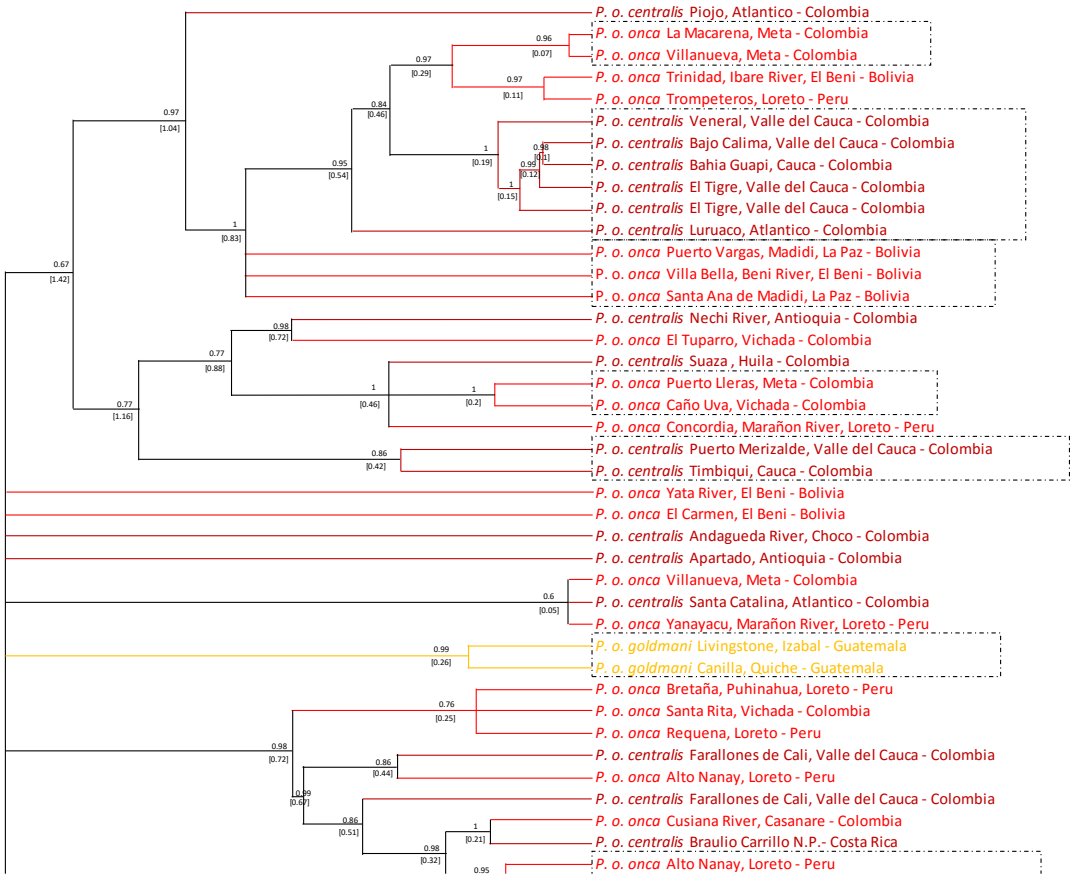


Figura 20. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

diversificación hace unos 190.000 años. Otro grupo mezclado de *P. o. onca* y *P. o. centralis* mostró el inicio de su diversificación alrededor de 720.000 años. Tres clados independientes de *P. o. onca* de Meta, Guainía y Amazonas en Colombia, de Meta, Guaviare y Amazonas en Colombia y de diferentes regiones en Colombia y Bolivia, presentaron valores de diversificación mitocondrial hace 200.000, 80.000 y 670.000 años respectivamente. Las secuencias de *P. o. goldmani* de Centro América comenzaron su diversificación hace aproximadamente 260.000 años.

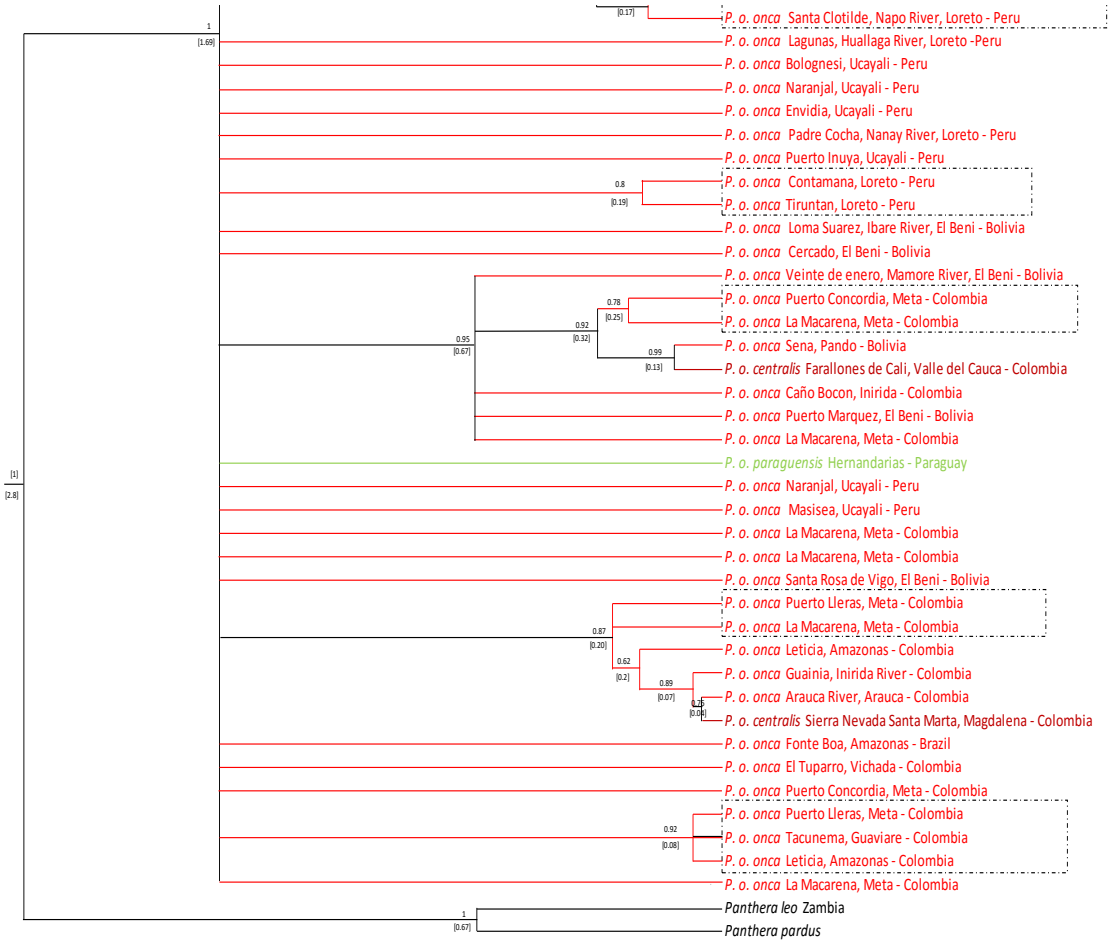


Figura 20. Árbol bayesiano para *Panthera onca*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

Todos los tiempos de divergencia encontrados en el seno de los linajes de jaguares detectados corresponden a la época pleistocénica.

3.4.2. Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*.

Para el análisis de máxima verosimilitud (Figura 21) y bayesiano (Figura 22) con secuencias de tres genes se analizaron individuos de siete supuestas subespecies morfológicas: *P. y. eyra, P. y. melantho, P. y. panamensis, P. y. tolteca, P. y. yagouaroundi, P. y. ameghinoi* y *P. y. fossata*. En los dos árboles no se formaron

grupos que albergaran un gran número de secuencias que correspondieran a ejemplares de una misma subespecie morfológica. La mayoría de las relaciones se encuentran sin resolver y las pocas y pequeñas agrupaciones, presentaron valores de bootstrap ligeramente superiores al 40%. El árbol bayesiano detectó menor número de agrupaciones que el de máxima verosimilitud. La agrupación con mayor valor de bootstrap (95 %) y de probabilidad posterior (0.9) corresponde a secuencias de *P. y. eyra* o *melantho* de Bolivia, seguida de un grupo de *P. y. panamensis* (B = 79% y PP = 1). Un clado con B = 50% presenta un subclado compuesto por 5 de las 7 secuencias de *P. y. eyra*. Otras agrupaciones corresponden a zonas geográficas donde no se discriminan subespecies geográficas determinadas (Figuras 21 y 22).

Los análisis con mitogenómica, contaron con secuencias de: *P. y. panamensis, P. y eyra, P. y. ameghinoi, P. y. melantho y P. y. yagouaroundi*. No hubo clados que correspondieran a las subespecies morfológicas. Los que se detectaron pertenecen a agrupaciones geográficas muy regionales. Los clados con valores altos de bootstrap y de probabilidad posterior fueron, con un B = 99% y PP = 0.99, el de P. y. panamensis (individuos del Cesar, Colombia); dos individuos de P. y. melantho procedentes del departamento del Meta (Colombia), dos grupos de P. y eyra con BB = 97% y PP = 1 (Brasil) y Chaco paraguayo y argentino (PP = 0.73), un grupo de Perú para P. y. melantho (B = 69%; PP = 0.67) y, finalmente, otro grupo de P. y melantho (B = 52%; PP = 0.99) también para secuencias de individuos procedentes de Perú. En el árbol bayesiano, para el mismo grupo de datos, se detectaron los mismos grupos excepto el de P. y. melantho – Meta (Figuras 23 y 24).

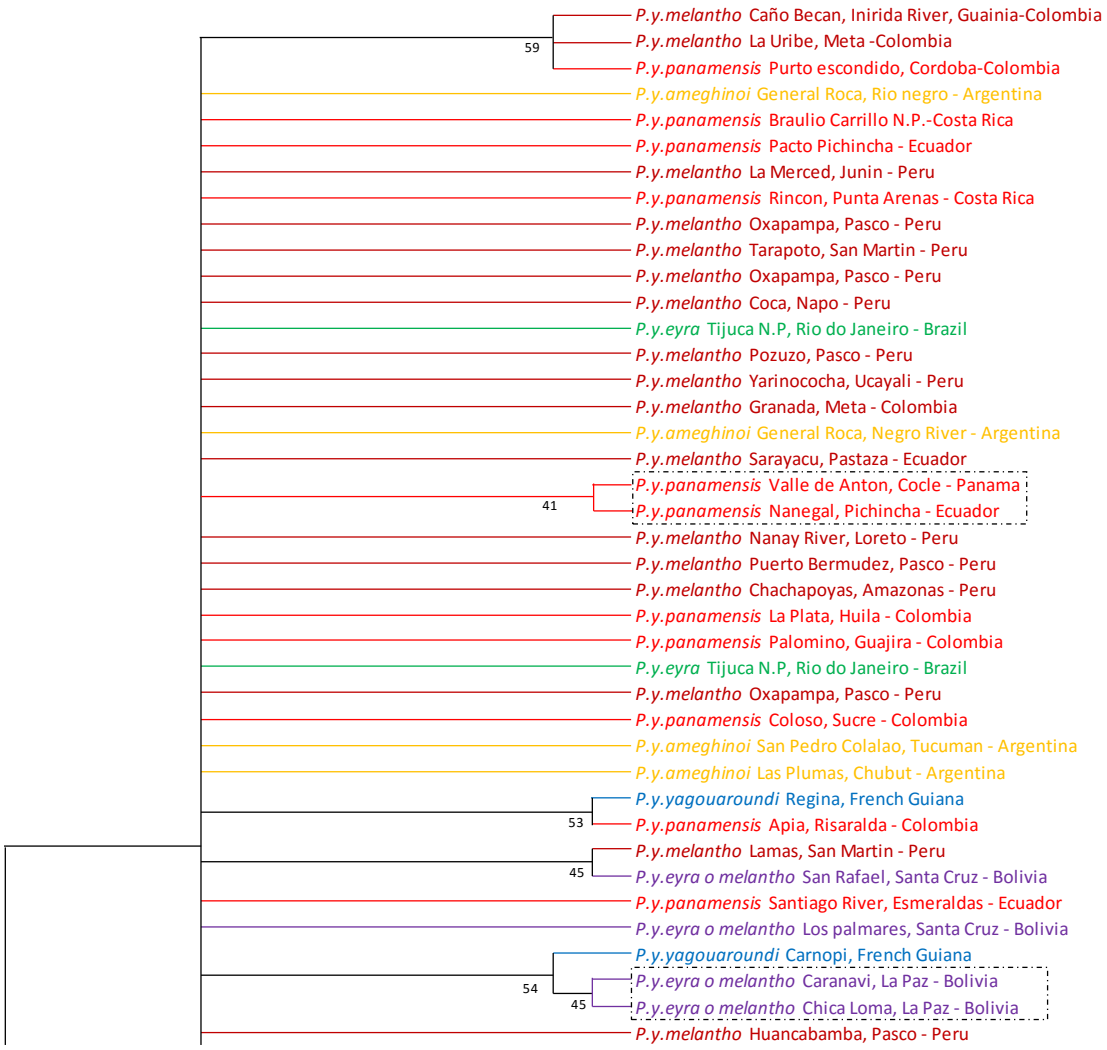


Figura 21. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

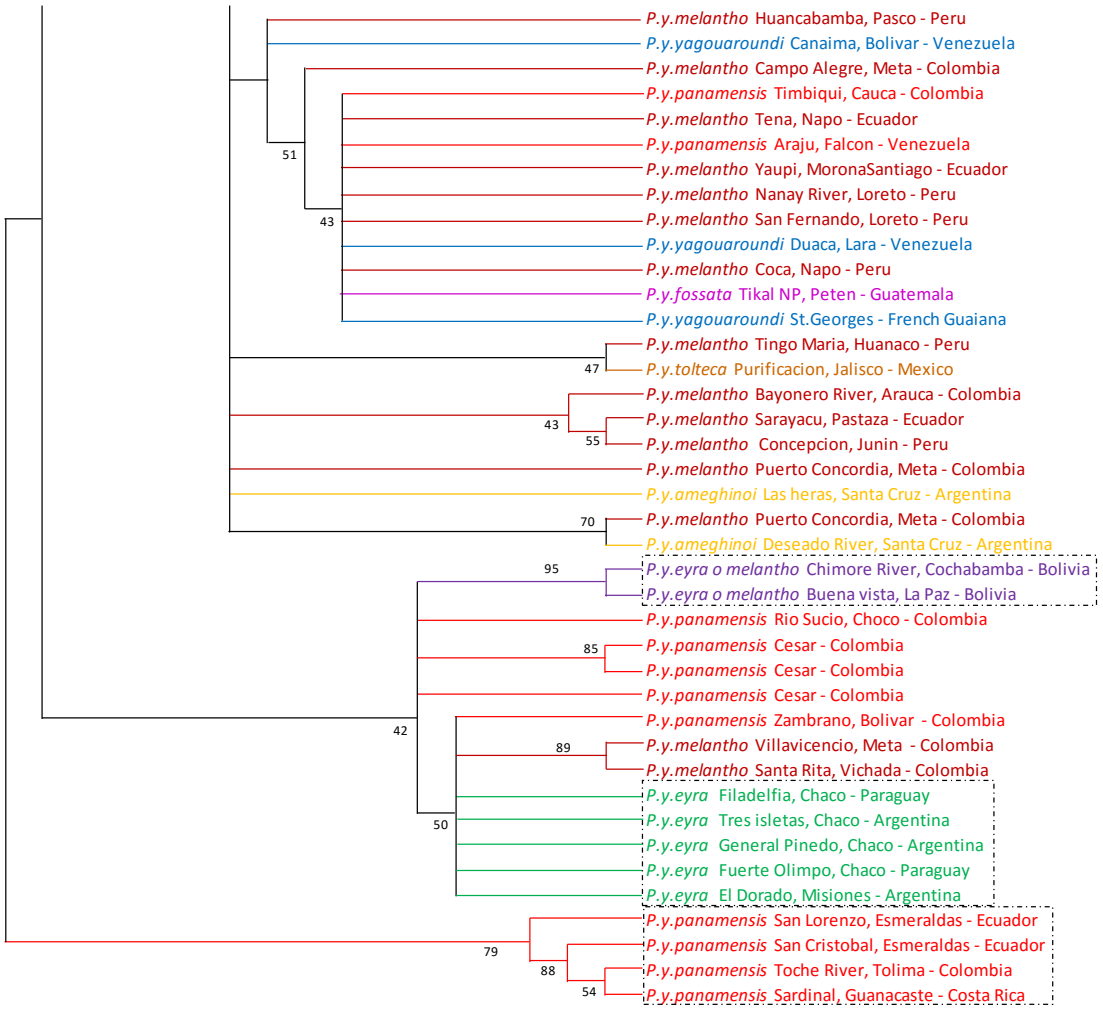


Figura 21. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (Continuación).

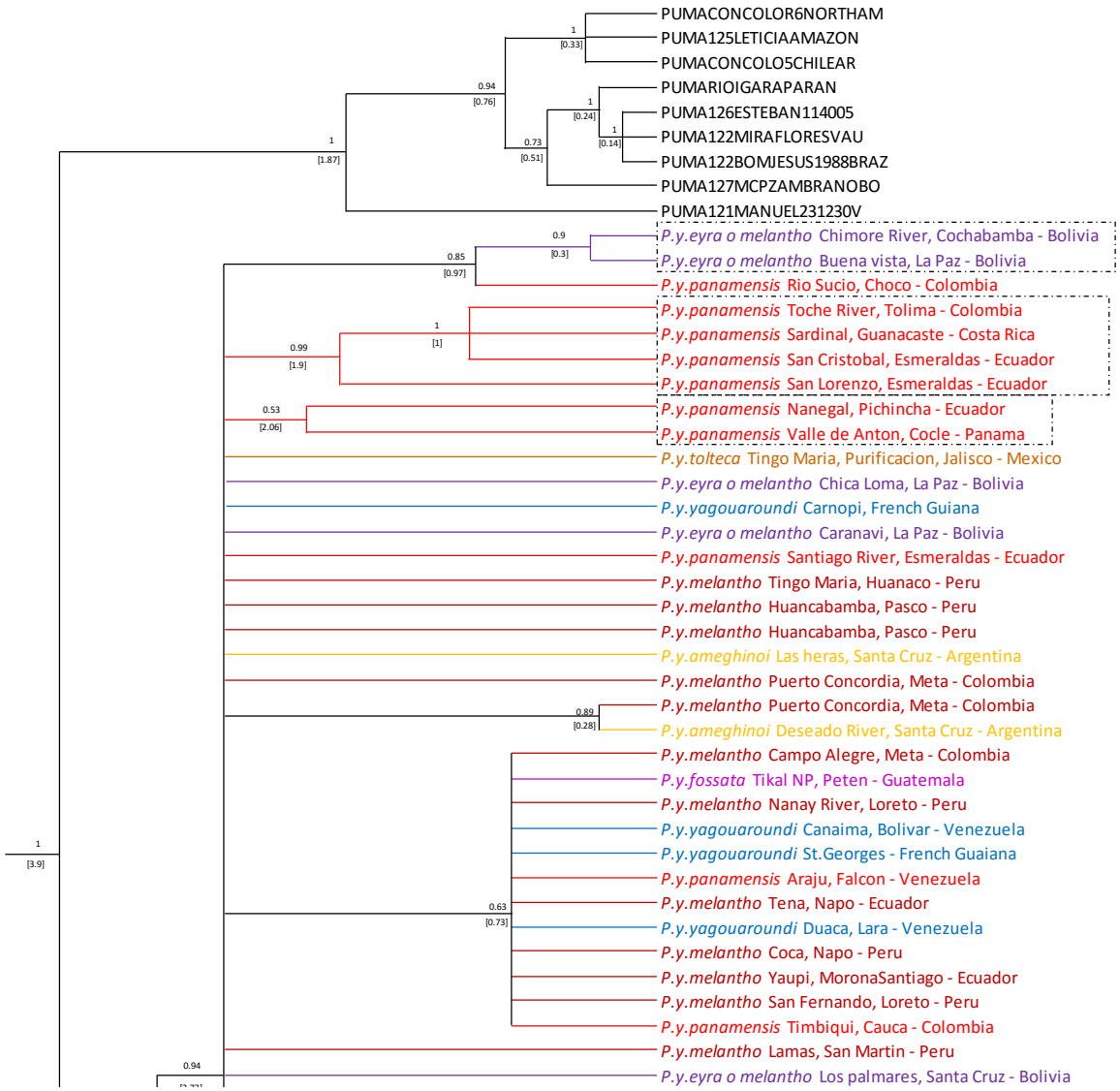


Figura 22. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

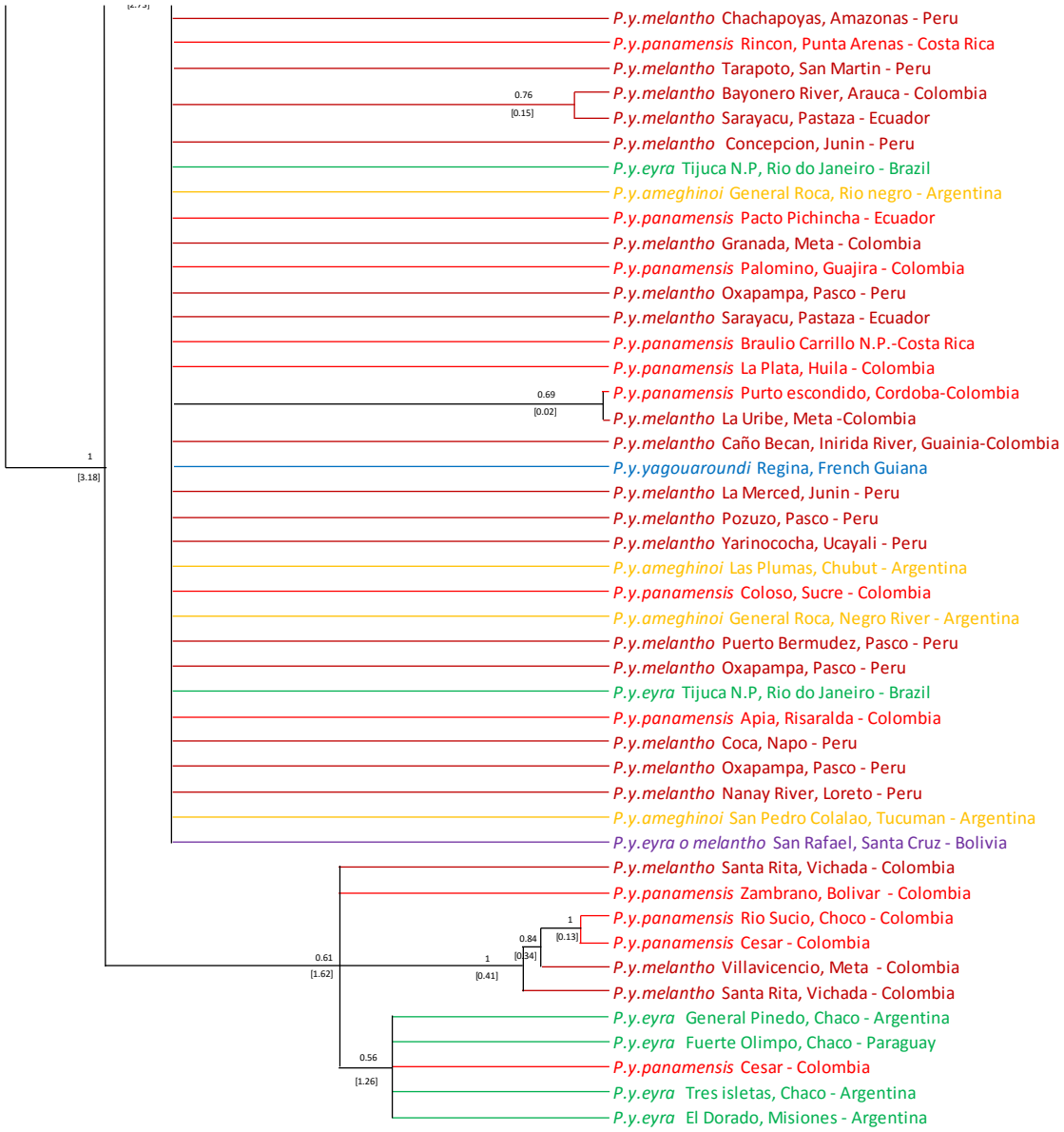


Figura 22. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

En el árbol bayesiano para tres genes (Figura 22), la primera diversificación del ancestro de *P. y. yagouaroundi* sucedió hace 3.18 millones de años cuando se formaron dos clados diferenciados. El clado que contuvo más secuencias presentó varias divisiones en su interior desde los 2.06 MA hasta los 10.000 años. Hace 630.000 años, se separó un grupo de 12 secuencias (5 *P. y melantho* de Colombia, Perú y Ecuador; 1 de *P. y. fossata* de Guatemala y 3 de *P. y. yagouaroundi* de Venezuela y la Guyana Francesa). En un clado menor, hubo dos divisiones. La primera, hace aproximadamente 1.62 millones de años, cuando se separa un clado con 5 secuencias (4 de *P. y. eyra* y 1 de *P. y. panamensis* de Cesar, Colombia) y otro hace 410.000 años cuando se separó una agrupación constituida por 4 secuencias (2 de *P. y. panamensis* y 2 de *P. y. melantho*). Posteriormente dentro de esta agrupación se presentaron otras dos divisiones.

En el árbol bayesiano con mitogenomas (Figura 24) se encontró que hace 3.9 MA se separaron los ancestros de *P. yagouaroundi* y de *P. concolor*. Hace 3.08 MA comenzó la diversificación mitocondrial de *P. yagouaroundi*. El primer ancestro en divergir se dio hace 1.55 MA en donde se separó el ancestro de un individuo

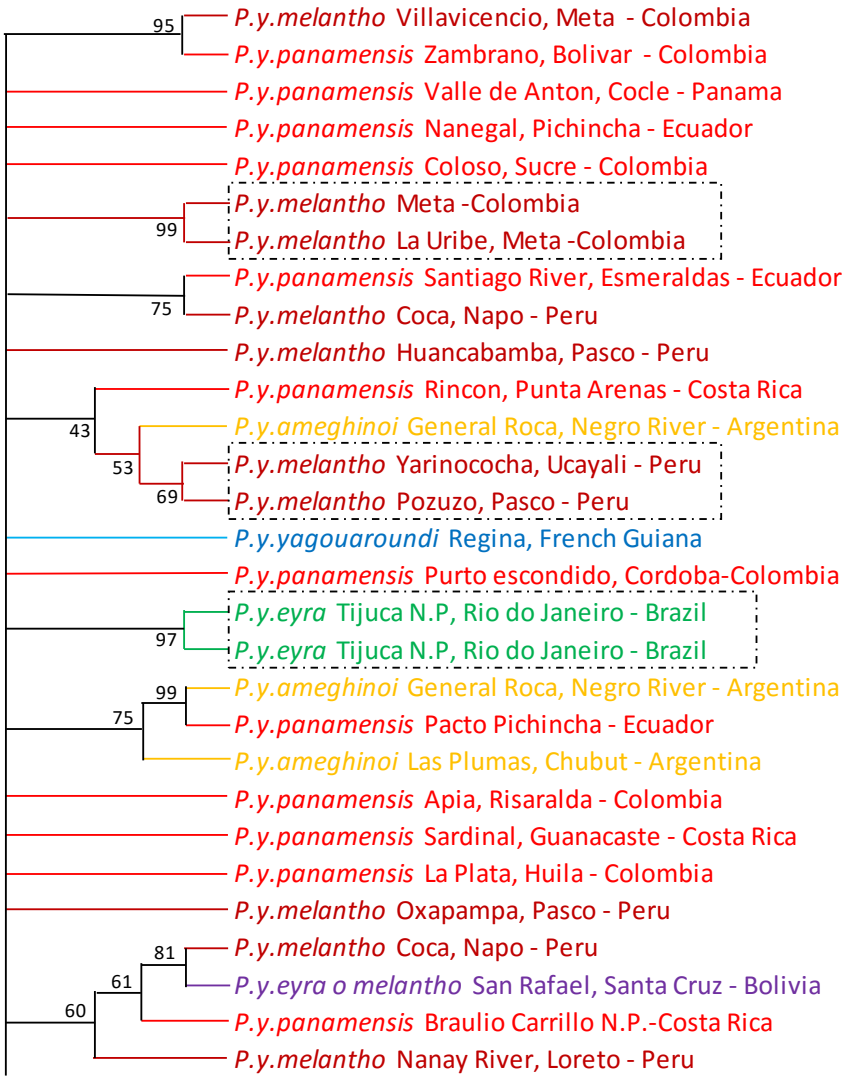


Figura 23. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

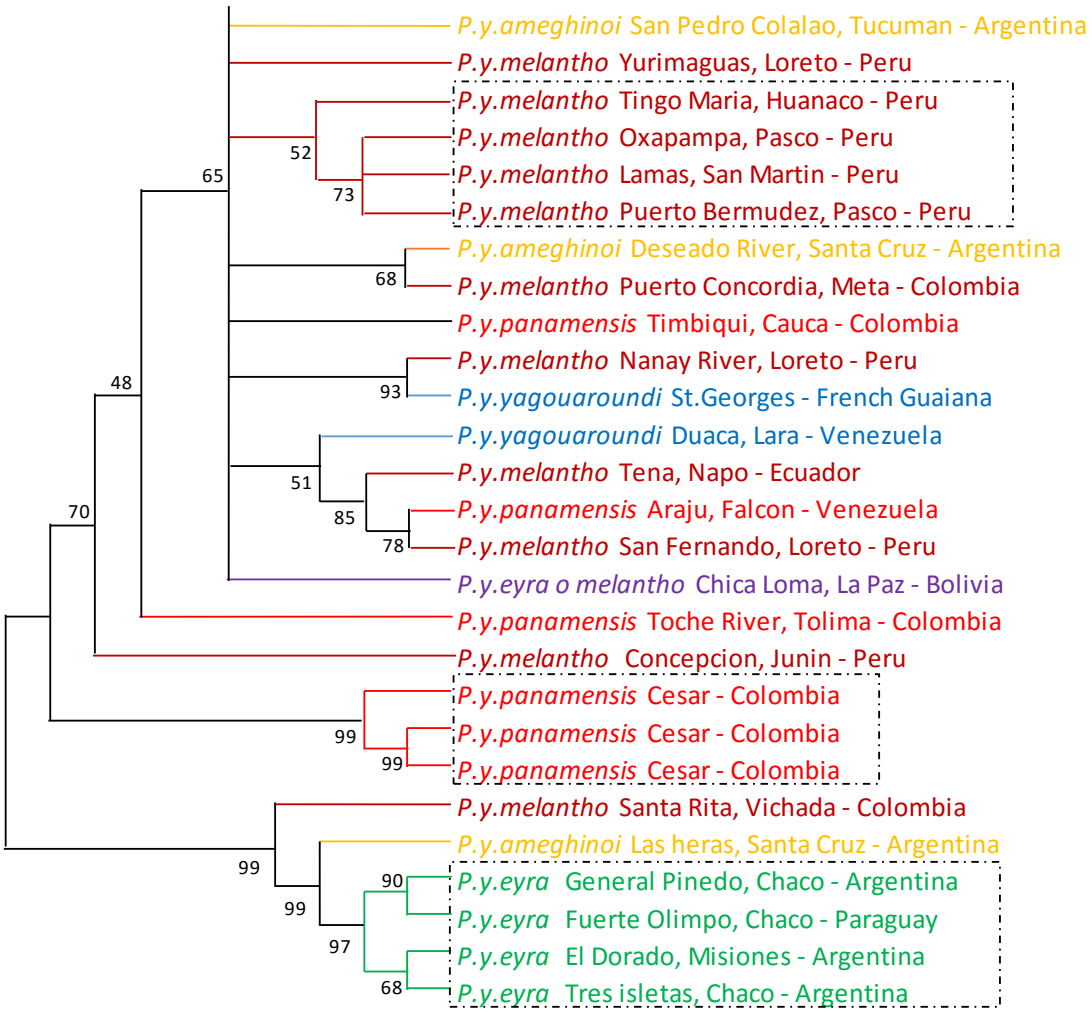


Figura 23. Árbol de máxima verosimilitud para *Puma yagouaroundi*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (Continuación).

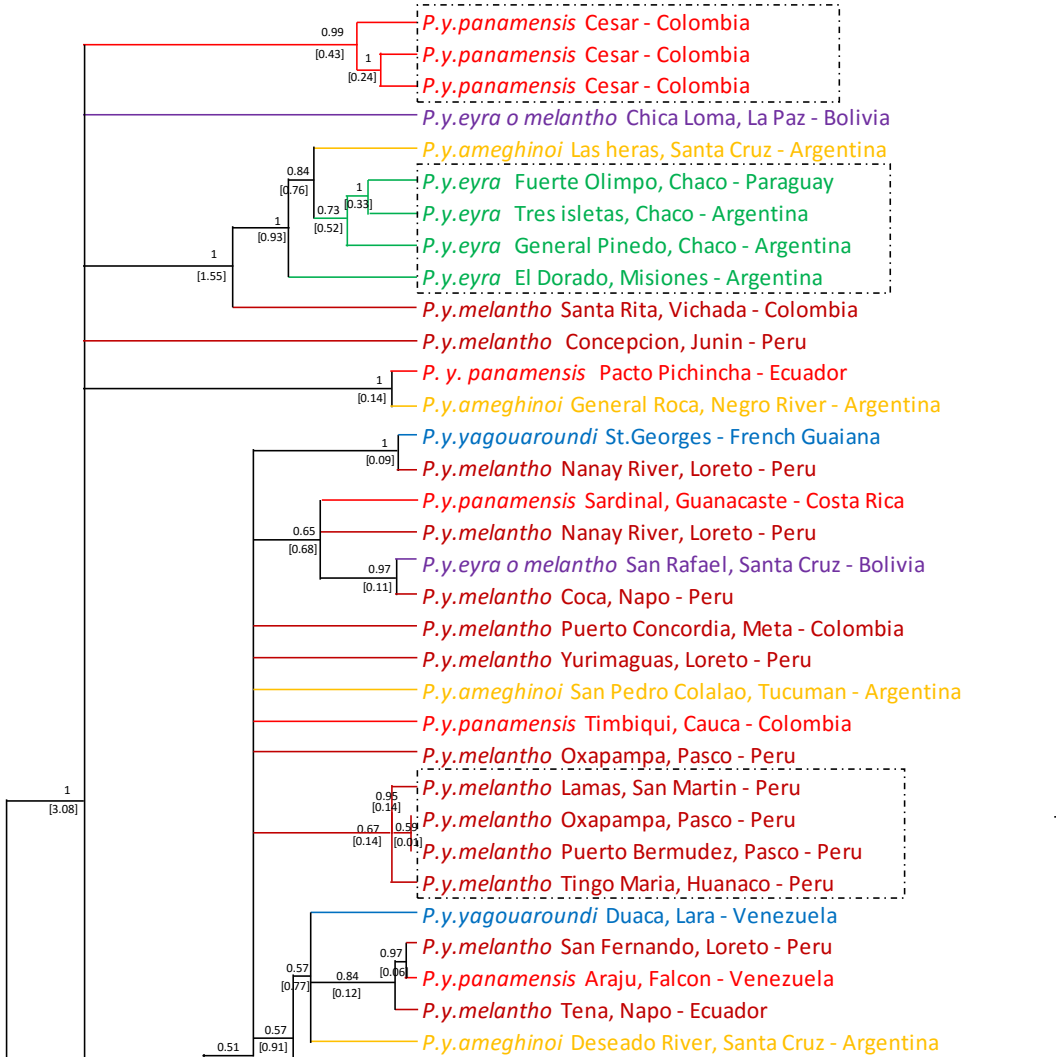


Figura 24. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

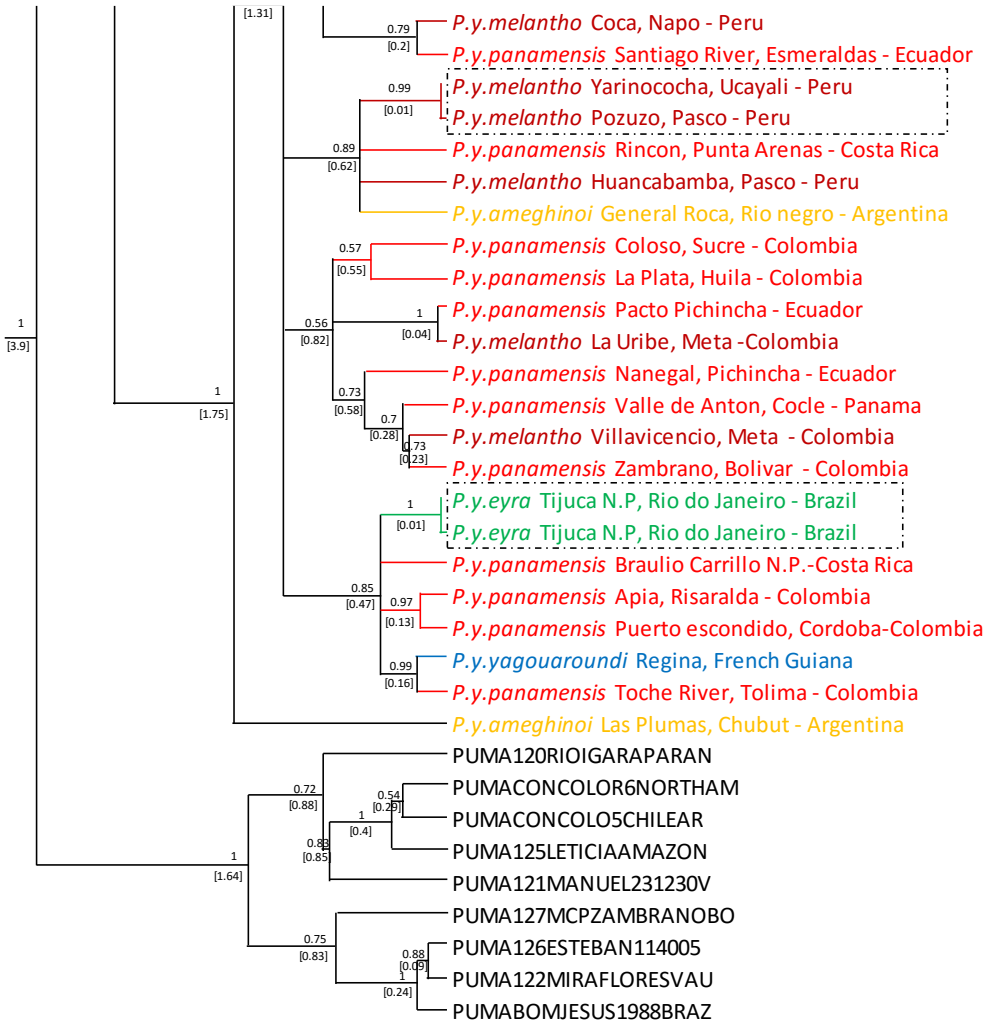


Figura 24. Árbol bayesiano para *Puma yagouaroundi*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (Continuación).

proveniente de Santa Rita - Vichada (*P. y. melantho*), seguida de otra división hace 930.000 años en donde se separa un clado con secuencias de los ancestros de *P. y. ameghinoi* y 3 de *P. y. eyra.* Dos separaciones se dieron en el clado *ameghinoi-eyra*, una hace 760.000 años donde se separa la secuencia de *P. y. ameghinoi* y otra hace 520.000 años en donde empiezan a diferenciarse las secuencias de *P. y. eyra* del Chaco paraguayo y argentino. Hace 430.000 años comenzó la diversificación mitocondrial de las secuencias de ejemplares procedentes del Cesar, Colombia (*P. y. panamensis*). Una agrupación de *P. y. melantho* del Perú comenzó hace unos 140.000 años y otra agrupación mayor que contiene simultáneamente secuencias de *P. y. melantho* y *P. y. panamensis* de Ecuador, Colombia y Panamá hace 820.000 años.

Los procesos de separación de los ancestros de los jaguarundis y pumas, al igual que el inicio de la diversificación de los jaguarundis, son típicamente procesos pliocénicos. Sin embargo, la mayor parte de los procesos al interior de la especie de interés son también básicamente pleistocénicos.

3.4.3. Ocelote, *Leopardus pardalis*.

En el grupo de datos correspondiente a tres genes, contó con secuencias de las siguientes subespecies morfológicas: *L. p. melanura*, *L. p. pseudopardalis*, *L. p. mitis*, *L. p. aequatorialis*, *L. p. pusaea* y *L. p. steinbachi*. En los dos árboles, máxima verosimilitud (Figura 25) y bayesiano (Figura 26), se detectaron agrupaciones asociadas a espacios geográficos que concuerdan con la distribución geográfica putativa de algunas subespecies morfológicas. Algunas de estas agrupaciones se encuentran dispersas a lo largo de los árboles siendo el caso, por ejemplo, de *L. p. mitis* – Bolivia (B=99%, PP=1), *L. p. melanura* – Perú (B= 69%, PP=0.55), *L. p. aequatorialis* – Colombia (B=53%, PP=1). En el caso de *L. p. pusaea* forma un solo clado muy relacionado con la subespecie morfológica determinada para la zona Pacífica del Ecuador. En el árbol bayesiano se obtuvo, además, un número mayor de agrupaciones con valores de probabilidad altos y mayor número de secuencias

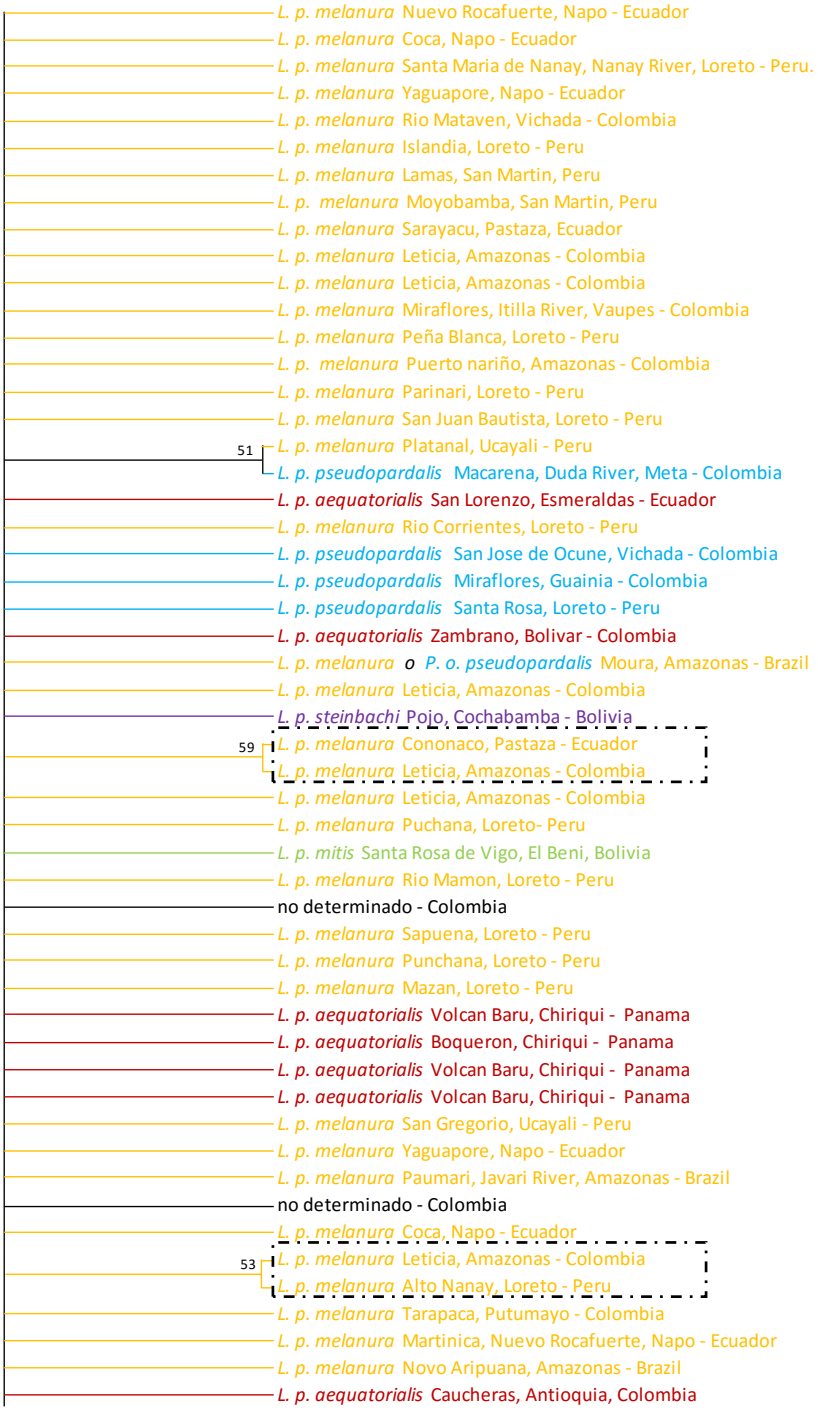


Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

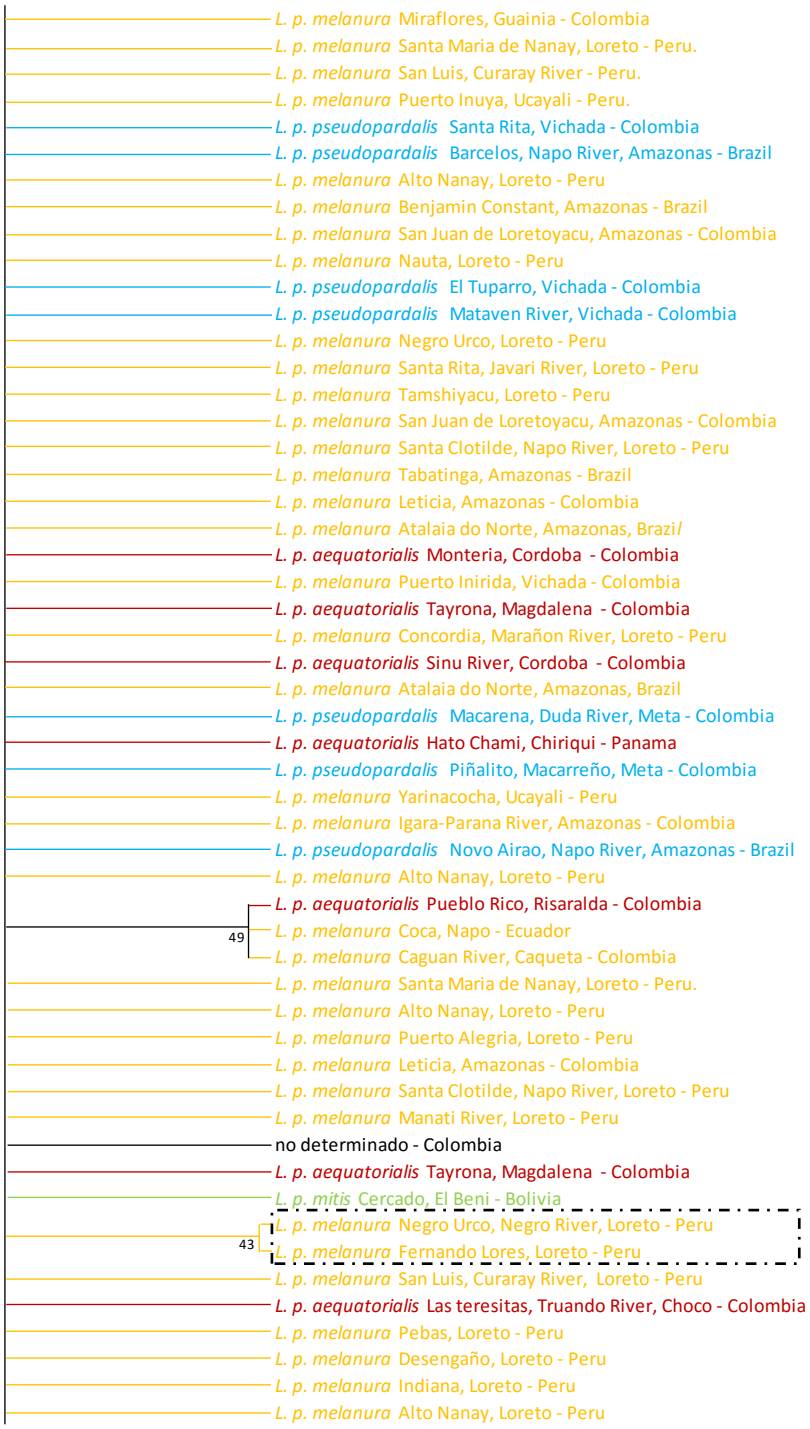


Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

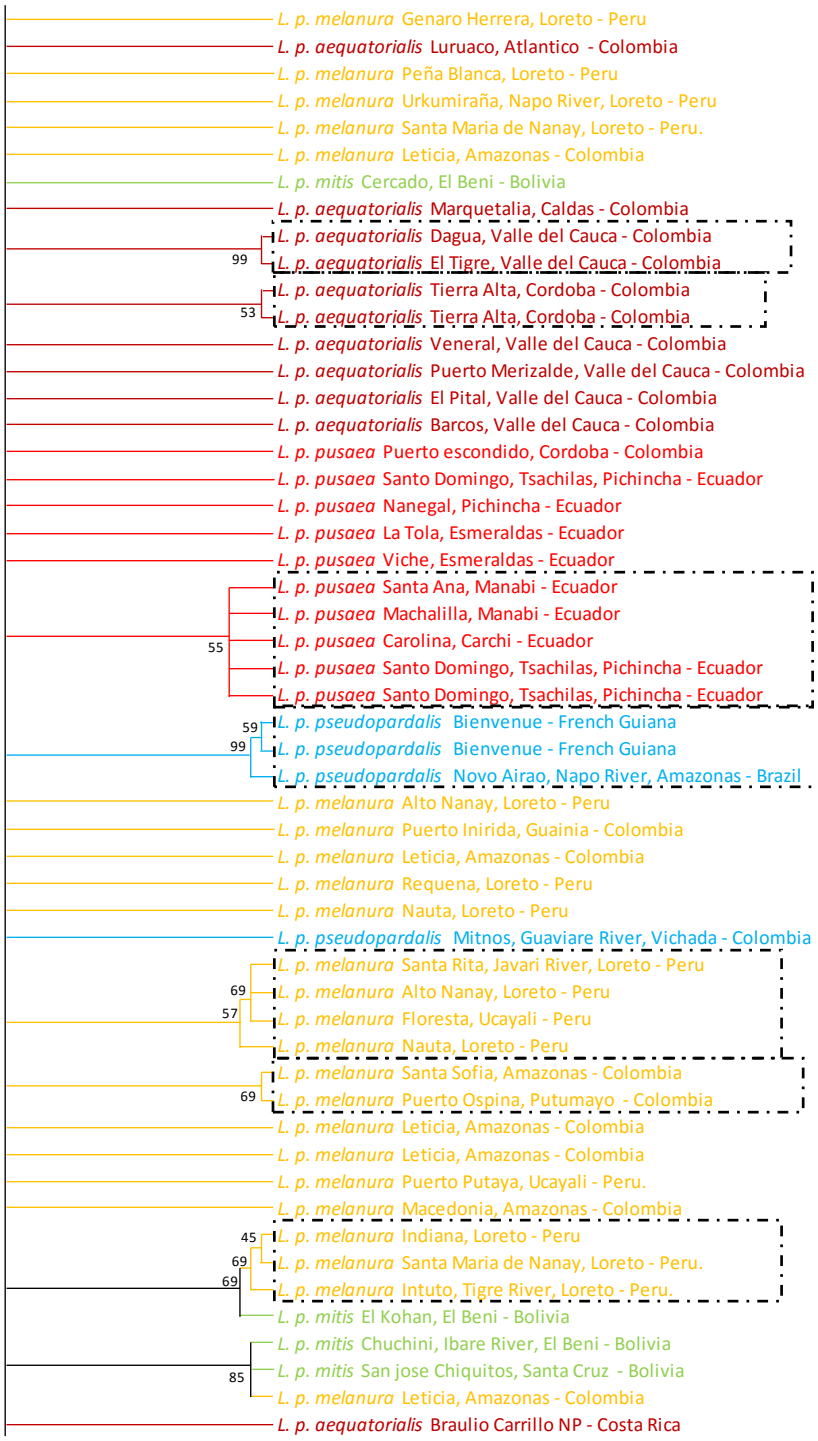


Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

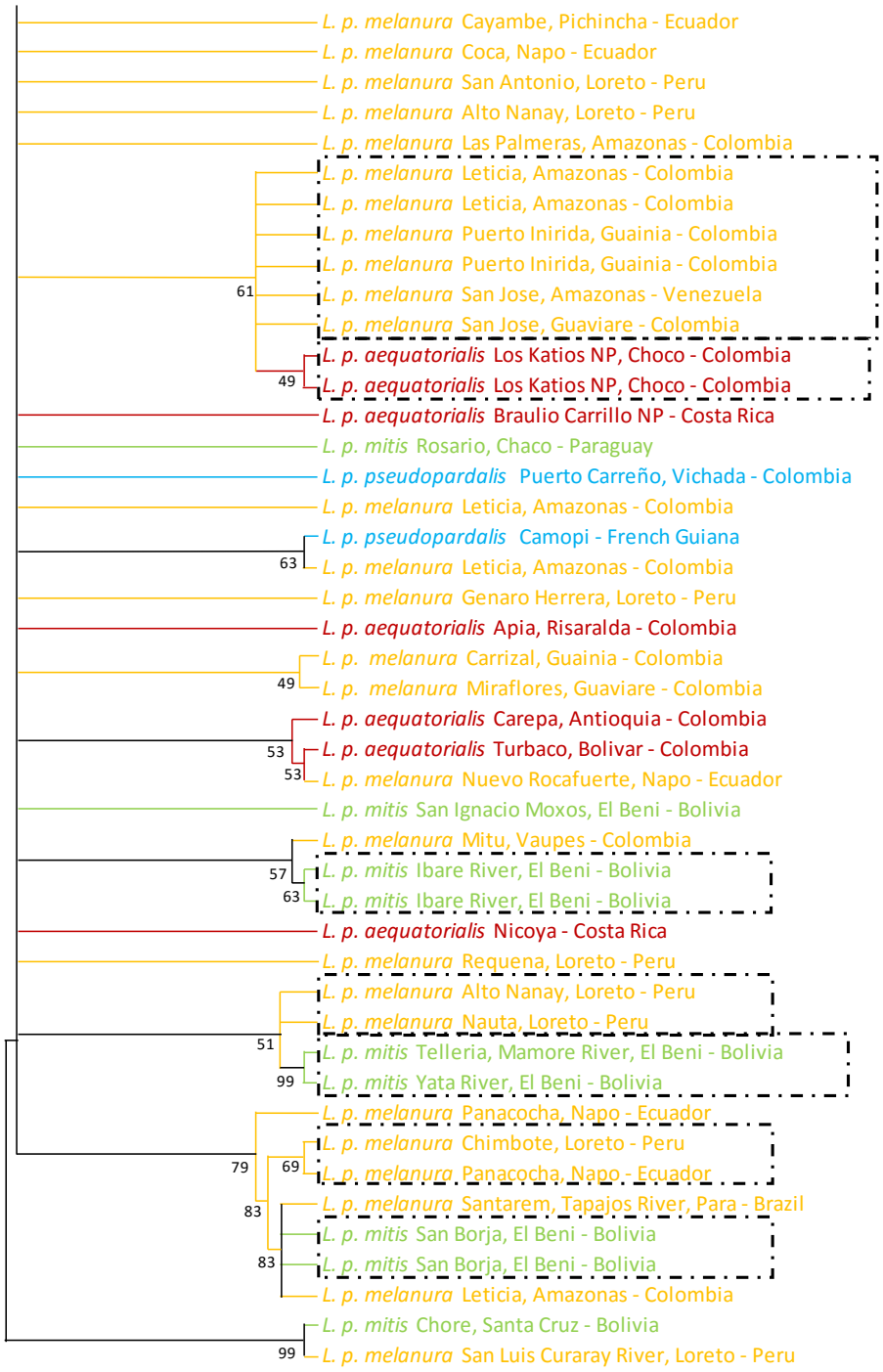


Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

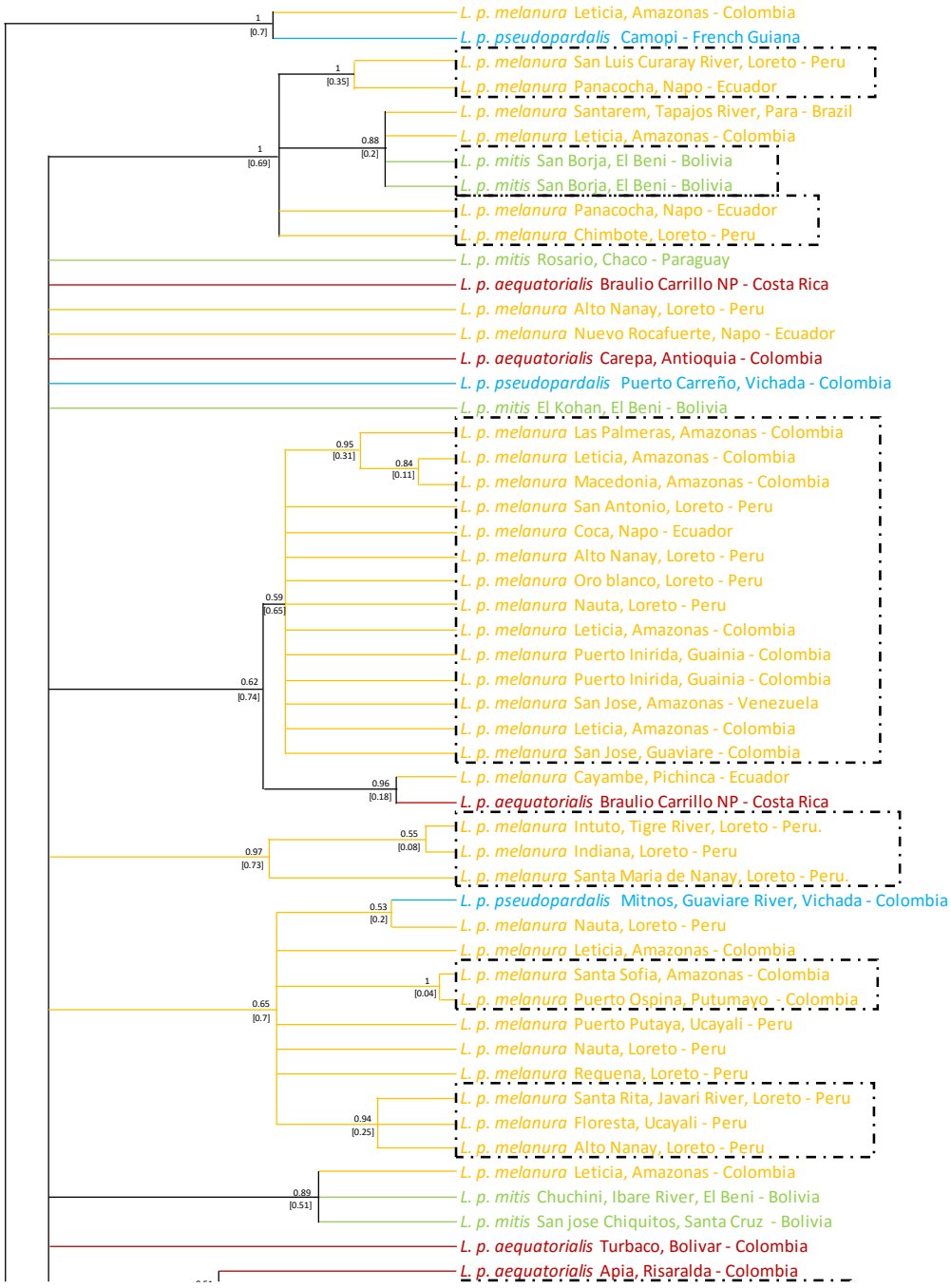


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

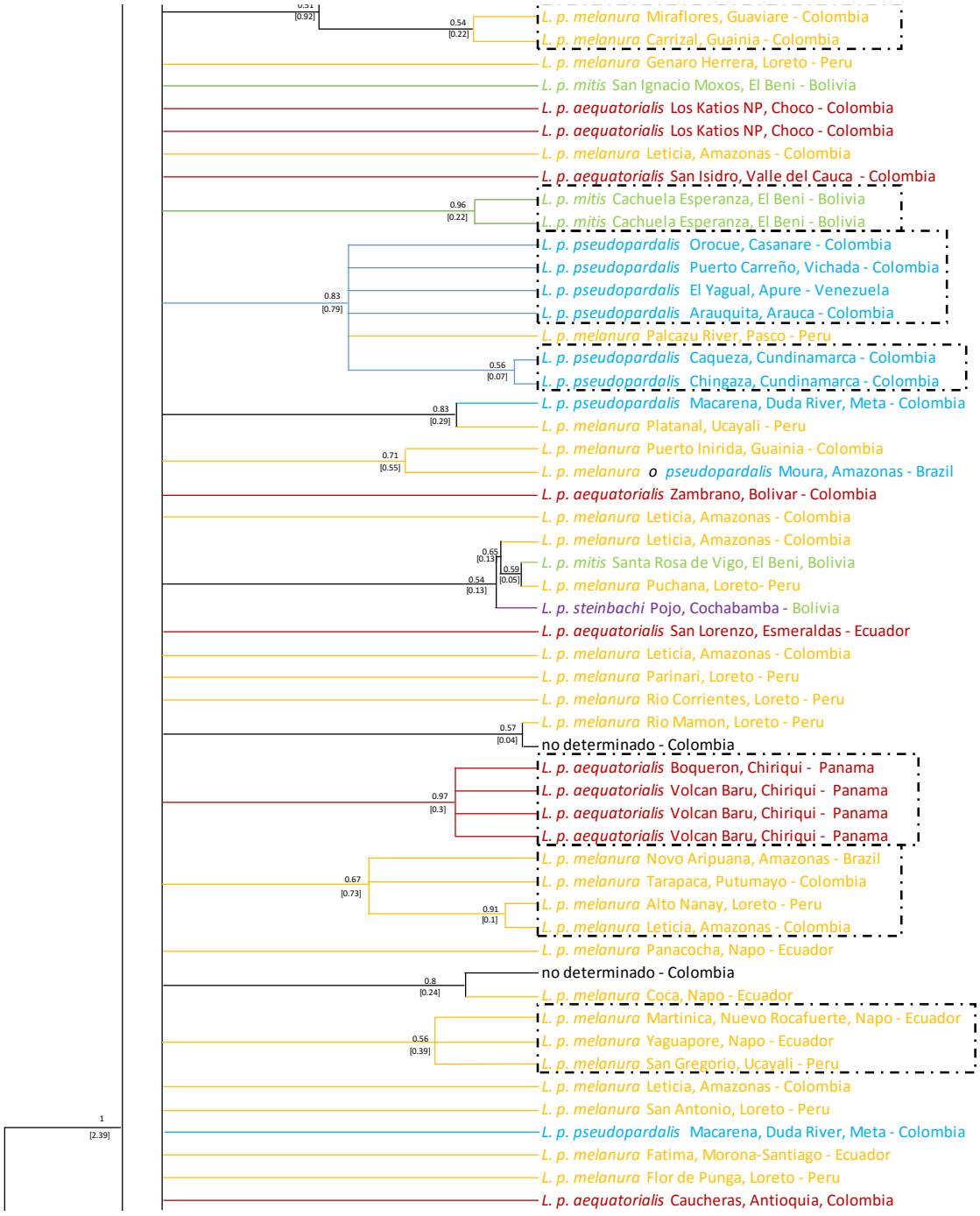


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

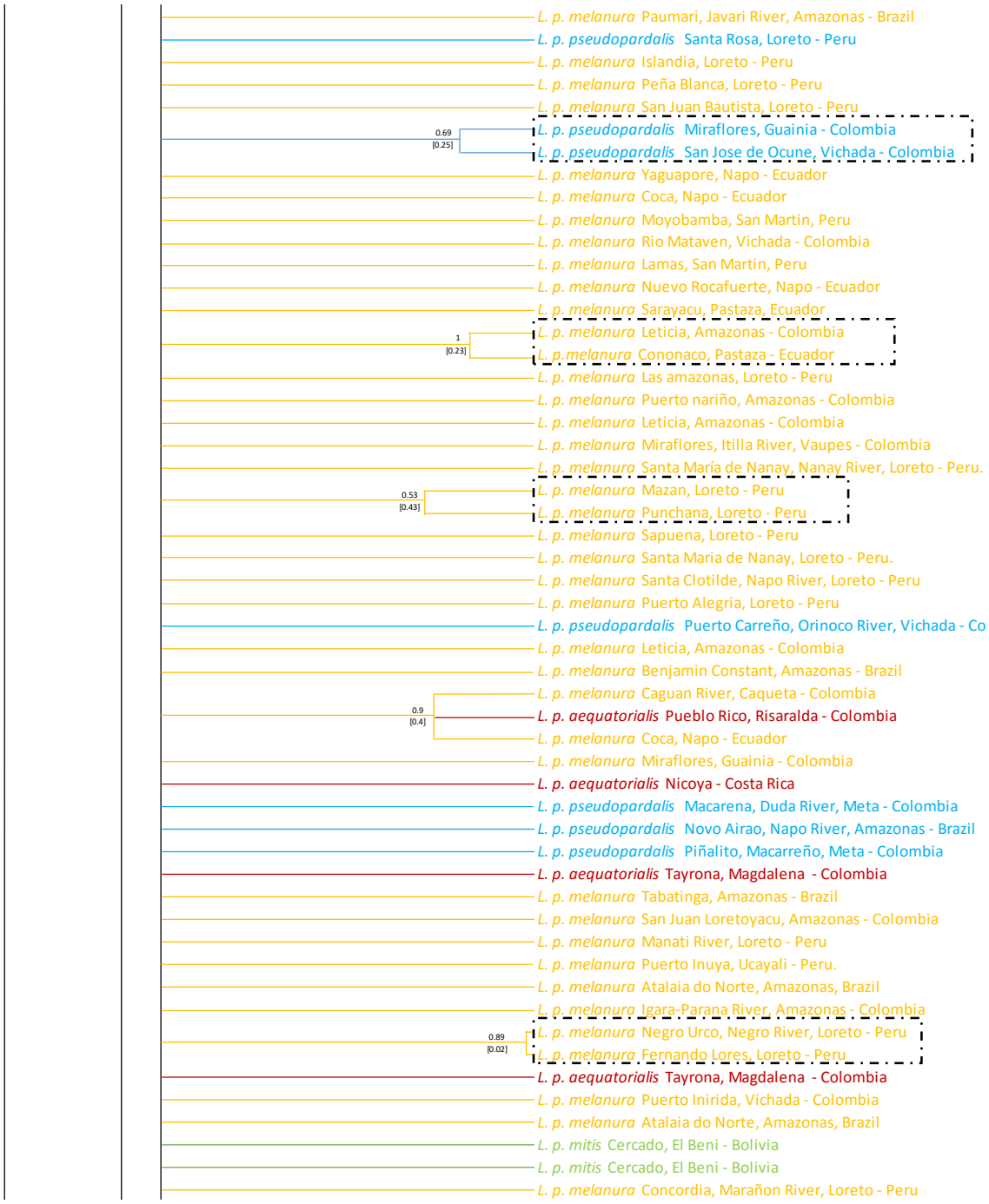


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

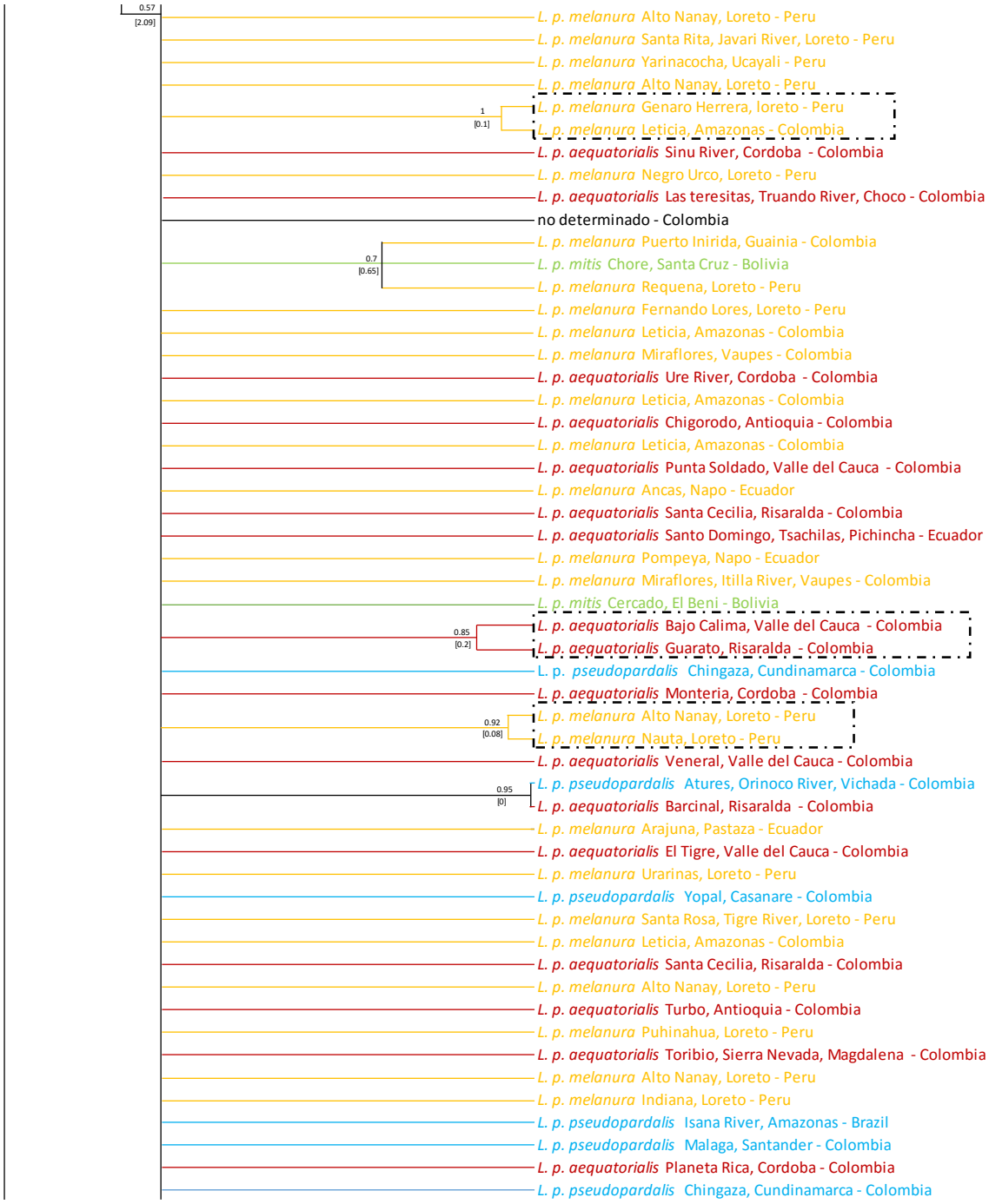


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

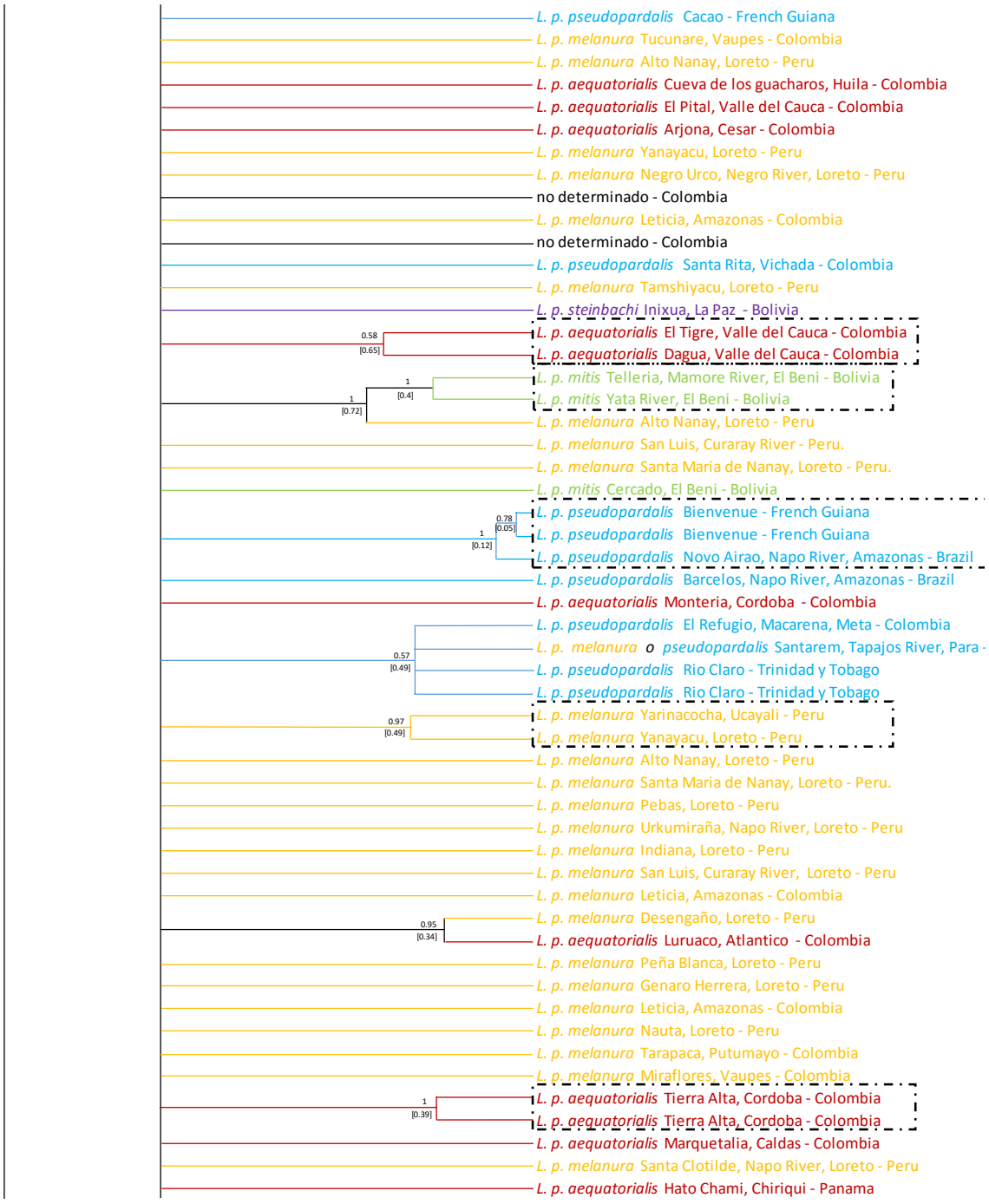


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

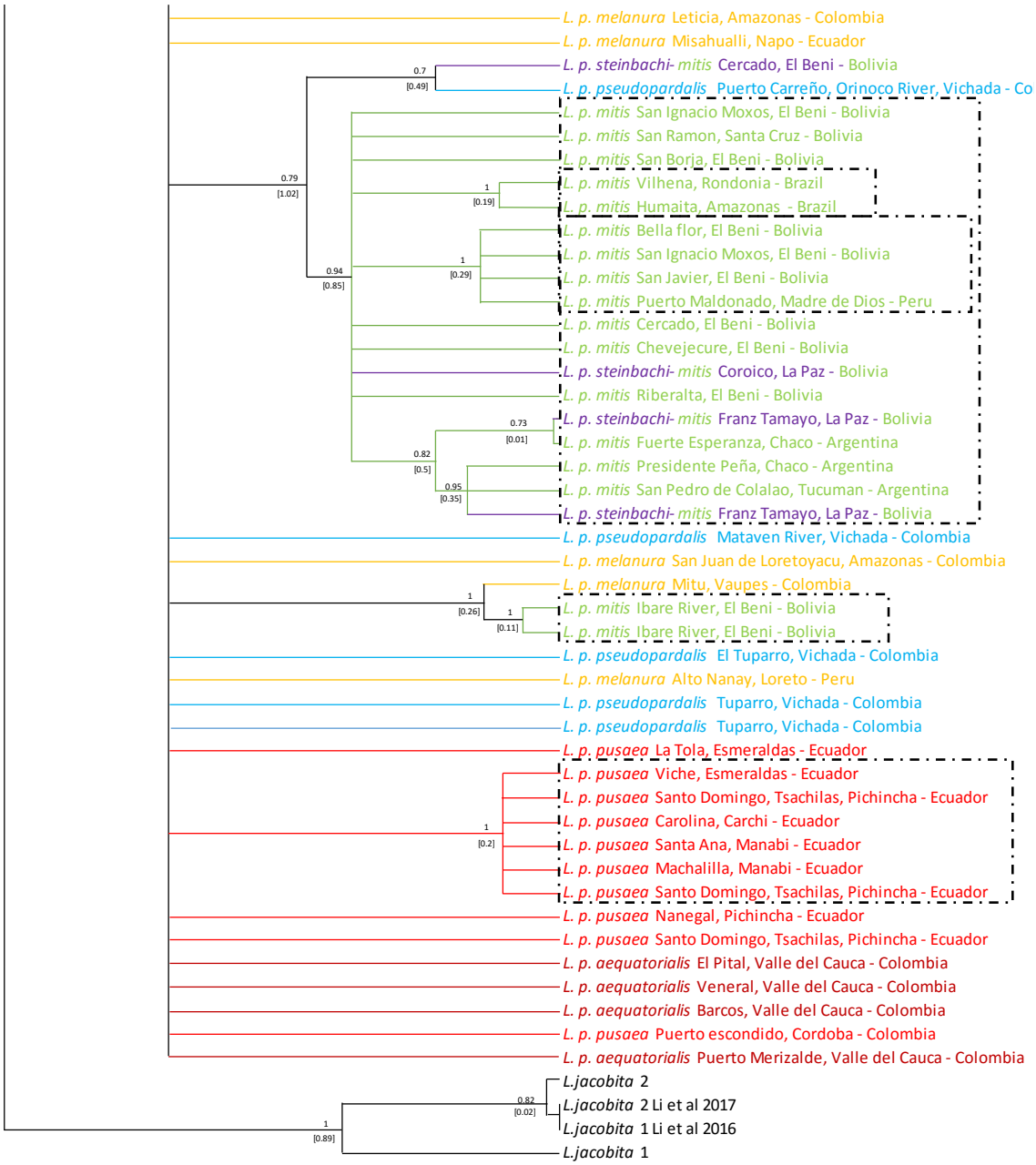


Figura 26. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

en cada una de sus agrupaciones. *L. p. mitis*, por ejemplo, presentó un clado con el 47% de las secuencias de esta subespecie de las zonas de Bolivia, Brasil, Perú y Argentina (PP=0.94). Por otra parte, *L. p. melanura* presentó otro grupo con el 8.5% de las secuencias de esta subespecie de las zonas de Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela (PP=0.59). En general, este árbol resolvió mejor las relaciones entre individuos que el de máxima verosimilitud. Al igual que aquel, *L. p. pusaea* presentó el mismo comportamiento.

Para el grupo de datos de mitogenoma (Figuras 27 y 28), se trabajaron secuencias de *L. p. melanura*, *L. p. pseudopardalis*, *L. p. mitis*, *L. p. aequatorialis*, *L. p. pusaea* y *L. p. steinbachi*. En estos árboles, las agrupaciones están mejor definidas. En el árbol de máxima verosimilitud (Figura 27), *L. p. pusaea, L. p. mitis, L. P. pseudopardalis* y *L. p. steinbachi* presentan clados con altos valores de B (90%, 52%, 76% y 99%). En el árbol bayesiano (Figura 28) y para el mismo grupo de datos, se resolvió un mayor número de relaciones y se conservaron las agrupaciones de las subespecies morfológicas, pero el clado de *P. o. steinbachi* se disoció.

Probablemente, en el ocelote es donde más correspondencia se encontró entre ciertas subespecies morfológicas y los clados moleculares obtenidos. En el caso de pusaea, y mitis existe una buena correspondencia entre los datos moleculares y las subespecies morfológicas tradicionalmente propuestas. En el caso de *melanura* y *aequatorialis*, también ciertos clados moleculares significativos se dan en las áreas geográficas donde putativamente viven esas subespecies.

Los tiempos de divergencia obtenidos a partir de los árboles bayesianos para los dos grupos de datos estiman que aproximadamente hace 2.9 millones de años el ancestro de *L. pardalis* divergió del ancestro de *L. jacobita*. Los principales grupos de secuencias de las posibles subespecies morfológicas divergieron así para el conjunto de tres genes: la diversificación mitocondrial de *L. p. mitis* habría comenzado hace aproximadamente 1 millón de años, el de *L. p. pseudopardalis*

Figura 27. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

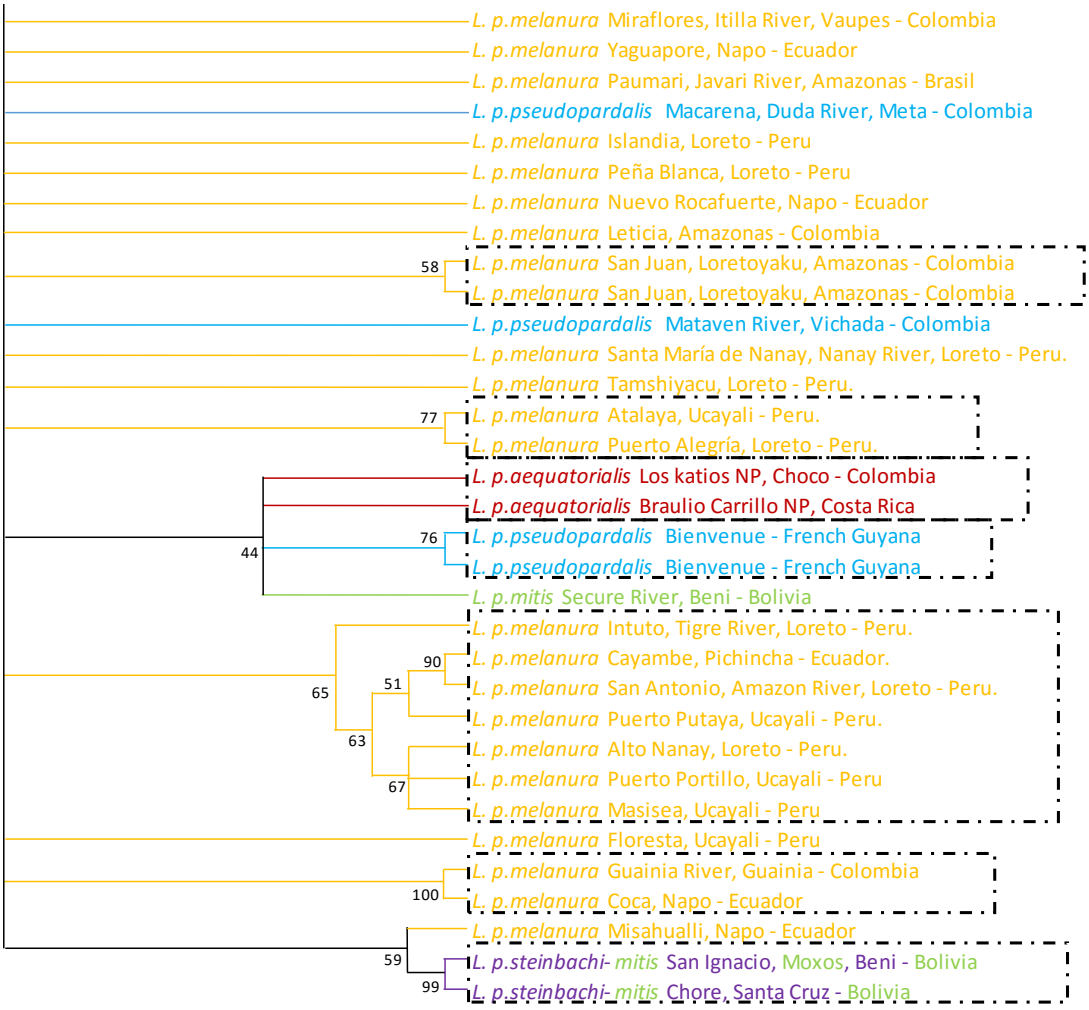


Figura 28. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus pardalis*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (Continuación).

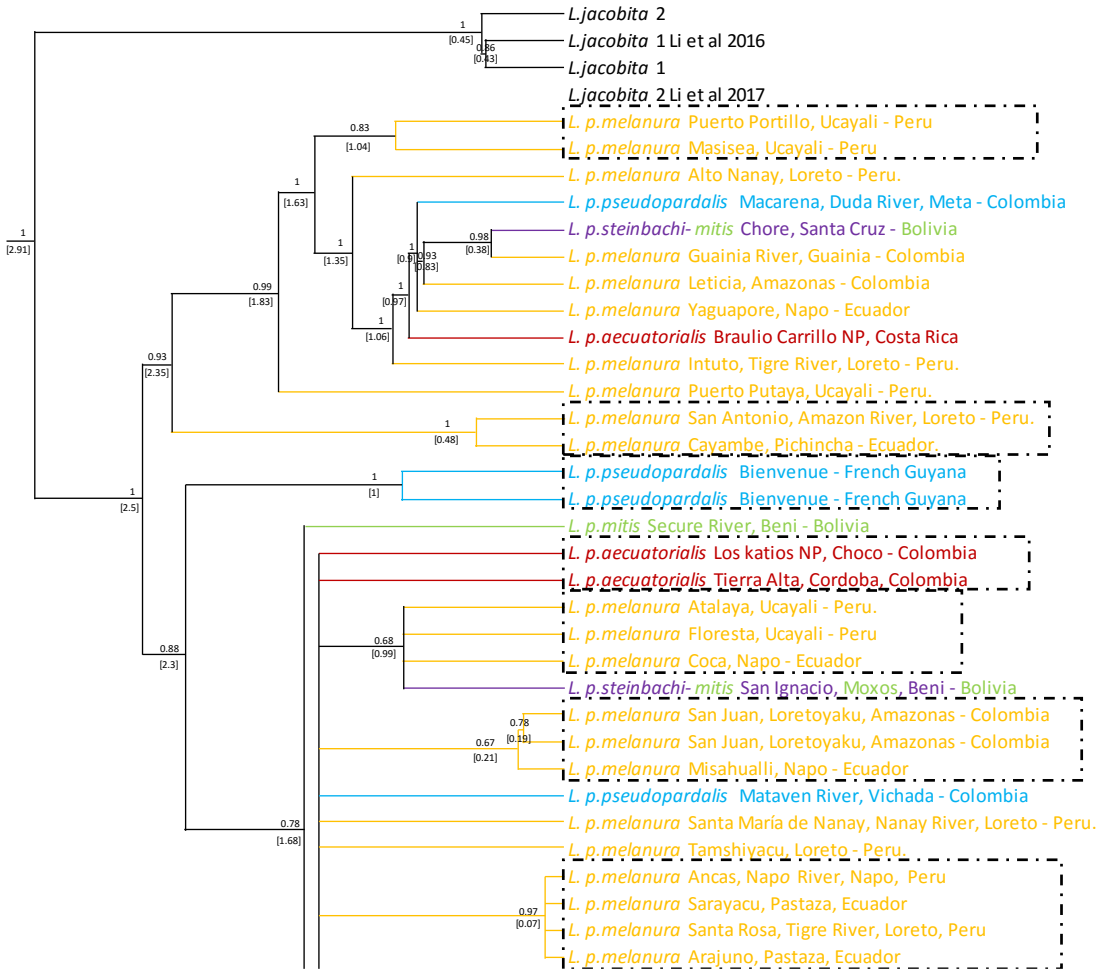


Figura 29. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

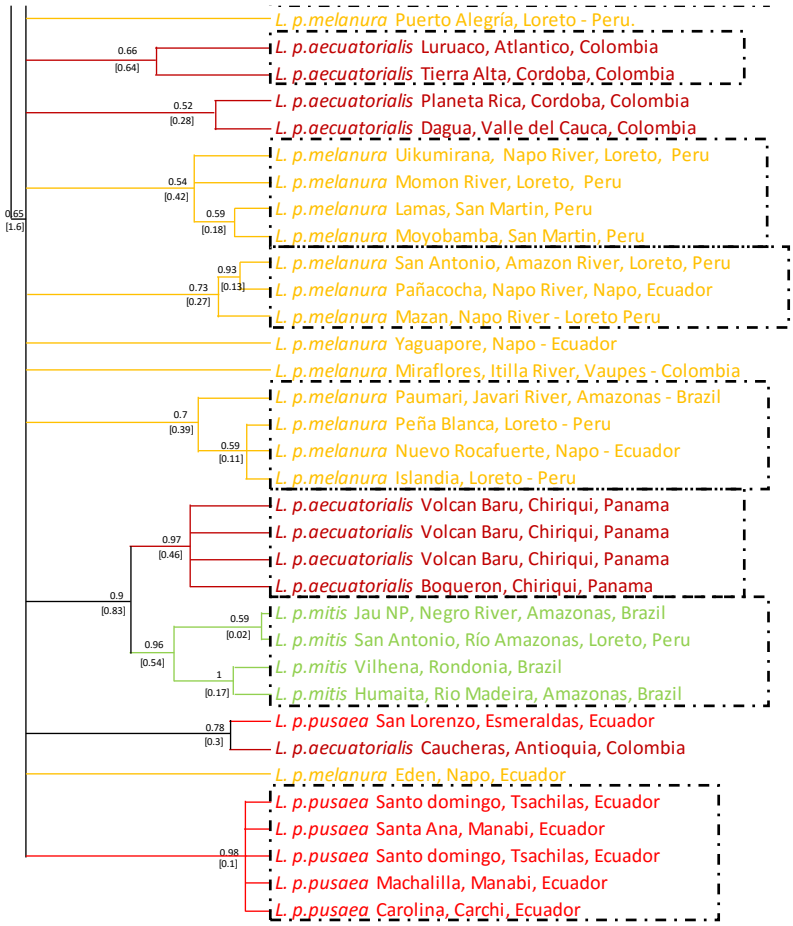


Figura 30. Árbol bayesiano para *Leopardus pardalis*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (Continuación).

hace aproximadamente 790.000 años, el ancestro del clado principal de *L. p. melanura* hace aproximadamente 740.000 años, el de *L. p. aequatorialis* hace unos 300.000 años y la diversificación mitocondrial del ancestro del actual *L. p. pusaea* hace 200.000 años.

Los valores del tiempo de divergencia de los clados principales para cada una de las subespecies putativas morfológicas para el árbol bayesiano con mitogenómica presentó valores del siguiente orden. Para la diversificación mitocondrial del ancestro del actual *L. p. pseudopardalis*, el proceso se inició hace 1 MA; para un grupo de *L. p. mitis* de Bolivia y Brasil hace 540.000 años, para el ancestro del grupo de *L. p. aequatorialis* en el norte de Panamá hace 460 mil años y para *L. p. pusaea* hace 100 mil años. Algunos de los diferentes grupos polifiléticos de *L. p. melanura*, comenzaron su diversificación mitocondrial hace 420.000 años (un grupo de la Amazonía peruana), 210.000 años (un grupo de la Amazonía colombiana y ecuatoriana) y 70.000 años (un grupo de la Amazonía peruana y ecuatoriana).

La separación del ancestro del ocelote respecto a otros linajes del género *Leopardus* pudo iniciarse al final del Plioceno, pero todos los procesos de diversificación al interior de la especie son típicamente pleistocénicos.

3.4.4. Margay, *Leopardus wiedii*.

Para el caso del análisis con las secuencias de tres genes, se trabajó con las subespecies morfológicas: *L. w. vigens*, *L. w. nicarague*, *L. w. glaucula*, *L. w. amazonica*, *L. w. pirrensis*, *L. w. boliviae* y *L. w. salvinia*.

En el árbol de máxima verosimilitud, no se encontraron agrupaciones gruesas de las presuntas subespecies morfológicas, sino pequeñas y numerosas agrupaciones geográficas diferentes en el seno de algunas de esas supuestas subespecies; por ejemplo: *L. w. amazonica* – Perú (B=78%, PP=0.9), *L. w. pirrensis* – Panamá (B=90%, PP=0.81), *L. w. boliviae* – Bolivia (B=60%, PP=0.86), entre otros. En el

caso de *L. w. vigens* con tres secuencias, dos de ellas se agruparon con Bootstrap (B=66% y PP= 0.92); la tercera secuencia, estuvo más relacionada con secuencias de *L. w. amazonica*. En el caso de *L. w. glaucula*, con 2 secuencias, éstas no se agruparon y *L. w. nicarague* con una sola secuencia, se agrupó con una secuencia de *L. w. amazonica* (Figura 29). El árbol bayesiano para el mismo grupo de muestras, estuvo más resuelto, conservó las agrupaciones del árbol de máxima verosimilitud incluyendo más secuencias en sus agrupaciones geográficas y detectando otras: *L. w. amazonica* (2) y *L. w. salvinia* (1). En este árbol, *L. w. salvinia* formó un solo clado con una probabilidad posterior de 0.78 (Figura 30). Las dos subespecies que formaron agrupaciones geográficas más significativas fueron *L. w. boliviae* y *L. w. amazonica*.

Los árboles de máxima verosimilitud y bayesiano (Figuras 31 y 32, respectivamente) para el grupo de datos mitogenómicos incluyeron secuencias de las subespecies morfológicas: *L. w. nicarague*, *L. w. glaucula*, *L. w. amazonica*, *L. w. pirrensis* y *L. w. boliviae*. En los dos, presentaron los mismos resultados. Es decir, diferentes agrupaciones geográficas de secuencias en el interior de las supuestas subespecies morfológicas, pero distribuidas por todo el árbol sin formar clados monofiléticos para las subespecies. Las secuencias de *L. w. glaucula* (2) no se agruparon y la de *L. w. nicarague*, se agrupó con una secuencia de Loreto (Perú) de *L. w amazonica*.

Es interesante anotar que el ocelote y el margay son dos especies del género *Leopardus* altamente emparentadas (Johnson *et al.* 1996; Johnson & O'Brien, 1997; Li *et al.* 2016) pero que, mientras el ocelote mostró una cierta correspondencia entre algunas de las subespecies morfológicas y los resultados moleculares (lo cual concuerda que es la especie analizada con mayor estructura espacial, sin contar con el complejo de especies de tigrillos), el margay es probablemente, de todas las especies estudiadas, en la que hay menor correspondencia entre los datos moleculares y las supuestas subespecies morfológicas tradicionalmente referidas

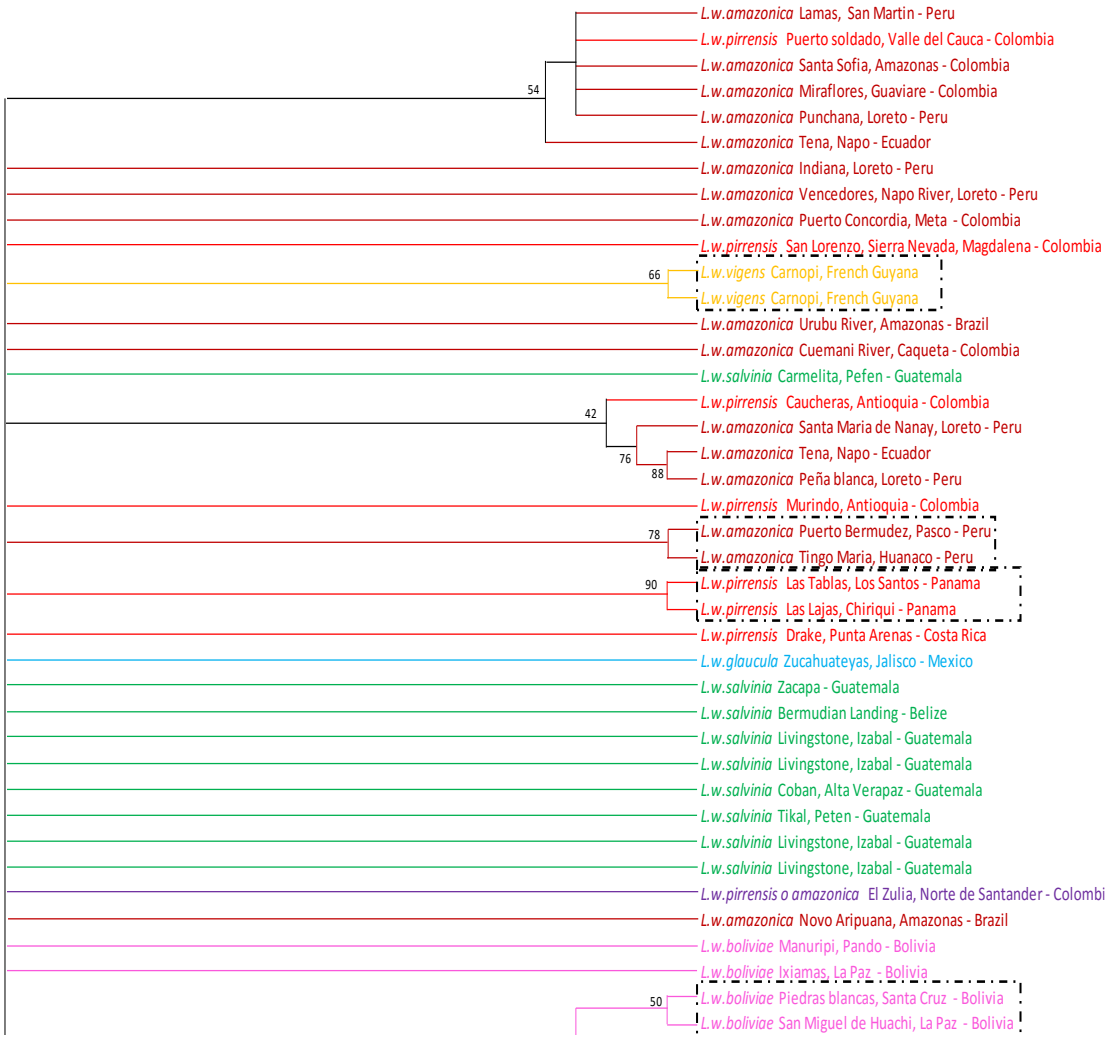


Figura 31. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

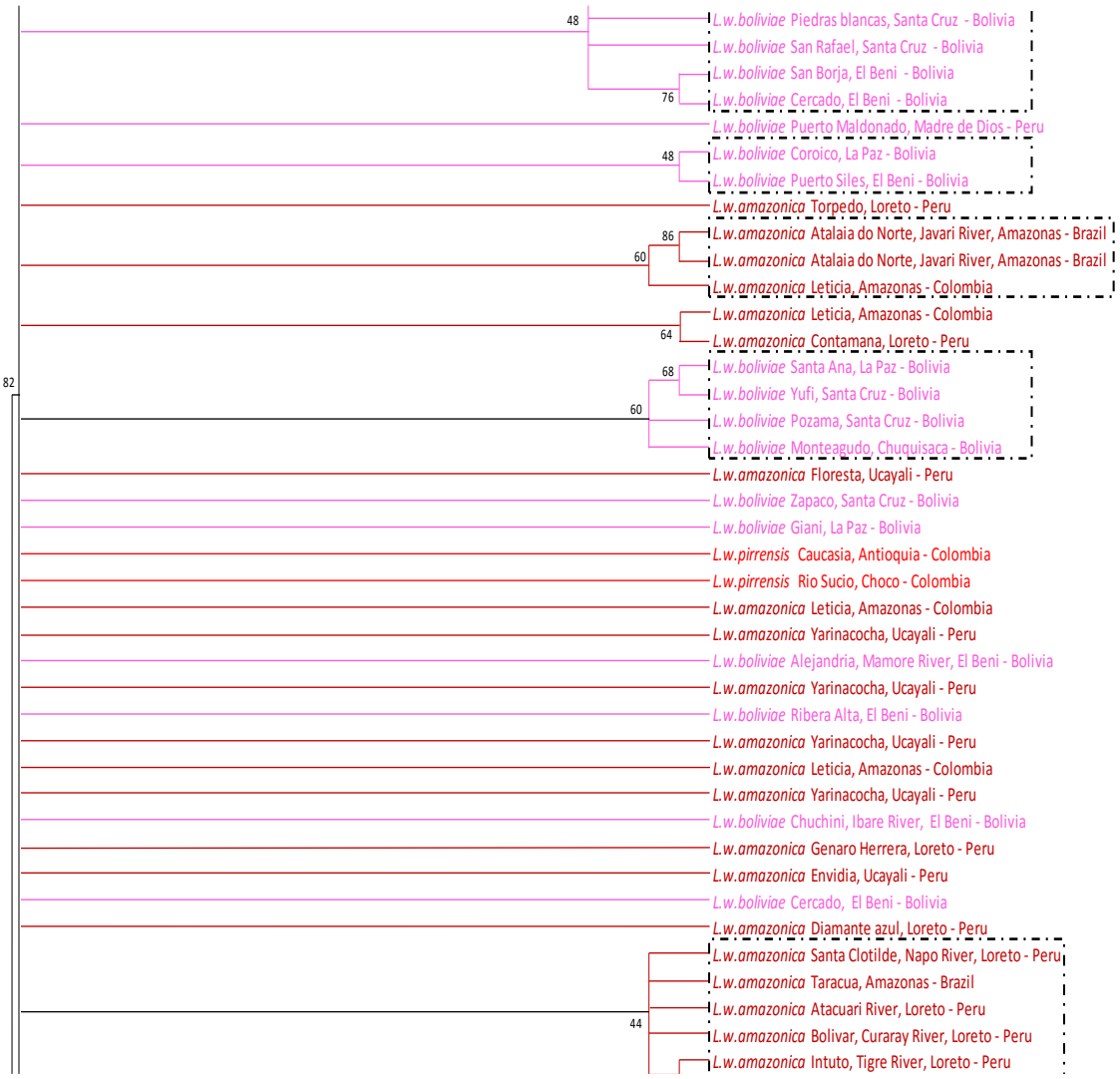


Figura 29. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

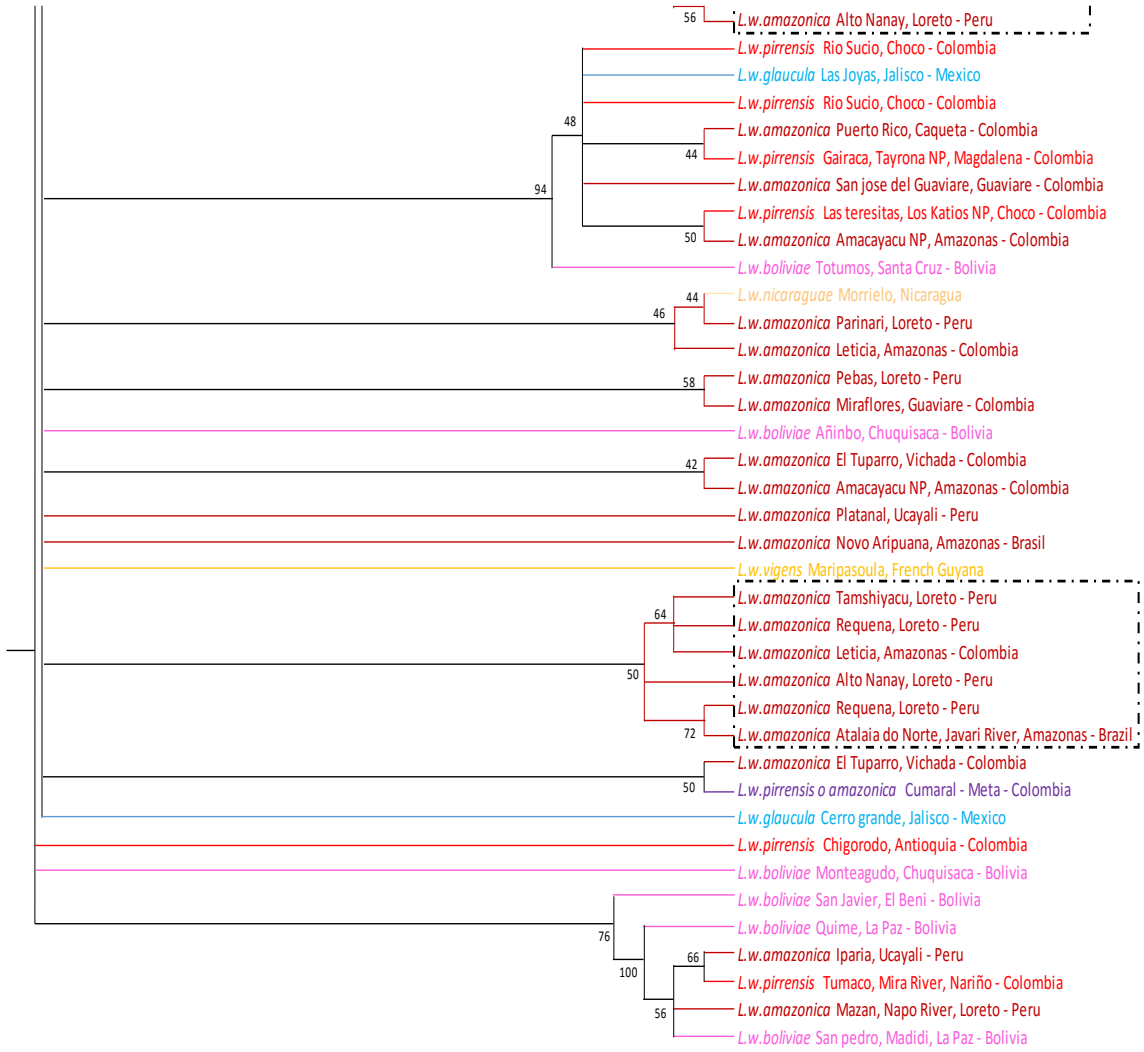


Figura 29. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos (continuación).

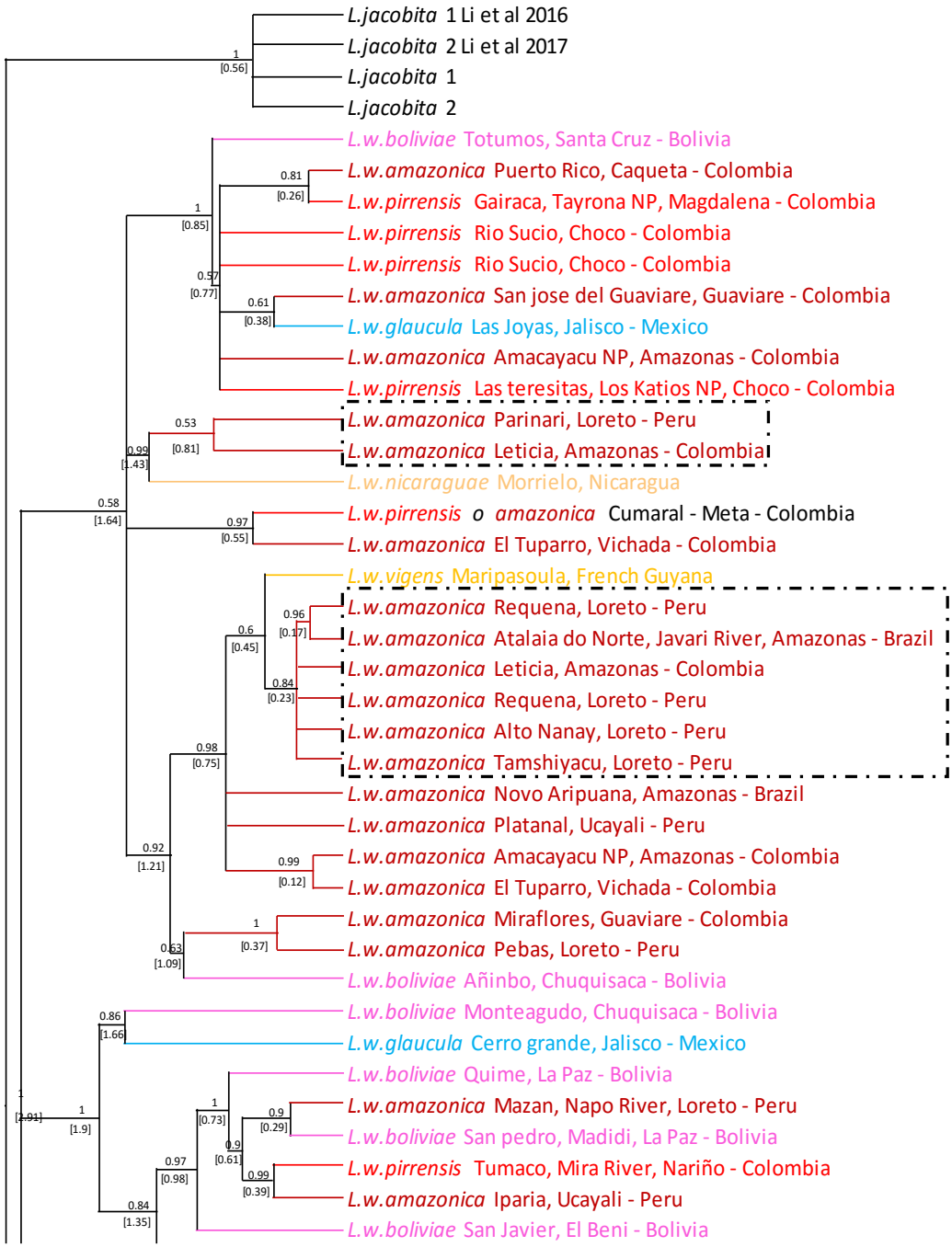


Figura 32. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

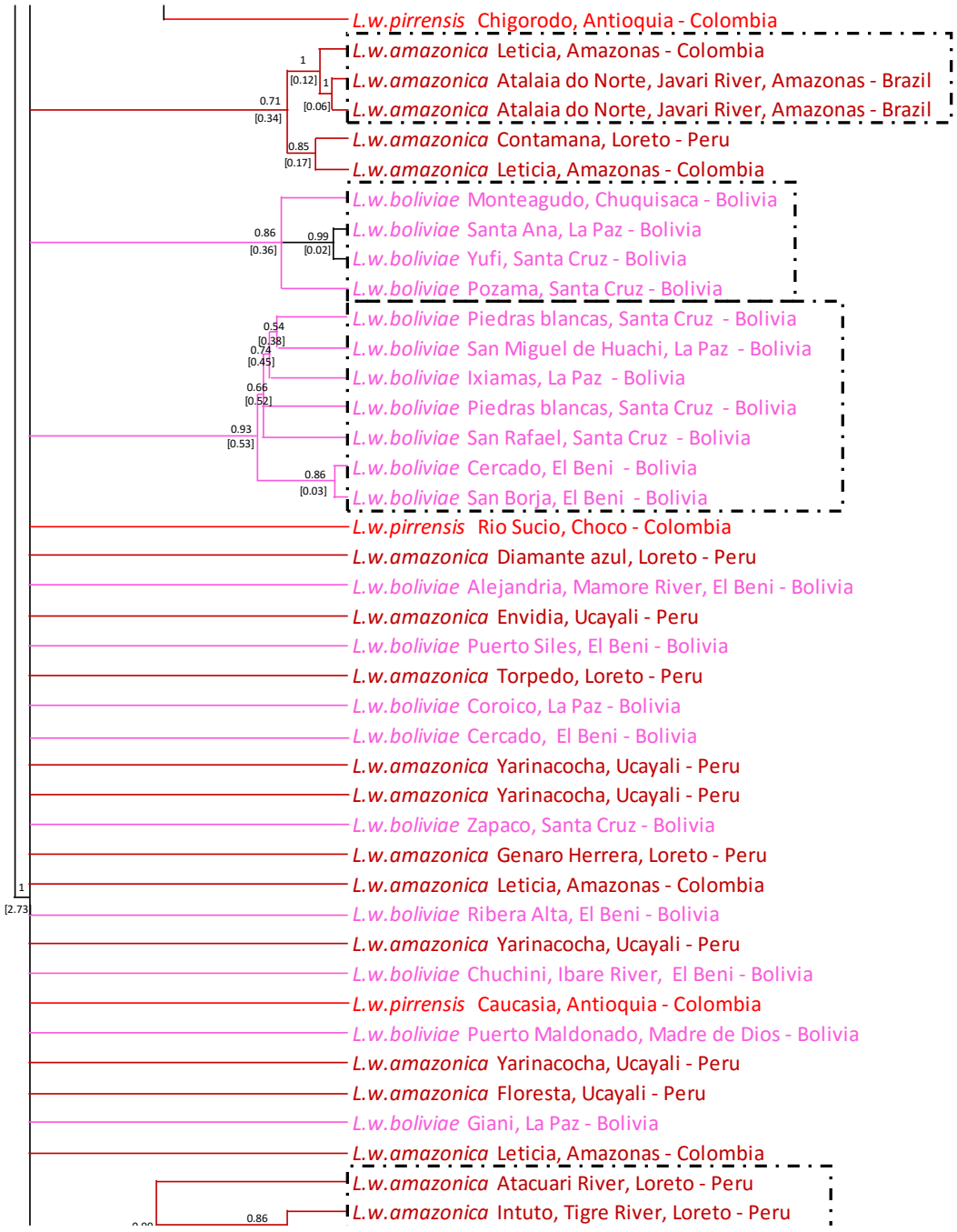


Figura 30. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

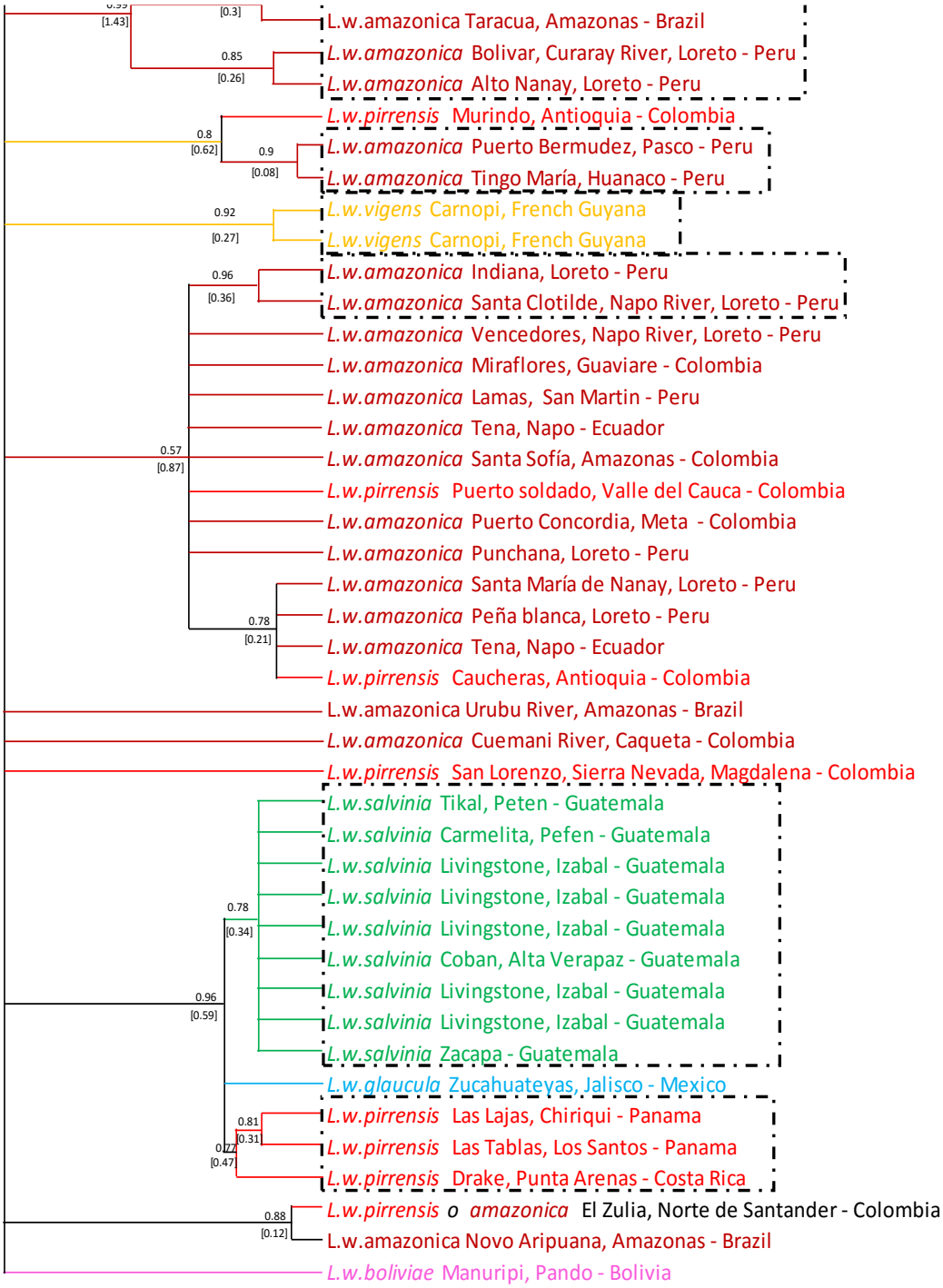


Figura 30. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii*. Tres genes. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (continuación).

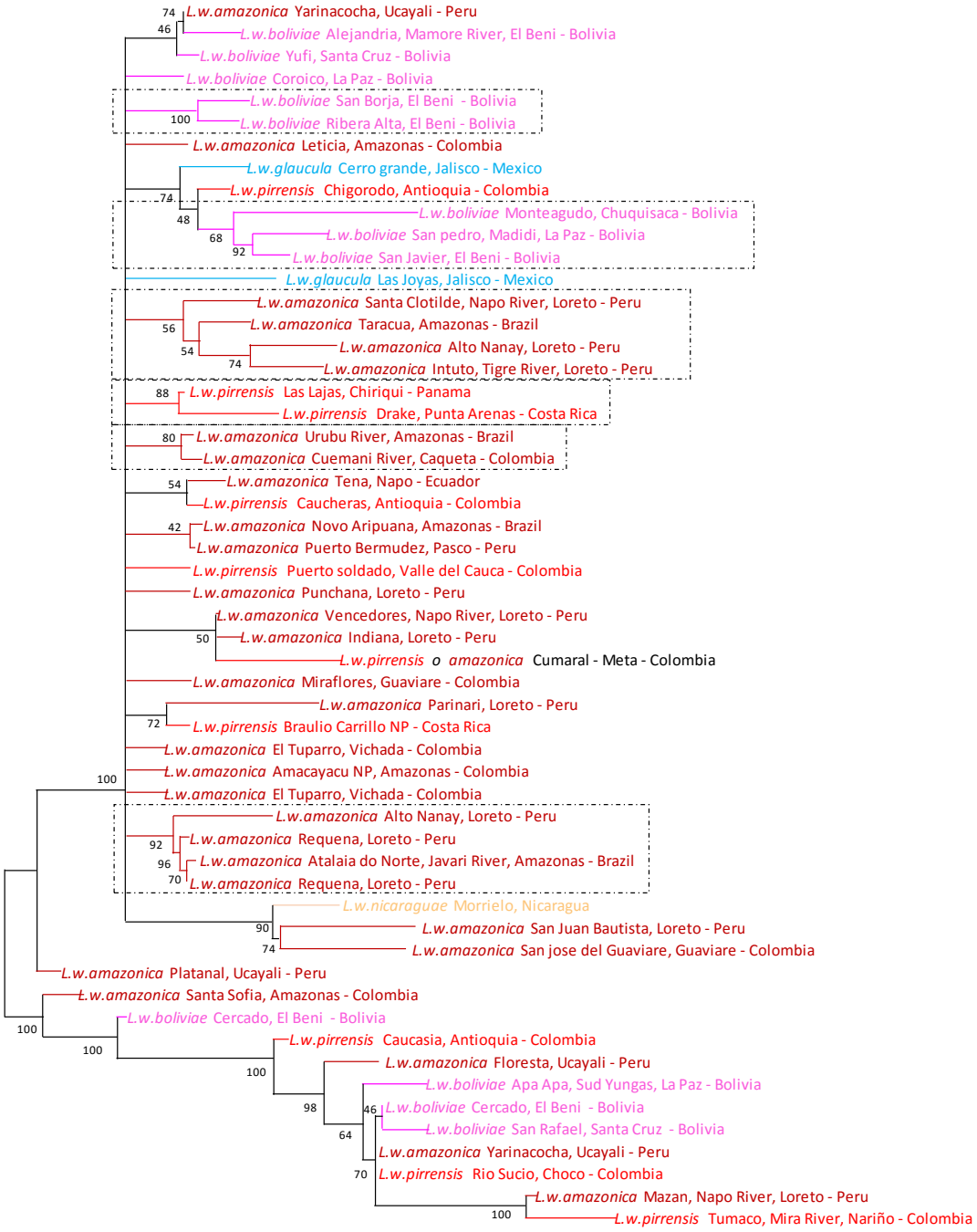


Figura 33. Árbol de máxima verosimilitud para *Leopardus wiedii*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

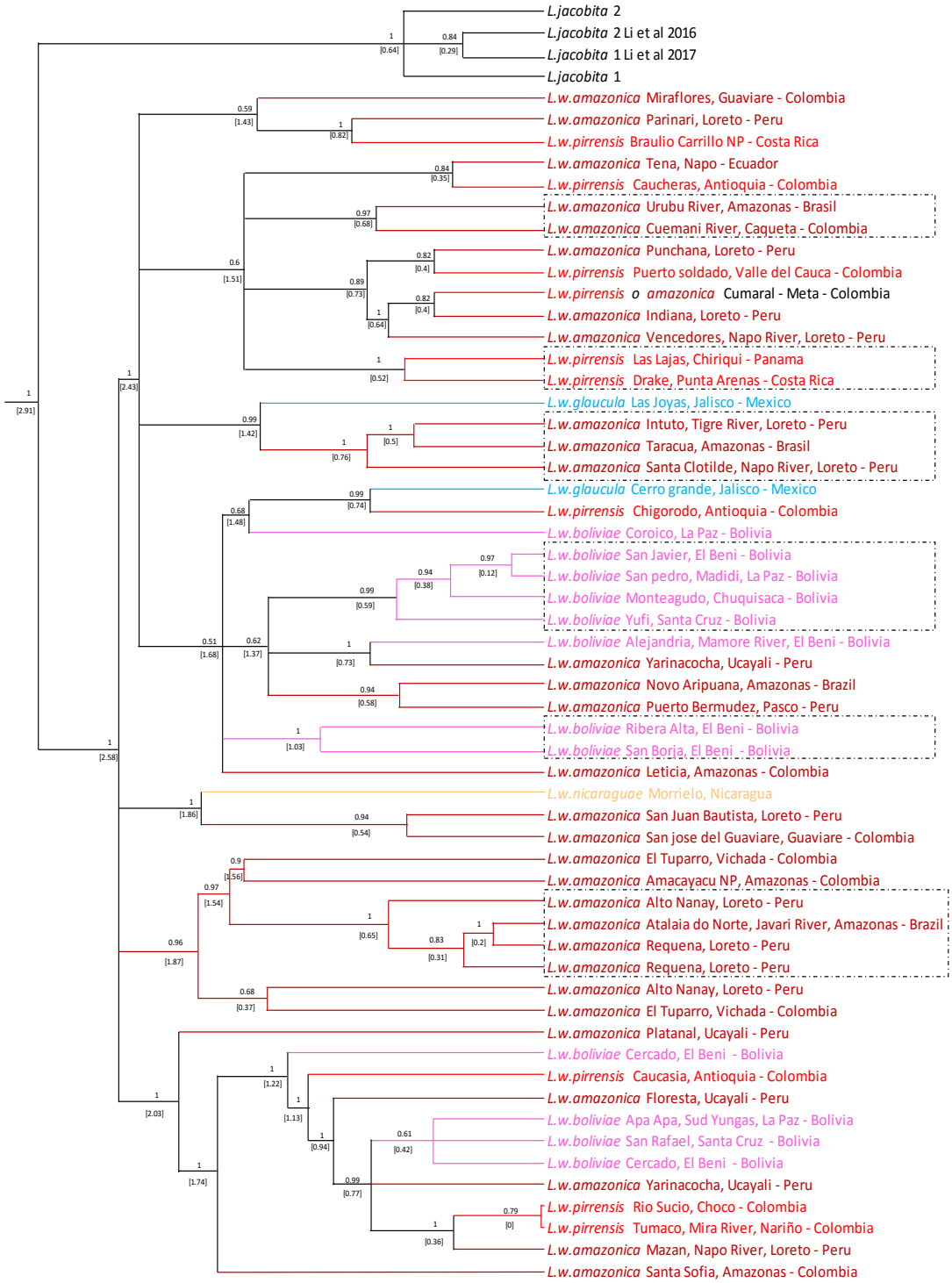


Figura 34. Árbol bayesiano para *Leopardus wiedii*. Mitogenomas. Los recuadros corresponden a grupos geográficos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

(lo cual, también, concuerda con ser la especie que menor estructura espacial mostró).

Los tiempos de divergencia estimados a partir de los árboles bayesianos dan inicio a la diversificación mitocondrial de *L. wiedii* hace aproximadamente 2.7 MA. Para los clados principales de cada uno de las posibles subespecies morfológicas en el árbol con tres genes, los tiempos de divergencia fueron para el ancestro del grupo principal de *L. w. amazonica* hace 1.43 MA, la de uno de los grupos de *L. w. boliviae* hace 530.000 años, *L. w. pirrensis* hace 470.000 años, *L. w. salvinia* hace 340.000 años y *L. w. vigens* 270.000 años. En el árbol bayesiano con mitogenomas, un grupo principal de *L. w. amazonica* hace 650.000 años y otro hace 760.000 años, para los dos grupos principales de *L. w. boliviae*, la divergencia se dio hace 590.000 años y 420.000 años, respectivamente y para *L. w. pirrensis* hace aproximadamente 520.000 años. Al igual que en casos anteriores todos esos procesos de diversificación mitocondrial fueron típicamente pleistocénicos.

3.4.5. Complejo de especies de tigrillos.

El árbol de máxima verosimilitud para el grupo de datos de ATP8 y 16S rRNA (Figura 33), fue construido con 41 secuencias de *L. tigrinus*, 6 de *L. pardalis*, 3 de *L. wiedii*, 3 de *L. colocolo*, 5 de *L. guigna*, 4 de *L. geoffroyi*, 4 de *L. jacobita*, 6 de *P. yagouaroundi* y 3 de *Felis catus*. Para el árbol bayesiano (Figura 34) no se tuvo en cuenta las secuencias de *P. yagouaroundi* y *Felis catus*.

En los dos árboles, se presentan ocho clados que contienen secuencias de individuos que fenotípicamente fueron clasificados *a priori* como especímenes de *L. tigrinus*: el primero, constituido por 3 individuos de Misiones Argentina y 2 del Paraná (Brasil), grupo que actualmente se reconoce como una especie independiente, *L. guttulus* (Trigo *et al.* 2013) con valores de B = 99% y PP = 1. El segundo grupo con 5 secuencias: 4 de Colombia y 1 de Ecuador (B=98%, PP= 0.98); el tercero con dos secuencias de Colombia y una de Perú (B=94%, PP=1).

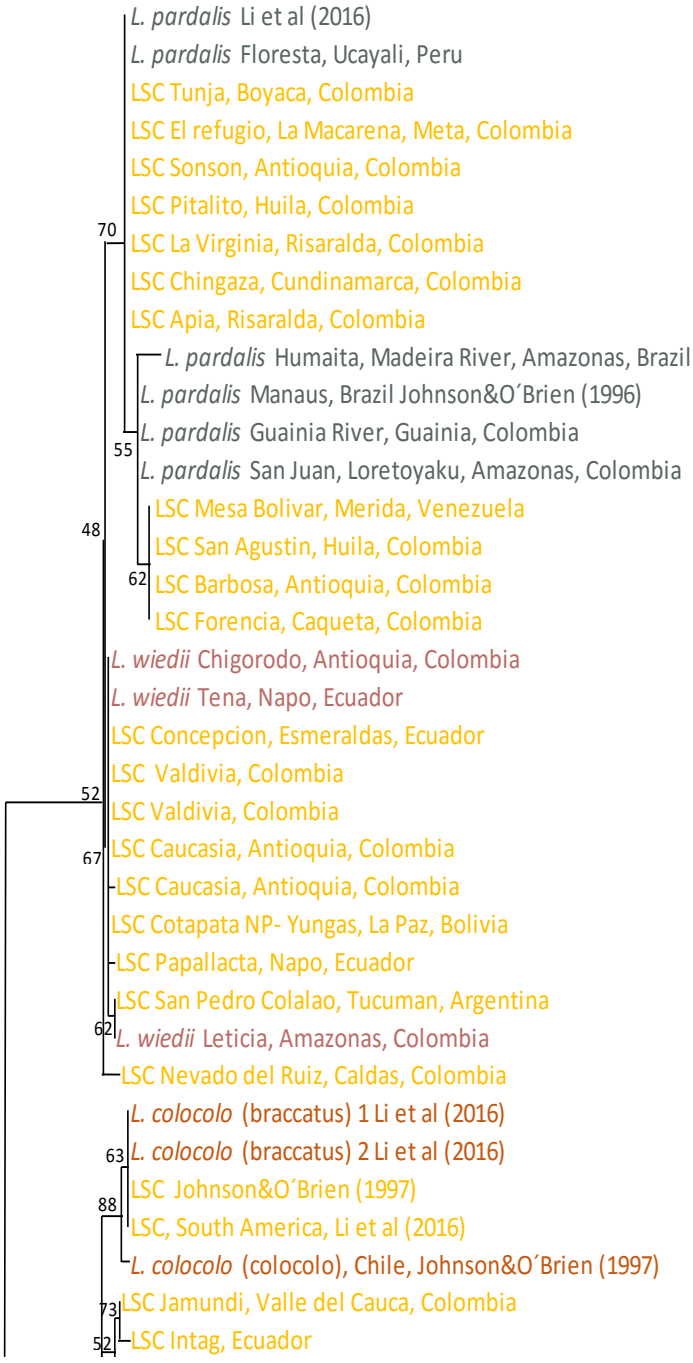


Figura 35. Árbol de máxima verosimilitud con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

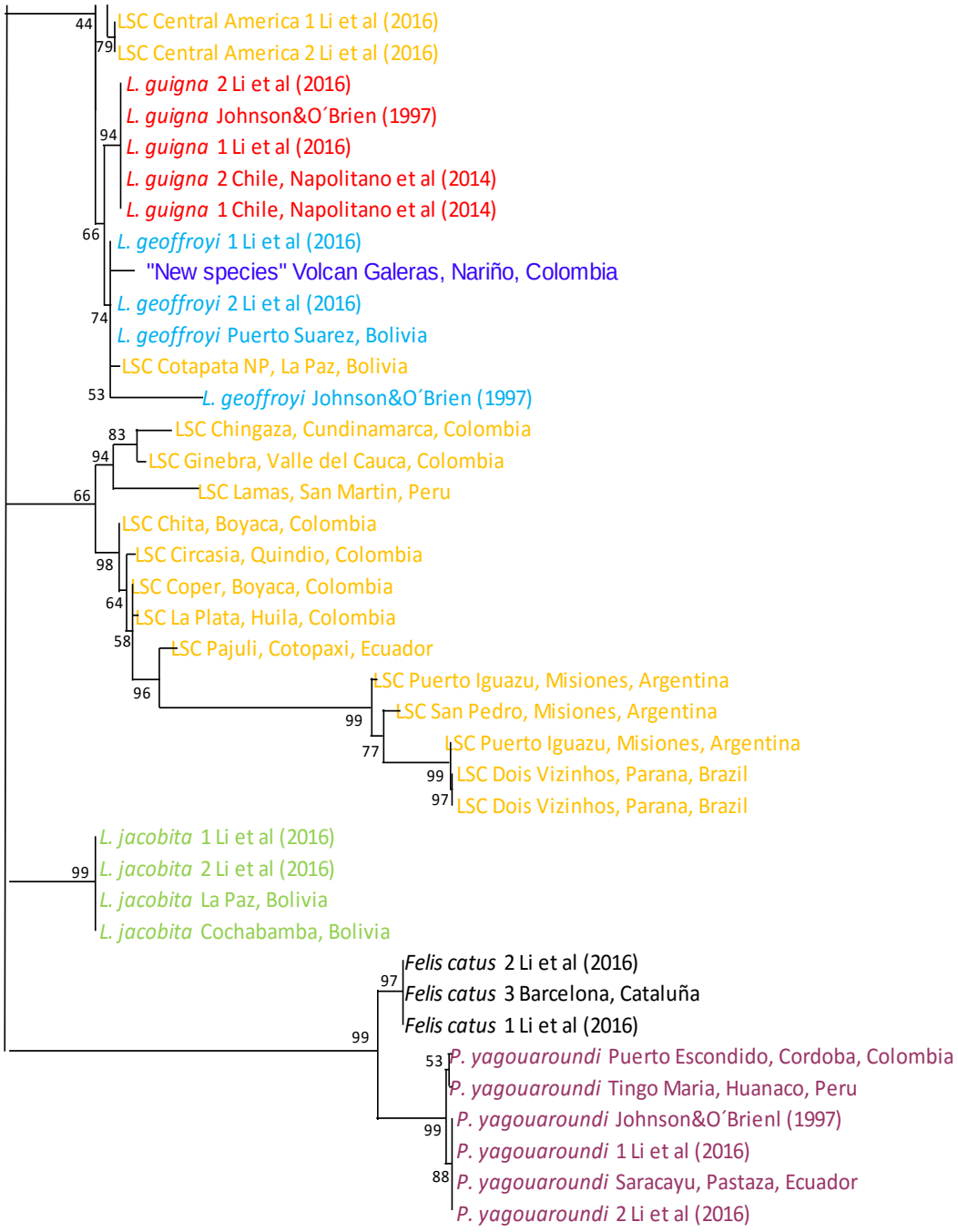


Figura 36. Árbol de máxima verosimilitud con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

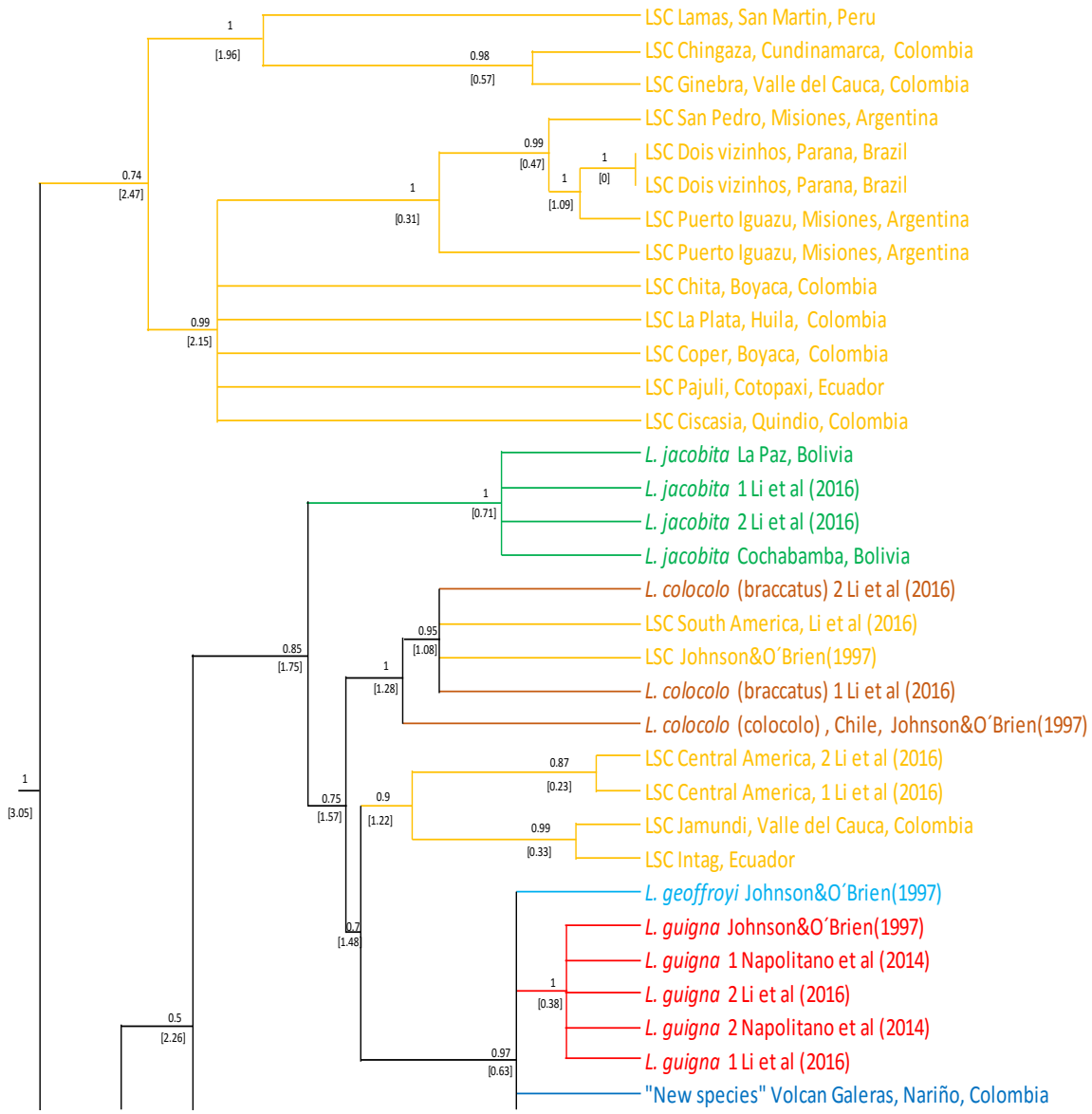


Figura 37. Árbol bayesiano con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

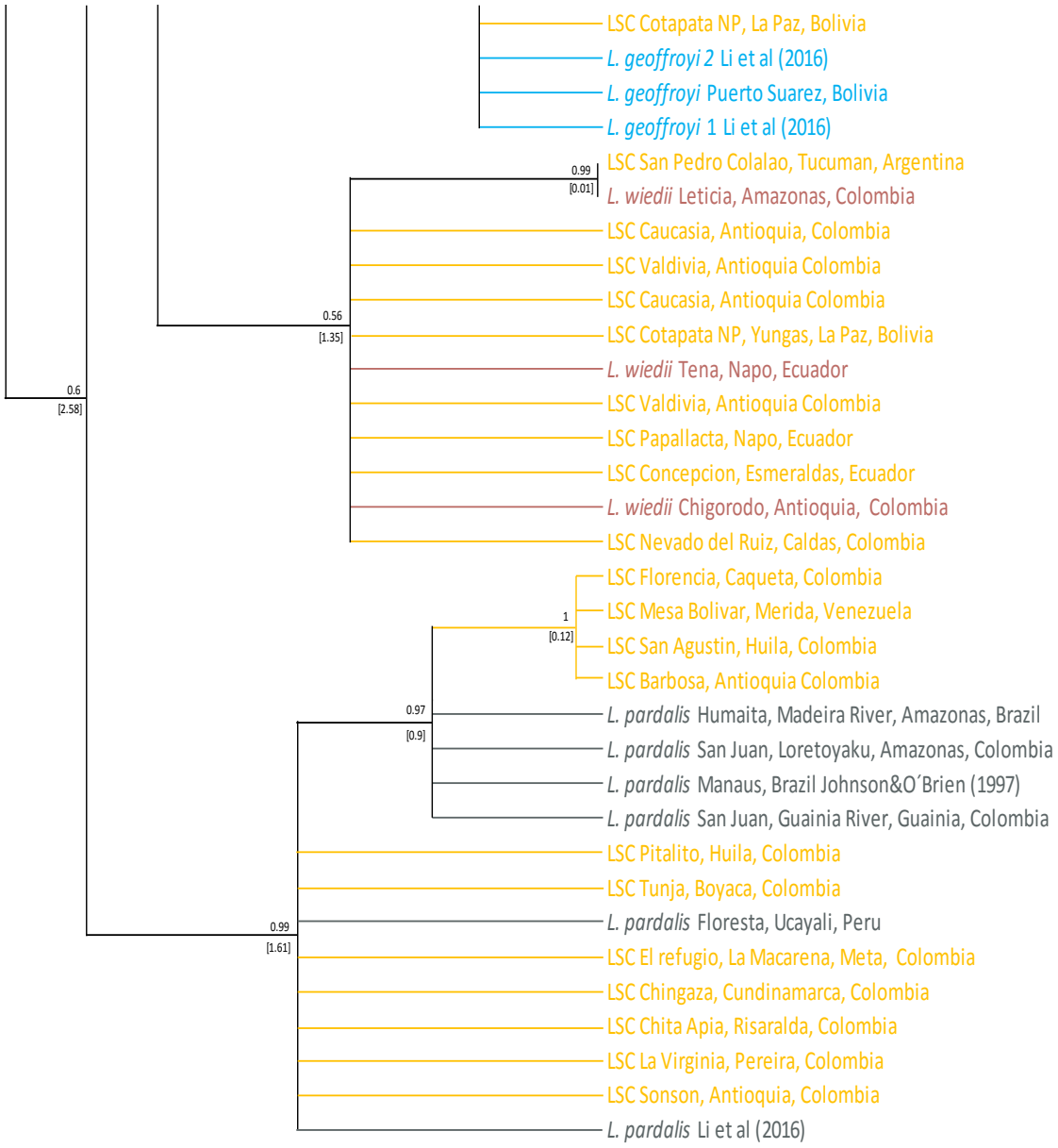


Figura 38. Árbol bayesiano con especímenes con fenotipo de tigrillos para los genes mitocondriales ATP8 – 16SrRNA. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

Un tercer clado con B = 74% con secuencias de *L. geoffroyi*, presenta dos individuos de fenotipo de tigrillo procedentes del Parque Nacional de Cotapata, La Paz, Bolivia, y otro que se ha considerado una nueva especie (Ruiz-García *et al.* 2017), proveniente del Volcán Galeras en Nariño, Colombia. Estos dos individuos presentan fenotipo de tigrillo, pero ADN mitocondrial de *L. geoffroyi*, lo cual es evidencia de hibridación entre estas dos especies. El cuarto clado con B= 79% y PP=0.87, corresponde a 2 tigrillos de Centroamérica analizados por Li *et al.* (2016) y obtenidos del GenBank. El quinto, formado por 2 tigrillos provenientes de Colombia y Ecuador (B=73%, PP=0.99). El sexto clado (B=63%, PP=0.95), con 2 secuencias de tigrillo analizadas en los trabajos de Jonhson & O'Brien (1997) y Li *et al.* (2016) y 2 secuencias de *L. colocolo* (*braccatus*) analizados por Li *et al.* (2016), todas obtenidas de GenBank. En este clado se evidencia también casos de hibridación entre dos especies, en este caso, tigrillo y *L. colocolo*. Un séptimo clado con B=67% y PP=0.56, conformado por 8 secuencias de tigrillos de Ecuador, Colombia, Bolivia y Argentina y 3 de *L. wiedii* y otras 6 de *L. pardalis*, donde se evidenciaría, por primera vez, hibridación entre tigrillos y margay-ocelotes.

El árbol bayesiano muestra también la inexistencia de monofilia entre los ejemplares con fenotipos de tigrillos, al igual que el árbol de máxima verosimilitud (Figuras 33 y 34).

Para el marcador mitocondrial ND5, los árboles de máxima verosimilitud (Figura 35) y bayesiano (Figura 36), se construyeron con un número menor de muestras de tigrillos que para el caso anterior, pero con un mayor número de secuencias bajadas del GenBank de los trabajos de Trigo *et al.* (2018, 2013) para *L. colocolo* y tigrillos del Brasil.

El clado más divergente (B=66%, PP= 0.98) contiene secuencias de tigrillos de Colombia, y Venezuela mezclados con secuencias de *L. wiedii* de Colombia y Ecuador y con secuencias de *L. pardalis* de Brasil, Colombia y Perú. Este marcador

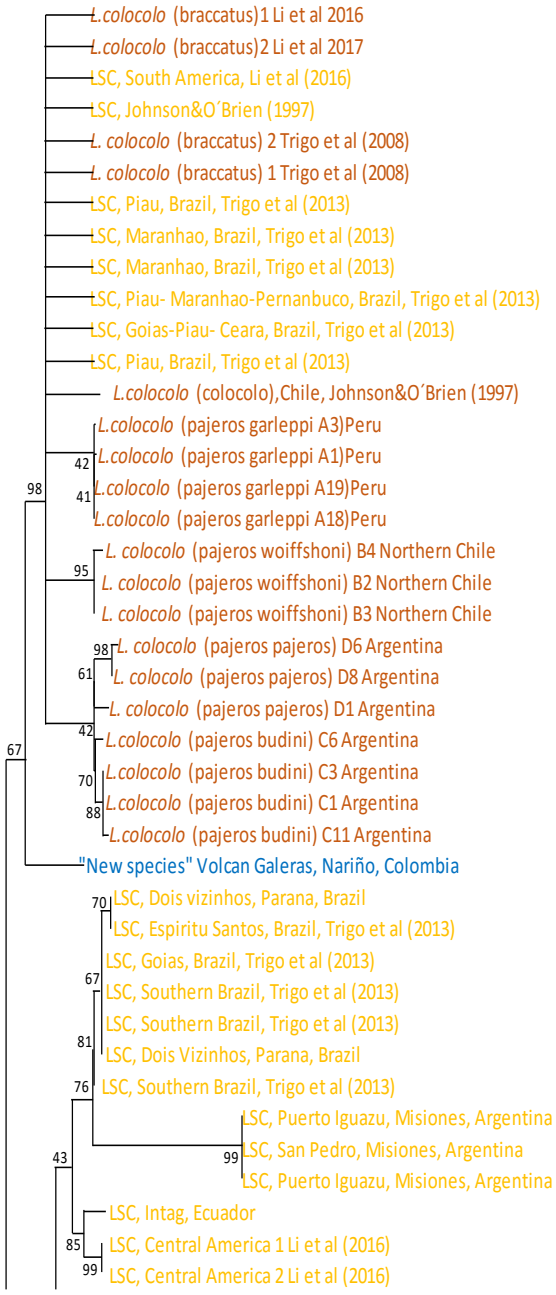


Figura 39. Árbol de máxima verosimilitud con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

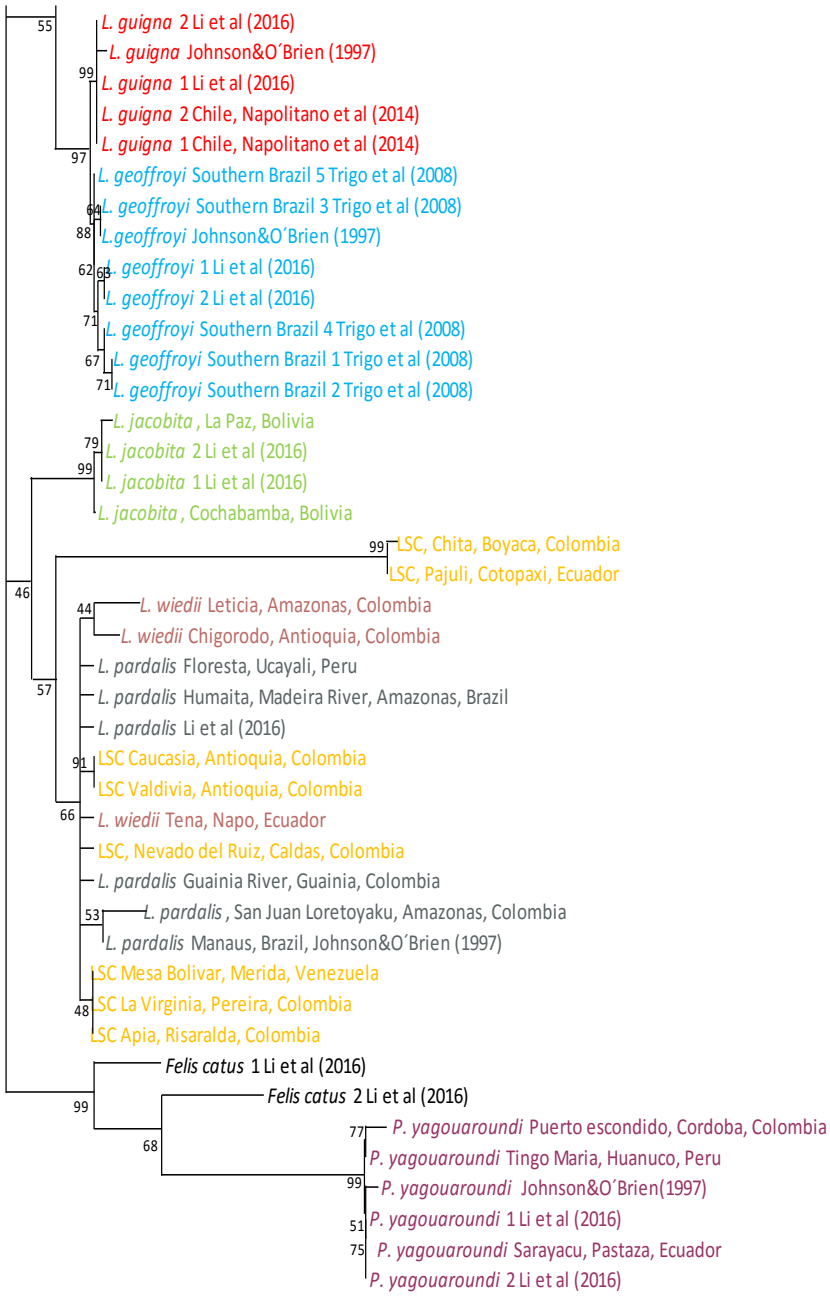


Figura 40. Árbol de máxima verosimilitud con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

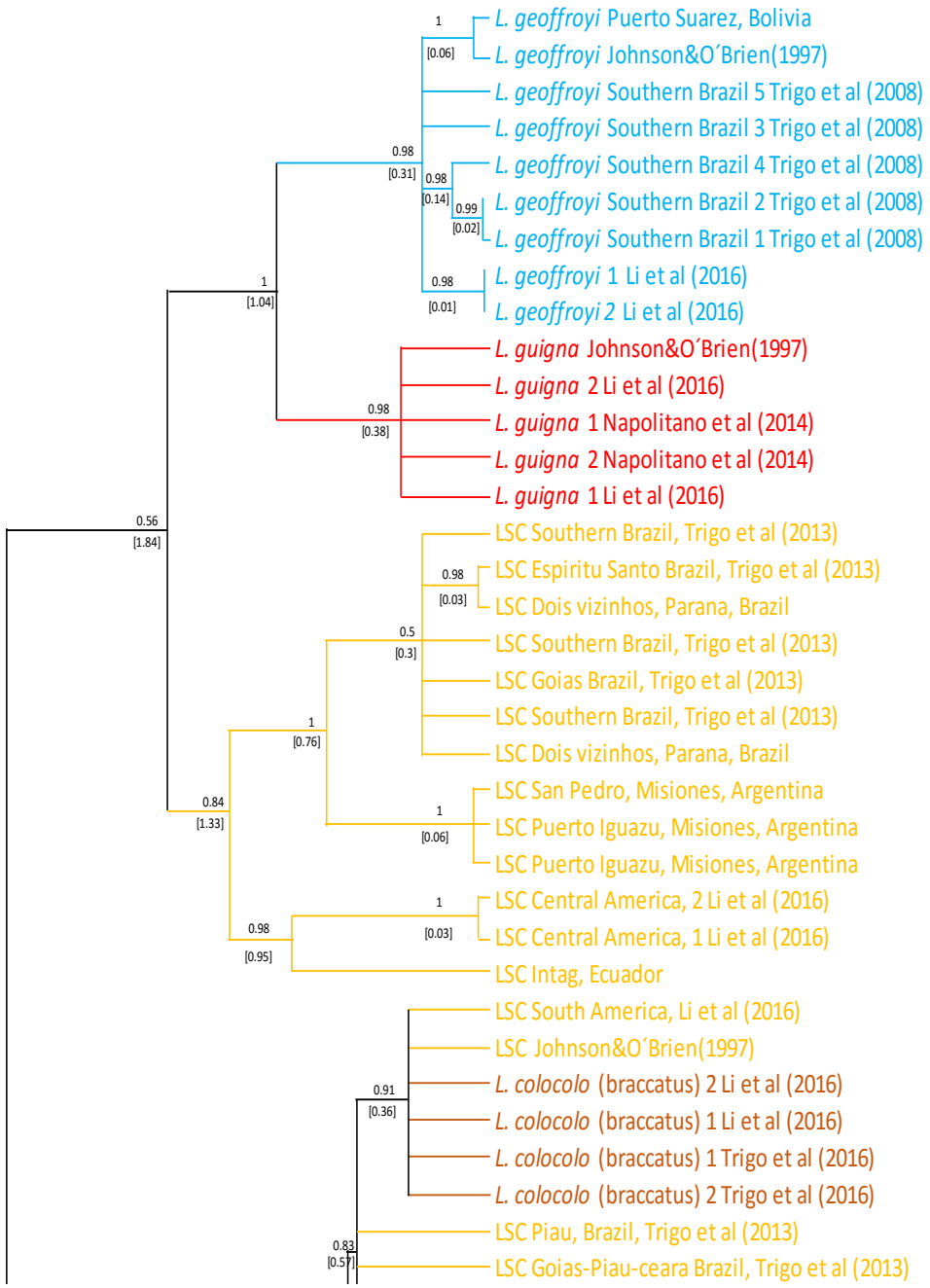


Figura 41. Árbol bayesiano con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

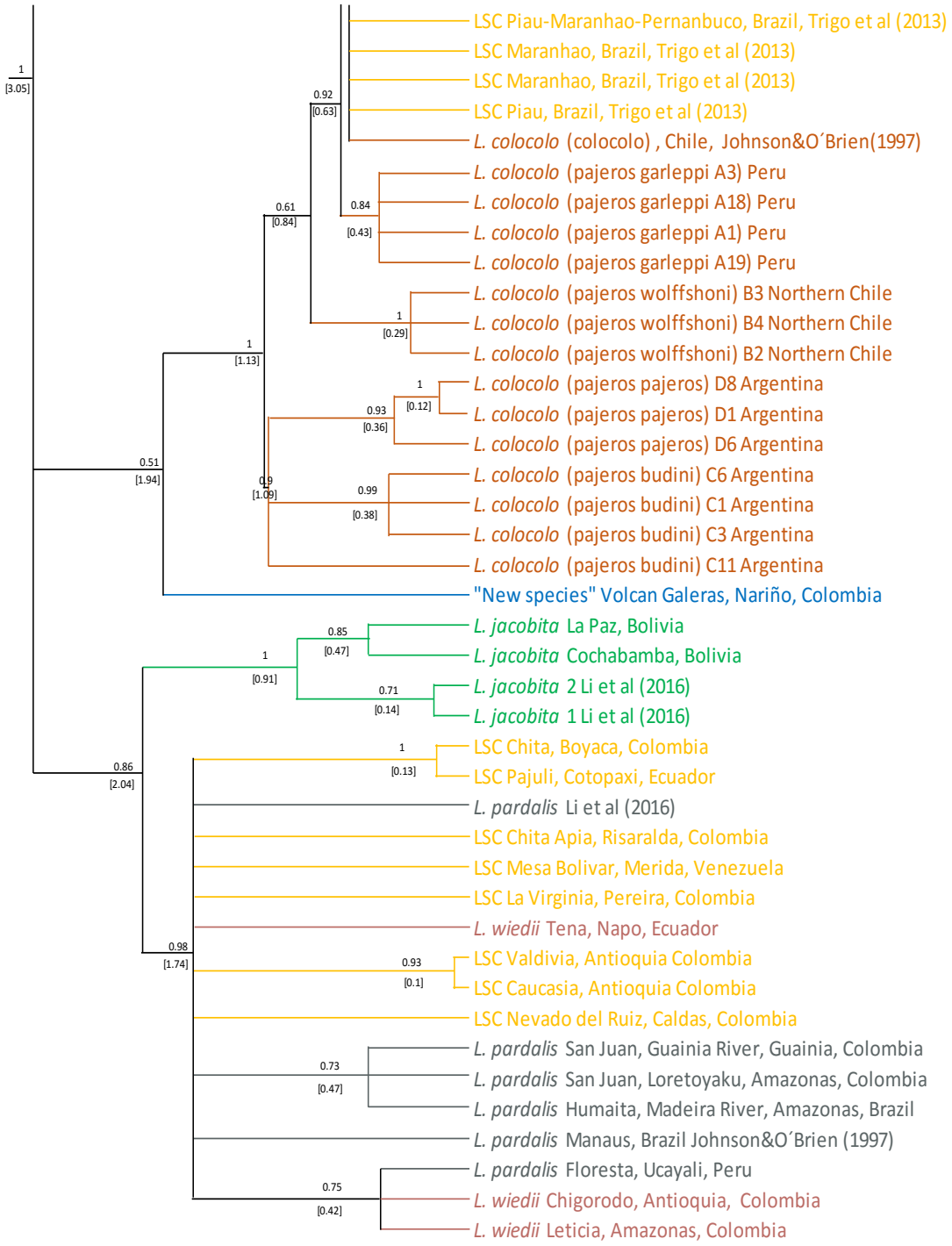


Figura 42. Árbol bayesiano con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos para el marcador mitocondrial ND5. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años (Continuación).

pone en evidencia la hibridación entre pequeños felinos manchados con aspecto de tigrillos y *L. pardalis* y *L. wiedii*. El siguiente clado está conformado por 2 tigrillos de Colombia y Ecuador (B=99%) y muy relacionado al clado anterior (B=57%), aunque en el árbol bayesiano, éste se encuentra en el mismo clado anterior con PP = 1. El clado de *L. jacobita* (B=99%) se encuentra relacionado con los clados descritos anteriormente con B=46% y PP= 1. Un cuarto clado (B=97%), está conformado por secuencias de *L. geoffroyi* (B=88%) y *L. guigna* (B=99%). Este clado corresponde al quinto clado en el árbol bayesiano con una PP=1, el cual se encuentra muy cercano al grupo (B=43%, PP=0.84) conformado por secuencias de felinos con aspecto de tigrillos de Centro América y de la zona trans-Andina del Ecuador (B=85%, PP=0.98) y el clado (B=76%, PP=0.5) del sur del Brasil y norte de Argentina (*L. guttulus*). El último gran clado (B=98%, PP=1) estuvo conformado por todos los ejemplares de *L. colocolo*, incluyendo los tigrillos del centro y norte de Brasil hibridizados con *L. colocolo*, específicamente con *L. colocolo braccatus* y *L. colocolo colocolo*; los morfotipos para las subespecies de *L. colocolo* se agruparon en cuatro subclados: *L. c. garleppi* (B=42%, PP=0.84), *L. c. woiffshoni* (B=95%, PP=1) y *L. c. budini* (B=70%, PP=0-99) y *L. c. pajeros* (B=61%, PP=0.93). La secuencia más divergente de este clado corresponde al nuevo morfotipo encontrado en Nariño Colombia (B=67%), pero a diferencia de los árboles de máxima verosimilitud y bayesiano realizados con secuencias de ATP8 y 16S no está relacionado con las secuencias de *L. geoffroyi*.

Para los datos de mitogenomas, en el árbol de máxima verosimilitud (Figura 37) se detectaron cinco haplogrupos conteniendo secuencias de felinos con aspecto de tigrillos. El clado más divergente (B=100%), conformado por secuencias del noreste de Argentina – Misiones (B=100%) y Sureste de Brasil (B=100%). El segundo haplogrupo con secuencias de Colombia y Ecuador (B=100%). El tercer haplogrupo conformado por tigrillos centroamericanos y de la zona transandina ecuatoriana (B=85%) muy relacionado al clado *L. geoffroyi – L. guigna* (B=100%). El nuevo morfotipo detectado en Nariño (Colombia) estuvo más relacionado al haplogrupo

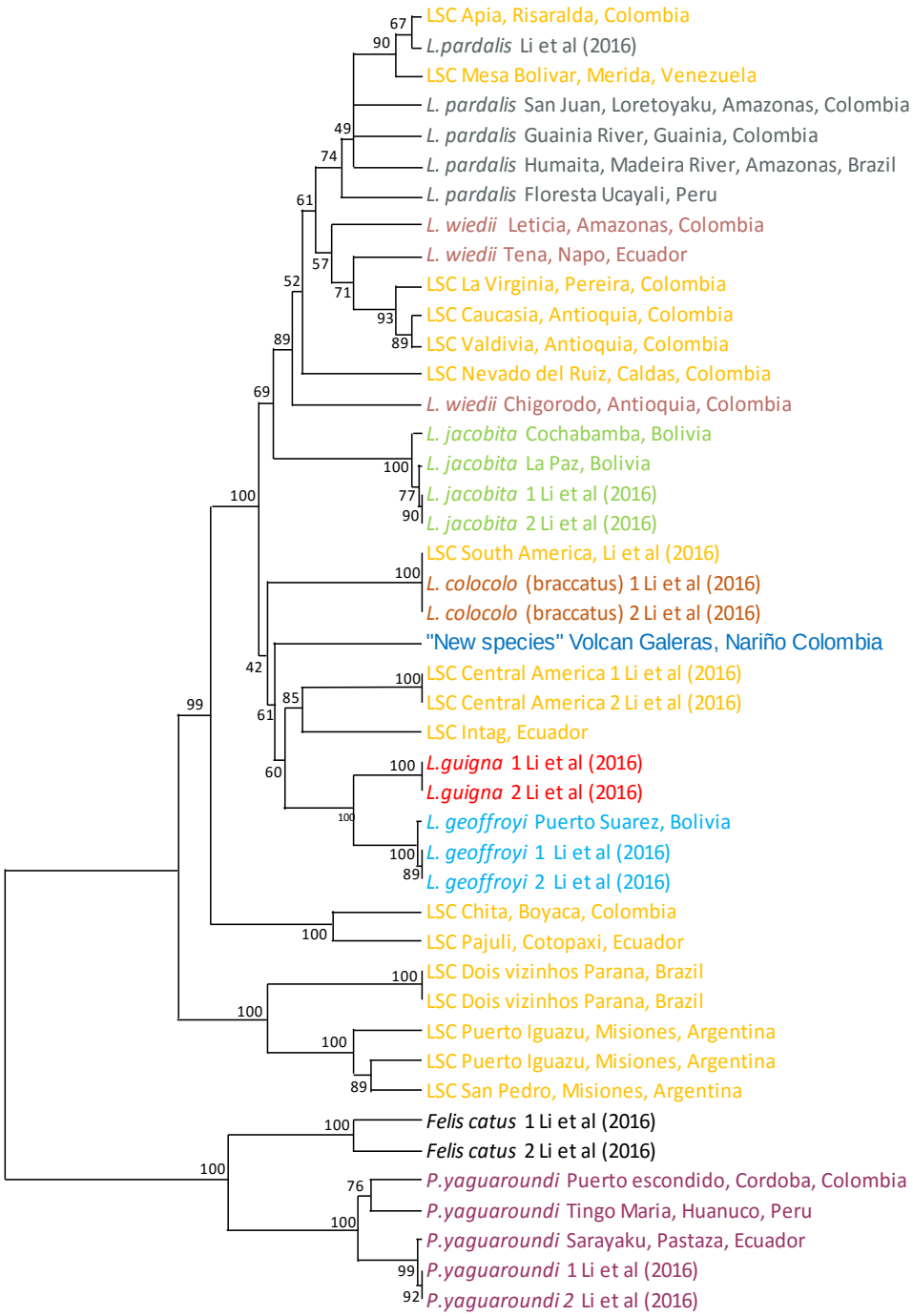


Figura 43. Árbol de máxima verosimilitud con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos mediante el análisis de mitogenomas completos. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestran con cifras en los nodos.

anterior (B=61%). El cuarto haplogrupo presenta una secuencia de tigrillo con el mitogenoma de *L. colocolo braccatus* (evidencia de hibridación) y el quinto haplogrupo con mitogenomas de tigrillos de Colombia mezclados (hibridados) con *L. pardalis* y *L. wiedii* (B=89%).

El árbol bayesiano, para el mismo grupo de datos (Figura 38) presentó diferencias significativas: el primer clado con PP = 0.98, constituido por mitogenomas de tigrillo mezclados con mitogenomas de *L. pardalis* y *L. wiedii*. El segundo haplogrupo de *L. colocolo* (*braccatus*) con un individuo que fenotípicamente fue un tigrillo, pero con mitogenoma de *L. colocolo braccatus*. El tercer haplogrupo conformado por mitogenomas de tigrillos centroamericanos y de la zona trans-Andina de Ecuador (PP=0.68), que se encuentra muy relacionado al cuarto haplogrupo de mitogenomas correspondiente a *L. guttulus* (PP=0.67). Finalmente, y más relacionado con el haplogrupo anterior, el nuevo morfotipo detectado en Nariño (Colombia). Es importante resaltar que el haplogrupo conformado por Cotopaxi (Ecuador) y Chita (Boyacá, Colombia), aunque fue monofilético (PP=1) se localizó dentro del primer clado, es decir entre las secuencias de los tigrillos que hibridaron con *L. pardalis* y *L. wiedii*.

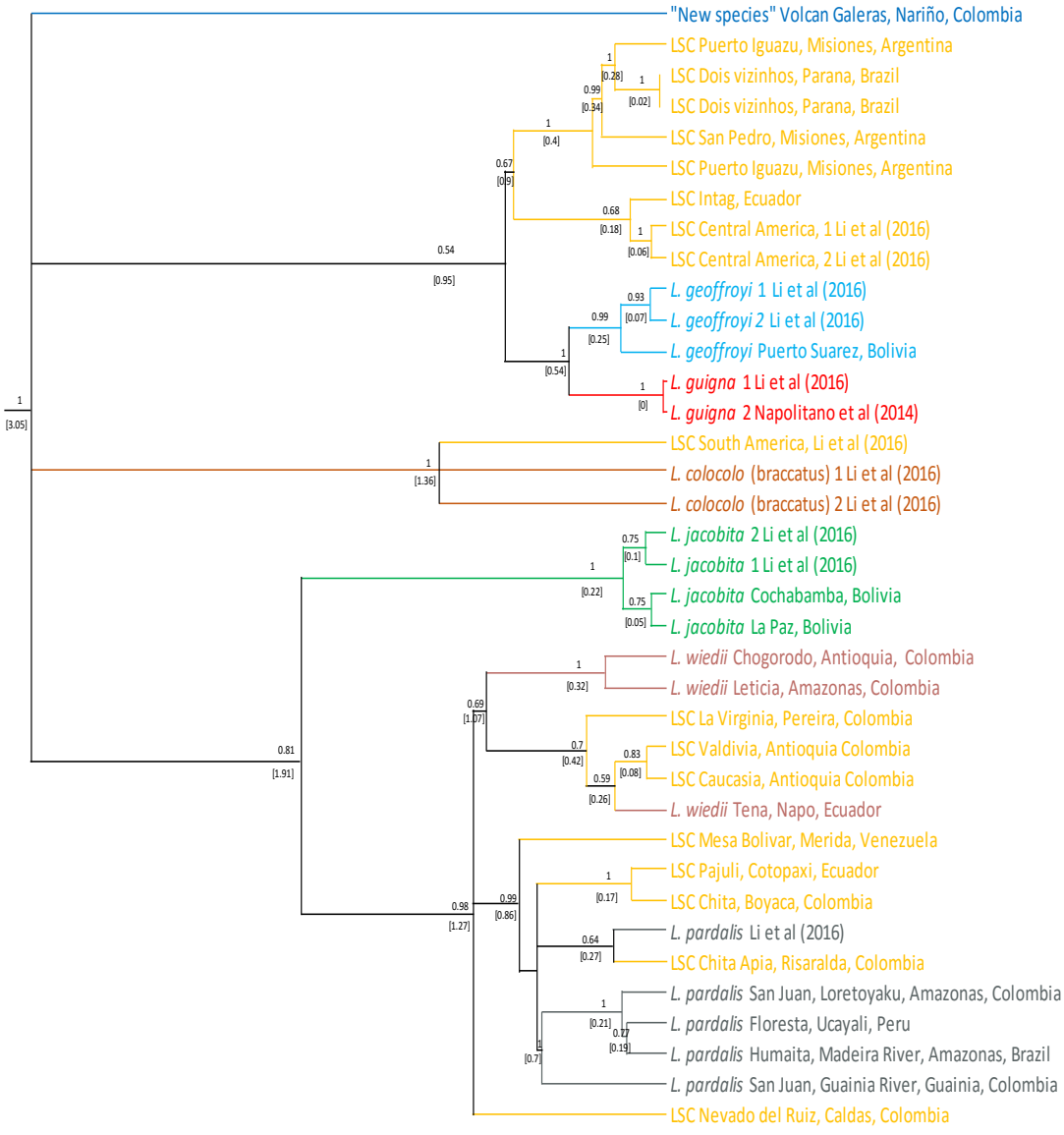


Figura 44. Árbol bayesiano con felinos manchados pequeños con aspecto de tigrillos mediante el análisis de mitogenomas completos. En los nodos, valor superior: probabilidad posterior; valor inferior: tiempo de divergencia en millones de años.

3.5. REDES DE HAPLOTIPOS

3.5.1. Jaguar, *Panthera onca.*

Tres genes mitocondriales

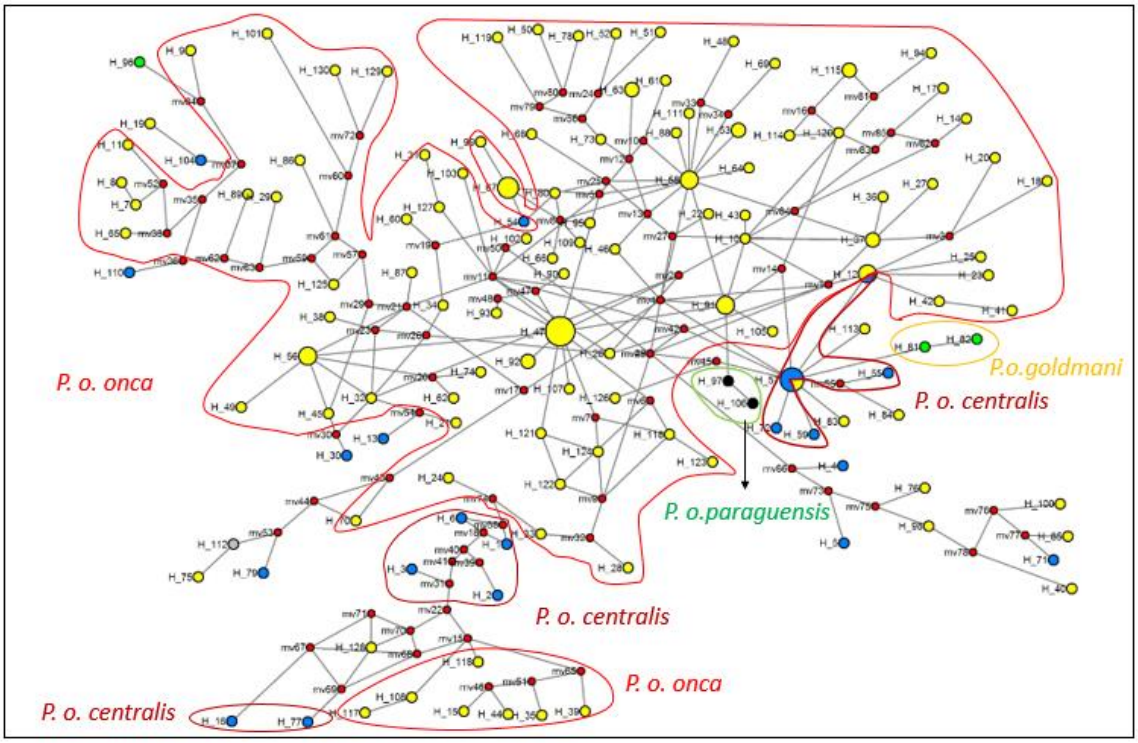


Figura 45. Red de haplotipos de *Panthera onca* mediante tres genes mitocondriales. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

De 157 secuencias se obtuvieron 130 haplotipos, los cuales de agruparon en siete haplogrupos: *P. o. onca* (2 claros haplogrupos polifiléticos, aunque existen más haplotipos polifiléticos), *P. o. centralis* (3 claros haplogrupos polifiléticos), *P. o. paraguensis* (1) y *P. o. goldmani* (1). La red presenta una figura de estrella lo cual evidencia una expansión poblacional. Los haplotipos 47 y 67 son los que tuvieron mayor número de secuencias, 8 (Bolivia y Perú – *P. o. onca*), y 4 (Colombia y Bolivia - *P. o. onca*), respectivamente. Los haplotipos 57 y 12, presentan haplotipos

compartidos: Haplotipo 57 (1 Colombia – *P. o. onca* y 4 Costa Rica y Colombia – *P. o. centralis*) y Haplotipo 12 (1 Colombia - *P. o. centralis* y 2 Perú – Colombia de *P. o. onca*), lo cual pone de manifiesto que no existe una clara separación entre esas dos posibles subespecies morfológicas (*onca* y centralis).

Mitogenoma

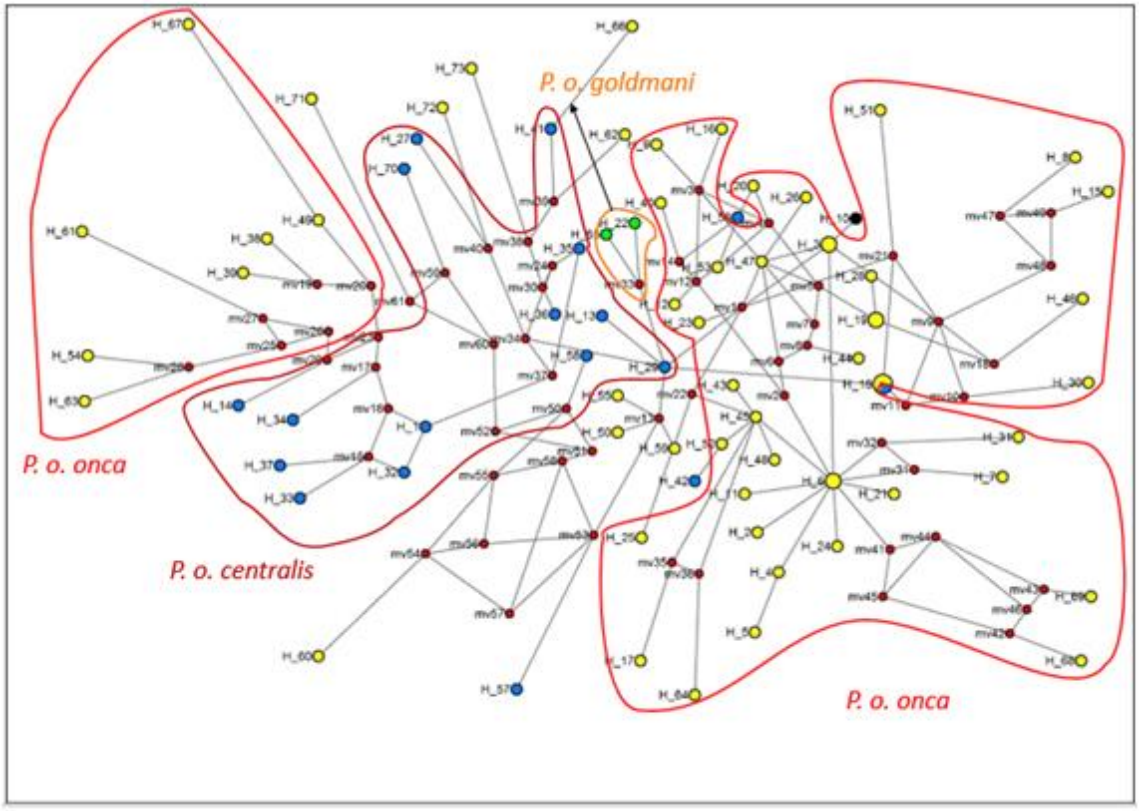


Figura 46. Red de haplotipos de *Panthera onca* mediante mitogenomas. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Para los mitogenomas de 78 individuos, se presentaron 73 haplotipos agrupados en 2 haplogrupos para *P. o. onca*, 1 para *P. o. centralis* y 1 para *P. o. goldmani*. De *P. o. paraguensis* se obtuvo solo el mitogenoma de un individuo: H10. Los haplotipos que agruparon más secuencias fueron H6 (2 secuencias de Perú), H18 (2 de

Colombia – *P. o. onca* y *P. o. centralis* y 1 de Perú – *P. o. onca*) y H19 (2 de Colombia). Es en el haplotipo 18 en donde se comparten secuencias de *P. o. onca* y *P. o. centralis*. En la red no es claro un comportamiento de expansión poblacional como en el caso de los tres genes y no se presenta una estructura para subespecies morfológicas, pues se encuentran varios haplotipos entremezclados y aunque están agrupados, no conforman haplogrupos únicos.

3.5.2. Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*.

Tres genes mitocondriales

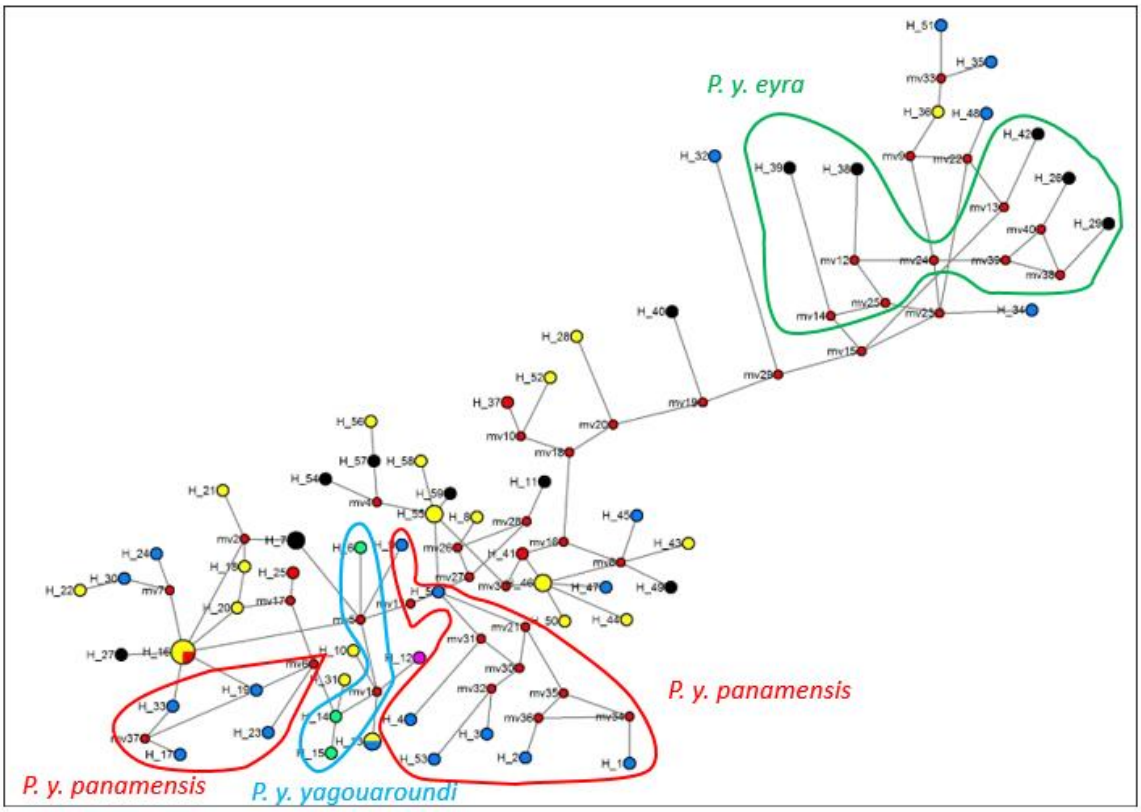


Figura 47. Red de haplotipos de *Puma yagouaroundi* mediante tres genes mitocondriales. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Para los tres genes mitocondriales se obtuvieron 66 secuencias repartidas en 59 haplotipos. El haplotipo 16 fue el que albergó más secuencias (4 secuencias, 3 de *P. y. melantho* – Perú y 1 de *P. y. ameghinoi*). Se dieron agrupaciones de secuencias de las subespecies morfológicas *P. y. panamensis* (2), *P. y. eyra* (1) y *P. y. yagouaroundi* (1). Esta última agrupación fue más compacta que las demás, es decir, todas sus secuencias estuvieron contenidas en este haplogrupo. Otra fue la situación de las secuencias de *P. y. melantho* y *P. y. ameghinoi*, las cuales se mostraron dispersas a través de la red.

Mitogenoma

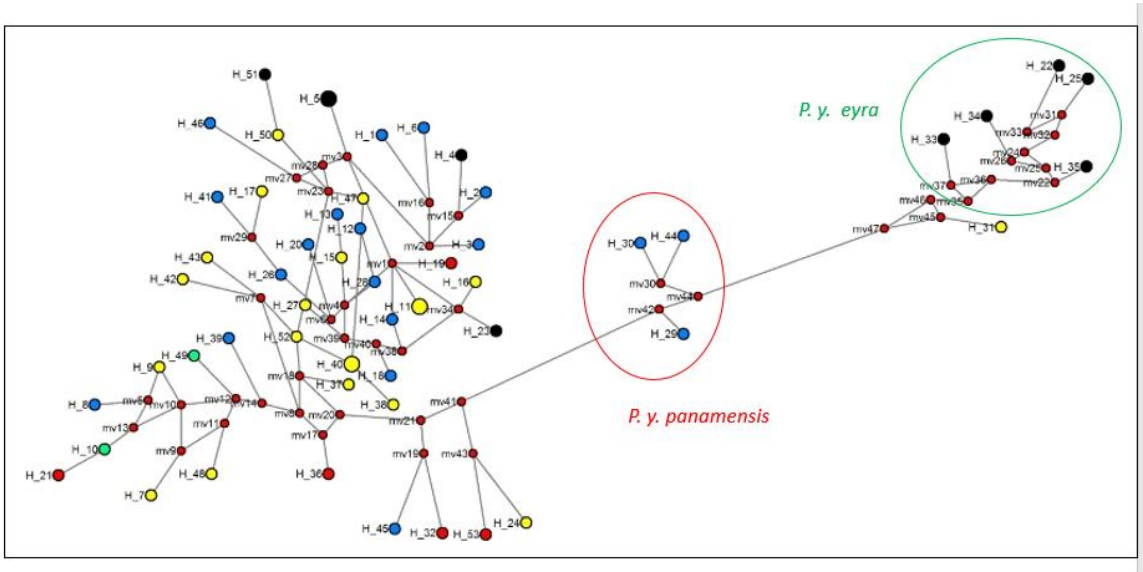


Figura 48. Red de haplotipos de *Puma yagouaroundi* mediante mitogenomas. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Se obtuvo el mitogenoma de 56 individuos los cuales formaron 53 haplotipos. Se formaron dos haplogrupos, uno para *P. y. eyra* (Chaco paraguayo y argentino) y otro para *P. y. panamensis* (Cesar – Colombia), pero sin contener la totalidad de las secuencias analizadas para cada subespecie morfológica. Los mitogenomas de *P.*

y. yagouaroundi, *P. y. melantho* y *P. y. ameghinoi* no se agruparon y se distribuyeron y entremezclaron entre sí por toda la red.

3.5.3. Ocelote, *Leopardus pardalis*.

Tres genes mitocondriales

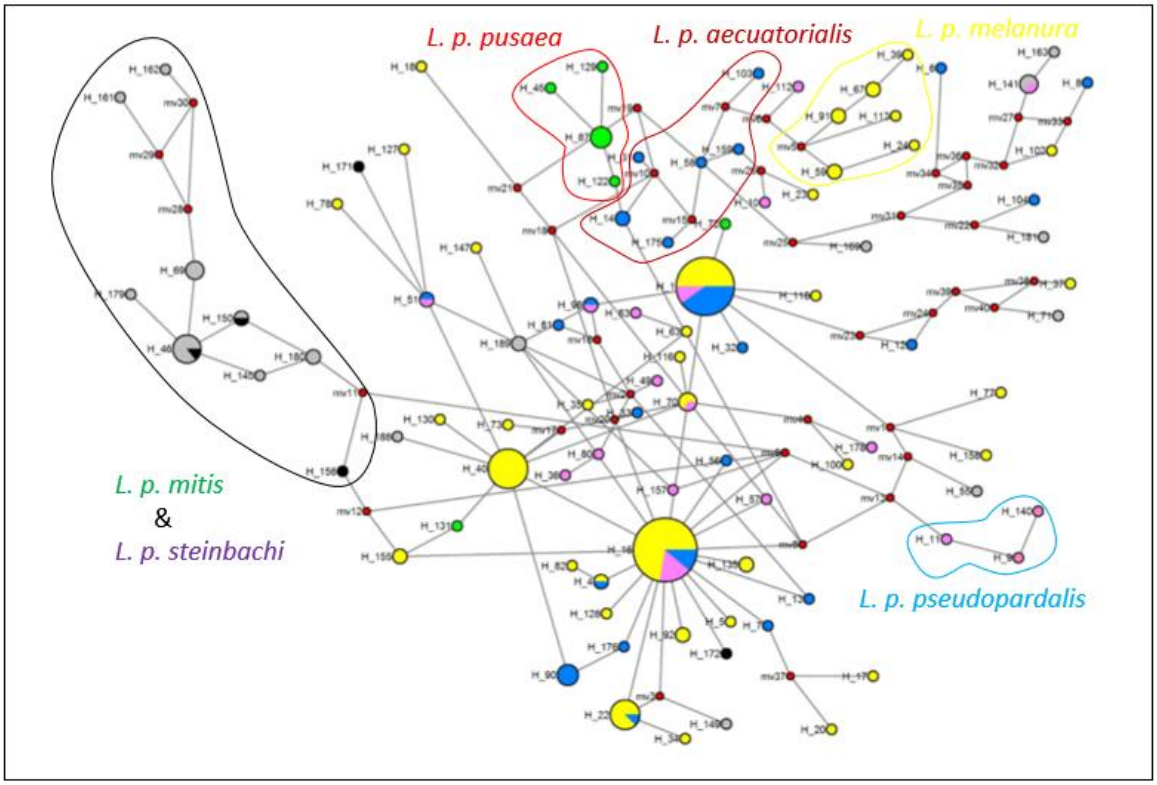


Figura 49. Red de haplotipos de *Leopardus pardalis* mediante tres genes mitocondriales. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Para este caso, se contó con 309 secuencias, las cuales formaron 191 haplotipos. Los haplotipos 1, 16, 40, 46 y 22 agruparon un mayor número de secuencias: 30, 36, 14, 7 y 8, respectivamente. El haplotipo 1 presentó 30 secuencias compartidas entre *L. p. aequatorialis* (11 de Colombia), 15 de *L. p. melanura* (6 de Colombia, 6 de Perú y 3 de Ecuador) y *L. p. pseudopardalis* (2 de Colombia y 1 de Brasil). El

haplotipo 16 es el que presentó el mayor número de secuencias, las cuáles fueron también fueron compartidas entre *L. p. melanura* (16 de Perú, 7 de Colombia y 4 de Brasil), *L. p. pseudopardalis* (4 de Colombia y 2 de Brasil) y *L. p. aequatorialis* (3 de Colombia). El haplotipo 46 contiene secuencias de *L. p. mitis* (7- Bolivia) y un posible *L. p. steinbachi* muestreado en Bolivia (este individuo procedió de una zona geográfica donde, *a priori* ambas subespecies morfológicas convergen). Este haplotipo sería típico, entonces, de la subespecie morfológica, *L. p. mitis*. Los otros dos grandes haplotipos H40 – *L. p. melanura* (14 secuencias) y H46 – *L. p. mitis* no compartieron secuencias con las otras posibles subespecies morfológicas.

En general, la red presenta estructura debido a que se identifican grupos de secuencias que concuerdan con las probables subespecies morfológicas: *L. p. mitis*, *L. p. pusaea*, y algunos grupos bien consolidados al interior de *L. p. aequatorialis*, *L. p. melanura* y *L. p. pseudopardalis*. De igual manera, la red presenta una forma de estrella que concuerda con una probable expansión poblacional para esta especie.

Mitogenoma

En este caso se trabajó con 66 secuencias que formaron 53 haplotipos. No hubo haplotipos que agruparan un gran número de secuencias como tampoco hay evidencia de que compartan secuencias de diferentes subespecies. Los haplogrupos de *L. p. steinbachi*, *L. p. pseudopardalis*, *L. p. mitis* y *L. p. melanura* se encuentran compactos, es decir, sus secuencias se agrupan exhibiendo diferencias geográficas, mientras que *L. p. aequatorialis* presenta dos haplogrupos. Uno de ellos se encuentra altamente relacionado con secuencias de L. p. pusaea (que forma un grupo altamente compacto). Este resultado muestra que los individuos del pacífico ecuatoriano (*L. p. pusaea*) y los trasandinos de Colombia (*L. p. aequatorialis*) conforman un mismo grupo, por lo que sería más lógico asignarlos a una única subespecie.

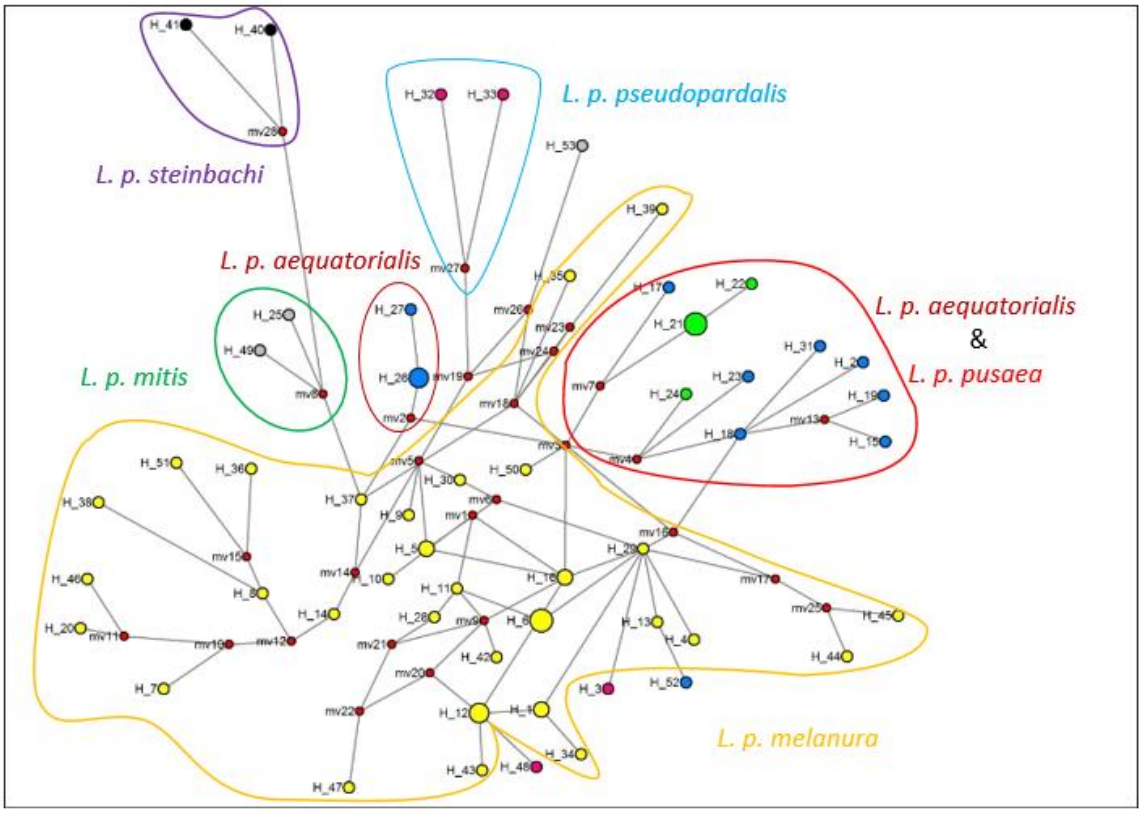


Figura 50. Red de haplotipos de *Leopardus pardalis* mediante mitogenomas. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

La mayor parte de los individuos pertenecen a *L. p. melanura*. *L. p. pseudopardalis* agrupa dos de sus cuatro haplotipos (H32 y H33 de la Guyana Francesa) mientras que los haplotipos H3 (Vichada- Colombia) y H48 (Meta – Colombia) están más relacionados con *L. p. melanura* que con la subespecie asignada *a priori*. En esta red se observa más estructura que en la correspondiente a tres genes.

3.5.4. Margay, *Leopardus wiedii*.

Tres genes mitocondriales

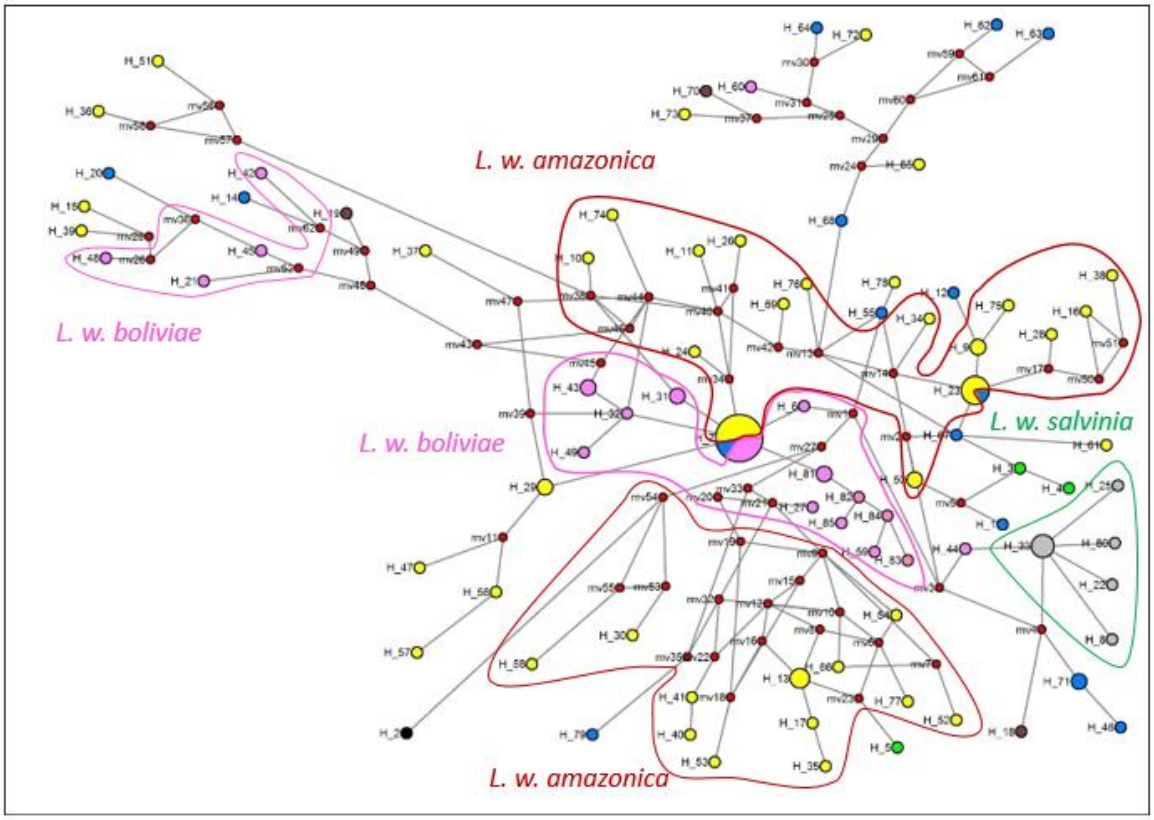


Figura 51. Red de haplotipos de *Leopardus wiedii* mediante tres genes mitocondriales. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Para el grupo de datos con tres genes mitocondriales se analizaron 118 secuencias que resultaron en 85 haplotipos, de los cuales el H7 agrupó 17 secuencias de tres subespecies morfológicas (9 secuencias de *L. w. amazonica*, 6 secuencias de *L. w. boliviae* y 2 secuencias de *L. w. pirrensis*).

Por su parte, el H23 agrupó 6 secuencias de dos subespecies morfológicas (5 secuencias de *L. w. amazonica* y 1 secuencias de *L. w. pirrensis*). Solamente *L. w.*

salvinia presentó un grupo compacto y coincidente con la subespecie morfológica correspondiente. *L. w. amazonica* presentó 2 grupos al igual que para *L. w. boliviae*. Las secuencias de *L. w. pirrensis* estuvieron dispersas por toda la red.

Mitogenoma

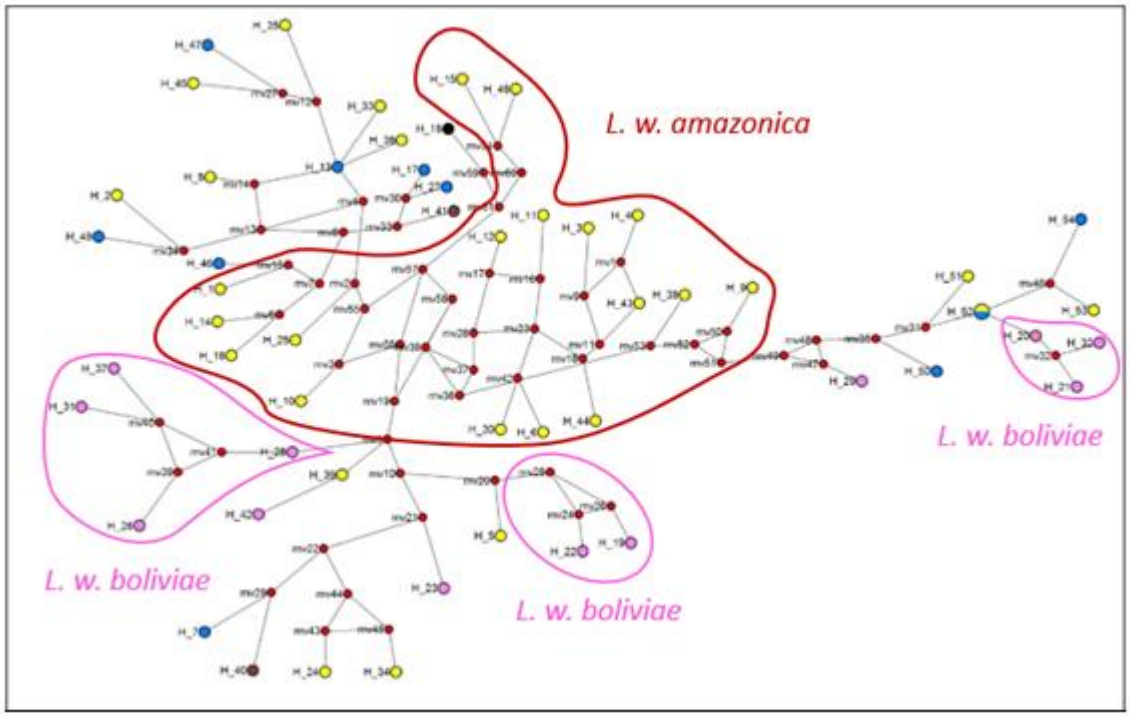


Figura 52. Red de haplotipos de *Leopardus wiedii* mediante mitogenomas. Las áreas delimitadas por líneas de colores representan los haplogrupos detectados para cada supuesta subespecie morfológica.

Se analizaron 55 mitogenomas, los cuales formaron 54 haplotipos. Solo el haplotipo 52 presentó 2 secuencias (1 de *L. w. pirrensis* y 1 de *L. w. amazonica*).

En cuanto a los haplogrupos, se conformaron uno grande con haplotipos de *L. w. amazonica* y tres en *L. w. boliviae*, en los que, aunque los ejemplares fueron muestreados básicamente en Bolivia, en la red se distribuyen alejados el uno del

otro, conformando tres clados bien diferenciados. No se dio ningún clado monofilético para *L. w. pirrensis* (azules).

3.5.5. Complejo de especies de tigrillos.

Marcadores mitocondriales ATP8-16S rRNA

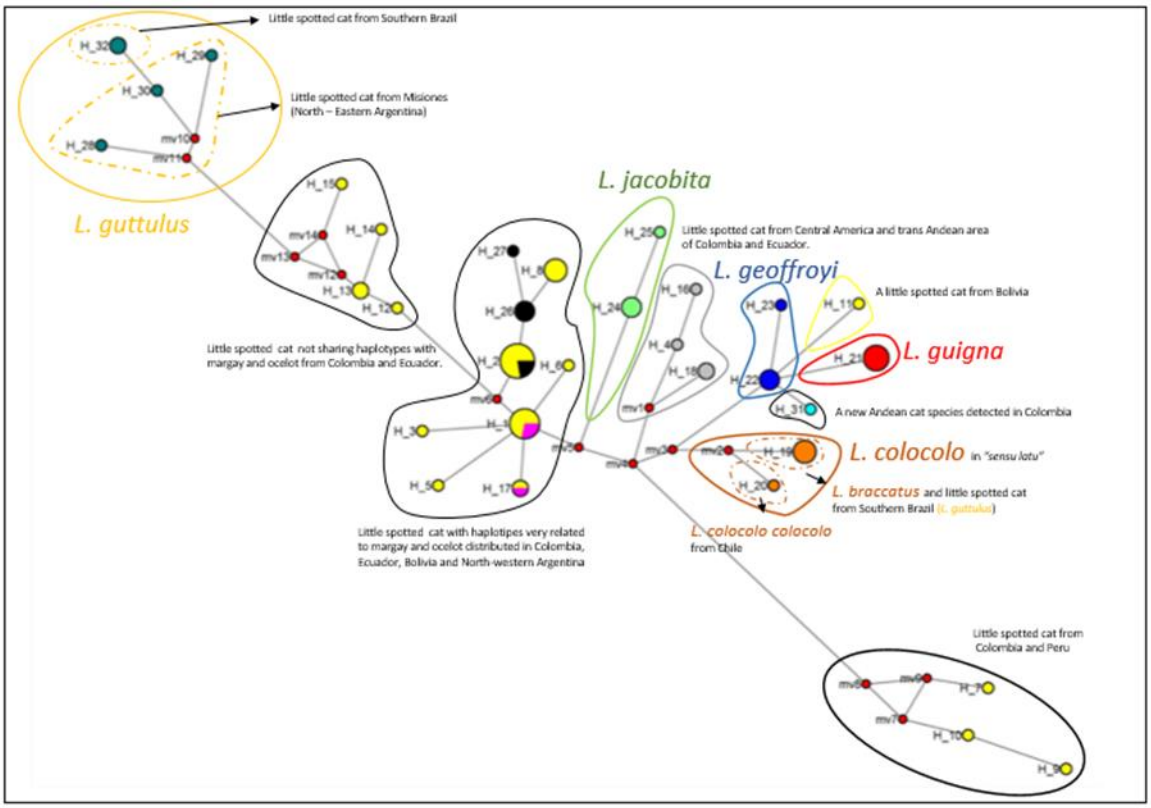


Figura 53. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con los genes mitocondriales ATP8 + 16S rRNA. Las líneas de colores delimitan haplogrupos.

Las secuencias conjuntas para los marcadores ATP8 y 16S rRNA (Figura 47), muestran 8 haplogrupos en lo que algunos de ellos contienen secuencias de especímenes con morfología de tigrillos sin hibridar con ninguna especie conocida de *Leopardus*, otros con tigrillos que muestran ADN mitocondrial de otras especies reconocidas del género *Leopardus* (híbridos) y otros haplogrupos que corresponden a las diferentes especies conocidas del género *Leopardus*. Iniciando en la parte

inferior derecha de la figura se observa un haplogrupo de tigrillos muestreados en Colombia y Perú (H7, H9 y H10), especialmente diferenciados de otros tigrillos analizados. El segundo haplogrupo aparecen tigrillos hibridados del centro de Brasil con la especie *L. colocolo* (H19 y H20). El tercer haplogrupo presentó individuos de *L. geoffroyi* (H23 y H22), un tigrillo muestreado en Bolivia (H11) con mitocondria de *L. geoffroyi*. Muy relacionado con estos haplotipos de *L. geoffroyi* está el haplotipo (H21) con secuencias de *L. guigna*. También, altamente relacionado con ellos está el haplotipo (H31) que corresponde al nuevo morfotipo muestreado en el sur de Colombia, muy relacionado también con *L. geoffroyi*. El haplogrupo cuarto está conformado por secuencias de tigrillos de Centroamérica y del área trans-andina de Colombia y Ecuador (H4, H16 y H18); el quinto haplogrupo corresponde a *L. jacobita* (H24 y H25). El sexto haplogrupo contiene las secuencias de tigrillos hibridados con el ADN mitocondrial de *L. wiedii* y *L. pardalis*. El séptimo haplogrupo presenta secuencias de tigrillos sin hibridar procedentes de Colombia y Ecuador (H12 – H15), pero muy diferenciadas del primer haplogrupo; finalmente el octavo haplogrupo está constituido con secuencias de tigrillos procedentes de Misiones – Argentina y del sur del Brasil que corresponden a la especie de tigrillo denominada actualmente *L. guttulus*.

Marcador mitocondrial ND5

Las secuencias de ND5 para el complejo de tigrillos formaron seis haplogrupos diferentes del total de nueve haplogrupos detectado en este análisis (Figura 48). El primero en la parte inferior derecha de la figura, está conformado por los haplotipos H48 y H4 de tigrillos muestreados en Colombia y Ecuador. El segundo haplogrupo de tigrillos, conformado por los haplotipos de tigrillos que hibridan con *L. pardalis* y *L. wiedii*; a continuación, se observa los haplogrupos de *L. jacobita*, *L. geoffroyi*, y *L. guigna*. El tercer haplogrupo de tigrillos está conformado por los haplotipos (H6 y H11) de tigrillos centroamericanos y del pacífico ecuatoriano; el cuarto haplogrupo está compuesto de haplotipos de *L. guttulus* muestreados en Misiones (Argentina),

sur y centro de Brasil sin hibridación con *L. geoffroyi*. El quinto haplogrupo está constituido por el haplotipo H19 correspondiente al nuevo morfotipo de felino procedente de Nariño (Colombia), que en este caso está más relacionado al haplogrupo de *L. colocolo* y finalmente el haplogrupo sexto con los tigrillos del norte y centro de Brasil (H50 y H51) que comparten haplotipos con *L. colocolo*.

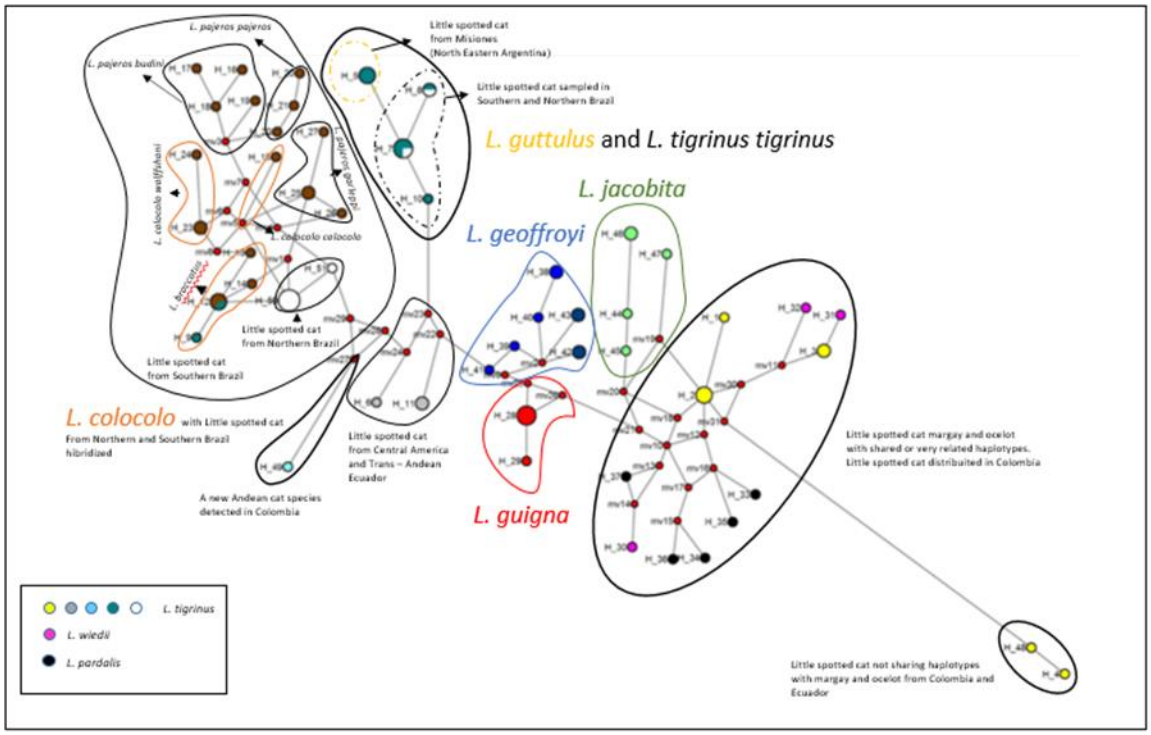


Figura 54. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con el marcador ND5. Las líneas de colores delimitan haplogrupos.

Mitogenoma

En la red de haplotipos construido con los mitogenomas (Figura 49), se observaron cinco haplogrupos de tigrillos: el primero está constituido por los haplotipos del sureste de Brasil y los haplotipos 8 – 10 de Misiones (Argentina) que constituyen el grupo de los tigrillos de la especie, *L. guttulus*. El segundo haplogrupo de tigrillos está conformado con haplotipos centroamericanos (H12) y del área transandina de

Ecuador (H11). Altamente relacionados con ellos los haplogrupos de *L. geoffroyi* y *L. guigna*. El tercer haplogrupo está conformado con el nuevo morfotipo detectado en Nariño (Colombia). El cuarto haplogrupo está conformado por los tigrillos hibridados con *L. pardalis* y *L. wiedii*; el quinto haplogrupo de tigrillos está conformados con los haplotipos 28 y 7 procedentes de Colombia y Ecuador y, finalmente, el sexto haplogrupo presenta un tigrillo del centro de Brasil hibridado con *L. colocolo braccatus*. Finalmente, está el haplogrupo de *L. jacobita*.

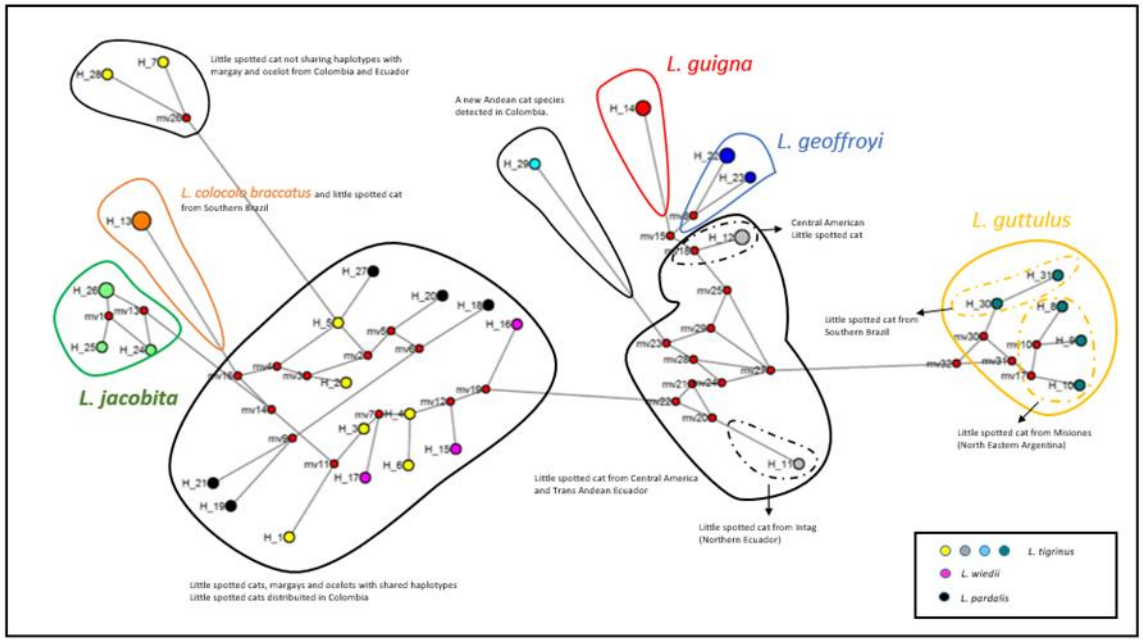


Figura 55. Red de haplotipos para el complejo de especies de tigrillos con mitogenomas. Las líneas de colores delimitan haplogrupos.

Los tiempos de divergencia entre los diferentes haplogrupos de tigrillos y las demás especies del género *Leopardus*, se estimaron mediante procedimientos bayesianos (árboles) y mediante el valor del estadístico ρ entre los haplotipos principales de cada haplogrupo encontrado en las redes de haplotipos (Tabla 8). En este caso, a diferencia del de las otras cuatro especies, el estadístico ρ de las redes MJN, es un buen procedimiento para calcular estimaciones de divisiones temporales porque la

Tabla 8. Tiempos de divergencia entre diferentes haplogrupos de tigrillos y otros taxones y especies del género *Leopardus*. Los valores se expresan en millones de años (MA).

Relaciones entre agrupaciones	Bayesiano (ATP8 y 16S)	Bayesiano (ND5)	Bayesiano (Mitogenoma)	Red de haplotipos (ATP8 y 16S)	Red de haplotipos (ND5)	Red de haplotipos (Mitogenoma)
Diversificación inicial dentro de *Leopardus*	3.06 ± 0.11	3.02 ± 0.10	3.05 ± 0.03	3.53 ± 0.09	3.77 ± 0.22	3.91 ± 0.02
Diferenciación entre el haplogrupo de tigrillos Colombianos y peruanos sin hibridar con *L. pardalis* y *L. wiedii*	1.96 ± 0.06	-	-	2.12 ± 0.37	-	-
Diferenciación de *L. guttulus* (Noreste de Argentina - Sureste de Brasil del haplogrupo mas cercano	2.15 ± 0.08	1.53 ± 0.09	0.90 ± 0.03	0.93 ± 0.13	1.73 ±0.31	2.85 ±0.01
Dentro de *L. guttulus*	1.09 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.40 ± 0.01	1.23 ± 0.07	1.08 ± 0.04	2.52 ± 0.03
Diferenciación entre el haplogrupo de tigrillos de Colombia y Ecuador que no compartes halotipos con *L. pardalis* y *L. wiedii*	1.31 ± 0.09	-	-	0.67 ± 0.26	-	-
Diferenciación de *L. jacobita* de otros taxa	1.75 ± 0.11	2.04 ± 0.08	1.91 ± 0.02	1.98 ± 0.09	2.11 ± 0.09	2.34 ± 0.02
Dentro de *L. jacobita*	0.71 ± 0.13	0.91 ± 0.09	0.22 ± 0.01	-	-	-
Dentro de *L. colocolo*	1.28 ± 0.08	1.13 ± 0.06	1.36 ± 0.01	-	-	-
Entre *L. c. braccatus* y un híbrido de tigrillo	0.63 ± 0.09	0.31 ± 0.06	0.09 ± 0.01	-	-	-
Entre los tigrillos centroamericanos y los trasandinos de Colombia y Ecuador y el grupo *L. geoffroyi* y *L. guigna*	1.48 ± 0.11	1.84 ± 0.09	0.95 ± 0.02	0.37 ± 0.06	2.77 ± 0.39	2.29 ± 0.19
Dentro del haplogrupo de los tigrillos centroamericanos y los trasandinos de Colombia y Ecuador	1.22 ± 0.06	0.95 ± 0.09	0.18 ± 0.01	0.35 ± 0.21	0.95 ± 0.15	1.65 ± 0.17
Dentro del haplogrupo de tigrillos centroamericanos	0.23 ± 0.07	0.13 ± 0.05	0.06 ± 0.01	-	-	-
Entre *L. geoffroyi* y *L. guigna*	0.63 ± 0.09	1.04 ± 0.12	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.30	0.31 ± 0.05	0.68 ± 0.13
Dentro de *L. geoffroyi*	0.34 ± 0.13	0.31 ± 0.07	0.25 ± 0.03	-	-	-
Dentro de *L. guigna*	0.62 ± 0.09	0.38 ± 0.04	-	-	-	-
Diferenciación del "nuevo gato pequeñodel Sur de Colombia " y el taxón más cercano.	0.52 ± 0.11	1.94 ± 0.10	1.09 ± 0.04	-	1.82 ± 0.22	1.33 ± 0.14
Diferenciación de los tigrillos de Colombia y Ecuador mezclados con *L. wiedii* y *L.pardalis* del taxón mas próximo.	1.61 ± 0.14	1.74 ± 0.12	1.27 ± 0.05	1.42 ± 0.11	1.17 ± 0.26	1.64 ± 0.09
Dentro de los tigrillos Colombianos y Ecuatorianos y los haplotipos de *L. wiedii*	0.03 ± 0.01	0.47 ± 0.05	0.26 ± 0.02	0.14 ± 0.06	-	-
Dentro de los togrillos Colombianos y Ecuatorianos y los haplotipos de *L. pardalis* .	0.06 ± 0.01	-	-	0.23 ± 0.15	-	-
Entre *L. c. braccatus* y los tigrillos hibridados del Norte del Brasil	-	0.57 ± 0.14	-	-	0.46 ± 0.27	
Dentro de los tigrillos del Norte del Brasil	-	0.46 ± 0.12	-	-	0.42 ± 0.09	-
Dentro de *L. c. budini*	-	0.56 ± 0.18	-	-	0.52 ± 0.29	-
Dentro de *L. c. pajeros*	-	0.36 ± 0.13	-	-	0.78 ± 0.36	-
Dentro de *L. c. wolffshoni*	-	0.29 ± 0.09	-	-	0.31 ± 0.18	-
Dentro de *L. c. garleppi*	-	0.43 ± 0.14	-	-	0.13 ± 0.09	-

diferenciación de haplogrupos es más notoria y diferencial que a nivel intraespecifico en jaguares, ocelotes, margays y jaguarundis.

Se determinó que la diversificación del género *Leopardus* se inició hace 3 a 4 millones de años. Al haplogrupo conformado por secuencias de tigrillos de Colombia y Perú sin trazas de hibridación con *L. pardalis* y *L. wiedii*, se estimó el inicio de su diversificación hace entre 2.12 a 1.96 MA (Grupo de datos mitocondriales ATP8 y 16S rRNA). Para la diferenciación del grupo de *L. guttulus* con el haplogrupo más cercano, los tiempos de divergencia variaron entre ellos ya fuera por el procedimiento o por el grupo de datos analizado. Se obtuvieron tiempos que oscilaban entre los 2.85 a 0.9 MA. El haplogrupo constituido por tigrillos de Colombia y Ecuador, que tampoco hibridaron con *L. pardalis* y *L. wiedii*, presentaron un tiempo de divergencia entre 1.31 a 0.67 MA respecto a los linajes más cercanos. La división temporal entre los tigrillos centroamericanos junto con los transandinos de Colombia y Ecuador y el clado *L. geoffroyi* y *L. guigna*, osciló entre los 2.77 – 0.37 MA. La división entre los tigrillos centroamericanos y los transandinos de Colombia y Ecuador osciló entre los 1.65 a 0.18 MA. La división temporal entre los tigrillos hibridados con *L. pardalis* y *L. wiedii* respecto al taxón más próximo fluctuó entre 1.74 y 1.17 MA. La nueva especie detectada en Nariño (Colombia) habría divergido entre 1.94 y 0.52 MA del taxón más próximo. Con el grupo de datos para ND5, se estimó el inicio de la diversificación entre los tigrillos del Noreste del Brasil entre 0.46 y 0.42 MA.

En cuanto a los otros taxones, o especies, los valores fueron muy similares a pesar de obtenerlos con diferentes procedimientos y grupos de datos. La separación de *L. jacobita* sucedió entre los 2.34 y 1.75 MA. La diversificación al interior de *L. colocolo* fue entre 1.36 y 1.13 MA. La divergencia entre *L. geoffroyi* y *L. guigna* se estableció entre 1.04 y 0.31 MA, mientras que la diversificación en el interior de *L. geoffroyi* fue estimada entre 0.34 y 0.25 MA.

4. DISCUSIÓN

La discusión de este trabajo se divide en cinco apartados. En los primeros cuatro, se discutirán los niveles de diversidad genética, cambios demográficos, estructura espacial y posible relación de los resultados filogeográficos moleculares con las supuestas subespecies morfológicas tradicionales tenidas en cuenta en el jaguar, ocelote, margay y jaguarundi. En el quinto y debido al sorprendente resultado obtenido de lo que se creía *a priori* que era una única especie, *L. tigrinus*, se ha optado por discutir la cuestión del complejo de especies de tigrillos como un apartado diferente de los anteriores.

4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

La primera idea que se obtiene al comparar las estimas de diversidad genética de las cuatro especies comentadas es que los felinos neotropicales se caracterizan por elevados, o muy elevados niveles de diversidad genética con respecto a otros grupos de mamíferos. Eso debe significar que existen procesos reproductivos y demográficos comunes que potencian elevados niveles de diversidad genética en los felinos en general (Ruiz-García, 1991) y, únicamente en casos de reducciones demográficas extremas o procesos de colonización en ambientes altamente desfavorables, podrían condicionar bajos niveles de diversidad genética en felinos (por ejemplo, el caso del guepardo, *Acinonyx jubatus*, (O´Brien *et al*. 1983, O´Brien *et al*. 1987, O´Brien 1994) o del gato andino, *L. pajeros* (Cossíos *et al.* 2012, Ruiz-García *et al.* 2013). Las estimas de diversidad genética obtenidas en este trabajo pueden ser comparadas con aquellas reportadas por otros autores para indagar si existe consistencia entre las mismas.

El caso del Jaguar

Para esta especie, se pueden hacer comparaciones directas con las estimas de diversidad haplotípica y nucleotídica con los trabajos de Eizirik *et al.* (2001) y Ruiz-García *et al.* (2013) quienes trabajaron con la región control mitocondrial y tres genes mitocondriales (ATP8, 16S rRNA y NAD5), respectivamente. Eizirik *et al.* 2001 analizaron 37 muestras que cubren gran parte del área de distribución del jaguar (desde México al sur del Brasil, pero procedentes en su mayoría de zoológicos con la incertidumbre que eso genera en cuanto al origen geográfico específico de los ejemplares analizados) con secuencias de la región control (715 pb). Esos autores obtuvieron valores medios de diversidad haplotípica (H_d = 0.739), pero bajos de diversidad nucleotídica (π = 0.00771), los cuales son muy bajos comparados con los encontrados en este trabajo para los dos grupos de datos analizados (H_d = 0.995, π = 0.035, 157 muestras, tres genes mitocondriales, y H_d = 0.998, π = 0.029, 78 muestras, mitogenómica). Ruiz-García *et al.* 2013, para el gen mitocondrial NAD5 y 37 jaguares, obtuvieron valores también elevados (H_d = 0.994, π = 0.0432) los cuales son similares a los encontrados en este trabajo. Una de las razones por las cuales los resultados de Eizirik *et al.* 2001 son más bajos en términos de diversidad haplotípica y nucleotídica que los obtenidos en este trabajo, podría obedecer a que en este trabajo se contó con un número mucho más amplio de muestras que cubrieron con mayor densidad gran parte del rango de distribución de la especie, además procedentes directamente de la naturaleza. Buena parte de las muestras analizadas aquí proceden de la amazonía colombiana, peruana y boliviana, región en la que se han encontrado los valores más elevados de diversidad genética (Ruiz-García *et al.* 2013). Contrariamente, el trabajo de Eizirik *et al.* (2001) únicamente incluyó tres muestras procedentes de Bolivia y una "posible" muestra de origen peruano, infravalorando ese estudio precisamente el área de Latinoamérica donde las poblaciones de jaguares poseen mayor diversidad genética. Otra razón es que el trabajo de esos autores incluyó básicamente animales de zoológicos. Es posible que las colecciones de jaguares en cautiverio posean únicamente una pequeña fracción de la variabilidad genética de las

poblaciones naturales de jaguares. Por ello es vital muestrear, en la medida de lo posible, organismos que procedan directamente de su medio natural.

Los valores elevados de diversidad genética en los jaguares no son un resultado exclusivo de genes mitocondriales. El jaguar también ha presentado valores elevados en términos de heterocigocidad (H) y riqueza alélica (nA) para marcadores nucleares como los microsatélites. Eizirik *et al.* (2001), con 29 microsatélites, obtuvieron valores de H = 0.711 y n_A = 6.79; Ruiz-García *et al.* (2003), con 18 microsatélites, obtuvieron valores para muestras de Colombia, Guatemala, Paraguay, Perú, Bolivia y Brasil de H = 0.84, n_A = 8.00. Ruiz-García *et al.* (2006), para las dos subespecies en Colombia (*P. o. onca* y *P. o. centralis*) con 62 muestras y 22 de otras subespecies con 12 microsatélites, obtuvieron un valor de H = 0.835 y de n_A = 11,330. Ruiz-García *et al.* 2013, con 12 microsatélites y 250 jaguares, obtuvieron valores de H = 0.87 y n_A = 14.456. Nuevamente, se evidencia que los trabajos de Ruiz-García *et al.* (2006, 2013) presentaron valores de diversidad genética más elevados comparados con los del trabajo de Eizirik *et al.* 2001, probablemente por la inclusión en los dos primeros trabajos de un mayor número de muestras y con mayor representación del rango de distribución de la especie.

En estudios de jaguares más locales, los valores también fueron elevados, pero más moderados. Ruiz-García (2001), con 5 microsatélites y 24 muestras de jaguares de Colombia, obtuvo valores de H = 0.76, n_A = 5.00. Moreno *et al.* 2006 con 39 de jaguares de zoológicos del Brasil y 4 microsatélites obtuvo valores de contenido de información polimórfica, PIC= 0.69 y n_A = 9.0. Eizirik *et al.* 2008, para 13 microsatélites y con 23 muestras de jaguares de la región del Pantanal en Brasil, obtuvieron valores de He = 0.717 y n_A = 5.83. Haag *et al.* 2010, para 50 muestras de jaguares del bosque atlántico de Paraná (Brasil), con 13 microsatélites, obtuvieron valores de He = 0.732 y n_A = 7.23. Wultsch *et al.* 2016, con 65 muestras de jaguares de la selva Maya (Belice, Guatemala y México) y 14 microsatélites, obtuvieron valores de He = 0.57 y n_A = 3.80.

Es evidente que los niveles de diversidad genética en regiones como El Pantanal en Brasil (Eizirik *et al.* 2008), bosque atlántico en Brasil (Haag *et al.* 2010) y la selva maya en Centroamérica (Wultsch *et al.* 2016), presentaron valores menores comparados con otros estudios locales realizados en otros países como Colombia, Perú y Bolivia. Coincidencialmente, corresponden a lugares donde la fragmentación del hábitat está muy avanzada por la presión de densidad humana. En el caso de Mesoamérica, las poblaciones de jaguar se han reducido a cerca de un tercio de su rango histórico y el 75% de las poblaciones remanentes han disminuido en número y se encuentran muy fragmentadas (Caso *et al.* 2008).

El caso del Jaguarundí.

Puma yagouaroundi, también presentó muy elevados niveles de diversidad genética (H_d = 0.995 y π = 0.047, tres genes, 66 secuencias; H_d = 0.998 y π = 0.066, 56 mitogenomas). Este es el primer trabajo, conjuntamente con el de Ruiz-García & Pinedo-Castro (2013) (con tres genes mitocondriales, ATP8,16S rRNA y NAD5), donde se ofrecen niveles de diversidad genética mitocondrial para el jaguarundi.

Otras estimas de variabilidad genética, en este caso, para marcadores nucleares (microsatélites) para *P. yagouaroundi* han sido publicadas en tres trabajos diferentes (Ruiz-García 2001, Moreno *et al.* 2006, Holbrook *et al.* 2013). Ruiz-García (2001) analizó 16 muestras, que podrían representar diversas subespecies (*P. y. panamensis*, *P. y. melantho*, *P. y. yagouaroundi* y *P. y. eyra*), mediante 5 microsatélites. Los valores de diversidad genética para todo el grupo de muestras fueron H = 0.616 y n_A = 4.6, valores que pueden considerarse moderados. Moreno *et al.* 2006 usaron 4 microsatélites y 36 muestras de jaguarundi de zoológicos en Brasil. El número de alelos promedio fue de n_A = 9. Holbrook *et al.* 2013, analizaron 11 jaguarundis (8 grises y 3 rojos) de la población de Tamaulipas - Rancho Los Ébanos (México) con 12 microsatélites. El valor promedio de H = 0.49 y n_A = 4.25. Estos bajos valores de diversidad genética nuclear para el jaguarundi del Norte de

México puede ser el resultado de la peripatría de esta población, al igual que se observó para la población de ocelotes en el norte de México y Texas (Walker *et al.* 1997, Janecka *et al.* 1997, Janecka *et al.* 2014).

El caso del Ocelote

Para *L. pardalis*, los valores de diversidad genética son similares a los de los jaguares (H_d = 0.974 y π = 0.030 para tres genes mitocondriales, 309 secuencias; H_d = 0.990 y π = 0.023 para mitogenómica y 66 especímenes analizados). Cabe resaltar que, para el conjunto de datos mitogenómicos, la diversidad nucleotídica fue la menor de las encontradas para las diferentes especies aquí abarcadas, aunque es un valor relativamente elevado.

El primer análisis molecular mitocondrial, y único a nivel global, con el ocelote (Eizirik *et al.* 1998), con la región control del ADN mitocondrial (423 pb) para 39 ocelotes, cubrió buena parte de la distribución geográfica de la especie: México (centro y sur), Guatemala, Nicaragua, Panamá, Venezuela, Trinidad, Guyana Francesa, Brasil (norte y sur del río Amazonas) y Bolivia. Para todas las secuencias estudiadas como un todo, los valores de diversidad genética fueron H_d = 0.962 y π = 0.068, siendo valores elevados (la diversidad nucleotídica incluso superiores a los aquí reportados). Por regiones, según las particiones filogenéticas encontradas, fueron encontradas como siguen: Sur de Sudamérica, H_d =0.895 y π = 0.022; Norte total de Sudamérica, H_d = 0.885 y π = 0.052; y Centroamérica, H_d = 0.952 y π = 0.020. El norte de Suramérica fue la región que presentó el mayor valor de diversidad nucleotídica. Los valores de diversidad haplotípica son más bajos que los encontrados para este trabajo, lo cual está sin duda relacionado con el menor tamaño muestral con respecto al aquí estudiado (casi 10 veces menor: 39 vs. 309 individuos analizados), y a diferencia de los valores de diversidad nucleotídica en el que prácticamente se duplica la cantidad aquí estimada. En este caso hay que tener en cuenta dos aspectos. El primero, el número de muestras analizadas por Eizirik *et al.* (1998) es bastante reducido, pero cubre regiones que en nuestro estudio no

se consideraron como México, Guatemala y Nicaragua (Centroamérica) cuya agrupación, en el mismo trabajo presentó características genéticas diferenciales. Esto podría, en conjunto, con los demás acervos genéticos aumentar el valor de π. El segundo tiene que ver con la tasa de sustitución de la región control. Es reconocido que esta región es la que presenta mayor tasa de mutación comparada con los demás genes, por lo cual, independientemente del número de muestras, podría presentar un mayor valor de diversidad nucleotídica.

Otros trabajos intentando abarcar la mayor parte del rango geográfico del ocelote, pero con marcadores nucleares (microsatélites) mostraron también elevados niveles de diversidad genética en esta especie. Ruiz-García *et al.* 2007 analizaron con 12 microsatélites muestras de 5 de las 10 subespecies morfológicas propuestas por Murray & Gadner (1997), cuya distribución abarca Costa Rica, Colombia, Venezuela, Brasil, Guyanas, Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay con un total de 133 muestras de ocelote. La diversidad genética en el conjunto global de las muestras fue H = 0.905 y n_A = 17.33, valores elevados que coinciden con los equivalentes mitocondriales para este estudio. Encontraron, además, que por subespecies morfológicas putativas también presentaron elevados valores de diversidad genética: *L. p. melanura* (H = 0.930), *L. p. aequatorialis* (H = 0.914), *L. p. pseudopardalis* (H = 0.868), *L. p. steinbachi* (H = 0.853) y *L. p. pusaea* (H = 0.941). Ruiz-García *et al.* (2012) realizaron un estudio craneométrico y molecular mediante 10 microsatélites. El número de muestras aumentó a 294 representando a 6 de las 10 subespecies morfológicas propuestas. Los valores de diversidad genética para cada probable subespecie considerada fueron: *L. p. aequatorialis* (H=0.904, n_A = 14.60), *L. p. melanura* (H=0.830, n_A = 5.50), *L. p. mitis* (H=0.501, n_A = 1.20), *L. p. steinbachi* (H=0.827, n_A = 4.30), *L. p. pardalis* (H=0.592, n_A = 1.64) y *L. p. pseudopardalis* (H = 0.897, n_A = 10.20). En este caso, *L. p. aequatorialis* y *L. p. pseudopardalis* presentaron los valores más altos de diversidad genética; en contraste, las probables subespecies *L. p. pardalis* y *L. p. mitis*, presentaron los valores menores de diversidad genética. Estas son las subespecies putativas que

se encuentran en los extremos del sur de la distribución considerada para esta especie. Este análisis también se realizó a nivel regional, emulando lo realizado por Eizirik *et al.* (1998). Los resultados fueron los siguientes en orden de mayor a menor valor de diversidad: Noroccidente de Suramérica (H = 0.906, n_A = 15.80), Nororiente de Suramérica (H = 0.868, n_A = 6.80), Sur de Suramérica (H = 0.858, n_A = 5.90) y Centroamérica (H = 0.815, n_A = 2.90). El noroccidente de Suramérica (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú) presentó el valor más elevado, seguido por el nororiente de Suramérica (Norte de Brasil y Guyanas). Comparando estos resultados con los de Eizirik *et al.* 1998, definitivamente es la región correspondiente al norte del río Amazonas la que presentó el valor más elevado de diversidad genética. En segundo lugar, está el sur de Suramérica, al sur del río Amazonas y el menor valor fue el de Centroamérica para ambos trabajos.

Desde un punto de vista más restrictivo geográficamente hablando, tres trabajos han analizado la diversidad genética de *L. pardalis*. Walker *et al.* 1997 encontraron con microsatélites que las poblaciones del sur de Texas, principalmente la de la Laguna Atascosa, presentaron menor heterocigocidad que la del norte de México, probablemente, por la fragmentación del hábitat para una de las subespecies más periféricas, *L. p. albescens* [una al norte de México-Tamaulipas (H = 0.698) y dos del sur de Texas, Willacy Country (H = 0.550) y Laguna Atascosa (H = 0.369)]. Janecka et al. (1997) secuenciaron la región control mitocondrial (1.179 pb) de esas tres poblaciones. Los valores más bajos corresponden de nuevo a las dos poblaciones texanas más periféricas (Texas: H_d = 0.33 y π = 0.00086; México: H_d = 1.00 y π = 0.00458). Cuando se utilizó la misma región, pero con un fragmento menor (410 pb), *L. p. albescens* (Tamaulipas-México + Texas) presentó un valor de π = 0.00434, menor a las regiones de Centroamérica (π = 0.03978), Norte de Suramérica (π = 0.03250) y Sur de Suramérica (π = 0.01457).

Janecka *et al.* 2014, con una porción de la región control (418 pb) y 11 microsatélites, examinaron 101 muestras norteamericanas que corresponderían a *L. p. albescens* para analizar la dinámica poblacional de los ocelotes de esa región

entre 1853 y 2005. Utilizaron 15 muestras de museo y 86 muestras contemporáneas. Para todas las muestras, los valores de diversidad genética fueron H = 0.426 y π = 0.00127, mientras que las muestras históricas, o de museo, presentaron valores superiores, H = 0.543 y π = 0.00146, con lo cual demostraron la disminución en la diversidad genética del ocelote en Norteamérica probablemente como consecuencia de la fragmentación del hábitat en el sur de los Estados Unidos. Un tercer trabajo (Wultsch *et al.* 2016) con 30 muestras de ocelotes centroamericanos (Belice, Guatemala y México-selva Maya), correspondiente putativamente a *L. p. pardalis*, con 14 microsatélites, mostró valores de He = 0.63 y n_A = 4.16. Por lo tanto, esta población mostró valores menores de diversidad genética que los obtenidos para las poblaciones suramericanas, pero bastante más elevados que los valores de las poblaciones del norte de México y Texas. Las poblaciones texanas exhibieron los valores más pequeños. Dentro de los Estados Unidos, Texas se considera el estado más poblado en los Estados Unidos después del estado de California, al igual que en su economía la cual está representada por grandes áreas de cultivos y ganadería, al igual que localidades de explotación petrolera. Estos disturbios antropocéntricos son la causa principal de la pérdida de diversidad genética (Janecka *et al.* 2014).

El caso del Margay

Al igual que en los casos anteriores, el margay se caracterizó por muy elevados niveles de diversidad genética (H_d = 0.976 y π = 0.035, tres genes y 118 secuencias; H_d = 0.999 y π = 0.073, 55 mitogenomas). El valor de π con mitogenómica es el más elevado que hemos encontrado para las especies de felinos analizadas, con excepción del complejo de especies de tigrillos.

Únicamente, un estudio previo había mostrado niveles de diversidad genética mitocondrial para el margay. Eizirik *et al.* 1998 analizaron 24 margays cubriendo la mayor parte de la distribución geográfica de la especie. Esos autores reportaron valores de diversidad genética para la región control de H_d = 0.985 y π = 0.183,

siendo este último valor uno de los más elevado encontrado en el seno de una única especie independientemente del taxón animal analizado. Por lo tanto, aquel trabajo, como el presente, reportan muy elevados niveles de diversidad genética en esta especie de felino. Esto puede interpretarse de dos maneras diferentes. En primer lugar, podría ser una consecuencia de que las tasas de evolución del ADN mitocondrial en el margay son más elevadas que en otras especies y/o, en segundo lugar, que en el interior de lo que se denomina margay pueda existir un complejo de especies simpátricas (y no dispuestas en diferentes regiones geográficas) muy similares morfológicamente y con una misma adaptación al medio arbóreo. Sin embargo, para sostener esta última hipótesis, sería necesario el análisis de un mayor número de muestras y de un mayor número de regiones geográficas, además de marcadores nucleares y de secuencias de los cromosomas X e Y.

Muy pocos trabajos han sido llevados a cabo con marcadores nucleares (microsatélites) para esta especie (Ruiz-García 2001, Grisolia *et al.* 2007). Esos trabajos también reportaron elevados niveles de diversidad genética. Ruiz-García (2001) analizó 12 muestras del amazonas colombiano (*L. w. amazonica*) y 2 de Bolivia (*L. w. boliviae*) mediante 5 microsatélites obteniendo valores de H = 0.846 y n_A = 5.5. Grisolia *et al.* 2007, mediante cuatro marcadores microsatélites, determinó la diversidad genética de 25 *L. wiedii* de diferentes zoológicos brasileños. Se estimó para este grupo de margays unos valores de H = 0.81 y n_A = 11, ratificando los elevados niveles de diversidad genética en esta especie independientemente del tipo de marcador molecular analizado.

En conclusión, para este apartado, todas las especies de felinos neotropicales estudiados se caracterizan por elevados niveles de diversidad genética, lo cual es importante desde una perspectiva conservacionista, aun cuando el rango de distribución de esas especies se haya reducido en los dos últimos siglos (Álvarez-Prada & Ruiz-García 2015). Para el jaguar y el ocelote, de los cuales ya existía una buena cantidad de trabajos que estimaron la diversidad genética de los mismos, se

confirmó lo ya reportado. Para el margay y el jaguarundi, de los cuáles prácticamente casi no existen trabajos al respecto, los resultados de diversidad genética aquí reportados son esenciales para el conocimiento de la biología y evolución de esas especies.

4.2. DIVISIONES TEMPORALES EN EL SENO DE LAS ESPECIES DE FELINOS ANALIZADAS Y CAMBIOS DEMOGRÁFICOS EN LAS MISMAS

El caso del jaguar

Los árboles bayesianos estimaron que la separación entre el ancestro de *P. onca* y *P. pardus-P. leo* se efectuó hace 2.8 millones de años (3 genes) y 1.7 millones de años (mitogenómica) y la diversificación de los linajes del jaguar se dio inicio alrededor de 1.3 MA (tres genes) y 1.2 (mitogenómica) hasta hace aproximadamente entre 70.000 años (tres genes) y 20.000 años (mitogenómica). Eizirik *et al.* 2001 empleando la región control mitocondrial estimaron que los orígenes de la mayor parte de los haplotipos actuales del jaguar se formaron hace entre 280.000 – 510.000 años (Intervalo de 137.000 – 830.000 años, 95% de confiabilidad). Ruiz García *et al.* 2013 estimaron tres diferentes periodos de intensa diversificación mitocondrial en los jaguares a partir del marcador NAD5 (500.000 - 600.000 años, 150.000 a 250.000 años y 10.000 a 55.000 años). Los resultados de este trabajo engloban perfectamente todos esos tiempos de diversificación mitocondrial. Igualmente, los eventos de expansión poblacional detectados en este trabajo, hace 150.000 años (tres genes) o 300.000 años (mitogenómica), coinciden perfectamente con el segundo y tercer periodo de diversificación mitocondrial propuesto por Ruiz- García *et al.* 2013 y se encuentra en el intervalo de confianza propuesto por Eizirik *et al.* 2001. Todos los periodos de diversificación mitocondrial, conjuntamente con los momentos de expansión poblacional en la historia evolutiva del jaguar se dieron durante el Pleistoceno. Esos tres periodos de diversificación detectados en Ruiz-García *et al.* (2013) pueden ser correlacionados con diversos eventos climatológicos pleistocénicos. El periodo de 500.000 a 600.000 años

coincide con la época más fría del periodo glacial Mindel-Kansas (Periodo Elster para Escandinavia, Bonaerense para Argentina y Kamasiense para África oriental; 0.3 a 0.6 MA). El segundo periodo de expansión para el jaguar, entre los 150.000 a 250.000 años, coincide con el periodo glacial Riss1 para Europa Central, periodo glacial Illinois para Norteamérica y glaciaciones Saale para las glaciaciones nórdicas y Kanjeriense para el África oriental. El tercer periodo entre los 55.000 y 10.000 años coincide con picos secos durante el cuarto periodo glacial. Un pico seco de aproximadamente de 33.500 a 26.500 años (Liu & Colinvaux, 1985), un pleniglacial superior entre 22.000 y 11.000 años junto a un periodo frio y seco (20.000-18.000) (Climap 1976, Brown 1982, Van der Hammen 1992) podría haber causado la segregación de la mayor parte de los haplotipos menos diferenciados. La teoría de los refugios pleistocénicos (Haffer 1969, Whitmore & Prance 1987, Haffer 1997), causada por los ciclos de Milankovich (cada 19.000-24.000, 43.000 o 90.000-100.000 años). La información molecular mostrada aquí revela que el registro fósil encontrado en Norteamérica, el cual data de hace aproximadamente 820.000 a 850.000 años, podría estar relacionado con los jaguares actuales, a diferencia de lo comentado por Eizirik *et al.* (2001) o Ruiz-García *et al.* (2013). Esos autores comentaron que esos jaguares fósiles norteamericanos podrían corresponder a una especie diferente a la actual (*Panthera augusta*). Sin embargo, los presentes resultados muestran que la diversificación mitocondrial del jaguar actual podría ser algo más antigua de lo estimado anteriormente y no necesariamente, los restos fósiles deberían pertenecer a una especie diferente a la actual. Otra hipótesis alternativa es que, si efectivamente lo fuera (mayor tamaño que la del jaguar actual), ambas especies pudieron co-existir, al menos, en el tiempo.

La red de haplotipos para tres genes, presentó una figura de estrella evidenciando adicionalmente también expansión poblacional. Los dos haplotipos principales situados en el centro de la red de haplotipos corresponden a secuencias provenientes de Bolivia, Perú y Colombia. Para el grupo de datos mitogenómicos, la red de haplotipos no es tan clara en cuanto a la forma de estrella (expansión

poblacional), pero los haplotipos que retienen mayor número de secuencias provienen de la amazonía peruana y colombiana. Esto indica que las secuencias más ancestrales encontradas en los jaguares actuales se encuentran en la Amazonía occidental (actualmente en Perú, Colombia y Bolivia), siendo esa el área a partir de donde se diversificaron los haplotipos mitocondriales de los jaguares actuales. Esto coincide con lo hipotetizado por Ruiz-García *et al.* (2013). Eizirik *et al.* (2001) también concluyeron que la forma de estrella de la red que obtuvieron, con ramas cortas era interpretable como un patrón de expansión poblacional reciente (Avise 2000). Sin embargo, la red de haplotipos de Eizirik *et al.* (2001) mostraría que la población ancestral de los jaguares actuales estaría centrada en el norte de Sudamérica a diferencia de lo determinado en este estudio y Ruiz-García *et al.* (2013). Muy probablemente la ausencia y /o escasez, de muestreo en la amazonía colombiana, peruana y boliviana por parte de Eizirik *et al.* (2001), no les permitió determinar con precisión cuál es el área geográfica original para la diversificación mitocondrial del actual jaguar. Esta información no es causa de sorpresa ya que la zona de la amazonía occidental ya ha sido reportada como fuente de diversidad en diferentes especies de mamíferos neotropicales, tales como en *Saimiri* (Lavergne *et al.* 2010), *Lagothrix* (Ruiz-García & Pinedo-Castro 2010, Ruiz-García *et al.* 2014); *Aotus* (Ruiz-García *et al.* 2011), *Cebus* (Ruiz-García *et al.* 2016) y *Tapirus* (Thoisy *et al.* 2010, Ruiz-García *et al.* 2012, Ruiz-García *et al.* 2015a & 2015b).

El caso del jaguarundi

En el caso del jaguarundí, el proceso de separación con el ancestro del puma y el inicio de diversificación en el seno del jaguarundí parece algo más antiguo que para los otros felinos estudiados. Mientras que, en el caso del jaguar y de todas las especies del género *Leopardus* prácticamente todos los procesos de división se dieron durante el Pleistoceno, para jaguarundí los procesos de divergencia claramente se inician durante el Plioceno medio y finales del Plioceno. En el presente estudio, se estimó que los ancestros de *P. y. yagouaroundi* y de *P.*

concolor se dio alrededor de 3.9 millones de años. Ruiz-García & Pinedo-Castro (2013) estimaron este proceso hace 4.14 MA, lo cual coincide con el valor propuesto por Johnson *et al.* (2006) (4.17 MA con un intervalo de confidencia de 3.16 a 6.01 MA), Por lo tanto, las tres estimas son muy similares.

El primer evento de divergencia entre los linajes de *P. y. yagouaroundi* se estimó alrededor de 3.18 MA para el grupo de datos con tres genes y alrededor de 3.08 MA para los datos mitogenómicos. Por lo tanto, los eventos de divergencia entre los diferentes haplotipos se iniciaron desde aproximadamente los 3 MA hasta hace unos 10.000 años. Por lo tanto, de las especies estudiadas, el jaguarundi es la que muestra haber tenido los procesos de divergencia más antiguos.

Las expansiones poblacionales en esta especie, sin embargo, son también claramente pleistocénicas, al igual que en todas las otras especies de felinos analizadas. Mediante el análisis Bayesian skyline plot con los datos de tres genes se observó un evento de expansión poblacional hace 700.000 años, mientras que para los datos mitogenómicos la expansión poblacional dio inicio hace unos 200.000 años. En ese último análisis también se detectó una débil disminución poblacional desde los 2.2 MA hasta 1.2 MA; a partir de ese momento hasta hace 300.000 años aproximadamente la población de hembras mostró un tamaño constante, hasta que hace 200.000 se inició una expansión poblacional. Mientras que, en todas las otras especies de felinos estudiadas, las fechas de expansiones poblacionales fueron muy similares independientemente de si las mismas fueron obtenidas mediante tres genes o mediante mitogenómica, en el caso del jaguarundi las estimas son bastante diferentes dependiendo del tipo de datos analizado.

Divergencia temporal dentro del género *Leopardus*

Basado en los tres diferentes conjuntos de datos mitocondriales para tigrina y los dos procedimientos utilizados para estimar divisiones temporales, se determinó que la diversificación inicial dentro del género *Leopardus* ocurrió entre los 3.91 a 3.02

millones de años. Todos los fósiles conocidos de *Leopardus* son más jóvenes que estos valores. Un fósil relacionado con este género se conoce desde el período Ensenadense de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y nombrado como ''*Felis*'' *vorohuensi* (Berta 1983). Estaba fechado alrededor de 0.78-0.5 MA (Prevosti, 2006). También hay algunos registros fósiles fragmentados de *L. pardalis* en América del Sur: Lagoa Santa, Minas Gerais (Berta 1978), México (Yucatán) (Hatt 1953) y Estados Unidos (Alachua Co, Florida) (Kurten 1965) y Marion Co, Florida (Ray *et al.* 1963) con estimaciones temporales que oscilan entre los 0.125 y 0.025 MA. Existen algunos fósiles más antiguos de *L. colocolo* de las etapas finales de Ensenadense (0.78-0.5 MA) y Bonaerense-Lujanense (0.5-0.0085 MA) en las pampas de Argentina. Prevosti (2006) encontró otros fósiles más recientes de esta especie en Tierra del Fuego (Chile) y en la Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul (Brasil) desde finales del Pleistoceno-Holoceno temprano. Sin embargo, no se encontraron fósiles (o sólo subfósiles) para otras especies de *Leopardus*, como *L. wiedii* (un sub-fósil de Orange Co, Texas, de alrededor de 4.400 A), *L. jacobita*, *L. geoffroyi*, *L. guigna* o tigrina. Se reconoce tradicionalmente que, por su naturaleza, los datos moleculares tienden a sobrestimar las divisiones temporales donde los fósiles tienden a subestimar (Steiper 2008). Por lo tanto, los datos fósiles no entran en conflicto con las estimaciones moleculares de este trabajo en cuanto a la diversificación temporal en *Leopardus*.

En general, las estimas de divergencia temporal de este trabajo, coinciden bastante bien con otras estimaciones realizadas por otros autores. La diversificación temporal inicial en *Leopardus* obtenida en este trabajo data entre los (3.91 a 3.02 MA), la cual es muy similar a la estimada por Li *et al.* (2016), 3.97-3.14 MA y Johnson *et al.* (2006), 2.91 MA. Otras divisiones temporales estrechamente de acuerdo son: una forma de tigrina vs. *L. geoffroyi* + *L. guigna* (2.77-0.95 MA en este trabajo vs. 2.58-1.33 MA (Li *et al.* 2016) o 0.93 MA (Johnson *et al.* 2006), *L. geoffroyi* vs. *L. guigna* (0.31-1.04 MA en este trabajo vs. 1.48-0.86 MA (Li *et al.* 2016) o 0.74 MA (Johnson *et al.* 2006), la división del ancestro de *L. jacobita* de otras especies (2.34-1.75 MA

en este trabajo vs. 2.91 MA (Li *et al.* 2016) o la diferenciación de *L. colocolo* (1.13-1.36 MA en este trabajo frente a 1.7 MA (Johnson *et al.* 2006).

Concretamente para el caso del ocelote, los árboles bayesianos para los dos grupos de datos estiman que la separación entre los linajes de *L. pardalis* y *L. jacobita* sucedió alrededor de 2.9-3.0 millones de años. La diversificación de los linajes dentro de *L. pardalis* se inició hace 2.39 MA cuando se originó un gran clado en el que se dan varias divisiones desde los 1.02 MA hasta los 10.000 años. Hacia los 850.000 años, divergió el grupo *L. p. mitis* (Bolivia), uno de los grupos que se comporta como subespecie y *L. p. pusaea* hace 200.000 años. En el árbol bayesiano de mitogenomas, la primera división entre linajes de *L. pardalis* ocurrió hace 2.5 MA cuando se formaron dos grandes clados, posteriormente, dentro de cada uno de éstos, se dieron sucesivas divisiones desde los 2.35 MA hasta los 20.000 años. La diversificación de *L. p. mitis* fue alrededor de 540.000 años, mientras que *L. p. pusaea*, mostró una divergencia alrededor de 100.000 años.

En el caso del margay, los árboles bayesianos para los dos conjuntos de datos estimaron que la división entre los linajes de *L. wiedii* y *L. jacobita* ocurrió en la misma época que la del ocelote (alrededor de 3 MA, coincidiendo con finales del Plioceno). La primera división dentro de los linajes de *L. wiedii* sucedió alrededor de 2.73 MA cuando se formaron dos grandes agrupaciones dentro de las cuales, se dieron sucesivas divisiones desde hace 1.9 MA hasta los 20.000 años. Hay un pico de diversificación hacia los 300.000 años cuando se forma el mayor número de agrupaciones (9) y en épocas posteriores (aproximadamente 20 agrupaciones en total en los últimos 300.000 años). En esta época es cuando diverge el grupo de *L. w. salvinia*. Para el caso de los datos mitogenómicos, la primera separación entre linajes aconteció hace 2.43 MYA y encontramos sucesivas divisiones hasta hace 100.000 años.

Dentro de los datos analizados en este trabajo, se detectan tres rangos temporales donde la diversificación mitocondrial fue fuerte. El primer período (3.5-2 MA) coincidió con los cambios climáticos que se originaron desde la finalización del puente terrestre panameño hace 2.8-3.1 millones de años (Marshall *et al.* 1982, Coates *et al.* 1996) y el comienzo del Pleistoceno. Sin embargo, algunos autores han afirmado recientemente que el Istmo de Panamá es más antiguo y que fue formado durante el Mioceno (Montes *et al.* 2012, Montes *et al.* 2015). Alrededor de 2.5 MA, los bosques andinos se transformaron en una sabana seca fría y fría (páramo), que podría tener poblaciones potencialmente aisladas de los antepasados de un taxón andino tigrina, así como de *L. jacobita*. Van der Hammen, (1992) demostró que la temperatura media en los Andes colombianos era 4°C menor que la de hoy. También indicó que el nivel de lluvia descendía por debajo del nivel reportado para hoy (500-1.000 mm). A 2.500 metros sobre el nivel del mar (msnm), la temperatura era 10°C más baja que en la actualidad. Esto también coincide con la última fase de formación de los Andes Centrales y una temperatura ambiente muy seca en las montañas andinas. Toda la cadena andina entre Cajamarca y Huancavelica en Perú apareció por volcanismo en este período, así como la introgresión marina llamada Interensenadense. En este período, la sabana de Bogotá alcanzó su altitud actual de 2.500 msnm. Esta época se caracterizó por un gran cambio de fauna con el inicio de la época marplatense en Argentina o la época villafranquense en Europa.

El segundo período de diversificación mitocondrial en *Leopardus* ocurrió alrededor de 1.5-0.8 millones de años. Esta divergencia podría haber sido iniciada por el período glacial pre-pastoniano (0.80-1.30 MA), que fue el pico glacial más alto del primer período glacial cuaternario (Nebraska-Günz). Este período glacial fue extremadamente seco, y hubo un gran grado de fragmentación del bosque. Este período fue un tiempo para la diversificación de haplotipos y la separación de muchos carnívoros, como se encontró anteriormente para el gato de las pampas (Cossíos *et al.* 2009), para el jaguarondi (Ruiz-García & Pinedo-Castro 2013), o para

el género *Lycalopex* (Ruiz-García *et al.* 2013). Alrededor de 1.3 MA, la fauna de Buenos Aires se transformó en una típica fauna semi-árida patagónica, representada por el guanaco, *Lestodelphys* y *Lyncodon*. Por lo tanto, el clima era considerablemente más frío y más seco y podría haber influido en la fragmentación del linaje haplotipo de *L. guttulus* de otros taxones. El clima también podría haber afectado la fragmentación de la tigrina andina con haplotipos similares de margay y ocelote de otros taxones de *Leopardus* o la aparición del antepasado del nuevo gato pequeño detectado en el sur de Colombia.

El tercer período de diversificación mitocondrial fue de 0,4-0,1 MA. Esto coincide bastante bien con la época más fría del período glacial Mindel-Kansas (período glacial Elster para Escandinavia y período Bonaerense para la Argentina) seguido por un período interglaciar (Hoxniense, 0.25-0.35 MA), que podría haber ayudado a esta diversificación mitocondrial. Esto coincide bastante bien con el período Bonaerense en Argentina (0.13-0.5 MA) con la fauna de *Megatherium americanum* y un aumento significativo de las especies Muridae y venado. En este momento, también hubo un aumento muy importante de especies de vegetación en la provincia de Buenos Aires porque el clima era más cálido y húmedo. Por lo tanto, la hipótesis de los refugios (Haffer 1969, 1997 & 2008) podría ser extremadamente útil para proporcionar una causa potencial para la diversificación extrema en estos pequeños gatos manchados llamados tigrinas, en particular, así como el proceso de diversificación en *Leopardus*, en general. La hipótesis de los refugios se basa en los ciclos seco/húmedo. Esta hipótesis fue originalmente establecida para el Pleistoceno, aunque posteriormente se expandió a los períodos Mioceno-Plioceno. Del mismo modo, Trigo *et al.* 2013 y Trigo *et al.* 2014 detectaron el crecimiento demográfico de *L. guttulus* inducido por la expansión de los bosques en el último cuaternario, alrededor de 70.000 años (Ledru *et al.* 1996, Behling 1998).

Claramente, el ocelote (150.000-300.000 años), el margay (300.000 años) y la población de tigrillos que mostró un ADN mitocondrial similar al de los margay-

ocelotes (150.000 años) mostraron expansiones poblacionales, al igual que para el jaguar, en la tercera fase de diversificación detectada en el Pleistoceno.

4.3. ESTRUCTURA ESPACIAL EN LAS ESPECIES DE FELINOS ESTUDIADAS

Aunque en ciertos parámetros analizados todas las especies de felinos de esta investigación poseen situaciones muy similares (elevados niveles de diversidad genética y la mayor parte de los procesos de división al interior de las especies durante el Pleistoceno), los análisis de estructura espacial muestran que no se puede afirmar que los mismos procesos vicariantes son los que han causado estructura espacial en cada una de las especies estudiadas. En el margay no se detectó ninguna evidencia de estructura espacial para ningún tipo de análisis entre las diferentes agrupaciones geográficas detectadas. Para el jaguar, se detectó autocorrelación espacial significativa para el conjunto de tres genes en forma de clina monotónica, aunque, en realidad, esa estructura es bastante débil porque el análisis con el test de Mantel reveló que solo el 1.72% de las distancias genéticas fue explicada por la distancia geográfica entre los individuos. En el caso del jaguarundi, se detectaron con autocorrelación clinas circulares (significativa la que se obtuvo con mitogenómica) pero, de nuevo, las distancias genéticas son únicamente explicadas por las distancias geográficas entorno al 4%. Para el ocelote también se detectó una cierta estructura clinal monotónica (sobre todo mitogenómica) como en el jaguar, pero con mayor fuerza estadística, ya que las distancias geográficas explicaron entorno al 7.14% de las distancias genéticas. Aunque significativas, algunas de esas estimaciones de estructura espacial en todos los casos fueron moderadas o muy ligeras. Contrariamente, el complejo de los tigrillos mostró una estructura espacial extremadamente fuerte, en forma de clina circular para los tres tipos de datos moleculares analizados para ese complejo de felinos. El conjunto de datos con ND5 (un solo gen) mostró que las distancias

geográficas explicaron un 22.87% de las distancias genéticas, mientras que los datos mitogenómicos mostraron que las distancias geográficas explicaron casi el 60% de la variación de las distancias genéticas entre los individuos analizados (57.22%).

Estos análisis espaciales pusieron de manifiesto tres aspectos importantes para comentar: **1.** La estructura espacial a escala macrogeográfica de las especies de felinos neotropicales aquí estudiadas es muy limitada, a excepción del complejo de especies de tigrillos; **2.** Sin embargo, cuando se detectó cierta estructura espacial, ésta es diferente entre las especies, lo que implica diferentes tipos de eventos vicariantes afectando limitadamente a esas especies y **3.** Los análisis de estructura espacial pueden ser vitales para detectar especies crípticas (o no reconocidas por fuerte similitud fenotípica) si existen procesos de diferenciación alopátrica o por fenómenos de hibridación dependientes de diferentes taxones en diferentes áreas geográficas.

Los análisis acá realizados están a una escala macrogeográfica (abarcando la mayor parte de la distribución geográfica de cada una de las especies analizadas). Sin embargo, a un nivel microgeográfico, podría detectarse un mayor grado de heterogeneidad genética y estructura espacial en algunas de esas especies. Por ejemplo, el jaguar prefiere habitar en bosques primarios, evitando áreas modificadas y accesibles para el hombre (De Angelo 2009) y, aunque los machos tienen una gran capacidad de dispersión, dichos disturbios antropocéntricos pueden disminuir el rango de tal dispersión manejando rangos hogareños mucho más pequeños que los registrados para hábitats sin disturbios, concentrándose en áreas muy alejadas de las que colindan con la presencia humana. Los animales de gran tamaño son las primeras en verse afectadas por las presiones humanas, por persecución directa, reducción del hábitat o por menor disponibilidad de alimento (Novack *et al.* 2005). Teniendo en consideración esos aspectos, Wultsch *et al.* (2016) encontraron en la selva maya de Belice que cuatro áreas protegidas, separadas por barreras humanas

(áreas agrícolas, carreteras, desarrollo urbano, etc.) presentaban cierta estructura espacial. El análisis de autocorrelación espacial mostró ser positiva y significativa hasta los 15 km, con un intercepto de r aproximadamente a los 20 km. Para el caso de los machos, este intercepto fue aproximadamente de 22 km. El análisis de componentes principales separó a los jaguares en dos regiones con valores bajos de diferenciación genética: una norte-central y otra sur. El análisis con GENELAND dio como resultado la posible estructura en tres poblaciones (norte, sur y centro). Igualmente, Haag *et al.* (2010), analizando cuatro fragmentos de bosque atlántico en Brasil, encontraron con STUCTURE y BAPS un valor de cuatro poblaciones diferentes de jaguares, que corresponden a las poblaciones geográficas limitadas *a priori* por ellos mismos (zonas de gran deforestación, ranchos ganaderos, cultivos, hidroeléctricas). En cuanto a la diferenciación genética entre esos fragmentos de bosque, los valores de FST oscilaron entre 0.198 y 0.048, valores muy elevados a pesar de la proximidad geográfica (entre 69 y 500 km de distancia). Sin embargo, no hubo relación entre la distancia geográfica y la diferenciación genética encontrada, debido a que causa de la subdivisión observada fue probablemente por deriva genética.

Algo similar fue encontrado para el ocelote por Wultsch *et al.* (2016) quienes obtuvieron valores de diferenciación genética (FST = 0.049 y GST = 0.173) entre las poblaciones norte y sur de Belice. El análisis con GENELAND detectó siete agrupaciones las cuales se agruparon en dos grandes grupos geográficos, en los que el grupo del norte presentó más mezcla que en el grupo del sur.

4.4. ¿EXISTE CORRESPONDENCIA ENTRE LAS SUBESPECIES MORFOLÓGICAS DESCRITAS PARA EL JAGUAR, OCELOTE, MARGAY Y JAGUARUNDI RESPECTO A LOS RESULTADOS MOLECULARES OBTENIDOS?

Para poder determinar esa posible asociación, se han considerado los resultados obtenidos con GENELAND, los árboles filogenéticos y las redes de haplotipos obtenidas.

El caso del jaguar

Se analizaron muestras de cinco de las ocho subespecies morfológicas putativas del jaguar. Eso significa que de las subespecies más norteñas de su distribución en México y sur de USA (*P. o. arizonensis; P. o. hernandesii* y *P. o. veraecruscis*) no se pueden aportar datos de la posible correspondencia entre las subespecies morfológicas y los resultados moleculares. Respecto a las cinco subespecies putativas analizadas no existe una clara monofilia recíproca entre ellas, con la excepción de los dos ejemplares de *P. o. paraguensis*. Eso significaría que, si se pudieran analizar más muestras de *P. o. paraguensis* y todas ellas formaran un clado monofilético, podríamos definir dos subespecies de jaguar en Sudamérica y en la parte de Centro-América analizadas: *P. o. onca* y *P. o. paraguensis*. Si al analizar más muestras de *P. o. paraguensis* no conformaran un clado monofilético, entonces, en el área de distribución de las cinco subespecies putativas estudiadas, podríamos definir una única subespecie: *P. o. onca* (Linneo, 1758).

En el interior de *P. o. onca* y de *P. o. centralis* se detectaron ciertos pequeños grupos con elevada afinidad genética en áreas geográficas muy concretas, lo que significa que pueden existir ciertas pequeñas agrupaciones geográficas pero que no tienen correspondencia con las subespecies morfológicas tradicionalmente definidas. La imposibilidad de diferenciación entre *P. o. onca* y *P. o. centralis* también fue detectada para el análisis de microsatélites nucleares por Ruiz-García *et al.* (2006).

Eizirik *et al.* (2001) no encontraron estructura geográfica entre las muestras de jaguar que analizaron, pero si definieron cuatro zonas parcialmente aisladas a lo largo del rango de distribución de la especie separadas por el río Amazonas y por el Tapón del Darién. En el presente estudio, conjuntamente con el de Ruiz-García *et al.* (2013), aumentando considerablemente el número de muestras de jaguares secuenciadas, claramente muestra que el río Amazonas y el Darién no son barreras geográficas importantes para la diferenciación genética de las poblaciones de jaguares.

Ruiz-García *et al.* (2013) encontraron que, para el análisis con microsatélites, la subespecie *P. o. goldmani* estaba claramente diferenciada de las subespecies *P. o. centralis*, *P. o. onca* y *P. o. paraguensis*, mientras que con el marcador mitocondrial NADH5 no se ratifica esta separación, al igual que ocurre en el presente estudio. En este caso, dos de las tres secuencias de *P. o. goldmani* se agrupan entre sí diferenciándose de *P. o. centralis* y *P. o. onca*. Pero una tercera secuencia se agrupa indiferenciadamente de las de *P. o. onca* y *P. o. centralis*. Sin embargo, hay evidencias de que los eventos y efectos de la fragmentación del hábitat en Mesoamérica han incidido en la diferenciación de las poblaciones de jaguar (Wultsch *et al.* 2016), lo que hace posible que estos efectos estén siendo detectados por marcadores microsatélites cuya tasa de evolución es mayor que para los genes mitocondriales.

El caso del jaguarundi

Para el jaguarundi se analizaron siete de las ocho subespecies morfológicas consideradas por Cabrera (1957) y de Oliveira (1998). Únicamente, la subespecie mexicana de la costa Caribe no ha sido analizada (*P. y. cacomitli*) por lo que no se harán inferencias sistemáticas de este taxón.

No se encontraron muchos grupos significativos, molecularmente hablando en el jaguarundi. Se detectó un grupo de animales del norte de Argentina y Paraguay que

formaron un grupo bien consolidado que corresponde a lo que Fisher (1814) determinó como *P. y. eyra* con la localidad tipo en Paraguay. Sin embargo, otros ejemplares, *a priori* clasificados en esta subespecie claramente no se agruparon con las anteriores. Estos ejemplares fueron del Estado de Rio de Janeiro en Brasil y ejemplares bolivianos, cuyas secuencias se agruparon entremezcladamente, especialmente con las de *P. y. melantho*, *P. y. panamensis* y *P. y. yagouaroundi*. Otra cuestión interesante es que una secuencia de jaguarundi procedente de la provincia de Santa Cruz (Argentina), *a priori* clasificada como *P. y. ameghinoi* por su origen geográfico también perteneció al grupo *eyra*. Eso significa que *P. y. eyra* está distribuida en la zona donde originalmente fue definida (Paraguay, además de Chaco y Misiones en Argentina) y en áreas más al sur en Argentina. También es notable resaltar que en Argentina existe otro taxón diferente de jaguarundi, que tradicionalmente fue clasificada como *P. y. ameghinoi* y que se distribuye clásicamente por la zona occidental de Argentina hacia el sur. Efectivamente, ese otro taxón es detectable mitocondrialmente, pero es indiferenciable de otras subespecies putativas más norteñas como *P. y. melantho*, *P. y. panamensis* y *P. y. yagouaroundi*.

En el seno de *P. y. panamensis* se detectaron varios grupos significativos (2-3 grupos dependiendo de los análisis). Algunos de ellos se sobrepusieron por zonas geográficas de Panamá, y áreas transandinas de Colombia y Ecuador, pero fueron claramente polifiléticos. Uno de ellos, del departamento de Cesar en Colombia, fue especialmente sólido y presentó especial afinidad por el grupo de *P. y. eyra* de Paraguay y Argentina, a pesar de estar distanciados por más de 4.500 km de distancia. Este fenómeno es el que creó una fuerte clina circular en el análisis de autocorrelación espacial. En Panamá y en el área transandina de Colombia y Ecuador, únicamente se ha definido una única forma de jaguarundi (*P. y. panamensis*) por Allen (1904) con localidad tipo en Boquerón, Chiriquí (Panamá). Algunos de los grupos en esa área comentada pueden corresponder a esa subespecie putativa, pero no existe denominación que se pudiera haber

considerado sinónima para los otros. Por lo tanto, se debería hacer un estudio minucioso morfológico de esos haplogrupos mitocondriales encontrados en el área de Panamá y la zona transandina colombiana y ecuatoriana.

En el análisis mitogenómico se detectó un grupo de cuatro ejemplares procedentes del centro de Perú que corresponde exactamente al área de la localidad tipo (Pozuzo, Huánuco, Perú) de definición de *P. y. melantho* por Thomas (1914). Por lo tanto, esta sería la subespecie propia de esa zona, mientras que la denominación *melantho* sería incorrecta para el resto de la distribución geográfica que se ha considerado *a priori* perteneciente a este taxón. Las restantes secuencias pertenecientes a *P. y. melantho* en la denominación inexacta que se utiliza *a priori*, *P. y. tolteca, P. y. fossata*, algunas de las secuencias denominadas *a priori P. y. panamensis*, *P. y. yagouaroundi*, y *P. y. ameghinoi* (exceptuando la de Santa Cruz-Argentina que se agrupó con *P. y. eyra*) se entremezclaron aleatoriamente en los árboles filogenéticos y en las redes de haplotipos. De todas ellas, la denominación más antigua es la correspondiente a *P. y. yagouaroundi* (Geoffroy 1803). Por lo tanto, los resultados mitocondriales obtenidos ponen de manifiesto la existencia de las siguientes subespecies en el jaguarundí: *P. y. yagouaroundi*, *P. y. panamensis* y otras posibles subespecies en el área de Panamá y zona transandina de Colombia y Ecuador, *P. y. melantho sensu stricto* del área central de Perú y *P. y. eyra* en Paraguay y Argentina, extendiéndose más al sur de Argentina de lo que anteriormente se había pensado. Por lo tanto, solo existe una correlación parcial entre las subespecies morfológicas tradicionalmente aceptadas y los resultados moleculares. Parece evidente que el número de subespecies que se pueden detectar molecularmente es menor que el que se ha definido morfológicamente. Esto resulta lo contrario de lo que se comenta con los tigrillos en los resultados y lo que, posteriormente, se discutirá acerca de su sistemática.

El caso del ocelote

Para el ocelote no se analizaron muestras de cuatro de las diez subespecies morfológicas putativas de esta especie (Cabrera 1957, Murray & Gadner 1997): *L. p. albescens*, *L. p. nelsoni, L. p. sonorensis* y *L. p. pardalis*, todas ellas formas putativas del norte de Centroamérica, México y Estados Unidos, por lo tanto, no se pueden hacer inferencias respecto a las mismas. Los resultados moleculares de este estudio mostraron que en el seno de esta especie existen agrupaciones que son coincidentes con algunas de las subespecies morfológicas reconocidas hasta la fecha, aunque no existan grupos monofiléticos estrictamente compuestos con exclusividad por todos los ejemplares analizados de una supuesta subespecie. Existen ciertos grupos bien delimitados en los taxones *L. p. mitis*, *L. p. steinbachi*, *L. p. aequatorialis* y *L. p. pusaea*. Existen algunos clados significativos geográficamente al interior de *L. p. pseudopardalis* y de *L. p. melanura*, aunque las secuencias de estas dos supuestas subespecies de ocelotes están ampliamente distribuidas por todos los árboles filogenéticos estimados. Los resultados obtenidos muestran muy interesantes consecuencias en la sistemática intraespecífica del ocelote. Tradicionalmente, se ha considerado que *L. p. aequatorialis* (Mearns 1903) se ha distribuido desde el norte de Ecuador (Paramba) por toda la costa Pacífica colombiana, Panamá y Costa Rica. En este último país, Allen (1904) había definido *L. p. mearnsi* (localidad tipo: Talamanca, Costa Rica), pero posteriormente *mearnsi* fue considerado un sinónimo de *aequatorialis* (Murray & Gadner 1997) y absorbido por éste. Igualmente, en la costa ecuatoriana, Thomas (1914) había definido *L. p. pusaea* (localidad tipo: Chongón, 15 km al Oeste de Guayaquil, Provincia de Guayas) como una subespecie diferenciada. El presente estudio muestra que la mayoría de ocelotes de toda la costa pacífica ecuatoriana y la zona transandina colombiana están fuertemente relacionados entre sí (los ejemplares de *L. p. pusaea* del Ecuador y los *L. p. aequatorialis* colombianos). Por prioridades clasificatorias, todo este grupo debería ser denominado *L. p. aequatorialis* (Mearns 1903 vs. Thomas 1914). Sin embargo, los supuestos *L. p. aequatorialis* que se muestrearon en el norte de Panamá formaron otra agrupación perfectamente diferenciable de la

anterior. Por lo tanto, se recupera la denominación de Allen (1904), *L. p. mearnsi* para esos ocelotes panameños y no se considera sinónimo de *L. p. aequatorialis*. En conclusión, en el sur de Centro América se considera la existencia de *L. p. mearnsi* y en toda la zona transandina colombiana y ecuatoriana la presencia de *L. p. aequatorialis*, eliminado la denominación de *L. p. pusaea* por ser un sinónimo más tardío del primero. También es interesante, la situación de *L. p. mitis* y *L. p. steinbachi* porque fueron detectadas ambas subespecies putativas en regiones sobrepuestas de Bolivia. El análisis con tres genes mitocondriales tiende a mezclar haplotipos de *L. p. mitis* y *L. p. steinbachi*. Por orden temporal, el grupo debería denominarse *L. p. mitis* (Cuvier 1820) y considerarse *L. p. steinbachi* como sinónimo (Pocock 1941) absorbido por el primero. Sin embargo, el análisis mitogenómico (con muchos menos individuos, pero con secuencias considerablemente mayores) tiende a diferenciar ambos taxones por lo que ambos serían válidos. Más muestras de origen boliviano deberían ser analizadas para desentrañar de forma fina ese problema taxonómico.

La mayor parte de las secuencias de *L. p. melanura* (Ball, 1844) y *L. p. pseudopardalis* (Boltard, 1842) están entremezcladas, por lo que la denominación cronológicamente correcta sería *L. p. pseudopardalis*. En resumen, en este trabajo se reconocen cinco subespecies de ocelotes en la zona analizada: *L. p. mearnsi*, *L. p. aequatorialis*, *L. p. pseudopardalis*, *L. p. mitis* y, probablemente, *L. p. steinbachi*. Janecka *et al.* (1997) mostraron que la forma norteña, *L. p. albescens*, claramente se diferenciaban a nivel molecular de otras formas de ocelotes en áreas más meridionales.

Eizirik *et al.* (1998) detectaron dos grupos filogenéticos grandes que corresponden a los ocelotes centroamericanos y los del nororiente de Suramérica por un lado y otro con los del sur de Suramérica junto con los del noroccidente de Suramérica formando así 4 particiones geográficas claras: sur de Sur-América (al sur del río Amazonas), noroccidente de Sudamérica (Venezuela, Trinidad, Brasil en la parte

norte del rio amazonas y Panamá), nororiente de Suramérica (Guyana Francesa y norte de Brasil al este del río Negro), y Centroamérica. La mayoría de las agrupaciones fueron monofiléticas excepto el clado noreste, el cual fue parafilético respecto a Centroamérica. Los resultados sugieren que los dos grupos del norte de Sudamérica (occidental y oriental) representan dos grupos históricamente diferentes, aislados en el pasado y posiblemente aún conservan niveles bajos de flujo génico por las barreras geográficas, en este caso, el río Negro. En el presente trabajo, tres secuencias procedentes del río Negro y la Guyana Francesa formaron un clado significativo que podría concordar con el grupo nororiental propuesto por Eizirik *et al.* (1998). Sin embargo, otra secuencia procedente de Guyana Francesa estuvo más relacionada con ejemplares de la zona noroccidental de Sudamérica. Si esto fuera así, la población nororiental de Sudamérica debería recibir la denominación de *L. p. melanura* (holotipo probablemente procedente de Guyana siguiendo a Pocock 1941) y la forma del noroccidente cisandino de Sudamérica y de la mayor porción del Amazonas correspondería a *L. p. pseudopardalis*, cambiándose de este modo de forma radical la distribución de *L. p. pseudopardalis* y *L. p. melanura* (casi invirtiéndose sus distribuciones) respecto a lo mostrado por Oliveira (1994) y Murray & Gadner (1997).

El caso del margay

De las 10 subespecies morfológicas descritas por Cabrera (1957) y de Oliveira (1998), no se analizaron tres de ellas, dos mexicanas (*L. w. oaxacensis* y *L. w. yucatanica*) y la subespecie putativa más oriental de Sudamérica en Brasil (*L. w. wiedii*), por lo tanto, no se harán inferencias con esas tres supuestas subespecies.

Aunque fueron analizadas muy pocas muestras de *L. w. vigens* (cercana a la desembocadura del Amazonas; Guyana Francesa) y algunas más de *L. w. salvinia* (Guatemala), estos dos taxones parecen válidos. Aparecen diferentes clados significativos de margay, pero no monofiléticos entre sí en territorio boliviano. Es

probable que alguno de ellos se corresponda con la subespecie *L. w. boliviae*. El problema es que no se sabe cuál exactamente. Es posible que diferentes haplogrupos de lo que se ha denominado *L. w. amazonica* se hayan expandido y se hayan sobrepuesto geográficamente en la zona donde también se encuentra *L. w. boliviae* (o viceversa). Las restantes secuencias analizadas corresponden a *L. w. glaucula*, *L. w. nicaraguae*, *L. w. pirrensis* y *L. w. amazonica* y se encuentran ampliamente entremezcladas entre sí en los árboles filogenéticos y en las redes de haplotipos. De todas esas denominaciones, la más antigua es la de *L. w. glaucula* (Thomas 1903) y, por lo tanto, absorbería las denominaciones de las otras cuatro subespecies. Por lo tanto, en este trabajo se reconocerían para el margay, en el área estudiada cuatro posibles subespecies: *L. w. glaucula*, *L. w. salvinia*, *L. w. vigens* y *L. w. boliviae*.

Eizirik *et al.* (1998) supuso que, para el margay, el río Amazonas es una barrera geográfica, debido a que dos de las particiones filogenéticas principales halladas fueron al norte de Sudamérica y al sur de Sudamérica; la tercera correspondiente a Centroamérica presentaría dos subclados: Costa Rica + Nicaragua, por un lado y Guatemala + México, por otro lado. Sin embargo, el sur de Suramérica presentó un clado con secuencias de Brasil y Paraguay que se diferenció de una secuencia de Bolivia. El valor de FST entre las particiones fue muy elevado, 0.622. También los dos subgrupos de Centroamérica presentaron un valor de FST muy elevado, 0.634. También se encontraron algunas distancias genéticas muy elevadas entre diferentes especímenes de margay, tanto en áreas geográficas distantes como entre individuos de las mismas zonas geográficas. Esto podría interpretarse de diferentes modos: **1.** Existió una diferenciación genética importante entre los acervos genéticos originales en el interior del margay y, posteriormente, se dio una fuerte expansión poblacional de algunos de esos haplogrupos que se superimpusieron geográficamente donde ya existían otros haplogrupos originales, viviendo en la actualidad en simpatría (parecido al caso de *Cebus albifrons*, Ruiz-García *et al.* 2010); **2.** Posible existencia de especies crípticas (morfológicamente

muy parecidas con adaptaciones al medio arbóreo - Ruiz-García ha observado diferentes morfotipos de margay en diversas áreas de Colombia y Centro América, observación no publicada) pero que, a diferencia del caso de los tigrillos, que se comenta en esta tesis, se encuentran en simpatría en buena parte de toda la distribución de lo que se ha denominado tradicionalmente margay. Al darse en simpatría, ese proceso no habría generado una fuerte estructura genética espacial como en el caso comentado del complejo de especies de tigrillos; y **3.** Se debería investigar si ha podido existir hibridación entre el margay y otras especies de pequeños felinos manchados, al igual que se demuestra aquí con los tigrillos, pero con introgresión mitocondrial de esos pequeños felinos manchados en el acervo del margay. Si eso hubiera ocurrido aleatoriamente en el rango de distribución de la especie podría generar fuertes diferencias genéticas mitocondriales entre animales de una misma zona geográfica no permitiendo encontrar, sin embargo, estructura espacial, tal como se mostrará en el caso del margay. Para resolver este problema es necesario hacer un análisis conjunto con todas las secuencias mitocondriales posibles de todas las especies del género *Leopardus* y el mayor número posible de individuos por especie, al igual que analizar secuencias de cromosomas autosómicos y del cromosoma Y, principalmente.

4.5. EL CASO DEL COMPLEJO DE ESPECIES DE TIGRILLOS

La sistemática de tigrina y su hibridación con otras especies.

La hibridación de tigrina con otras especies del género *Leopardus* ha sido previamente reconocida. Algunos estudios determinaron que tigrina estaba altamente hibridada con otras dos especies de *Leopardus*, *L. geoffroyi* y *L. colocolo*. El primer estudio para detectar alguna hibridación fue el de Johnson *et al.* (1999), quienes detectaron hibridación entre los machos *L. tigrinus* y las hembras *L. colocolo* en el medio silvestre. Esto no se había reportado previamente en la

naturaleza, pero se había observado en cautiverio (Hemmer 1979). Estos autores explicaron esta hibridación en parte por las distribuciones y densidades relativas de las dos especies. Estos híbridos silvestres provienen del centro de Brasil, donde *L. tigrinus* es reportado como más frecuente que *L. colocolo*. No sería raro que los machos de las especies más comunes se aparearan con hembras de las especies más raras, que pueden tener más dificultades para encontrar pareja.

Posteriormente, el grupo de Trigo (Trigo *et al.* 2013) utilizaron las secuencias del gen mitocondrial ND5 y detectaron ocho individuos de *L. geoffroyi* ubicados en el clado *L. tigrinus*. También detectaron un individuo de *L. colocolo* en el clado de *L. tigrinus*, seis individuos de *L. tigrinus* en el clado de *L. geoffroyi* y cinco muestras de *L. tigrinus* colocadas en el clado *L. colocolo*. Estos autores utilizaron microsatélites y asumieron un valor q de 0.9 como umbral para distinguir a individuos puros de híbridos. Identificaron 12 híbridos putativos entre los individuos morfológicamente definidos de *L. geoffroyi* y 21 entre los *L. tigrinus*. Afirmaron que éste sería uno de los niveles más extensos de hibridación reportados para carnívoros hasta ahora, con datos de ADNmt que apoyan la distinción evolutiva de las dos especies. Esto contrasta notablemente con el bajo nivel de diferenciación observado con los marcadores microsatélites. Concluyeron que estos resultados indican que la mezcla entre estas especies está bastante concentrada en las áreas que rodean su zona de contacto, lo que sugiere que el proceso de hibridación es extremadamente reciente y/o que hay alguna restricción selectiva en la extensión geográfica de los descendientes mezclados fuera de esta zona de contacto en el sur de Brasil. Concluyeron, además, que ambas especies de felinos evolucionaron en alopatría alrededor de 1 MA. Además, el proceso de hibridación ocurrió muy recientemente porque detectaron expansiones poblacionales con diferentes procedimientos alrededor de 76.000 años para ambas especies de felinos. Esta expansión de la población fue más fuerte en tigrina que en el gato de Geoffroyi. Sin embargo, los autores no descartaron una hibridación mucho más reciente influenciada por las actividades humanas. En algunas zonas del sur de Brasil se han producido

alteraciones antropogénicas del hábitat durante más de dos siglos. Es concebible que estas poblaciones no estuvieran en contacto directo antes de la perturbación humana. Dependiendo de la intensidad de los cruzamientos interespecíficos por generación, los autores afirmaron que es posible que dos siglos de hibridación pudieran conducir al patrón de mezcla observado.

Trigo *et al.* 2014, determinaron que los híbridos identificados entre tigrina y *L. geoffroyi* eran compatibles con un estado F2 o retrocruzamiento, sin un solo caso claro para un individuo F1. Estos hallazgos indican que los híbridos son viables y al menos parcialmente fértiles. Los autores documentaron la fertilidad de los híbridos con el ejemplo de una hembra muerta y embarazada. Se identificó morfológicamente como una tigrina, pero se reconoció como un híbrido con los datos moleculares. También afirmaron que la dificultad para distinguir diferentes categorías híbridas en este caso, podría estar asociada con la alta tasa de hibridación. Se estima que hasta el 40% de la muestra constaba de híbridos. Sobre la base de sus análisis morfométricos y la evaluación espacial de la variación genética y morfológica, la existencia de algún nivel de selección que actúa contra los híbridos podría ser verdad. Esto evitaría la completa homogeneización genética y morfológica de las dos especies en las regiones que rodean su zona de contacto.

Tigrina, tradicionalmente considerada una especie con cuatro subespecies geográficamente definidas (*L. t. oncilla*, *L. t. pardinoides*, *L. t. tigrinus* y *L. t. guttulus*), ha sido intensamente estudiada en Brasil desde una perspectiva de genética molecular. Trigo *et al.* (2013) analizaron 115 tigrinas, 74 *L. geoffroyi* y 27 *L. colocolo* para el gen mitocondrial ND5, dos intrones ligados a X (PLP1 y BTK) y dos intrones ligados a Y (ZFY y SMCY3) junto con diez *loci* microsatélites. Ellos fueron los primeros en analizar muestras de poblaciones de tigrinas del noreste de Brasil (*L. t. tigrinus*). Todos sus análisis detectaron un amplio intercambio de haplotipos entre tigrina y *L. geoffroyi* en todos los genes, incluyendo individuos que llevan haplotipos que no coinciden con su fenotipo, especialmente procedentes del sur de Brasil. En

contraste, la discordancia entre tigrina y *L. colocolo* sólo se observó con los datos del ADNmt, indicando claramente un patrón de introgresión histórica, unidireccional de esta última especie en tigrina. Todas las tigrinas del noreste de Brasil albergaron haplotipos de *L. colocolo*, lo que también fue el caso de tres de los cinco tigrinas del centro de Brasil. No se observó introgresión mitocondrial de *L. colocolo* en las poblaciones de tigrinas del sur y sureste de Brasil. Teniendo en cuenta todas las secuencias nucleares de tigrina, todos los individuos del noreste de Brasil y los tres centrales con ADNmt de *L. colocolo*, contenía un conjunto único de haplotipos, no compartida con los individuos de tigrina del sur. Esto también fue corroborado por el análisis de microsatélites autosómicos. Los autores encontraron una fuerte evidencia de diferenciación genética entre las poblaciones de tigrina del noreste y del sur. Su nivel de diferenciación genética fue similar a los encontrados entre diferentes especies, como *L. geoffroyi* en relación con *L. colocolo*. Además, no se encontró que un único alelo en los marcadores ligados a Y o ligados a X fuera compartido entre estas poblaciones de tigrinas contiguas y supuestamente conectadas. Estos resultados indican fuertemente la ausencia de flujo genético actual o reciente entre las poblaciones de tigrina del noreste y del sur, apoyando la existencia de dos diferentes especies de tigrinas en Brasil que se separaron alrededor de 0.5-0.8 MA. Por lo tanto, Trigo *et al.* 2013 mostraron que dos especies diferentes de tigrina están en Brasil, una en el sur y el centro de Brasil (*L. guttulus*) y otra en el noreste y el centro de Brasil (*L. tigrinus*). Algunos estudios anteriores (Johnson *et al.* 1999, Trigo *et al.* 2013, Li *et al.* 2016) también afirmaron la posibilidad de que la tigrina centroamericana pudiera ser una especie diferente, aunque el número de individuos centroamericanos estudiados era extremadamente pequeño. Por ejemplo, Trigo *et al.* (2008) demostró que todas las muestras de tigrina del sur de Brasil formaron un clado bien soportado, correspondiente a una especie morfológicamente bien definida con una profunda divergencia entre este clado y la muestra centroamericana de *L. tigrinus* (Lti13). Esto también se ha observado en otro estudio (Johnson *et al.* 1999). Además, mostraron que el linaje Lti13 estaba

más estrechamente relacionado con el clado *L. geoffroyi* + *L. guigna* que con la tigrina del sur de Brasil.

En este trabajo también se ha demostrado un amplio grado de hibridación entre tigrina en otras áreas de América Latina anteriormente no estudiadas, así como muchas otras posibles especies de tigrina. Además, se ha demostrado que la situación con las tigrinas es extremadamente más compleja de lo que pensaban otros autores. El análisis de secuencias procesadas para este trabajo junto con las obtenidas en GenBank (Johnson & O'Brien 1997, Trigo *et al.* 2008, Trigo *et al.* 2013, Li *et al.* 2016) mostró las siguientes especies de tigrina si se sigue el concepto filogenético de especie:

1. Los tigrina de Costa Rica son claramente un taxón diferenciable de otros linajes de tigrina, lo que concuerda bastante bien con los resultados anteriores (Johnson *et al.* 1999, Trigo *et al.* 2013, Li *et al.* 2016); por lo tanto, este taxón debe ser nombrado como *Leopardus oncilla* (Thomas, 1903), sustituyendo a *L. t. oncilla*. Este podría ser el taxón de tigrina más relacionado con *L. geoffroyi* y *L. guigna*. Uno de los descubrimientos más destacados en este trabajo es que este taxón no sólo se distribuye en Costa Rica y Panamá (Centroamérica), sino que también se distribuye en la zona transandina de Colombia y Ecuador. Se detectó un ejemplar en el departamento del Valle del Cauca en Colombia y otro en Intag (provincia de Imbabura), Ecuador. Este descubrimiento está de acuerdo con la existencia de muchas especies de mamíferos que se distribuyen en América Central y en el área transandina de Colombia y Ecuador (*Caluromys derbianus, Tamandua mexicana, Choloepus hoffmanni, Cebus capucinus, Alouatta palliata, Ateles fusciceps, Nasua narica, Tapirus bairdii* para citar algunos de ellos). Si se acepta a *L. oncilla* como una especie completa, los resultados mitogenómicos podrían interpretarse como la existencia de dos subespecies dentro de esta especie debido a cierto grado de heterogeneidad interna. Una sería la subespecie de los tigrina de Centroamérica y la segunda sería la de los tigrina colombianos transandinos y de Ecuador.

2. Los resultados concuerdan con Trigo *et al.* (2013) y Trigo *et al.* (2014) en que los tigrina del sur de Brasil y parte del Brasil central son un taxón diferenciado de tigrina, *L. guttulus* (Hensel 1872). Aunque los datos son claramente menos completos (en individuos y marcadores moleculares) que los de Trigo *et al.* (2013) y Trigo *et al.* (2014), se ha detectado la marcada diferenciación de estos tigrina en referencia a otros grupos de tigrina. De hecho, también se analizaron tres individuos del noreste de Argentina (Provincia de Misiones), que pertenecían a este taxón tigrina.

3. Aunque no se estudiaron directamente los tigrinas del noreste (y algunas centrales) de Brasil, cuando se introdujeron las secuencias del gen ND5 de los trabajos de Trigo *et al.* (2008) y Trigo *et al.* (2013), todos estos tigrinas mostraron claramente un genoma mitocondrial de *L. colocolo*. Esto, junto con los resultados de Trigo *et al.* (2013) para otros marcadores moleculares, coinciden bastante bien con la existencia de otra especie de tigrina diferenciada, *L. tigrinus* (Schreiber 1775) sensu *stricto*. Por lo tanto, tres de las cuatro tradicionales subespecies podrían elevarse a la categoría taxonómica de especie.

4. La situación sistemática más compleja se encuentra en el área de distribución geográfica de la tradicional y putativa cuarta subespecie de tigrina, *L. t. pardinoides* en las zonas andinas de Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. Teniendo en cuenta el conjunto de datos mitocondriales con la mayoría de los individuos analizados y los fenotipos registrados, se detectaron cuatro taxones diferentes que aparentemente tienen una distribución geográfica simpátrica. Tres tienen fenotipos relacionados con lo que tradicionalmente se ha clasificado como tigrina y un nuevo pequeño gato manchado con mitocondrias y un fenotipo totalmente diferente de cualquier otro gato silvestre en el Neotrópico:

4.1. Un taxón consta de tres individuos, uno de Lamas (Departamento de San Martín) en el Perú y otro dos de origen colombiano (uno del Parque Natural Chingaza, Departamento de Cundinamarca y otro del Departamento de Tolima). Estos animales se caracterizaron por el pelo corto y numerosas rosetas medianas en toda su piel. Infortunadamente, no se logró amplificar la mitocondria completa para cualquiera de estos individuos.

4.2. Un taxón consistió en individuos de diferentes departamentos andinos de Colombia (Quindío, Boyacá y Huila) y un individuo de la zona de Cotopaxi en Ecuador. Estos animales eran más corpulentos, con cuerpos y cabezas más redondeados y de coloración negruzca o más oscura y pelo más largo que los individuos del taxón anterior.

4.3. La mayoría de los tigrina andinos estudiados comparten haplotipos muy similares a los encontrados en margay y en ocelotes. También mostraron muy diversos fenotipos de pelaje. Tigrinas con haplotipos estrechamente relacionados con margay y ocelotes se detectaron en las áreas andinas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia y noroeste de Argentina. De hecho, con sólo los haplotipos de ATP-8-mt 16S rRNA, algunos de estos tigrina compartieron el mismo haplotipo que se encuentra en algunos margays, mientras que otros tigrinas compartieron los mismos haplotipos que el de algunos ocelotes.

Con los datos trabajados, se pueden proporcionar tres explicaciones posibles:

A. Hay hibridación esporádica y reciente sin introgresión entre los tigrina, el margay y el ocelote. En este caso, pocos individuos híbridos deben ser detectados (Schwartz *et al*. 2004). Esta hipótesis sería apoyada cuando las hembras de las especies menos abundantes tienden a hibridarse con los

machos de especies abundantes. En apoyo de esta hipótesis el mayor conjunto de muestras (ATP8-16s rRNA) contenía tigrinas con los mismos haplotipos se encuentran en margays y ocelotes. También a favor de esta hipótesis, se detectaron dos individuos que podrían ser híbridos muy recientes. El primer caso involucró una muestra de tigrina cerca del Nevado del Ruiz, un volcán cercano a Manizales dentro del Departamento de Caldas de Colombia. Este espécimen no se incluyó en este trabajo, ya que sólo se amplificó para el gen 16S rRNA gen, pero sí mostró una secuencia de un gato doméstico. El segundo caso, aquí presentado, es el de una muestra de tigrina en la provincia de Salta, en el noroeste de Argentina, que tenía un haplotipo margay. Trigo *et al.* (2014), afirmaron que la hibridación entre *L. guttulus* y *L. geoffroyi* en el sur de Brasil comprende una de las hibridaciones más extensas detectadas en carnívoros. Es equivalente solamente a lobos y coyotes en Norteamérica (Benson *et al.* 2012, Monzón *et al.* 2014) y a gatos salvajes y domésticos en Hungría (Lecis *et al.* 2006). Si el caso es de una hibridación reciente en curso, podría representar el caso más grande (en referencia al tamaño del área geográfica: más de 4.000 km) de hibridación de cualquier carnívoro y posiblemente de cualquier mamífero. El argumento de esta hipótesis es el mismo hecho de un área geográfica extremadamente grande y que la mayor parte de los tigrina andinos colombianos comparten haplotipos de margays y ocelotes. Dos hechos adicionales no apoyan esta hipótesis. Primero, donde tigrinas, margay y ocelotes se encuentran en las mismas áreas geográficas de Colombia, Ecuador y Bolivia, tigrina es la más escasa. Los tigrina andinos son muy escasos y no son tan abundantes como los tigrina en el sur o el norte de Brasil. Por lo tanto, se espera que la hibridación reciente se haya producido entre machos margay-ocelote y tigrinas hembra (y ningún ADN mitocondrial de margays y ocelote debe registrarse en estas tigrinas actuales). En segundo lugar, en algunas zonas de Colombia y Ecuador donde se han muestreado tigrinas, no se han

reportado margays y ocelotes. Esto no está de acuerdo con hibridaciones muy recientes.

B. La segunda hipótesis, y tal vez la más factible, es una hibridación más antigua entre tigrina y margay y ocelote con posterior introgresión extensa dentro de los tigrina. El ejemplo clásico de este tipo es con *Mus musculus* y *Mus domesticus* en Dinamarca (Ferris *et al.* 1983). Otros ejemplos son los perros-coyotes (Mengel 1971), las especies de elefantes africanos (Roca *et al.* 2005), los osos polares (Hailer *et al.* 2012) y el complejo *Rattus ratus* (Pagés *et al.* 2013). Una extensa zona introgresiva conduce a la producción de enjambres híbridos (Nolte *et al.* 2006), o posiblemente a la formación de nuevas especies (Roy *et al.* 1994, Reich *et al.* 1999). La esterilidad unisexual junto con la dispersión de los machos favorece situaciones en las que las mitocondrias de una especie pueden persistir dentro del fondo genómico de una especie diferente después de la introgresión en una de las especies parentales (Roca *et al.* 2005). Esto es similar a lo que se informó para los tigrina del noreste de Brasil (*L. tigrinus*) y *L. colocolo* (Trigo *et al.* 2014). No detectaron ninguna evidencia de un proceso de mezcla en *L. colocolo* con ningún marcador molecular, y sí observaron la presencia sólo de ADNmt de *L. colocolo* en tigrina, pero no en otros marcadores moleculares diferentes. Interpretaron que el hallazgo era el resultado de un antiguo episodio de hibridación, cuya señal se diluyó posteriormente en el genoma nuclear debido a varias generaciones de retrocruzamiento. Este episodio antiguo debió de haber implicado cruzamientos entre las hembras de *L. colocolo* y los machos de tigrina del noreste de Brasil. Esto fue seguido por retrocruzamientos de híbridos femeninos con tigrinas masculinos (noreste de Brasil) por múltiples generaciones. Aunque éste podría ser el caso de los tigrina y *L. colocolo* en el noreste de Brasil y para lo que aquí se reporta sobre una gran fracción de las tigrinas, margay y ocelotes andinos, esto no es común en mamíferos. Si este fue el caso para una gran fracción de tigrinas andinas, la pregunta

debería ser si esto ocurría en un solo punto geográfico. Luego, ¿hubo una colonización masiva de estas tigrinas mixtas? ¿O la introgresión se produjo independientemente en muchas áreas geográficas diferentes simultáneamente o en momentos diferentes? En cualquier caso, parece que estos tigrinas andinos mixtos tienen más éxito a través de su rango de distribución geográfica que los taxones de tigrina descritos en 4.1 y 4.2. Tal como fue reclamado por Trigo *et al*. (2014), la introgresión morfológica puede seguir distribuciones que difieren de las de los marcadores neutrales, porque los rasgos morfológicos pueden ser controlados por los genes que están bajo la selección de adaptación. En este caso, el pequeño morfotipo y fisiología de los tigrina andinos puede hacer que esta especie tenga una mayor capacidad para vivir en el medio andino que los margay y los ocelotes cuyos morfotipos y fisiologías están más adaptados a vivir en tierras bajas.

Es posible que los marcadores moleculares neutrales (diferentes de ADNmt) de margay y ocelotes se encuentren en tigrinas. También es posible que los procesos genómicos que impliquen dominancia y/o epistasis en los *loci* relacionados con la morfología conduzcan a que los híbridos se parezcan más a los tigrina que a los margays y ocelotes. De ser así, esto también podría influir en su éxito relativo y en la dirección de su dispersión en favor de los tigrina. Esto podría ser similar al espécimen estudiado por Trigo *et al.* (2014) que tenía un fenotipo de *L. geoffroyi*, pero poseía los marcadores moleculares de *L. guttulus*. Además, el éxito de estos tigrinas mixtos andinos podrían haberse originado de la creación de una extensa variedad de recombinantes (Allendorf *et al.* 2001). Algunos de ellos pudieron haber tenido éxito en la conquista de nuevos hábitats a lo largo de las cordilleras andinas.

La pregunta para ambas hipótesis es, ¿cuál es el ADNmt original de estos tigrinas andinos hibridados? Una posibilidad es que el ADNmt original del tigrina andino no mixta sea el de los taxones 4.1 ó 4.2. Alternativamente, éste

podría provenir de un taxón de tigrina andino aún no detectado. Sólo un aumento en el tamaño de la muestra (el tigrina andino es muy escaso y es muy difícil obtener muestras de ellos) y la inclusión de análisis de más marcadores moleculares puede ayudar a responder a esta pregunta.

Trigo *et al.* (2008) comentaron que la situación inusual de una zona híbrida doble para tigrinas, *L. geoffroyi* y *L. colocolo* fue un caso natural no necesariamente influenciado por la actividad humana. Sin embargo, citaron otros dos casos, que probablemente fueron influenciados por disturbios humanos. Existe el caso de los coyotes (*C. latrans*) que se han hibridizado en diferentes niveles con lobos grises (*C. lupus*). Las poblaciones resultantes del lobo oriental se reconocen a menudo como taxones separados (*C. rufus* y/o *C. lycaon*) (Lehman *et al.* 1991, Roy *et al.* 1994, Kyle *et al.* 2006). También existe el caso de tres especies de focas (*Arctocephalus*); ellas están recolonizando una isla subantártica después de su extirpación histórica en el siglo XIX (Lancaster *et al.* 2006). Sin embargo, el caso que acá se trata es extremadamente más complejo. En Bolivia, en la misma zona geográfica, se detectaron dos tigrinas (las dos primeras capturadas en ese país), una con mitocondrias de un margay u ocelote y otra con mitocondrias de *L. geoffroyi*. Por lo tanto, la hibridación de tigrina con *L. geoffroyi* también ocurre fuera del sur de Brasil. En este caso, cuatro especies de gatos podrían estar involucradas (tigrina, margay, ocelote y *L. geoffroyi*). Sin embargo, si se tiene en cuenta toda la zona andina, se encuentra una zona híbrida afectada por hasta ocho especies diferentes de gatos (la tigrina centroamericana y transandina, los dos taxones de tigrina andina no mezclados detectados, margay, ocelote, *L. geoffroyi*, *L. colocolo* y la nueva especie encontrada). Por ejemplo, en los Andes colombianos, seis de estos taxones están presentes, y en los Andes ecuatorianos, por lo menos, cinco (o incluso hasta siete) de estos taxones existen.

Un hecho adicional a mencionar es que la hibridación antigua (o reciente) entre los tigrina andinos y los margays y ocelotes podría verse afectada por la posible separación incompleta del linaje entre margay y ocelote o hibridación entre las dos últimas especies. Todos los estudios publicados muestran que el margay y el ocelote son especies hermanas (Johnson *et al.* 2006, Li *et al.* 2016) con divisiones temporales de 1.58 MA (Johnson *et al.* 2006) o 2.47 MA (genoma nuclear) y 1.70 MA (mitogenómica) (Li *et al.* 2016). Por lo tanto, es muy probable que ambas especies compartan haplotipos mitocondriales por separación incompleta de linaje y/o eventos de hibridación ocurridos después de la especiación. Los ocelotes son considerablemente más grandes que los tigrina y probablemente los depredaron (González-Maya, com. pers.). Por lo tanto, hay una baja probabilidad de un cruzamiento basado entre un macho tigrina con un hembra ocelote. Hay una mayor probabilidad de una cruza entre un tigrina macho con una hembra margay (más similar en tamaño). Estas hembras de margay compartieron haplotipos de ocelotes por separación incompleta de linaje y/o hibridación entre ocelotes y margays.

C. Una hipótesis alternativa es la posibilidad de que el tigrina andino, con haplotipos de ADNmt muy similares de margay y ocelotes, no sean híbridos entre tigrinas y los otros dos gatos salvajes neotropicales. Por el contrario, esta tigrina sea una especie recientemente divergente del clado margay-ocelote a través de la separación incompleta de linaje (Neigel & Avise 1986). Las tres especies compartieron haplotipos mitocondriales idénticos o muy similares. Si es así, sólo en Colombia podríamos definir al menos cuatro diferentes especies de tigrinas y una nueva especie de gato pequeño manchado.

Así, en el área andina donde tradicionalmente solo vive *L. t. pardinoides*, también hay al menos dos o tres especies de tigrina, sin tener en cuenta *L.*

oncilla y las nuevas especies de gatos reportados aquí. En este momento, se desconoce cuál de estos taxones debe ser llamado *Leopardus pardinoides* y por lo tanto cuáles nombres deben recibir los otros taxones detectados. A lo largo de este trabajo se utilizó el concepto filogenético de especie, junto con las inferencias obtenidas de las obras de Trigo *et al.* (2008) y Trigo *et al.* (2013), para determinar estos nuevos taxones de tigrina. Sin embargo, el concepto biológico de especie (Mayr 1942, Mayr 1963) debe ser consultado para determinar la posible existencia de barreras reproductivas pre y post-cigóticas entre todos estos gatos pequeños en el Neotrópico. Además, habría que determinar el papel que juegan en la hibridación y la especiación en tigrinas. Sin embargo, la propensión a la hibridación en las especies de *Leopardus* se ve facilitada por la fuerte similitud cariotípica entre estos felinos, junto con una divergencia genética muy reciente (Wurster-Hill & Centerwall 1982, Davis *et al.* 2009, Cho *et al.* 2013).

5. Una de las muestras estudiadas mostró un fenotipo de piel y cuerpo claramente diferenciado de todos los otros gatos salvajes neotropicales que se han visto previamente. Este ejemplar fue capturado en el volcán Galeras en el departamento de Nariño en el sur de Colombia en 1989 y posteriormente depositado en la colección de Mastozoología del Instituto Humboldt (ID 5857, Villa de Leyva, Colombia). Tentativamente, se llamó a esta nueva especie como: *Leopardus narinensis* sp. nov. Ruiz-García 2016. El informe de esta nueva especie se puede ver en Ruiz-García *et al.* (2017).

Para definir con exactitud cuántas especies de tigrina se encuentran en América Central y en el área andina de América del Sur es esencial analizar los cromosomas X e Y y las secuencias de genes autosómicos nucleares como lo hizo Trigo *et al.* (2013) y Trigo *et al.* (2014) para los tigrina del sur y noreste de Brasil. Los felinos machos se dispersan más lejos que las hembras (Sunquist & Sunquist 2002), por lo tanto, el genoma mitocondrial transmitido por la madre no se prevé que refleje los

límites de las especies con la misma precisión que el cromosoma Y y marcadores autosómicos (Currat *et al.* 2008, Petit & Excoffier 2009). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, los resultados mitocondriales aquí presentados ponen de manifiesto que las relaciones filogenéticas, y los eventos de hibridación, para los tigrinas andinos, son mucho más complejas de lo que se pensaba anteriormente.

Además, la hibridación interespecífica y la introgresión son preocupantes para la conservación, ya que pueden conducir a una menor aptitud física y, en algunos casos, a la extinción de las especies parentales. Alternativamente, la hibridación puede conducir a una mayor aptitud (es decir, heterosis) a través de la generación de nuevas combinaciones genéticas y un mayor potencial adaptativo. También es de fundamental importancia diferenciar entre hibridación natural y mediada por humanos para desarrollar estrategias efectivas de conservación en favor de estos increíbles felinos.

5. CONCLUSIONES

Los felinos neotropicales presentan elevados, o muy elevados niveles de diversidad genética, lo cual puede significar que existen procesos reproductivos y demográficos que potencian elevados niveles de diversidad genética en los felinos en general y únicamente en casos de reducciones demográficas extremas o procesos de colonización en ambientes altamente desfavorables, podrían condicionar bajos niveles de diversidad genética.

Para el Jaguar y las especies del género *Leopardus*, los procesos de división se dieron durante el Pleistoceno, mientras que para el jaguarundí los procesos de divergencia claramente se inician durante el Plioceno medio y finales del Plioceno, sin embargo, las expansiones poblacionales para todas las especies coincidieron en darse durante el pleistoceno.

Los análisis de estructura espacial mostraron resultados desde los moderados a muy ligeros, lo que implica diferentes tipos de eventos vicariantes afectando limitadamente a esas especies. Contrariamente, el complejo de los tigrillos mostró una estructura espacial extremadamente fuerte, en forma de clina circular para los tres tipos de datos moleculares analizados para ese complejo de felinos.

El número de subespecies que se detectó molecularmente fue menor que el que se ha definido morfológicamente. Para los tigrillos, los resultados detectaron lo contrario, es decir, lo que se consideraba una sola especie, molecularmente, es un complejo de especies.

Se ha demostrado un amplio grado de hibridación en tigrina en otras áreas de América Latina anteriormente no estudiadas, así como muchas otras posibles especies de tigrina. Además, se ha demostrado que la situación con las tigrinas es extremadamente más compleja de lo que pensaban otros autores.

El análisis de secuencias procesadas para este trabajo junto con las obtenidas en GenBank mostró dos posibles especies nuevas para Colombia y Ecuador.

RECOMENDACIONES

Analizar muestras de las subespecies morfológicas de *P. o. arizonensis, P. o. hernandesii, P. o. veraecruscis, P. y. cacomitli, L. p. albescens, L. p. sonoriensis, L. p. nelsoni, L. p. pardalis, L w. oaxacensis, L. w. yucatanica, L. w. wiedii* y aumentar las muestras de *P. o. paraguensis*.

Hacer un estudio minucioso morfológico de los haplogrupos mitocondriales encontrados en el área de Panamá y la zona transandina colombiana y ecuatoriana para *P. y. panamensis*.

Aumentar el muestreo en Bolivia para desentrañar la asociación o no de *L. p. mitis – L. p. steinbachi*.

Utilizar marcadores nucleares para verificar especies en tigrillos.

LITERATURA CITADA

Abascal, F. 2007. Alineamiento de secuencias. Motivos, perfiles y dominios. Madrid, España. Centro Nacional de Biotecnología. 71 diapositivas.

Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control, AC. 19: 716–723.

Allendorf, F.W., R.F. Leary, P. Spruell & J. K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends Ecol Evol.16: 613–622.

Alho, C. J., T. E. Lacher Jr., J. M. Campos & H. C. Gonçalves. 1988. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: Levantamento preliminar de espécies. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 48, no. 2, p. 213-225.

Allen, J.A. 1919. Severtzow's classification of the Felidae. Bullet. Am. Mus. Nat. Hist., XLI (VI): 335-340.

Aranda, J. M. 1990. The Jaguar (*Panthera onca*) in the Calakmul reserve: morphometrics, food habits, and population density. M. S. Thesis. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Arbogast, B.S. & G. J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. Journal of Biogeography, 28: 819-825.

Arra, M.A. 1974. Distribución de *Leo onca* (L) en Argentina. Neotropica, 20(63):156-158.

Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Berminham, T. Lamb, L. E. Neigel, C. Reeb. C. Saunders. 1987. Intraespecific phylogeography: The mitocondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review in Ecology and Systematics, 18: 489 – 522.

Avise, J. C. & J. L. Hamrick. 1996. Conservation Genetics: Case Histories from Nature**.** Chapman & Hall, New York. 512 pp.

Avise, J. C., 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography, 36: 3–15.

Bandelt, H. J., P. Forster & A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16 (1): 37-48.

Behling, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. Rev Palaeobot Palynol. 99: 143–156.

Benson, J.F., B. R. Patterson, T. J. Wheeldon. 2012. Spatial genetic and morphologic structure of wolves and coyotes in relation to environmental heterogeneity in a Canis hybrid zone. Mol Ecol. 21: 5934–5954

Berta, A & L. G. Marshall.1978. South American Carnivora, i-viii, 1-48, pars 125. In: Westphal F (Ed.), Fossilium catalogus, I: Animalia (125). Ed. The Hague (Dr.Junk), Boston/London. 1978; Pp. 1-48.

Berta, A. 1983. A new species of small cat (Felidae) from the late Pliocene–early Pleistocene (Uquian) of Argentina. J Mammal. 1983; 64: 720–725.

Bisbal, F. J. 1986. Food habits of some Notropical carnivores in Venezuela (Mammalia, Carnivora). Mammalia. 50: 329- 340.

Broad, S. 1987. International trade in skin of Latin American spotted cats. TrAFFIC Bulletin. 9: 56-63.

Brooks, D. 1992. Felids on the Paraguayan Chaco. Cat News, 16:19-23.
Brown, D. F. 1983. On the status of the jaguar in the Southwest. Southwestern Nat. 28: 459-460.

Cabrera, A. 1934. Los yagures vivientes y extinguidos. Notas preliminares del Museo de la Plata. 2:9-39

Cabrera, A. & Yepes, Y. 1940. Mamíferos sudamericanos: vida, costumbres y descripción. Cía. Argentina de Editores, Buenos Aires, 370 pp

Cabrera, A. 1957. Catálogo de los mamíferos de América del sur. Revista del museo argentino de Ciencias naturales “Bernardino Rivadavia”. Ciencias Zoológicas. 4:1-307.

Carman, R. L. 1984. Límite austral de la distribución del tigre o yaguareté (Leo onca) en los siglos XVIII y XIX. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Zool. XIII (30):293-296.

Caso, A., C. López-González, E. Payán, E. Eizirik, T. de Oliveira, R. Leite-Pitman, M. Kelly & Valderrama, C. 2008. *Panthera onca*. The IUCN Red List of Threatened Species:e.T15953A5327466. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T15953A5327466.en. Downloaded on 05 February 2017.

Cho, Y.S, L. Hu, H. L. Hou, H. Lee, J. H. Xu, S. Kwon, S. Oh, H. M. Kim, S. Jho, S. Kim, et al. 2013 The tiger genome and comparative analysis with lion and snow leopard genomes. Nat Commun. 4: 2433.

Coates, A. G & J. A. Obando. 1996. The geological evolution of the central american isthmus. In: Evolution and Environment in Tropical America (eds Jackson JBC, Budd AF, Coates AG), University of Chicago Press, Chicago, IL. pp. 21–56.

Collier, G. E & O'Brien S. J. 1985. A molecular phylogeny of the Felidae: Immunological distance. Evolution. 39: 437–487.

Collins, N. M. 1990. The last rainforests. Mitchell Beazley und IUCN, London.

Cossíos, E.D., M. Lucherini, M. Ruiz-García, B. Angers. 2009. Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the Pampas cat (*Leopardus colocolo*). BMC Evol Biol. 2009; 9: 68-79.

Cossíos, E. D, S., M. Lucherini, M. Ruiz-García & B. Angers. 2012. Between high-altitude islands and high-altitude corridors. The population structure of the Andean cat (*Leopardus jacobita*). Endangered Species Research. 2012; 16: 283-29.

Crawshaw, J. R. & H. B. Quigley, 1991. Jaguar spacing, activity and habitat use in a seasonally flooded environment in Brazil. Journal of Zoology 223: 357-370.

Crawshaw, Jr., P. G. 1995. Comparative ecology of ocelot Felis pardalis and jaguar Panthera onca in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina. PhD. Thesis, University of Florida, Gainesville, USA. Pp190

Culver, M., W. E. Johnson, J. Pecon-Slattery & S. J. O'brien. 2000. Genomic ancestry of the American Puma (Puma concolor). Journal of Heredity 91: 186-197.

Cummings, D. J., J. M. Domenico, J. Nelson & M. L. Sogin. 1989. DNA sequence, structure and phylogenetic relationships of the small subunit rRNA coding region of

mitocondrial DNA from Podospora anserina. Journal of Molecular Evolution 28: 232–241.

Currat, M., M. Ruedi, R. J. Petit & L. Excoffier. 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. Evolution. 62: 1908–1920.

Davis, B.W, T. Raudsepp, A. J. Pearks Wilkerson, R. Agarwala, A. A. Schäffer, M. Houck, B. P. Chowdhary & W. J. Murphy. 2009. A high-resolution cat radiation hybrid and integrated FISH mapping resource for phylogenomic studies across Felidae. Genomics. 93: 299–304.

de Almeida, A.1990. Jaguar Hunting in the Mato Grosso and Bolivia. Safari Press, CA, USA.

de Blainville, H. M. 1843. Osteografie, ou description iconographique comparée du squelette et du systeme dentaire des mammiferes recents et fossiles pour servir de base á la zoologie et a la geologie, J. B. Bailliere et fils, París 2 (15):1-197.

Deutsch, L.A. 1975. Contribucao para o conhecimento da Panthera onca (Linee)-onca pintada (Mammalia-Carnivora). Curzamento de exemplares pintadas con melanicos. Ciencia Biol. Secao 5, Zoologica 5: 369-370.

Dittrich, L. 1979. Die vererbung des melanismus beim jaguar (*Panthera onca*). Zool. Garten 49: 417–428.

Doughty, R. W. & N. Myers. 1971. Notes in the amazon wildlife trade. Biol. Conserv. 3: 293- 297.

Drummond, A. J., S. Y. W. Ho, M. J. Phillips & A. Rambaut. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 4(5): e88.

Drummond, A. J & A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7: 214.

Drummond, A.J., M. A. Suchard, D. Xie & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution 29 (8): 1969-1973.

Eizirik, E., S. L. Bonatto, W. E. Johnson, P. G. Crawshaw Jr., J. C. Vie, D. M. Brousset, S. J. O'Brien & F. M. Salzano. 1998. Phylogeographic Patterns and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in Two Neotropical Cats (Mammalia, Felidae). Journal of Molecular Evolution 47: 613-624.

Eizirik, E., J. Kim, M. Menotti-Raymond, P. G. Crawshaw Jr. S. J. O'Brien & W. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (Panthera onca, Mammalia, Felidae). Molecular Ecology 10: 65-79.

Eizirik, E, T. Haag, A. Santos, F. Salzano, L. Silveira, F. Azevedo & M. Furtado. 2008. Jaguar Conservation Genetics. CAT News.Special Issue 4.

Emmons, L.H. 1987. Comparatíve feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. Behav. Ecol. Sociobiol. 20: 271-283.

Emmons, L. 1991. Mamíferos de los bosques húmedos de américa tropical: una guía de campo. FAN. Santa Cruz de la Sierra, BOL. 298 pp.

Ferris, S.D., R. D. Sage, C. M. Huang, C. T. Nielsen, U. Ritte & A. C. Wilson. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 2290–2294.

Frankham, D. *et al*. 2010. Introduction to conservation genetics. Second edition. Cambridge University Press. United Kingdom.133 pp.

Goldman, M.E., J. A. O'Brien, T. L. Ruffing, W. A. Schleif, V. V. Sardana, V. W. Byrnes, J. H. Condra, J. M. Hoffman & E. A. Emini. 1993. A nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active on human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to related inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 37(5):947–949.

Goldman, E. A. 1943. The races of the ocelot and margay in Middle America. Journal of Mammalogy 24: 372-385.

Gonyea, W. 1976. Behavioral implications of Saber-toothed felid morphology. Paleobiology. 4 (2): 332-242.

Gray, J. E. 1867. Notes on the skulls of the cats (Felidae). Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London 1867:258–277.

Green, R. 1991. Wild cat species of the world. Basset, Plymouth.

Grisolia, A. B., V.R. Moreno, F. Campagnari, M.P. Milazzotto, J.F. Garcia, C.H. Adania & E.B. Souza. 2007. Genetic diversity of microsatellite loci in Leopardus pardalis, Leopardus wiedii and Leopardus tigrinus. Genetics and Molecular Research 6 (2): 382- 389.

Grisolia, A. B. & Moreno-Cotulio, V. 2012. Molecular Markers and Genetic Diversity in Neotropical Felids. In: Analysis of Genetic Variation in Animals. Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/34103. Disponible en: http://www.intechopen.com/books/analysis-of-genetic-variation-in animals/molecular-markers-and-genetic-diversity-in-neotropical-felids.

de Oliveira, T.G. 1998. Herpailurus yagouaroundi. Mammalian Species 578: 1–6.

Guillot, G., F. Mortier, A & Estoup 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5: 712-715.

Eisenberg, J. F. 1989. Mammals of the Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. The University of Chicago Press, Chicago, 449 pp.

Goodwyn, F. Jr. 1970 Behavior, Life History, and Present Status of the Jaguarundi, Felis yagouaroundi (Lacepede) in South Texas. MA thesis, Texas A&M University, Kingsville, Texas, USA

Guggisberg, C. 1975. Wild cats of the world. Tapplinger Press. New York, US. 328 pp.

Haag, T. A. S. Santos, D.A. Sana, R. G. Morato, L. Cullen JR. P.G. Crawshaw JR, C De Angelo. M.S. Di Bitetti, F. M. Salzano & E. Eizirik. 2010. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). Molecular Ecology 19: 4906- 4921.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. Science 165: 131-137.

Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. Biodiversity and Evolution ,6: 451-476.

Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. Braz J Biol. 68: 917-947.

Hailer, F., V. E. Kutschera, B. M. Hallstrom, D. Klassert, S. R. Fain, J. A. Leonard, U. Arnason & A. Janque. 2012. Nuclear genomic sequences reveal that polar bears are an old and distinct bear lineage. Science 336: 344–347.

Hardy, M.E., J. M. Grady & E. J. Routman. 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. Molecular Ecology, 11: 2393 – 2403.

Harpending, H. C., S. T. Sherry, A. R. Rogers & M. Stoneking. 1993. Genetic structure of ancient human populations. Current Antrophology 34: 483-496.

Harpending, H. C. 1994. Signature and ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology 66:591-600.

Hatt, T. R. 1953. The Mammals. Pp. 45-77. In Faunal and archaeological researches in Yucatan caves. Cranbook Institute Scientific Bulletin. 33: 1-119.

Hemmer, H. 1978. Ein bastard Pampaskatze (Oncifelis pajeros) x oncilla (Oncifelis tigrinus). Säugetier Mitt.; 27:156–158

Hemmer, H. 1979. Gestation period and postnatal development in Felids. Carnivore 2 (2): 90-100.

Herrington, S. J. 1986 Phylogenetic relationships of the wild cats of the world: University of Kansas.

Hoelzel, A.R & A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hoelzel AR (Ed). Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom. 1992; Pp. 159–187.

Hoffstetter, R. 1952. Les mammifères Pléistocènes de la République de l' Equateur. Mémoires Société Géologique de France 31(66):1-391.

Holbrook, J. A., Caso, R. DeYoung, & M. Tewes. 2013. Population genetics of Jaguarundis in Mexico: Implications for future Research and Conservation. Wildlife Society Bulletin 37 (2): 336- 341.

Hollister, N. 1914. Two new South American Jaguars. Proc. U. S. Natl. Mus. 48 (169-170.

Hoogesteijn, R. & E. Mondolfi, 1992. El jaguar. Tigre americano. Armitano Editores. Venezuela. 182 pp

Hulley, J. T. 1976. Maintenance and breeding of captive jaguarundis. Felis yagouaroundi at Chester Zoo and Toronto International Zoo. Yerabook 16: 120-122.

Janczewski, D. N., W.S. Modi, S. J., O'Brien. 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae. Molecular Biology and Evolution 12: 690–707

Janecka, J., W. Chris, M. Tewes, A. Caso, L. Laack & R. Honeycutt. 2007. Phylogenetic relationships of ocelot (Leopardus pardalis albescens) populations from The Tamaulipan Biotic Province and implications for recovery. The Southwestern Naturalist 52 (1): 89-96.

Janecka, J., M. Tewes, L. Laack, A. Caso, L. Grassman & R. Honeycutt. 2014. Loss of genetic diversity among ocelots in the United States during the 20 th century linked to human induced population reductions. PLoS ONE 9 (2): e89384.

Jardine, W. 1834. The naturalist's library. Vol. 16. Mammalia. Part 2. Felinæ. W. H. Lazars, Edinburgh, United Kingdom

Johnson W. E, P. A. Dratch, J. S. Martenson & S. J. O'Brien. 1996. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. J Mammal Evol. 3: 97-120.

Johnson, W. E. & S. J. O'Brien. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. J Mol Evol. 44: S98–S116.

Johnson W. E., M. Culver, J. A. Iriarte, E. Eizirik, K. L. Seymour & S. J. O'Brien. 1998. Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. J Hered. 89: 227–232.

Johnson, W. E, J. P. Slattery, E, Eizirik, J. H. Kim, M. M. Raymond, C, Bonacic, R. Cambre, P. Crawshaw, A. Nunes & H. N. Seuanez. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. Mol. Ecol. (Suppl 1): S79–S94.

Johnson, W. E.; E. Eizirik, J. Pecon-Slattery, W. J. Murphy, A. Antunes, E, Teeling & S. J. O´Brien. 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science. 311:73-77.

Jorgenson, J.P. & K.H. Redford. 1993. Human and big cats as predators in the Neotropics, p. 367-390. In: N. DUNSTONE & M.L. GORMAN (Eds). Mammals as Predators. Oxford, Oxford University Press, 512pp.

Kerr, R. 1792. Class I. Mammalia: containing a complete Systematic Description, Arrangement, and Nomenclature, of all the known Species and Varieties of the Mammalia, or Animals which give suck to their young. Animal Kingdom. A. Strahan & T. Cadell, London; and W. Creech, Edinburgh, pp.400.

Kitchener, A. 1991. The Natural History of the Wild Cats. Comstock/ Cornell, Ithaca.

Konecny, M. J. 1989. Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America. In: Redford K. H, Eisenberg J. F (eds) Advances in Neotropical Mammalogy, 243–264. Sandhill Crane Press, Gainesville, Florida, USA.

Kurten B. 1965. The Pleistocene Felidae of Florida. Florida State Mus. Biol. Sci. Bull. 9: 216-273.

Kurten, B., 1973. Pleistocene jaguars in North America. Commentationes Biologica. 62:1-23

Kyle C. J., Johnson A. R., Patterson B. R. *et al*. 2006. Genetic nature of eastern wolves: past, present and future. Conserv Genet.7: 273–287.

Lacépéde, B. G. E. 1809. Felis yagouaroundi, Plate 10. In voyage dans lámerique meridionale (F. de azara. Imprimieur- Libraire, París (citado en Wozencraft, 1993)

Lanave, C., G. Preparata, C. Saccone, G. Serio, G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. Journal of Molecular evolution 20 (1): 86-93

Lancaster M. L., N. J. Gemmell, S. Negro, S. Goldsworthy & P. Sunnucks. 2006. Ménage a trois on Macquarie Island: hybridization among three species of fur seal (Arctocephalus spp.) following historical population extinction. Mol Ecol. 15: 3681–3692.

Lanteri, A. & V. Confaloneri. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía: 185-194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.) CONABIO, México.

Larson S. E. 1997. “Taxonomic re-evaluation of the jaguar”, Zoo Biology, 16:107-120.

Leal, R. P. 1979. Esaios sobre a reproducao do Jaguar em cautiveiro Pnthera onca. L. 1758. Acta Zoologica Lilloana 34: 107-112.

Lecis, R., M. Pierpaoli, Z. S. Biró, L. Szemethy, B. Ragni, *et al*. 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (Felis silvestris) using linked microsatellite loci. Mol Ecol. 15: 119–131.

Ledesma, C.O; M. A. Ledesma & R. J. Gunski. 2005. Descripción del yaguareté *Panthera onca* (Felidae: Pantherinae) de la Provincia de Misiones. Comparación con el cariotipo del gato doméstico. Tesis Licenciatura en Genética, Misiones, Argentina: Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. 210 p.

Ledru, M.P., P. I. S. Braga, F. Soubies, M. Fournier, L. Martin, K. Suguio & B. Turcq. 1996. The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol. 123: 239–257.

Lehman, N., A. Eisenhawer, K. Hansen *et al*. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. Evolution. 45: 104–119.

Leopold, A. 1959. Wildlife of Mexico. Univ. California Press, Berkeley. 568 pp.

Leyhausen, P.1963. Über südamerikanische Pardelkatzen. Z Tierpsychol. 20: 1365 627–640.

Leyhausen, P. & M. Falkena M.1966. Breeding the Brazilian ocelot-cat *Leopardus tigrinus* in captivity. Int. Zoo Yearb. 1966; 6: 176–178.

Li, G. B. W. Davis, E. Eizirik, W. J. Murphy. Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae). Genome Research. 2016; 26: 1-1338.

Librado, P. & J. Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25, 1451-1452 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.

Linnaeus, C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum clases, ordines, genera, species, cum characteribus, diferentes, synonymis, licis. Thenth ed. L. Salvii, Upssala. 1:1-824.

López, J. V., N. Yuhki, R. Masuda, W. Modi & S. J. O'Brien. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. Journal of Evolutionary Evolution 39: 174-190.

Ludlow, M. E., & M. E. Sunquist. 1987. Ecology and behavior of ocelots in Venezuela. National Geographic Research 3: 447-461.

McCarthy, T. J. 1992. Notes concerning the jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) in Caribbean lowlands of Belize and Guatemala. Mammalia 56: 302–306

Mellen, J. D. 1993. A comparative analysis of scent marking, social and reproductive behavior in 20 species of small cats (Felis). American zoologist, 33: 151-166.

Marshall L. G, S. D. Webb, J. J. Sepkoski & D. M. R. 1982. Mammalian evolution and the great American interchange. Science 215: 1351–1357.

Masuda, R., J. V. Lopez, J. Pecon-Slattery, N. Yuhki & S. J. O'Brien. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. Molecular Phylogenetics and Evolution 6: 351-365.

Mattern, M. Y. & D. A. Mclennan. 2000. Phylogeny and speciation in Felids. Cladistics 16: 232-253. Washington. District of Columbia. 501 pp.

Mayr, E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York, USA. pp 334.

Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. Pp 797.

Mearns, E. R. 1901. The American jaguars. Proc. Biol. Soc. Washington. 14: 137-143.

Mengel, R. M. 1971. A Study of Dog-Coyote Hybrids and Implications concerning Hybridization in Canis. J Mammal. 52: 316-336.

Menotti-Raymond M.A & S. J. O'Brien.1993. Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 3172–3176.

Miller, M. P. 2005. Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. Journal of Heredity 96 (6): 722-724.

Mondolfi, E. 1986. Notes on the biology and status of small eild cats in Venezuela. Pp 125-146. In: Cats of the world: biology. Conservation and management. National Wildlife Federation

Monterrubio-Rico T, J. F. Charre-Medellín, M. G. Zavala-Paramo, H. Cano-Camacho, M. Q. Pureco-Rivera & L. Leon-Paniagua. 2012. Evidencias fotográfica, biológica y genética de la presencia actual de jaguaroundi (*Puma yagouaroundi*) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 83: 826-833.

Montes, C. A. Cardona, R. McFadden, S. E. Morón & C. A. Silva. 2012. Evidence for middle Eocene and younger land emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure. Geol Soc Am Bull.124: 780–799.

Montes, C.; A. Cardona, C. Jaramillo, A. Pardo, J. C. Silva, V. Valencia, V. C. Ayala, L. C. Pérez-Angel, L. A. Rodriguez-Parra, V. Ramirez et al. 2015. Middle Miocene closure of the Central American sea way. Science 348: 226–229.

Monzón, J., R. Kays & D. E. Dykhuizen. 2014. Assessment of coyote–wolf–dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. Mol Ecol. 23: 182–197.

Moreno V. R., A. Grisolia, F. Campagnari, M. Milazzotto, C. Adania, J. F. Garcia, & E. Barreiros de Souza. 2006. Genetic variability of Herpailurus yagouaroundi, Puma concolor and Panthera onca (Mammalia, Felidae) studied using Felis catus microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29 (2) 290-293.

Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. Tree 10 (9): 373-375.

Murray, J. L. & G. L. Gardner.1997. Leopardus pardalis. Mammalian Species 548: 1-10.

Nabholz, B., S. Glemin, & N. Galtier, 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals-the longevity hypothesis. Mol. Biol. Evol. 25: 120–130

Nabholz, B., N. Uwimana & N. Lartillot. 2013. Reconstructing the phylogenetic history of long-term effective population size and life-history traits using patterns of amino Acid replacement in mitochondrial genomes of mammals and birds. Genome Biol. Evol. 5: 1273–1290.

Napolitano C, M. Benett, W. E. Johnson, S. J. O’Brien, P. A. Marquet, I. Barría, E. Poulin & A. Iriarte. 2008. Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic Andean cat species using genetic identification of faecal samples. Mol Ecol. 17: 678-690.

Napolitano, C. 2012. Filogeografía, inferencia demográfica y genética de la conservación del felino Leopardus guigna en el sur de Sudamérica. PhD thesis. Santiago, Chile: Universidad de Chile. p. 224.

Napolitano, C., W. E. Johnson, J. Sanderson, S. J. O’Brien, A. R. Hoelzel, R. Freer, N. Dunstone, K. Ritland, C. E. Ritland & E. Poulin. 2014. Phylogeography and population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid. Conservation Genetics. 15: 631-653.

Neigel, J. E & J. C. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Evolutionary Processes and Theory, E. Nevo and S. Karlin (eds.). Academic Press, New York. 515-534.

Nelson, E.W. & E. A. Goldman. 1933. Revision of the jaguars. Journal of Mammalogy. 14:221-240

Nielsen, R. & A. Beaumont. 2009. Statistical inferences in phylogeography. Molecular Ecology, 18: 1034–1047.

Nolte, A. W, J. Freyhof & D. Tautz. 2006. When invaders meet locally adapted types: rapid moulding of hybrid zones between sculpins (Cottus, Pisces) in the Rhine system. Mol Ecol. 15: 1983–1993.

Nowak, R. M. 1999. Walker's Mammals of the World. 6 ed. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Presser. 793 pp.

Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

O'Brien S. J, D. E. Wildt, D. Goldman, C. R. Merril & M. Bush. 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. Science. 221(4609):459–62.

O'Brien, S. J. 1986. Molecular genetics in the domestic cat and its relatives. Trends in Genetics 2: 137-142.

O'Brien, S. J., D. E. Wildt & M. Bush. 1986. The cheetah in genetic peril. *Sci Am*, 254: 68–76.

O´Brien, S. J., D. E. Wildt, M. Bush, T. M. Caro, C. FitzGibbon. I. Aggundey & R. E. Leakey. 1987. East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 84, 508–511.

O´Brien, S. J. 1994. The Cheetah's Conservation Controversy. Conservation Biology 4 (8): 1153-1155.

Oken, L. 1816. Okens Lehrbuch der Naturgeschichte. Dritter Theil. Zoologie. Mit vierzig Kupfertafeln. Zweite Abtheilung. Fleischthiere. - pp. [1], 1-1270

Oliveira, T.G. 1994. Neotropical cats: ecology and conservation. Sao Luiz: EDUFMA.

Olrog, C.C. y M. Lucero. 1981. Guía de los mamíferos argentinos. Fundación Miguel Lillo, Tucumán

Payán, E. y C. Soto. 2012. Los Felinos de Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Panthera Colombia. Ediprint. Colombia 48 pp.

Pagés M, E. Bazin, M. Galan, Y. Chaval, J. Claude, V. Herbreteau, J. Michaux, S. Piry, S. Morand & J. F. 2013. Cosson. Cytonuclear discordance among Southeast Asian black rats (Rattus complex). Mol Ecol. 22: 1019–1034.

Pecon-Slattery, J., S. J. O'Brien. 1998. Patterns of Y and X chromosomes DNA sequence divergence during the Felidae radiation. Genetics 148: 1245-1255.

Pennington, R. T & C. W. Dick. 2010. Diversification of the Amazonian flora and its relation to key geological and environmental events: a molecular perspective. Chapter 23 in C. Hoorn and F. P. Wesselingh (eds) Amazonia, Landscape and

Species evolution. Blackwell Publishing, Oxford, UK. Pp. 373-385. http://hdl.handle.net/2027.42/83292

Petit, R. J, & L. Excoffier. 2009. Gene flow and species delimitation. Trends Ecol Evol. 24: 386–393.

Pockok, R. I. 1917. The classification of existing Felidae. Annals and Magazine of Natural History, Series 8, 20:329–350.

Pockok, R. I. 1939. The races of jaguar (*Panthera onca*). Novit. Zool. 41:406-422.

Posada, D. & T. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian Approaches over Likelihood radio test. Systematic Biology 53(5): 793-808.

Posada, D & Crandall, K. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 98 (24): 13757-13762.

Prevosti, F. J. 2006. New material of Pleistocene cats (Carnivora, Felidae) from southern South America with comments on biogeography and the fossil record. Geobios. 39: 679–694.

Raaum, R. L, K. N. Sterner, C. M. Noviello, C. B. Stewart & T. R. Disotell. Catarrhine primate divergence dates estimated from complete mitochondrial genomes: concordance with fossil and nuclear DNA evidence. J Hum Evol. 2005; 48: 237–257

Rabinowitz, A. R., B. G. Nottingham. 1986. Ecology and behavior of the jaguar (*Panthera onca*) in Belize, Central America. J. Zool Lond. 210: 149 – 159.

Rabinowitz, A.R., 1986. Jaguar predation on domestic livestock in Belize. Wildlife Soc. Bull. 14, 170–174.

Ray, C. E, S. J. Olsen & H. J. Gut 1963. Three mammals new to the Pleistocene fauna of Florida, and a reconsideration of five earlier records. J Mammal. 44: 373-395.

Redford, K. H., A. Taber, & J. A. Simonetti. 1990. Biodiversity: there is more to biodiversity than the tropical rain forest. Conservation Biology 4:328– 330.

Redford, K. H. & J. F. Eisenberg. 1992. Mammals of the neotropics; the southern cone. The university of Chicago Press. 2: 1-430.

Reich D.E., Feldman M. W. & Goldstein D. B. 1999. Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. Molecular Biology and Evolution 16: 453-466

Roca, A.L., N. Georgiadis, S. J. O'Brien. 2005. Cytonuclear genomic dissociation in African elephant species. Nat Genet.37: 96–100.

Rogers, A. R., A. E. Fraley, M. J. Bamshad, W. S. Watkins & L. B. Jorde. 1996. Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. Molecular Biology and Evolution 13: 895-902.

Rogers, A. R & H. C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution 9: 552-569.

Roy M. S., E. Geffen, D. Smith, E. A. Ostrander & R. K. Wayne. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American Wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. Mol Biol Evol.11: 553–570.

Ruiz-García, M. 2001. Diversidad genética como herramienta de zonificación ambiental: Estudios moleculares (microsatélites) en el caso de Primates y Félidos neotropicales comportan una nueva perspectiva. En: Zonificación Ambiental para el Ordenamiento Territorial en la Amazonía Colombiana. Ed. Thomas Defler & P.A. Palacios. pp 85-108.

Ruiz-García, P. Orozco-terWengel, E. Payán & A. Castellanos. 2003. Genética de poblaciones molecular aplicada al estudio de dos grandes carnívoros (Tremarctos ornatus-Oso andino, *Panthera onca*-jaguar): lecciones de conservación. Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat. 1-4 (98): 135-158.

Ruiz-García, M., E, Payán. & D. Álvarez. 2006. DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. Genes Genet. Syst. 81: 115-127.

Ruiz-García, M. A. Murillo, C. Corrales, N. Romero – Aleán & D. Álvarez-Prada. 2007. Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes. Animal biodiversity and conservación. 2 (30) 115-130.

Ruiz-García M, C. Corrales & M. Pinedo-Castro. 2013. Craniometric and microsatellite genetic differentiation among putative ocelot subspecies (Leopardus pardalis) throughout latin america In: Ruiz-García, M., Shostell, J. (Eds). Molecular Population Genetics, Phylogenetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Carnivores. Nova Science Publishers, New York; Pp. 245–288.

Ruiz-García M, D. Cossíos, M. Lucherini, F. Yañez, M. Pinedo-Castro & B. Angers. 2013. Population genetics and spatial structure in two Andean cats (the Pampas cat, *Leopardus pajeros* and the Andean mountain cat, *L. jacobita*) by means of nuclear and mitochondrial markers and some notes on skull biometrics. Ruiz-García, M., and Shostell, J. M., (Eds.) in Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of Neotropical Carnivores. Nova Science Publishers, Inc. New York (USA). 2013; Pp. 187-246

Ruiz-García M, C. Vásquez, A. Murillo, M. Pinedo-Castro, D. Álvarez. 2013. Population genetics and phylogeography of the largest wild cat in the Americas: an analysis of the jaguar by means of microsatellites and mitochondrial gene sequences. In: Ruiz-García M, Shostell JM, (Eds.). Molecular population genetics, evolutionary biology and biological conservation of Neotropical carnivores. New York: Nova Science Publishers. Pp. 413–464.

Ruiz-García M & M. Pinedo-Castro. 2013. Population genetics and phylogeographic analyses of the jaguarundi (Puma yagouaroundi) by means of three mitocondrial markers: the first molecular population study of this species. In: Ruiz-García, M., Shostell, J. (Eds). Molecular Population Genetics, Phylogenetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Carnivores. Nova Science Publishers, New York. 2013; Pp. 245–288.

Rus-Hoelzel, A., J. V. Lopez, G. A. Dover & S. J. O'Brien. 1994. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of Carnivores. Journal of Molecular Evolution 39: 191-199.

Sadleir R. M. F. S. 1966. Notes on reproduction in the larger Felidae. International Zoo Yearbook. 1 (6) 184-187.

Salles, L. O. 1992. Felid phylogenetics: extant taxa and skull morphology (Felidae, Aeluroidae). American Museum Novitates. 3047: 1–67.

Sambrock J, E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory manual. 2nd edition. V1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989

Sanderson, E.W., K. H. Redford, C. Chetkiewicz *et al.* 2002. Planning to save a species: the jaguar as a model. Conservation Biology, 16, 58–72.

Severtzow, M. N. (1857-1858). Notice sur la classification multisériale des carnivores, spécialement des félides, et les études de zoologie générale qui s´y rattachent. Revue et Magazine de Zoologie. 9, 389-391, 433-439.

Seymour, KL 1989. *Panthera onca*. Mammalian Species 340: 1-9.

Schaller, G. B & P. G. Crawshaw, 1980. Movement pattern of jaguar. Biotropica 12: 161-168.

Simpson, G. G. 1941. Large Pleistocene Felines of North America. American Museum Novitates.1136:1-27 66.

Simpson, G. G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. Bullet. Amer. Mus. Nat. Hist. New York, 85: 1-3, 118-121.

Soares T., M. Telles, L. Resende, L. Silveira, A. Jácomo, R. Morato, J. Diniz-Filho, E. Eizirik, R. Brondani & C. Brondani. 2006. Genetics and Molecular Biology 29 (4) 735-740.

Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22 (21): 2688-2690.

Stehlik, J. 1971. Breeding jaguars Panthera onca at Ostrava Zoo Internat. Zoo. Yearb. 11: 116-118.

Steiper, M. E & N. M. Young. 2008. Timing primate evolution: Lessons from the discordance between molecular and paleontological estimates. Evolutionary Anthropology Issues, News, Rev. 17: 179–188.

Sunquist, M, F. Sunquist & D. E. Daneke. 1989. Ecological separation in a Venezuelan llanos carnivore community. In Redford, K. H., and Eisenberg, J. F. (Eds.). Advances in Neotropical Mammalogy. The Sandhill Crane Press, Inc., Gainseville, Florida. 614 pp.

Sunquist M & F. Sunquist. Wild cats of the world. Univ. of Chicago Press, Chicago. 2002. Pp 452.

Swank, W. & Teer, J. 1989. Status of the jaguar - 1987. Oryx 23: 14-21.

Schwartz, M. K., K. L. Pilgrim, K. S. McKelvey *et al*. 2004. Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications. Conserv Genet. 5: 349–355.,

Taanman, J. W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim Biophys Acta. 1410(2):103-23.

Talavera G & J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Syst Biol 2007; 56: 564–577.

Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725-2729.

Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathemathics in the life sciences. American Mathematical Society 17, 57-86.

Tello, J. L. 1986. The situation of the wild cats (Felidae) in Bolivia. Report prepared for CITES secretariat, Lausane, Switzerland. 67 pp.

Tewes M. E, D. D. Everett. 1986. Status and distribution of the endangered ocelot and jaguarundi in Texas. In: Miller S. D, D. D. Everett (eds) Cats of the World: Biology, Conservation, and Management, 147–158. National Wildlife Federation, Washington, DC, USA

Thalmann O, J. Hebler, H. N. Poinar, S. Paabo & Vigilant L. 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: A cautionary tale from analysis of humans and other apes. Mol Ecol. 2004; 13: 321–335.

Trigo T. C., T. Freitas, G. Kunzler, L. Cardoso, J. Silva, W. Johnson, S. J. O'Brien, S. L. Bonatto & E. Eizirik. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. Mol Ecol. 17: 4317–4333.

Trigo T.C., A. Schneider, T. G. Oliveira, L. M. Lehugeur & L. Silveira. 2013. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. Curr Biol. 23: 2528–2533.

Trigo T. C., F. P: Tirelli, T. de Freitas & E. Eizirik. 2014. Comparative Assessment of Genetic and Morphological Variation at an Extensive Hybrid Zone between Two Wild Cats in Southern Brazil. PLoS ONE. 9: e108469. doi: 10.1371/journal.pone.0108469.

Vaidya G, D. J. Lohman & R. Meier. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics. 2011; 27: 171–180.

Van der Hammen T. La paleoecología de Suramérica Tropical. Cuarenta años de investigación de la historia del medio ambiente y de la vegetación. In Historia, Ecología y Vegetación. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana para la Amazonía-Araracuara. 1992; pp. 1-411.

Vázquez–Domínguez, E., A. Hernández–Valdés, A. Rojas–Santoyo & L. Zambrano. 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fish species inhabiting highly seasonal systems. Revista Mexicana de Biodiversidad, 80: 181–192.

Vaughan, C. 1983. A report on dense forest habitat for endangered wildlife species in Costa Rica. Universidad Nacional. Heredia, CR. 10 p.

Walsh, P.S, D. A. Metzger & R. Higuchi. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques. 1991; 10: 506-513.

Wayne R. K., Benveniste R. E., Janczewsku D. N. & S. J. O´Brien. 1989. Molecular and biochemical evolution of the carnívora. In: Carnivore behavior, ecology and evolution (Gittleman JL, ed). Ithaca, New York: Cornell University Press. 465 – 494.

Wozencraft, W.C. 1993. Order Carnivora. In: Wilson, D.E. & Reeder, D.M. Mammal Species of the World, Second Edition. Smithsonian Institution Press, Washington and London.: 279-348.

Wozencraft, W.C. 2005. Order Carnivora: 532-545 (en) Wilson, D.E & Reeder, D.M. (eds.) Mammal Species of the World. A taxonomic and geographic reference. 3rd Edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Wultsch, C, L. P. Walts & M. Kelly. 2016. A Comparative Analysis of Genetic Diversity and Structure in Jaguars (*Panthera onca*), Pumas (*Puma concolor*), and Ocelots (*Leopardus pardalis*) in Fragmented Landscapes of a Critical Mesoamerican Linkage Zone. PLoS ONE 11(3): e0151043. doi: 10.1371/journal.pone.0151043.

Wurster-Hill, D. H & W. R. Centerwall.1982. The interrelationships of chromosome banding patterns in Procyonids, Viverrids and Felids. Cytogenet Cell Genet. 34: 178– 192.

Yuhki, N. & S. J. O'Brien. 1994. Exchanges of short polymorphic DNA segments predating speciation in Feline Major Histocompatibility complex class I genes. Journal of Molecular Evolution. 39: 22-33.

Zeller, K. 2007. Jaguars in the New Millennium Data Set Update: The State of the Jaguar in 2006. Wildlife Conservation Society's Jaguar Conservation Program, Takoma Park, MD.