

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Estructura genética poblacional de *Oligoryzomys longicaudatus*
(Rodentia, Cricetidae), reservorio natural del Hantavirus Andes”

por

Biol. Natalia Ortiz

Director: Dr. Raúl E. González Ittig

Director Asociado: Jaime J. Polop

Lugar de Trabajo

Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), CONICET-UNC,
Argentina.

Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

I D E A

2017

Córdoba, Argentina

COMISIÓN ASESORA

Dr. Raúl Enrique González-Ittig, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC.

Dr. José Waldemar Priotto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC.

Dra. Isabel Gómez Villafañe, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRUBUNAL

Firma:.....

Aclaración:

Firma:.....

Aclaración:

Firma:.....

Aclaración:

A mi familia...

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle a mi director Raúl por acompañarme y apuntalarme durante toda mi formación que comenzó desde la Tesina. Su incondicional apoyo, confianza en mí y constante predisposición para atender mis consultas/dudas/problemas fueron de fundamental importancia para que hoy pueda estar escribiendo esta Tesis. Sin dudas puedo decir que es un GRAN director. También quisiera agradecerle a Noemí Gardenal que a pesar de todas sus responsabilidades siempre estuvo cuando la necesité. Su gran compromiso y aportes definitivamente hicieron la diferencia. Cualquier sentimiento de ansiedad o angustia que tuve se disiparon al instante cuando hablé con ella. Nunca vi a alguien con la capacidad para resolver distintas situaciones tan eficientemente... Mil gracias por la dedicación. En esta misma línea quiero agradecer también a Marina Chiappero, que a pesar de no estar vinculada de manera directa con mi Tesis me ayudó muchísimo, tanto en la parte experimental, como en los análisis de los datos y la interpretación de resultados. Muchas gracias por la buena onda y la buena voluntad. Este proceso hubiera sido mucho más difícil sin tu ayuda. La calidez y deferencia con las que me trataron Raúl, Noemí y Marina me hizo sentir muy cómoda y contenida. Realmente puedo decir que fue un placer transitar este camino con ustedes.

También les agradezco mucho a mi Co-Director Jaime Polop y a los miembros de mi Comisión Asesora, José Priotto e Isabel Gómez-Villafañe, quienes siguieron atentamente cada uno de mis pasos a lo largo de mi doctorado y me hicieron valiosos aportes para mejorar cada vez más mi Tesis. Siempre estuvieron presentes a pesar de no compartir el lugar físico.

Siguiendo en el ámbito institucional quisiera agradecerles a Germán González y Manuel Sosa, quienes colaboraron con los análisis estadísticos y el dibujo de los mapas respectivamente para los análisis de *Causal Modeling* en la sección de Escala de Paisaje de esta Tesis. Valoro mucho la buena predisposición y la velocidad con la que respondieron a mi pedido.

Por otro lado quiero agradecerle a cada uno de los chicos con los que compartí el laboratorio: Carla de Anzamendi, Luci Sommaro, Mauri Renny, Noe Vera, Sole Acosta, Anita Ayala, Lau Trimarchi, Ima Cabaña, Ale Ferreiro, Luci Plum, Nati Cuellar, Noe Dambrosi, Diego Pinotti, Paula Rivera, Luis Vaschetto y Diego Uñates. Con ellos no solo compartimos el lugar de trabajo sino también muchos mates, grandes charlas, varias aventuras y muy lindas experiencias. Fueron una gran compañía y sostén... ¡¡¡no se puede decir que no nos divertimos!!! De hecho nunca disfruté tanto de ir a trabajar como lo hice ahí. Es un hermoso grupo con una calidez única, del cual saqué muy buenos amigos. También le agradezco a Ernesto Juan y Belén Avila por enseñarme todo lo que sé sobre el trabajo en el campo. Su buena

onda, paciencia y amabilidad hicieron de mi estadía en Cholila una excelente experiencia. Ernesto además me proveyó muestras, planillas, figuras, citas y explicaciones con la mejor de las predisposiciones cada vez que se lo pedí, al igual que Francisco Polop y Veronica Andreo.

Fuera del ámbito académico no puedo dejar de agradecerle a mi familia, mi sostén y puerto seguro. Cada uno de ellos juega un rol fundamental en mi vida. En particular quiero darle las gracias a mi mamá por darme alas para volar, por su amor desinteresado e incondicional entrega, por darme siempre lo mejor y velar por mi futuro. Ella me enseñó a luchar por lo que quiero con su gran ejemplo, es mi fuente de inspiración, a quien más admiro y a quien le debo todo lo que soy. En segundo lugar le agradezco a mi tío Miguel Angel, que más que eso es un padre para mí. A él también le debo en gran parte este logro, siempre me brindó la palabra justa en el momento indicado y puso todas sus expectativas en mí. Es mi otro ejemplo a seguir y a quién respeto profundamente. Mi familia me acompañó a lo largo de este camino, celebrando conmigo mis éxitos y conteniéndome en los momentos difíciles. No sé qué haría sin ellos...

Por otro lado, no puedo dejar de agradecer a mis amigos de la vida, Ema, Naty, Janet, Mario, Luci, Maru, Gon, Coty, Mari, Maty, Salo, Majo, Seba, Javi y Pablo por estar siempre a mi lado apoyándome y brindándome palabras de aliento. Son personas muy importantes en mi vida que dejaron huella en mí.

Por último agradezco a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, (FONCYT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por subsidiar el proyecto que enmarcó esta Tesis y a la UNC que me brindó el espacio y los recursos humanos para mi formación de postgrado.

Gracias a la Universidad Pública y Gratuita y a los que lucharon para que sea de esta manera.

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Comisión Asesora | i |
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Índice | v |
| Resumen | vii |
| Abstract | ix |
| 1. Capítulo 1: Introducción general | 1 |
| 1.1. Introducción: La estructura genética poblacional: implicancias en especies de interés sanitario | 2 |
| 1.1.1. Los hantavirus y <i>O. longicaudatus</i> | 9 |
| 1.1.2. Características ecológicas de <i>O. longicaudatus</i> | 13 |
| 1.1.3. Estudios genético-poblacionales previos en <i>O. longicaudatus</i> | 14 |
| 1.2. Objetivo general de la Tesis | 15 |
| 2. Capítulo 2: Estructura genética de <i>O. longicaudatus</i> a escala regional | 16 |
| 2.1. Introducción | 17 |
| 2.2. Objetivo específico | 22 |
| 2.3. Hipótesis y predicciones | 22 |
| 2.4. Materiales y Métodos | 22 |
| 2.4.1. Área de estudio | 22 |
| 2.4.2. Muestreo | 23 |
| 2.4.3. Extracción de ADN | 24 |
| 2.4.4. Amplificación de Microsatélites | 25 |
| 2.4.5. Análisis de datos | 26 |
| 2.5. Resultados | 28 |
| 2.6. Discusión y conclusiones | 34 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| 3. Capítulo 3: Estructura genética de <i>O. longicaudatus</i> | |
| a escala de paisaje | 41 |
| 3.1. Introducción | 42 |
| 3.2. Objetivo específico | 45 |
| 3.3. Hipótesis y predicciones | 45 |
| 3.4. Materiales y métodos | 46 |
| 3.4.1. Muestreo | 46 |
| 3.4.2. Análisis de datos | 47 |
| 3.5. Resultados | 51 |
| 3.6. Discusión y conclusiones | 59 |
| 4. Capítulo 4: Estructura genética de <i>O. longicaudatus</i> | |
| a escala local o microgeográfica | 63 |
| 4.1. Introducción | 64 |
| 4.2. Objetivos específicos | 66 |
| 4.3. Hipótesis y predicciones | 66 |
| 4.4. Materiales y métodos | 67 |
| 4.4.1. Muestreo | 67 |
| 4.4.2. Análisis de datos | 69 |
| 4.5. Resultados | 71 |
| 4.6. Discusión y conclusiones | 78 |
| 5. Conclusiones finales | 85 |
| 6. Referencias bibliográficas | 88 |
| 7. Material suplementario: Publicaciones derivadas de la Tesis | 105 |

Resumen

El ratón colilargo *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Cricetidae) es el principal reservorio del hantavirus genotipo Andes, asociado a la enfermedad humana denominada Síndrome Pulmonar por Hantavirus (HPS) en el sur de Argentina y Chile. Dada su importancia sanitaria, en esta Tesis doctoral se estudió la estructura genética poblacional del roedor a tres escalas geográficas: regional, de paisaje y local en la Patagonia Argentina. La escala regional incluyó cinco poblaciones separadas entre 60 y 315 km. La escala de paisaje incluyó cinco poblaciones de diferentes valles de la localidad de Cholila situadas en el bosque sub-antártico, separadas entre 6 y 27 km. La escala local abarcó muestreos en un sistema de grillas en el valle Villa Lago Rivadavia, con una separación máxima de 500 m entre sitios. Para realizar los estudios genético-poblacionales se amplificaron 8 loci de microsatélites especie-específicos y se utilizaron diferentes programas de análisis para cada escala geográfica. En la escala regional se encontró estructuración genética con disposición latitudinal, indicando bajos niveles actuales de flujo génico entre las poblaciones de *O. longicaudatus*. El elevado nivel de polimorfismo de los microsatélites permitió la detección de mayor diferenciación genética que estudios previos, con otros marcadores moleculares, no habían detectado. A escala de paisaje, también se detectó una diferencia norte-sur y se estimó que el flujo génico siguió una dirección asimétrica desde los valles cordilleranos hacia la población ubicada en la estepa patagónica. Al probar la resistencia de ciertos elementos del paisaje al flujo génico, se encontró que la zona urbana y los lagos ejercen alta resistencia, mientras que los ríos ejercerían una resistencia intermedia para las poblaciones del roedor en el área. Este resultado explicaría por qué algunas poblaciones cercanas son muy diferentes en su composición genética. De acuerdo con los resultados, la probabilidad de transmisión de este virus entre los roedores de diversos valles sería baja. Por último, a escala local, se determinó

que los machos presentaron mayores niveles de dispersión que las hembras, confirmando el sistema de apareamiento poligínico propuesto previamente para la especie. La estructura genética espacial en otoño estaría determinada por las hembras, que permanecerían filopátricas en defensa de sus nidos y crías. La dispersión temprana de los machos juveniles evitaría la competencia intra-sexual. En verano, ninguno de los sexos presentó estructura genética espacial; esto podría deberse al fenómeno de espaciamiento debido a las bajas densidades poblacionales reportadas para la estación y a las elevadas tasas de recambio entre ambientes contiguos con diferentes recursos (cobertura vegetal, disponibilidad de alimentos, etc). Respecto a los cambios inter-anales en la densidad se infirió que, ante aumentos poblacionales, los individuos emparentados (principalmente en las hembras) permanecieron más cerca unos de otros, disminuyendo su área de acción. Los individuos establecidos en una región "cercarían" la población inhibiendo la inmigración de individuos desde áreas vecinas hasta que la densidad poblacional descienda nuevamente. El estudio a diferentes escalas geográficas permitió detectar distintos niveles de estructuración genética en *O. longicaudatus* ampliando los conocimientos sobre esta especie.

Abstract

The long-tailed pygmy rice rat or “Colilargo” *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Cricetidae) acts as the main reservoir of the Andes Hantavirus, associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) in southern Argentina and Chile. The aim of this study was to examine the rodent’s population genetic structure at three different geographic scales: regional, landscape and local in the Argentinean Patagonia. The regional scale included five populations separated between 60 and 315 km. The landscape scale included five populations from different valleys in the locality of Cholila, situated in the sub-antarctic forest, separated from 6 to 27 km. The local scale included a grid sampling system in Villa. Lago Rivadavia valley separated up to 500 m. To perform the genetic studies, eight species-specific microsatellite loci were amplified and several analyzes for each geographic scale were used. At the regional scale, a latitudinally disposed genetic structure was found, indicating low levels of current genetic flow among populations of *O. longicaudatus*. The high levels of polymorphism of the microsatellites allowed the detection of genetic differentiation that could not be shown in previous studies, which used other molecular markers. At the landscape scale, a north-south genetic divergence was also detected and the estimated gene flow was asymmetric, from the mountain valleys to the patagonian steppe. The test that evaluated the resistance to gene flow of different landscape elements revealed that the urban zone and lakes would exert high resistance, while rivers would exert an intermediate resistance for the rodent populations in the area. This result would explain why some nearby populations differ so much in their genetic composition. According to these results, the probability of Hantavirus Andes transmission among rodent populations from different valleys would be low. Lastly, at the local scale, males were found to present

higher dispersion levels than females, confirming the polygynic mating system previously proposed for the species. In autumn, the spatial genetic structure would be determined by females, which would remain philopatric to defend their nests and newborns. The early dispersion of juvenile males would avoid intra-sexual competition. In summer none of the sexes exhibited spatial genetic structure, which could be due to a spacing behavior given the low density reported for the season, in combination with high replacement rates among contiguous environments with different resources (vegetal cover, food availability, etc.) Regarding inter-annual changes in population density, it was inferred that at high density values individuals (mainly the females) remained closer one to another, contracting their home ranges. These established individuals would “fence” the area inhibiting the immigration of individuals coming from adjacent areas until population density declines again. The study at different geographic scales enabled to detect different levels of genetic structure in *O. longicaudatus*, expanding the knowledge about this species.

1. Capítulo 1

Introducción General

1.1. Introducción

La estructura genética poblacional: implicancias en especies de interés sanitario

Una población, desde el punto de vista ecológico, es un conjunto de individuos de una misma especie que conviven en un área determinada, interactúan y se reproducen entre sí (Purves *et al.*, 2004). Desde el punto de vista genético, se considera una población a un grupo de individuos de la misma especie que viven lo suficientemente cerca como para que cualquiera de ellos potencialmente pueda aparearse con otro miembro del grupo y exhiban una continuidad reproductiva de generación en generación (Waples y Gaggiotti, 2006). Cada uno de esos individuos posee una combinación particular de genes, que en conjunto conforman el “pool” o acervo génico de dicha población. Desde este punto de vista, puede ser estudiada como una unidad reproductiva individual caracterizada por sus frecuencias alélicas. En muchas ocasiones las poblaciones de una especie sobreviven en parches de hábitat favorable; en otros casos la subdivisión puede deberse a variables comportamentales. Una población puede presentar estructuración genética si los apareamientos entre individuos no ocurren al azar a nivel intrapoblacional y/o entre subpoblaciones, de tal modo que la deriva genética las diferencia de manera aleatoria (Hartl y Clark, 1997).

La dispersión se refiere generalmente al movimiento ocasional de individuos entre poblaciones discretas, mientras que la migración se refiere al movimiento periódico hacia y desde un área geográfica específica que ocurre generalmente con un régimen estacional a través de una ruta definida (Freeland *et al.*, 2011). Tanto la dispersión como la migración deben preceder al flujo génico, pero

puede que ninguna de ellas resulte en él a menos que los individuos se reproduzcan exitosamente una vez que hayan llegado a su nueva locación. El flujo génico se refiere entonces al paso y establecimiento de los genes característicos de una población en el acervo genético de otra mediante la reproducción. En genética de poblaciones el término migración suele utilizarse como sinónimo de dispersión efectiva (es decir, dispersión que resulta en flujo génico) La migración puede provocar cambios en las frecuencias alélicas que será proporcional a la diferencia entre la frecuencia de la población receptora y el promedio de las poblaciones donantes; el efecto final es una homogeneización de las frecuencias alélicas que ayuda a integrar poblaciones y a evitar su divergencia. En poblaciones que han estado aisladas, el efecto inmediato es el aumento de la variabilidad genética de una población, lo cual es beneficioso en términos de posibilidades de subsistencia ante circunstancias ambientales adversas (Hartl y Clark, 1997).

El movimiento de individuos y sus genes entre poblaciones influye tanto en la dinámica como en la persistencia de las poblaciones de una especie, así como también en la distribución y abundancia de las especies y la estructura de las comunidades. Para medir estos niveles de movimiento existen tanto métodos directos como indirectos. Los primeros están basados en mediciones de la movilidad de los individuos a través de técnicas como por ejemplo de captura, marcado y recaptura y el uso de teledetección en un área geográfica restringida, entre otros. Estas técnicas permiten estimar la dispersión de los individuos dentro y entre poblaciones, las condiciones ecológicas en las cuales ocurre y los factores que intervienen en el proceso. La desventaja de este tipo de método es que requiere monitorear un gran número de individuos durante las mediciones; además subestiman las estimaciones de dispersión a larga distancia, ya que metodológicamente son difíciles de realizar y requieren de mucho esfuerzo y tiempo de seguimiento. Los métodos

directos presentan además la limitación de que sólo pueden medir dispersión instantánea, teniendo validez bajo las condiciones particulares de tiempo y espacio en que se realizan. Algunos tipos de movimientos pueden generar cierta confusión a la hora de estudiar la dispersión, como los que incluyen el nomadismo (movimientos de los individuos que se desplazan permanentemente sin establecer una nueva área de acción) y las excursiones (movimientos de los individuos que abandonan temporalmente sus áreas de acción retornando luego de un breve episodio exploratorio). Así, al capturar un individuo en poblaciones naturales, la distinción entre un individuo nómada y un viajero ocasional es difícil de establecer. Además, si no se elige adecuadamente la escala geográfica y temporal en que se realiza el muestreo, en relación con la historia de vida del organismo en estudio, se podría generar tanto sobrestimaciones como subestimaciones de los desplazamientos dispersivos (Lidicker y Stenseth, 1992). Los métodos indirectos, en cambio, permiten estimar la dispersión efectiva, es decir los niveles de flujo génico que dependen del número de dispersantes y de su éxito reproductivo en la nueva población (Número efectivo de migrantes). Estas estimaciones se realizan a través de datos obtenidos de marcadores moleculares como los genes mitocondriales, ISSR, SNPs, microsatélites, entre otros (Schweizer *et al.*, 2007).

En la Genética de Poblaciones, el modelo de Hardy-Weinberg permite definir la distribución de probabilidad de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas en una población ideal, que cumple una serie de supuestos como reproducción sexuada y al azar entre organismos diploides, generaciones no superpuestas, poblaciones de gran tamaño, migración mínima o nula, mutaciones desestimables y alelos no sujetos a selección natural. Este modelo predice que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantendrán de generación en generación si no hay fuerzas que alteren el equilibrio.

Los sistemas de apareamiento se pueden clasificar a grandes rasgos en dos tipos: al azar y no al azar. En aquellos apareamientos que ocurren al azar, la probabilidad de que dos individuos se apareen no depende de los genotipos de ninguno de ellos y la probabilidad de que un individuo se aparee con otro de un determinado genotipo será igual a la frecuencia de ese genotipo en la población. En contraposición, el apareamiento no al azar puede darse de dos maneras según el comportamiento respecto a los fenotipos individuales; se dice que es positivo cuando el apareamiento ocurre entre individuos con fenotipos similares y se lo considera negativo cuando ocurre entre individuos con fenotipos disímiles. Por último, el apareamiento entre parientes se conoce como endogamia, proceso que aumenta la homocigosis en desmedro de los heterocigotas de una población y su efecto es generalizado para todos los loci del genoma. La endogamia produce un cambio en las frecuencias genotípicas de una población pero no afecta sus frecuencias alélicas, por lo que no se considera una fuerza evolutiva. Los principales procesos que deteminan el mantenimiento de la diversidad y la diferenciación entre las subpoblaciones de una especie son la migración, la deriva genética y algunos tipos de selección natural (Hartl y Clark, 1997).

La deriva genética se refiere a las fluctuaciones en las frecuencias alélicas que ocurren por azar como resultado del muestreo aleatorio entre las gametas de una generación a otra. Los efectos de la deriva genética son mayores en poblaciones pequeñas, debido a que las fluctuaciones en las frecuencias alélicas pueden llevar a la pérdida de alelos poco usuales, reduciendo el número total de alelos, y por ende el parámetro poblacional denominado "tamaño efectivo" (el tamaño de una población ideal que muestra la misma tasa de pérdida de variación genética, debida a la deriva genética, que la población de interés). En poblaciones grandes, las frecuencias alélicas pueden oscilar sin fijación o pérdida de alguno de los alelos y

por lo tanto se mantiene el polimorfismo. A nivel interpoblacional, cuando no hay flujo génico o éste es muy restringido, la deriva genética puede causar diferenciación aleatoria en las frecuencias alélicas entre poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

En el estudio de la estructura genética poblacional de una especie existen dos aproximaciones para analizar los datos obtenidos a partir de los marcadores moleculares (como por ejemplo genes mitocondriales, ISSR, SNPs, microsatélites, etc): *a priori* y *a posteriori*. La primera aproximación se refiere al análisis basado en un número de poblaciones que se define de antemano en función de la disposición geográfica de las presuntas poblaciones o de algún otro criterio que parezca influir en la delimitación de esas poblaciones. La desventaja de utilizar los métodos *a priori* es que se corre el riesgo de que, por efecto Whalund, se considere varias poblaciones como una única entidad cuando en realidad son entidades distintas con frecuencias alélicas diferentes. Esto conlleva a subestimar la heterocigosis total, ya que en el efecto Whalund se observa un aumento de la homocigosis similar a la endogamia, que no se relaciona con los apareamientos entre parientes sino con las diferencias en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones. Este problema se puede evitar con las aproximaciones *a posteriori*, que se basan en la información genética (pudiendo incluir también información geográfica) para asignar a qué población pertenece un individuo, sin suponer poblaciones predefinidas. Este tipo de aproximación permite estimar la probabilidad de que un individuo pertenezca a una población en base a su genotipo multilocus, comparando sus frecuencias alélicas con las de todos los individuos de las distintas poblaciones analizadas (Freeland *et al.*, 2011).

Entre los estadísticos que estiman la estructura poblacional *a priori* se encuentran los estadísticos F de Wright (1951), quien los definió como coeficientes que miden el grado de correlación entre pares de alelos tomados al azar a diferentes niveles de organización.

De acuerdo con estos niveles de organización existen dos estadísticos F muy utilizados: F_{IS} y F_{ST} que miden cómo son los apareamientos a nivel de individuos de una subpoblación y entre sub-poblaciones respectivamente. El estadístico F_{IS} estima la desviación entre la heterocigosis observada y esperada debida a apareamientos no al azar dentro de cada sub-población; se expresa como: $F_{IS} = H_S - H_I / H_S$, donde H_S es la heterocigosis esperada en una sub-población suponiendo apareamientos al azar y H_I la Heterocigosis observada de los individuos en cada subpoblación. En el caso de que las sub-poblaciones se comporten como una población ideal, es decir que se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg, este coeficiente no difiere significativamente de cero; cuando existe endogamia o apareamientos por fenotipo similar, toma valores positivos significativos debido a una deficiencia de heterocigotas. En contraposición, puede tomar valores negativos en el caso de exceso de heterocigotas, debido a exogamia o a apareamientos entre fenotipos disímiles. El estadístico F_{ST} es una estimación de la varianza de las frecuencias alélicas entre sub-poblaciones. Se puede definir también como una medida de la reducción de la heterocigosis debido a la subdivisión de las poblaciones, en comparación con una población ideal no subdividida. Se expresa como: $F_{ST} = H_T - H_S / H_T$, donde H_T es la heterocigosis esperada en la población total suponiendo apareamientos al azar y ausencia de subdivisión. Sus valores oscilan entre cero (cuando todas las sub-poblaciones tienen las mismas frecuencias alélicas) y uno (cuando las sub-poblaciones tienen fijados distintos alelos) (Freeland *et al.*, 2011).

Con respecto a los métodos que analizan las poblaciones a *posteriori*, éstos utilizan una estadística basada en el teorema de Bayes (Bayes, 1763) y recibe el nombre coloquial de "estadística bayesiana". Esta metodología realiza "pruebas de asignación" para inferir la estructuración genética poblacional a partir del genotipo multilocus de los individuos. En general, calculan probabilidades de

pertenencia de los individuos a las poblaciones analizadas. Estos métodos han sido ampliamente utilizados para estimar tasas de dispersión entre poblaciones, analizar la distribución de las muestras en el espacio y detectar barreras que afectan el flujo de genes a escala de paisaje (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). Existen varios programas que realizan este tipo de análisis como Structure (Pritchard *et al.* 2000) y Geneland (Guillot *et al.* 2005), entre otros. Una limitante de los métodos de asignación mencionados es que la mayoría de sus algoritmos tienen el supuesto de que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y no presentan desequilibrio por ligamiento, cosa que no siempre se cumple en las poblaciones que se desea estudiar.

La estructura de una población afecta el grado de variación genética y los patrones de distribución de una especie. Los pequeños mamíferos de distribución geográfica extendida, con diferentes niveles de dispersión y de densidad poblacional, proveen una buena oportunidad para investigar el impacto relativo de fuerzas que modelan la estructura genética a diferentes escalas espaciales, ya que dicha estructura refleja la influencia de procesos evolutivos tanto históricos como recientes (Coulon *et al.*, 2004). Cuando estos mamíferos son además reservorio de patógenos que producen enfermedades en humanos, el panorama se torna más complejo, ya que la dinámica de la enfermedad se ve afectada por factores ecológicos y evolutivos no sólo del patógeno y del huésped humano, sino también del reservorio (Biek y Real, 2010). En ese sentido, conocer la ecología de los reservorios, su distribución geográfica y la estructura genética de sus poblaciones es de fundamental importancia para definir el área máxima en la cual la enfermedad puede ser endémica y predecir si la circulación del virus estará o no restringida geográficamente (Mills y Childs, 1998).

1.1.1. Los hantavirus y *O. longicaudatus*

El Síndrome Pulmonar por Hantavirus (HPS por su sigla en inglés) es una enfermedad emergente del continente americano. Fue descrita en 1993 debido a un brote en el sudoeste de los Estados Unidos (Arizona, Nuevo México, Colorado, Utah). El agente causal identificado fue un nuevo hantavirus en relación a los ya conocidos de Europa y Asia, los que producían el Síndrome Renal por Hantavirus. Este nuevo virus fue denominado "Sin Nombre" (Baró *et al.*, 1999). En Sudamérica, el hantavirus genotipo Andes fue identificado como el agente etiológico del HPS en la región sur de Argentina en 1995, a partir de un brote ocurrido en la localidad de El Bolsón (Lázaro *et al.*, 2000). Investigaciones ulteriores han identificado al menos 25 variantes genéticas o linajes del género Hantavirus en América del Sur, con reservorio en roedores cricétidos, varias de ellas asociadas a HPS (Enría y Pinheiro, 2000; Rivera *et al.*, 2015). En Argentina existen seis variantes confirmadas y asociadas a una determinada región del país: el genotipo Andes está presente en la región patagónica, el Orán y el Bermejo se encuentran en la región noroeste, el Lechiguanas y el Central Plata están presentes en la región del delta del Paraná en el centro del país, y el genotipo Jujituba se encuentra en el noreste (Levis *et al.* 1998; Lázaro *et al.*, 2000; Padula *et al.*, 2000; Padula *et al.*, 2007). El HPS es una enfermedad rural, cuyos factores de riesgo son las actividades de agricultura, la limpieza de domicilios y peridomicilios y de estructuras que han permanecido deshabitadas por algún tiempo que han sido infestadas por roedores (Enría y Levis, 2004).

A la hora de abordar el estudio sobre la dinámica de dispersión de los virus y sus reservorios surge una cuestión de fundamental importancia: la escala geográfica. Cuando se observa el rango de distribución de un objeto de estudio, debe tenerse en cuenta que esa distribución es en realidad la resultante de los distintos factores que

la modelaron en cada escala. Es decir, que la distribución espacial se ve afectada por diferentes procesos y factores ambientales según la escala considerada. En general, a escalas que van desde las globales a las regionales, las variables climáticas podrían considerarse los factores dominantes. A escala de paisaje, factores como la topografía y el uso y cobertura vegetal cobrarían mayor importancia en la determinación de la distribución y abundancia de las especies, mientras que a escalas locales y más pequeñas aún, el tipo de suelo, el microclima, la composición y estructura de la comunidad vegetal y las interacciones bióticas se vuelven muy significativos, así como la competencia entre individuos de una misma especie (Pearson y Dawson, 2003). En función de esto, si se desea obtener una profunda comprensión del sistema huésped-virus resulta imprescindible abarcar todas las escalas previamente mencionadas. Así se podrá predecir/explicar su distribución de una manera más integral y exhaustiva, ya que se estarán teniendo en cuenta tanto los patrones históricos como ecológicos del proceso (Pearson y Dawson, 2003). Un ejemplo de este tipo de estudio multiescala es el realizado por García-Mudarra *et al.* (2009), quienes analizaron la estructura genética poblacional del murciélago *Eptesicus isabellinus* (portador del virus de la rabia EBLV-1) a dos escalas geográficas distintas en Gibraltar. Los autores observaron que las poblaciones de Marruecos y la Península Ibérica presentaban poca divergencia genética, demostrando que el estrecho de Gibraltar no constituye un impedimento para el flujo génico de la especie. A una escala geográfica más reducida, encontraron elevada diferenciación genética entre colonias vecinas en Gibraltar, debido probablemente a la ausencia de flujo génico mediado por hembras entre esas colonias. Este estudio aportó a la dilucidación de los patrones históricos y ecológicos que influyeron en el modelado de las poblaciones del murciélago transmisor de rabia.

El objeto de estudio de esta Tesis, *Oligoryzomys longicaudatus* (Cricetidae, Sigmodontinae) o "ratón colilargo" (Figura 1), constituye un claro ejemplo de especie de interés sanitario por ser el reservorio natural del hantavirus genotipo Andes, agente etiológico del HPS en la Patagonia Argentina. Dicho virus ocasiona una infección crónica, persistente y asintomática en este roedor (Levis *et al.*, 1998; Padula *et al.*, 2004). Por tal motivo, conocer los procesos que modelan la distribución espacial de las frecuencias alélicas en *O. longicaudatus* provee información esencial para predecir la propagación y persistencia de la zoonosis en el área de estudio (Guivier *et al.*, 2011). En *O. longicaudatus* la transmisión del genotipo Andes se produce en forma horizontal entre los individuos que comparten el mismo hábitat; su vía principal son los aerosoles que se originan a partir de las excretas contaminadas como orina, heces y saliva. Se postula también que los encuentros agresivos entre machos adultos en el período de apareamiento proveen múltiples oportunidades para la transmisión (Padula *et al.*, 2004, Murúa y González, 1982; González *et al.* 2000). La infección en humanos surge como consecuencia de la exposición a roedores infectados y se piensa que ocurre fundamentalmente por vía de aerosoles a partir de excretas infectadas. En la mayoría de los hantavirus la transmisión interhumana es infrecuente, a excepción del genotipo Andes que ha sido identificado como el único que se puede transmitir de persona a persona (Padula *et al.*, 1998; Pinna *et al.*, 2004).



Figura 1: ejemplar de *Oligoryzomys longicaudatus* o "ratón colilargo".

La enfermedad humana es endémica y epidémica (epidemias focalizadas, como la ocurrida entre setiembre y diciembre de 1996 en la provincia de Río Negro). En Argentina los primeros casos retrospectivos datan de 1988. Es una enfermedad de notificación obligatoria (desde 1995 se han informado más de 1000 casos de HPS en la Argentina) y objeto de vigilancia intensificada desde 1997 (González Ayala, 2004; Bellomo *et al.*, 2009). El HPS se manifiesta en dos etapas: la etapa prodrómica o inicial, con fiebre y mialgias y la fase cardiopulmonar, caracterizada por la aparición súbita de insuficiencia respiratoria e inestabilidad hemodinámica. A esta segunda fase también se la conoce como Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus y posee una letalidad del 38%. El tratamiento es sintomático y de sostén; no se dispone de tratamiento específico, ni de vacunas preventivas (González Ayala, 2004).

1.1.2. Características ecológicas de *O. longicaudatus*

El ratón colilargo se encuentra comúnmente en los bosques templados de *Nothofagus* y áreas arbustivas a ambos lados de la Cordillera de Los Andes en Argentina y Chile. En Argentina, se distribuye desde los 36°S hasta los 51°S sobre la ladera oriental de Los Andes, hasta la Estepa Patagónica (Carbajo y Pardiñas, 2007). La especie se caracteriza por poseer elevada vagilidad y flexibilidad en el uso del hábitat, lo que causa importantes cambios en su área de acción a lo largo del año (Murúa *et al.*, 1986). Además, experimenta fluctuaciones en su densidad, con aumento durante el otoño (abril/junio) y disminución en verano (diciembre/febrero) (Contreras, 1972; Murúa *et al.*, 1986; Polop *et al.*, 2010; 2014). La expectativa de vida de *O. longicaudatus* es de aproximadamente un año, pero puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales, factores climáticos y a la competencia intra-específica relacionada con la densidad poblacional (Pearson, 1983; Murúa *et al.*, 1986). El período reproductivo comprende los meses de octubre a mayo, aunque varía entre años. Pueden encontrarse hasta cinco generaciones superpuestas por año (nacidos entre octubre y abril), con distintas tasas de supervivencia y máxima superposición a fines de otoño-principios de invierno (Murúa *et al.*, 1986; Polop *et al.*, 2010; 2014). Otro fenómeno que se observa en *O. longicaudatus*, son las explosiones demográficas denominadas "ratadas", que se generan por condiciones tales como inviernos cálidos, lluvias abundantes y la producción cíclica masiva de semillas de las plantas tipo bambú (*Chusquea quila*, *C. coleou* y *C. valdiviensis*) (Gallardo y Mercado, 1999; Lima *et al.*, 1999). Como consecuencia, aumenta la probabilidad de invasiones del roedor a asentamientos humanos, incrementando el riesgo de infección con el genotipo Andes (Calderón *et al.*, 1999).

1.1.3. Estudios genético-poblacionales previos en *O. longicaudatus*

Los estudios genético-poblacionales desarrollados en esta especie han sido principalmente a escala macrogeográfica. Palma *et al.* (2005) y González-Ittig *et al.* (2010) propusieron que *O. longicaudatus* habría experimentado una expansión reciente de rango. Torres-Perez *et al.* (2011) y Palma *et al.* (2012) detectaron una estructura geográfica marcada, con orientación norte-sur en poblaciones de la especie en Chile, mientras que del lado Argentino, González-Ittig *et al.* (2010) y Lessa *et al.* (2010) reportaron una elevada similitud genética entre localidades. Sin embargo, González-Ittig *et al.* (2010) encontraron haplotipos exclusivos en varias poblaciones, lo que sugería que los niveles de flujo génico actual entre ellas eran de bajos a moderados. Para elucidar los procesos microevolutivos tales como los determinados por flujo génico, los marcadores mitocondriales no son los más apropiados, ya que revelan procesos a mayores escalas tanto espaciales como temporales (Avice, 2000). Los microsátélites, en cambio, son vastamente utilizados para estos fines, ya que permiten estudiar con gran resolución la variación genética de las poblaciones a escala geográfica fina (Selkoe y Toonen, 2006). Estos marcadores son secuencias cortas de ADN (de entre 1 y 6 pares de bases) que se repiten en tándem (o secuencialmente) y no codifican para ningún gen de función conocida. Se han hallado en la mayoría de los organismos, tanto en genomas cloroplásticos como nucleares. Si bien se caracterizan porque las secuencias de ADN que los flanquean son específicos de cada especie, a veces es posible amplificarlos *in vitro* con los cebadores desarrollados para otras especies filogenéticamente cercanas. Segregan como co-dominantes y son altamente polimórficos, por lo que brindan información para estimar niveles recientes y/o contemporáneos de dispersión efectiva. Además, son los más adecuados para analizar el grado de parentesco y la estructura genética poblacional entre individuos muestreados en

áreas geográficas reducidas (Gerlach y Mulsof, 2000). Actualmente son los marcadores moleculares más utilizados en estudios de Genética del Paisaje.

En el estudio de González-Ittig *et al.* (2008) se describieron 8 loci de microsatélites específicos para *O. longicaudatus*; con estos marcadores se detectaron importantes cambios temporales en la composición genética del roedor a escala geográfica fina, que estarían relacionados con los altos niveles de recambio poblacional en un mismo sitio (González Ittig *et al.*, 2015). El estudio de la estructura genética a distintas escalas geográficas de *O. longicaudatus* permitiría evaluar el grado de contacto entre poblaciones, que a su vez posibilitaría estimar el riesgo de dispersión del hantavirus Andes entre ellas. También colaboraría con el conocimiento de los procesos que modelaron la estructura genética poblacional actual de la especie.

1.2. Objetivo general de la Tesis

Caracterizar la estructura genética de *Oligoryzomys longicaudatus* a distintas escalas espaciales (regional, de paisaje y local) como aporte al conocimiento de la dispersión del hantavirus Andes en la Patagonia argentina.

2. Capítulo 2

Estructura genética de *O. longicaudatus* a escala regional

2.1. Introducción

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas también resulten las más parecidas desde el punto de vista genético, ya que se supone que el flujo génico es más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. Este patrón se conoce como de "aislamiento por distancia" (Wright, 1943), modelo que asume equilibrio entre deriva genética y flujo génico. Uno de los métodos clásicos para evaluar si existe o no aislamiento por distancia es la prueba de Mantel, que estima la correlación entre matrices de distancias genéticas y geográficas. Si el coeficiente de correlación es positivo, indica que las poblaciones se distribuyen según dicho modelo. El patrón de aislamiento por distancia puede darse tanto en el caso donde los individuos se distribuyen de manera continua ("modelo de ambiente continuo"), como en el caso en donde existe una distribución en parches o demos. En este segundo caso se habla un modelo de "stepping-stone" (o de "las piedras de paso"), de una, dos o n dimensiones. En estos modelos existen dos tasas de migración diferentes: una para distancias cortas (m_1) y otra para la migración ocasional a larga distancia (m_2), cuyo valor es más reducido que aquel de " m_1 " por poseer menor probabilidad, pero cuando ocurre su impacto es muy alto, ya que trae alelos nuevos y diferentes. Para ambos modelos se utiliza la relación entre el índice F_{ST} y el número efectivo de migrantes ($N_e m$) para cuantificar el flujo génico (Rousset, 1997). El modelo "stepping-stone" de una dimensión predice que, en cada generación, los individuos tienden a migrar un paso en ambas direcciones entre demos adyacentes, mientras que el de dos dimensiones asume que la población entera está distribuida en forma de una matriz rectangular de demos, donde cada uno de ellos ocupa un punto. En cada generación, los individuos de cada demo

migran hacia demos circundantes, pero el número efectivo de migrantes de la población en cada demo sigue siendo el mismo (Kimura y Weiss, 1964). Por lo tanto, asumiendo este modelo de estructura de poblaciones, se puede afirmar que las poblaciones de una región alcanzaron un equilibrio entre deriva genética y flujo génico si hay una asociación entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones en esa región.

Un patrón consistente con el equilibrio entre flujo génico y deriva genética a nivel regional se adquiere si persisten las condiciones propicias para que la dispersión se mantenga estable en toda la región durante un período suficientemente largo (Whitlock y McCauley, 1999). Sin embargo, existen casos en los que aunque se rechace la hipótesis de equilibrio entre deriva y flujo génico a nivel regional, se puede obtener información valiosa sobre las influencias relativas de cada una de estas fuerzas opuestas en la estructura de las poblaciones analizadas (Hutchinson y Templeton, 1999). En función de esto, se pueden distinguir cuatro escenarios diferentes a través de la observación de la nube de puntos obtenida mediante el test de Mantel: A) Si tanto la distancia genética como la geográfica muestran correlación positiva, indica que transcurrió suficiente tiempo para que el flujo génico y la deriva genética alcancen un equilibrio. B) Si predomina el flujo génico por sobre la deriva, el test de Mantel no revelará una correlación significativa y todos los valores de F_{ST} serán bajos, aun cuando las poblaciones se encuentren alejadas geográficamente. Esto mismo provocaría la expansión reciente de rango. C) Si predomina la deriva genética, el test de Mantel no revelaría correlación significativa entre la distancia geográfica y genética y el valor del estadístico F_{ST} oscilaría entre magnitudes altas y bajas, pudiendo ocurrir que poblaciones cercanas tengan gran diferenciación genética y poblaciones lejanas tengan muy poca diferenciación. Esto mismo lo provocaría un ambiente fragmentado o especies con baja capacidad de dispersión. D) Si las

poblaciones próximas alcanzan un equilibrio debido a que a escalas geográficas pequeñas el flujo génico y la deriva genética se compensan, pero luego la distancia genética deja de estar correlacionada con la geográfica a mayores escalas, indicaría que a escalas geográficas amplias hay un predominio de la deriva por sobre el flujo génico. Generalmente esto se debe a que no ha transcurrido el tiempo suficiente para que dichas fuerzas se compensen a gran escala. Si las condiciones permanecieran estables y transcurriera el tiempo suficiente, este caso se convertiría en un modelo de aislamiento por distancia del tipo "stepping-stone" (Hutchison y Templeton, 1999).

La especie *Oligoryzomys longicaudatus* es un buen modelo de estudio gracias a su amplia distribución, ya que se han hallado registros de presencia en gran parte de La Patagonia (Carbajo *et al.*, 2009). La Patagonia como región se caracteriza por un marcado gradiente longitudinal en las precipitaciones y tipos de suelos y un gradiente latitudinal gradual de temperatura. Las precipitaciones decrecen de oeste a este y la temperatura de norte a sur. En la zona más occidental y húmeda dominan los bosques, con suelos de origen volcánico, mientras que hacia el este se extiende una transición desde pastizales hacia estepas con pastos y arbustos dispersos sobre aridisoles. En la zona de transición entre bosques y estepa, la vegetación consiste en arbustos y pastos. De acuerdo con estas características, Cabrera y Willink (1973) y Morrone (2015) dividieron a la Patagonia en dominios fitogeográficos, que a su vez se componen de diferentes provincias biogeográficas (Figura 2). El área de estudio de esta Tesis comprende dos dominios fitogeográficos: el Subantártico y el Andino-Patagónico (Cabrera y Willink, 1973). El Dominio Subantártico, y dentro del mismo la Provincia Subantártica, constituye una angosta faja en dirección norte-sur desde el sur de Mendoza hasta el extremo sur de Santa Cruz y Tierra del Fuego, en la que se incluyen los Andes Patagónicos. El clima es templado a frío y

húmedo, con abundantes nevadas y lluvias invernales (de unos 1000-3000 mm anuales). Ocurren heladas en la mayor parte del año y fuertes vientos del oeste. La geomorfología está definida por los Andes, que en el área de estudio alcanza alturas entre 600 y 3000m sobre el nivel del mar. El relieve es abrupto y escarpado, con picos nevados, valles glaciarios, geoformas de origen volcánico, abundantes cursos de agua y lagos que desaguan a las vertientes del Atlántico y el Pacífico. Dominan los bosques caducifolios o perennifolios de especies del género *Nothofagus* conocidas como falsas hayas del sur, aunque también se pueden encontrar praderas y turberas. Las especies más comunes del género *Nothofagus* en este dominio son *N. antartica* (Ñire) y *N. pumilio* (Lenga). También existe en menor proporción la conífera *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de cordillera) y en las laderas más protegidas, donde hay mayor humedad, se hallan abundantes ejemplares de *Nothofagus dombeyi* (Coihue). Esta especie, en conjunto con otras, conforma bosques de aspecto selvático con cañaverales, musgos y líquenes. Los bosques forman mosaicos con predominancia de especies arbóreas, entremezcladas con pastizales, arbustales, turberas, mallines y cultivos en función de la altitud, latitud, precipitaciones, exposición del suelo, usos humanos y eventos de alcance local tales como avalanchas, sequías, heladas o incendios (Cabrera y Willink, 1973).

Dentro del dominio Andino-Patagónico, la Estepa o Provincia Patagónica es una de las regiones fitogeográficas más australes de Sudamérica. Esta Provincia abarca el centro-oeste de Mendoza, oeste de Neuquén y Río Negro, casi la totalidad de Chubut y Santa Cruz y nordeste de Tierra del Fuego. El relieve está fundamentalmente caracterizado por mesetas escalonadas, elevaciones de escasa altitud, valles, cañadones y llanuras. En el oeste, en una estrecha franja que bordea los Andes patagónicos, existen serranías y lomadas paralelas a la Cordillera, separadas por pequeñas llanuras. Los suelos son, en su mayoría, petro-arenosos y pobres en materia orgánica. El

clima es templado-frío y seco, con fuertes vientos del oeste, nevadas en invierno y heladas durante casi todo el año. Las precipitaciones se concentran en la estación invernal y son menores a los 250 mm de promedio anual, aunque aumentan en proximidades a la Cordillera. Las temperaturas medias anuales oscilan entre los 10 y 14° C en el Norte y entre los 5 y 8° C en el Sur de la región. La vegetación es baja y achaparrada (Cabrera y Willink, 1973).

Conocer la estructura genética poblacional del roedor a escala regional, aportaría información relevante sobre el grado de contacto de las poblaciones de La Patagonia y, por ende, del riesgo de dispersión de Hantavirus entre ellas.

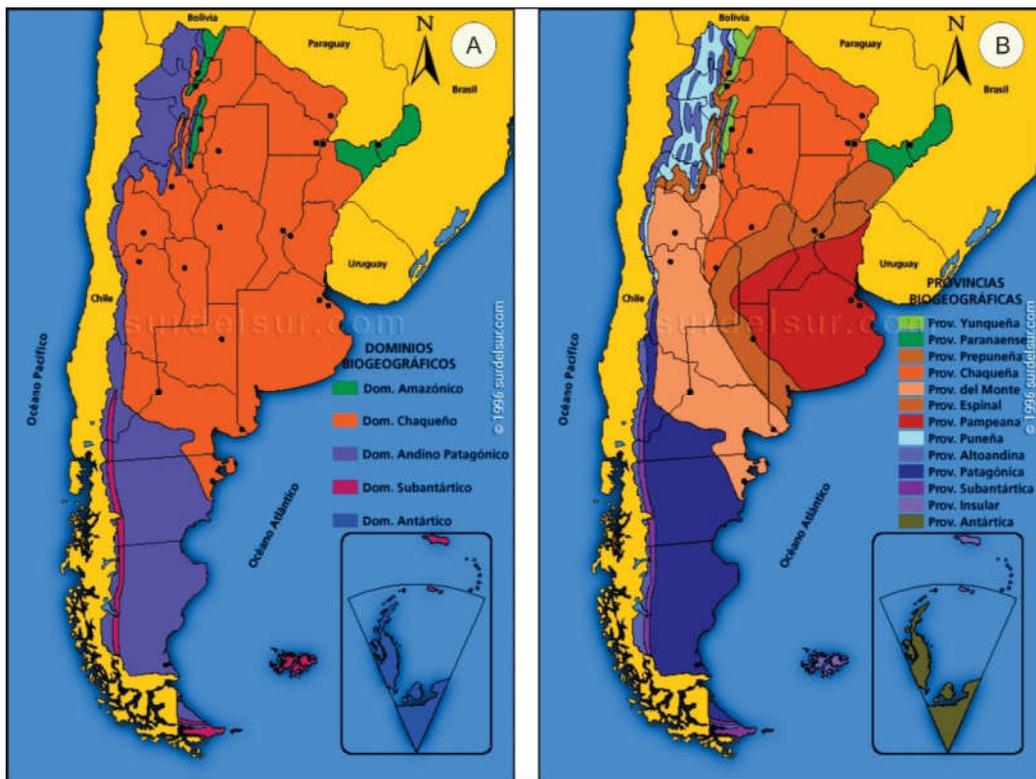


Figura 2 A) Dominios Biogeográficos **B)** Provincias Biogeográficas presentes en America de Sur. Obtenido de: <https://surdelsur.com/es/regiones-biogeograficas-argentinas/> (con "Auspicio y Declaración de interés cultural" de la Secretaría de Cultura, Presidencia de la Nación). Accedido el 20/10/2017.

2.2. Objetivo específico

- Estimar niveles de flujo génico a escala regional.

2.3. Hipótesis y predicciones

- A escala regional, la diferenciación genética sigue un patrón de aislamiento por distancia.

Predicciones: El nivel de divergencia genética alcanzará su máxima magnitud entre las poblaciones de Chubut (Leleque-Cholila) y Neuquén (Junín de los Andes), separadas por 315 km. Las poblaciones geográficamente más próximas presentarán mayor similitud genética entre sí.

2.4. Materiales y Métodos

2.4.1. Área de estudio

Las localidades que componen el área de estudio del presente capítulo son: Junín de los Andes ($39^{\circ} 56.127'S$, $71^{\circ} 5.364'W$) en Neuquén; Bariloche ($41^{\circ} 09'S$, $71^{\circ} 27'W$), El Bolsón ($41^{\circ} 59.345'S$, $71^{\circ} 33.665'W$) ubicadas en Río Negro; Leleque ($42^{\circ} 24.583' S$, $71^{\circ} 4.279'W$) y Cholila ($42^{\circ}28.785'S$, $71^{\circ}26.563'W$), pertenecientes a la provincia de Chubut. La localidad de Cholila, emplazada entre la Cordillera de los Andes y la precordillera, presenta 4 valles: El Cajón ($42^{\circ} 26.919'S$, $71^{\circ} 20.717'W$); El Blanco ($42^{\circ} 28.299'S$, $71^{\circ} 26.919'W$); El Rincón ($42^{\circ} 29.712'S$, $71^{\circ} 23.273'W$) y Villa Lago Rivadavia ($42^{\circ} 33.465'S$, $71^{\circ} 38.057'W$) (Figura 3). Junín de los Andes, Bariloche, El Bolsón y Cholila pertenecen a la provincia Subantártica dentro del dominio Subantártico, mientras que Leleque pertenece a la región fitogeográfica de la Estepa Patagónica, que se ubica en el dominio Andino-Patagónico.

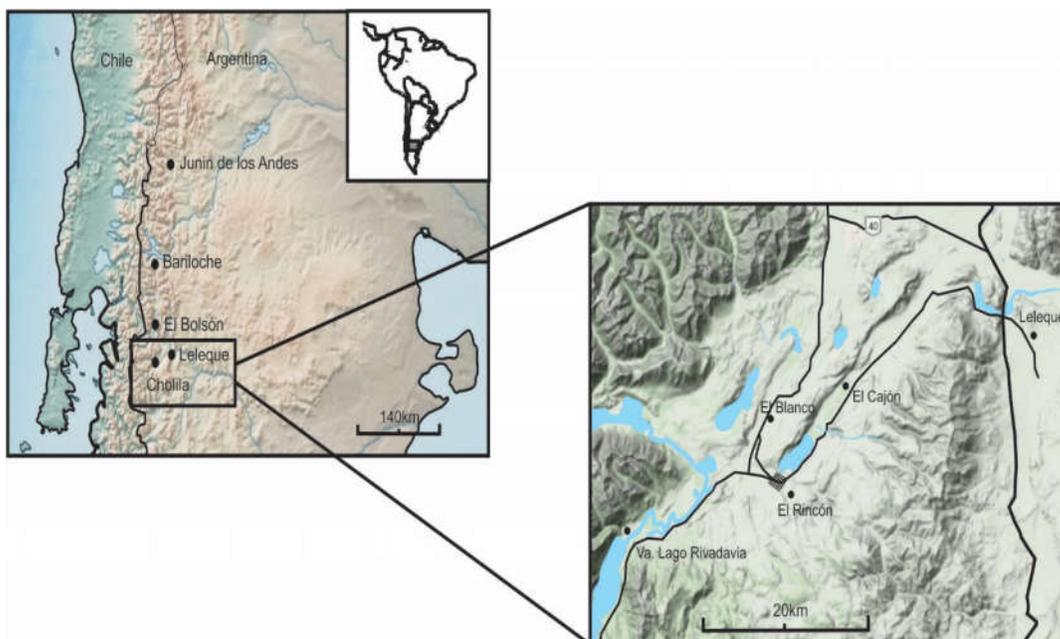


Figura 3: Ubicación geográfica del área de estudio y localidades muestreadas.

2.4.2. Muestreo

Las muestras destinadas a cumplir con el objetivo y sus correspondientes fechas de colecta fueron:

- Junín de los Andes (n = 14): marzo-abril de 2000.
- Bariloche (n=6): marzo-abril de 2000.
- El Bolsón (n=14): marzo-abril de 2000.
- Leleque (n=20): marzo-abril de 2007 y 2009.
- El Cajón (n=14): agosto de 2006.

Las muestras de las localidades de Junín de Los Andes, Bariloche y El Bolsón fueron obtenidas por personal del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH, Pergamino, Buenos Aires) en el año 2000. Inicialmente fueron utilizadas en estudios filogenéticos para determinar relaciones de ancestro-descendientes entre distintas especies del género *Oligoryzomys* (*O. longicaudatus*, *O. chacoensis*, *O. flavescens*, etc; González-Ittig *et al.* 2002 y Rivera *et al.*, 2007) y

luego, en un estudio filogeográfico a escala macro (Gonzalez-Ittig *et al.*, 2010). Los muestreos constaron de líneas que abarcaron varios ambientes; se realizaron capturas vivas utilizando trampas Sherman.

Las muestras de las localidades de Leleque y El Cajón fueron obtenidas por el Grupo de Investigación en Ecología Poblacional y Comportamental (GIEPCO, Universidad Nacional de Río Cuarto), en colaboración con el INEVH, entre los años 2006 y 2009, utilizando un sistema de muestreos por remoción. Se colocaron trampas en líneas con un largo total de unos 100 m, con una separación de 200 m entre ellas. Dentro de cada línea se colocaron 20 estaciones de trampeo, con un intervalo de 5 m entre ellas, alternando Sherman y captura muerta. El cebo utilizado fue una mezcla de grasa vacuna y manteca de maní. El procedimiento se realizó durante 3 noches consecutivas cada temporada. Los ejemplares capturados fueron trasladados dentro de bolsas herméticas hasta el laboratorio de campaña, donde se realizó el procesamiento. Se registraron la especie, el sexo y las medidas corporales (peso, longitud total y longitud de cola). A todos los ejemplares se les sacó sangre para los estudios virológicos del INEVH y se les cortó la punta de la cola (conservadas en alcohol 85%) para los estudios en el laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución. Tanto las muestras utilizadas de Leleque y Cholila para cumplir con los objetivos de este capítulo como los del siguiente (escala de paisaje) se obtuvieron de los muestreos que formaron parte de las Tesis doctorales de Francisco Polop (2011, UNRC) y Verónica Andeo (2012, UNRC).

2.4.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN de cada muestra se realizó mediante la técnica de extracción salina (Bruford *et al.*, 1992), en mesa de flujo laminar, tomando todas las precauciones necesarias para el manejo de material de riesgo (potencialmente infectado). Su cuantificación se realizó a través de la comparación con el marcador λ /HindIII en geles

de agarosa al 0,7%, utilizando bromuro de etidio para su visualización. En general se obtuvo ADN total de buena calidad.

2.4.4. Amplificación de Microsatélites

En cada muestra se realizaron amplificaciones por PCR con cebadores específicos para *O. longicaudatus* descritos en González-Ittig *et al.* (2008): Olong1, Olong4, Olong5, Olong6, Olong7, Olong9, Olong10 y Olong12 (Tabla 1). Los cebadores *forward* de cada locus fueron marcados con fluorocromos (Invitrogen, Argentina). Olong7 y Olong9 se marcaron con 6-FAM (azul), Olong1 y Olong10 se marcaron con VIC (verde), Olong5 y Olong6 con NED (amarillo) y Olong12 con PET (rojo). Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla de 10 μ l, con la siguiente composición: 1x buffer de reacción [75mM Tris-HCl; pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 Tween 20]; 130 μ M de dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 0,6 μ M de cada cebador; 1,0 U de Taq polimerasa (Fermentas Life Sciences, EEUU) y 5ng de ADN total (la concentración de MgCl₂ varió según las condiciones de amplificación de cada locus). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra UnoII (Biometra, Alemania), con una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de ciclos (cuyo número varió según el locus) de 30s a 94°C, 30s a la temperatura de hibridación de los cebadores y 30s a 72°C, finalizando con una extensión 5 min a 72°C.

Los alelos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando el sistema de buffer Tris-Glicina (White *et al.*, 2002) y se tiñeron con el sistema de nitrato de plata para su visualización y control de calidad de la amplificación (Neilan *et al.*, 1994). Luego los productos de PCR de buena calidad se enviaron para analizar mediante genotipado en secuenciadores automáticos (genotipado multilocus) en compañías que ofrecen el servicio (Macrogen Inc.; Corea del Sur). El análisis de los tamaños de los alelos se realizó con el programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, 2006). Luego se obtuvieron los valores definitivos con el

programa MsatAllele 1.02 (Manaster, 2002) del paquete R; este programa brinda un novedoso método que utiliza la información de la distribución de los tamaños de fragmentos de microsatélites registrados en una base de datos en R, para clasificarlos según las clases de tamaño que correspondan a los diferentes alelos.

Tabla 1: Loci de microsatélites específicos para *O. longicaudatus* y sus características.

| Locus | Secuencia (5'-3') | Motivo repetido | TA (°C) | [MgCl ₂] | Nº ciclos |
|---------|----------------------------------------------------------------|-----------------|---------|----------------------|-----------|
| Olong1 | F: TAATACCACAGTCACTGGAC R: CTTGATGAATGAGAAGCCAAGCTAC | (CA)21 | 55 | 1,2 | 20 |
| Olong4 | F: CTCACAAGGAGCACTGCACAGTCC R: TCTCTGTTAGGTAAGTACTGAGACACGA | (TG)4TT(TG)16 | 58 | 1,6 | 24 |
| Olong5 | F:AAGTGTGATATCTTGGACTGCCAGC R: GCTGTACAGCCCAAGTCCATCAC | (CA)2GA(CA)28 | 63 | 1,2 | 25 |
| Olong6 | F: AATGCTGTCCTGATACAGACACTG R: GCAAAGCATTCTTAGCGTGT | (CA)9 | 55 | 1,2 | 24 |
| Olong7 | F: GTTATCGAGTACCCAGTGGTCAT R: CAGCACATTACCTCACCTCC | Imperfecto† | 56 | 1,6 | 24 |
| Olong9 | F: CCTCACACAGGGGTGCATAAACGC R: CAGAATGTTCTCGAGTATGCGT | (CA)7CCTA(CA)16 | 58 | 1,2 | 29 |
| Olong10 | F: ACACCCTTACTTAAGAGCCACAC R: ATGGTAGCAGTTTTCCCAACGTT | (AC)15 | 56 | 1,2 | 22 |
| Olong12 | F: TGTGGGCACCTGGGAGA R: CACTTACATATACACCCTCATGGG | (TG)25(GT)5 | 57 | 1,2 | 28 |

† (TG) 8TTT (GT)2(AC) 2A (TG)3(TA) 3.TA: Temperatura de Annealing.

2.4.5. Análisis de datos

Para estimar el grado de polimorfismo en cada población se calcularon diferentes índices utilizando el programa Genalex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006) (Tabla 2).

Con respecto al análisis de la estructura genética *a priori*, se evaluó la diferenciación genética entre poblaciones con un análisis de varianza molecular (AMOVA) y se calculó el estadístico F_{ST} con el programa Arlequin 3.5.1.2 (Schneider *et al.*, 2000). Para ello se utilizó un nivel de significación de 0,05 y 10000 permutaciones.

Para probar la posible existencia de aislamiento por distancia se realizó un test de Mantel con el programa TFPGA 1.3. (Miller, 1997), que calcula la correlación entre la distancia genética ($F_{ST}/[1-F_{ST}]$) y el logaritmo natural de la distancia geográfica (Rousset, 1997). Las computaciones fueron realizadas con 1000 permutaciones. Las relaciones entre las poblaciones se representaron a través de dos fenogramas, el primero utilizando el método de Neighbour-Joining con el programa Populations 1.2.31 (Langella, 2009) y el segundo, utilizando el método UPGMA y la distancia de Nei (Nei, 1972) con el programa TFPGA 1.3. El método UPGMA consiste en un ligamiento promedio no ponderado, mientras que el Neighbour-joining utiliza el método de mínimos cuadrados para calcular la distancia entre dos poblaciones; la distancia de Nei estándar combina las frecuencias alélicas de distintos sistemas genéticos en una única medida que indica la diferencia entre pares de poblaciones.

Con respecto a los análisis de la estructura genética *a posteriori*, para visualizar espacialmente el número de grupos genéticos (K) se utilizó el programa Geneland 2.13.2 (Guillot *et al.*, 2005), que emplea el método bayesiano junto con las coordenadas geográficas para detectar discontinuidades espaciales entre las poblaciones. Las corridas preliminares se realizaron con valores de K entre 1 y 10, ejecutando 10000000 iteraciones y tomando muestras cada 1000. Dado que K=4 fue el de mayor probabilidad en las corridas preliminares, para el resultado final se realizaron 3 corridas independientes con K fijado en 4. Se utilizó el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas y se emplearon 1000 iteraciones de *burnin*. Además, se agregó un análisis de asignación individual utilizando la salida del programa Geneland y se calcularon índices descriptivos de la variabilidad genética poblacional. También se examinó la estructura genética con el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007), que implementa el algoritmo bayesiano para calcular el número más probable de grupos genéticos o clusters

a posteriori. Se asumió la existencia de poblaciones mezcladas y frecuencias alélicas correlacionadas. El análisis se realizó con valores de K entre 1 y 5 usando 2500000 iteraciones de *burnin* de un total de 7500000 iteraciones. El procedimiento se repitió 10 veces para cada K. El valor óptimo de K se calculó con el método de ΔK descrito por Evanno *et al.* (2005), usando el software en línea Structure Harvester 0.6.7 (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/). Las corridas múltiples de Structure se analizaron con el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) utilizando el algoritmo Greedy. Con este resultado se construyó el gráfico de barras de cada individuo empleando el programa DISTRUCT v 1.1 (Rosenberg, 2004). Para determinar el grado de ancestría mixta se utilizó el criterio de 0,2 establecido por Vähä y Primer (2006).

2.5. Resultados

En general, la heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) no difirieron significativamente entre sí, indicando que todas las poblaciones analizadas están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El número promedio de alelos diferentes de las poblaciones osciló entre 7,375 y 11,5 y el número promedio de alelos privados de población osciló entre 0,250 y 1,125 (Tabla 2).

Tabla 2: índices determinantes del grado de polimorfismo en poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus*.

| Población | Latitud | Longitud | N | Na | Ne | Ho | He | Valor P | UHe | Nº Exclus. Alelos | %P | F |
|--------------------|--------------|--------------|----|------------------|---------------------|------------------|-----------------|---------|-----------------|-------------------|-----|------------------|
| Junín de los Andes | 39°56'07.6"S | 71°05'21.8"W | 14 | 11.250± 1.359 | 7.688 ± 1.196 | 0.857± 0.027 | 0.842± 0.029 | 0.410 | 0.873± 0.030 | 1.125± 0.295 | 100 | -0.021± 0.011 |
| Bariloche | 41°08'60.0"S | 71°27'00.0"W | 6 | 7.375± 0.9740 | 6.050 ± 0.974 | 0.792± 0.121 | 0.786± 0.047 | 0.480 | 0.858± 0.051 | 0.250± 0.164 | 100 | 0.041± 0.147 |
| El Bolsón | 41°59'20.7"S | 71°33'39.9"W | 14 | 10.500± 1.086 | 6.935 ± 0.937 | 0.813± 0.062 | 0.828± 0.031 | 0.383 | 0.859± 0.032 | 0.375± 0.183 | 100 | 0.029± 0.050 |
| Leleque | 42°24'35.0"S | 71°04'16.7"W | 20 | 10.625± 1.523 | 6.860 ± 0.933 | 0.825± 0.043 | 0.808± 0.054 | 0.420 | 0.828± 0.056 | 0.625± 0.498 | 100 | -0.038± 0.043 |
| El Cajón | 42°26'55.1"S | 71°20'43.0"W | 14 | 9.250± 1.306 | 6.345 ± 0.992 | 0.741± 0.0359 | 0.796± 0.051 | 0.205 | 0.826± 0.053 | 0.375± 0.263 | 100 | 0.095± 0.085 |

Abreviaturas: **Na:** Número de alelos promedio; **Ne:** Número promedio efectivo de alelos (número promedio de alelos ponderado en función del tamaño muestral); **Ho:** Heterocigosis observada; **He:** Heterocigosis esperada; **Valor P:** Significancia estadística entre Ho y He; **UHe:** Heterocigosis esperada no sesgada; **Nº exclus. Alelos:** Nº de alelos únicos en una única población; **%P:** Porcentaje de loci polimórficos; **F:** índice de fijación.

A escala regional, el F_{ST} promedio fue moderado (0,067), con valores que oscilaron entre 0,015 y 0,097, todos significativos para un $P < 0,05$. La diferenciación más baja ocurrió entre Leleque y el valle El Cajón en Cholila, mientras que la mayor diferenciación se dio entre Bariloche y Leleque (Tabla 3). El análisis de AMOVA reveló que el 94,84% de la varianza ocurrió dentro de las poblaciones y el 5,16% entre ellas ($P < 0,05$). El test de aislamiento por distancia reveló una correlación no significativa ($r = 0,0105$; $P = 0,4150$) entre la distancia genética y geográfica para las poblaciones de *O. longicaudatus*. Los métodos de Neighbor-Joining y UPGMA revelaron relaciones similares entre las poblaciones: un grupo incluyó a Junín de los Andes, Bariloche y El Bolsón, mientras que el otro, a El Cajón y Leleque (Figura 4a y 4b).

Tabla 3: F_{ST} de a pares entre las poblaciones *Oligoryzomys longicaudatus* a escala regional.

| | Junín de los Andes | Bariloche | El Bolsón | Leleque | El Cajón |
|--------------------|--------------------|-----------|-----------|---------|----------|
| Junín de los Andes | 0,00000 | --- | --- | --- | --- |
| Bariloche | 0,02708 | 0,00000 | --- | --- | --- |
| El Bolsón | 0,02814 | 0,02843 | 0,00000 | --- | --- |
| Leleque | 0,05887 | 0,09737 | 0,08045 | 0,00000 | --- |
| El Cajón | 0,04161 | 0,06940 | 0,06533 | 0,01507 | 0,00000 |

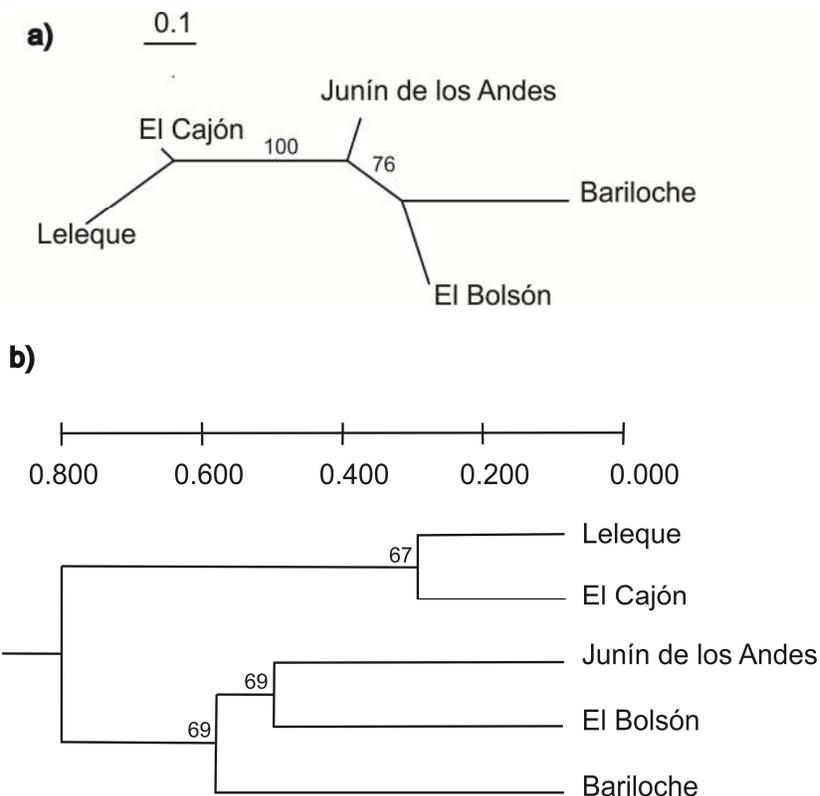


Figura 4: Representación de las relaciones entre poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala regional mediante **a)** el método de NJ **b)** el método de UPGMA. Los soportes de bootstrap se indican en la base de cada nodo y la escala en el margen superior de la sección b representa la distancia genética de Nei (1972).

La combinación de información genética y datos geográficos realizada por el programa Geneland reveló la existencia de cuatro grupos genéticos ($K=4$); cada K fue representado por una única población, excepto para el cluster o grupo 3, que estuvo representado por Leleque y El Cajón (Figura 5). Las probabilidades posteriores de pertenencia a cada grupo genético para Junín de los Andes, Bariloche, El Bolsón y Leleque junto a El Cajón fueron de 0,7, 0,6, 0,8 y 0,9 respectivamente. El gráfico de asignación individual mostró un resultado similar: los individuos de Leleque y El Cajón presentaron una composición genética muy similar; los individuos de Junín de los Andes, Bariloche y El Bolsón mostraron ancestría mixta, pero con

elevada pertenencia al grupo genético 2, 4 y 1, respectivamente (Figura 6).

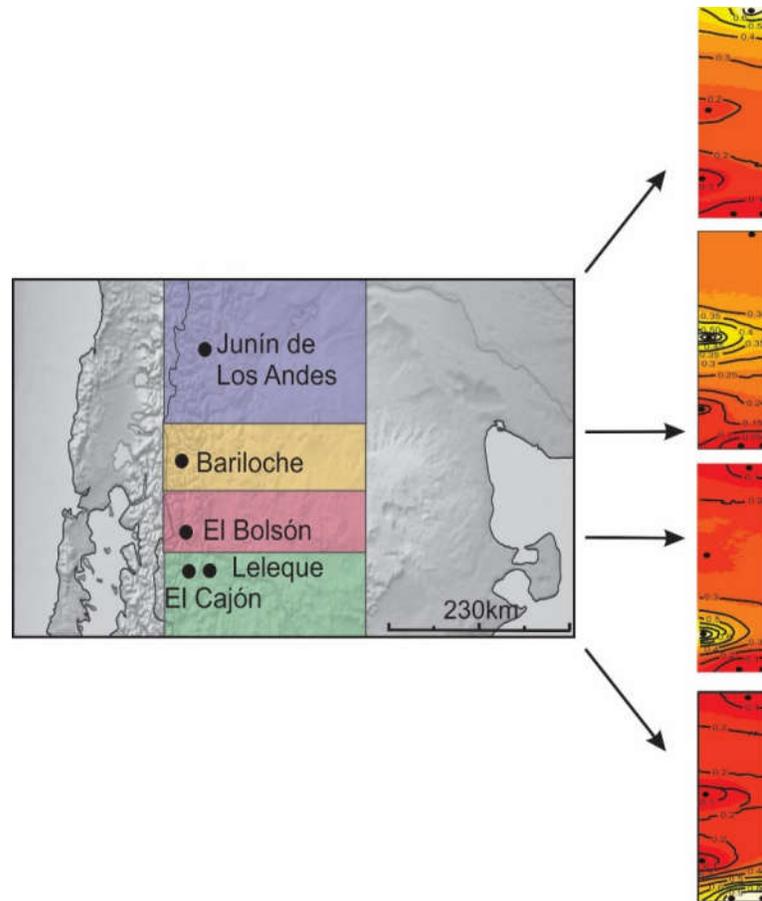


Figura 5: Distribución espacial de los grupos genéticos con sus probabilidades a escala regional obtenido a partir del programa Geneland.

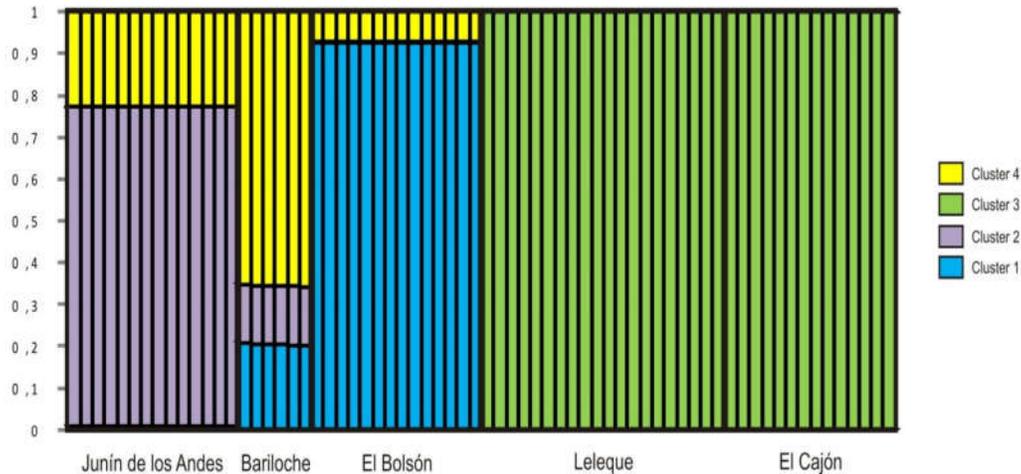


Figura 6: Representación individual de la composición genética en cada población de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala regional realizada a partir de la salida del programa Geneland. Los individuos están delimitados por líneas finas mientras que las poblaciones se delimitan con líneas gruesas.

La representación de la composición genética de cada individuo realizada por el programa Structure 2.3 reveló la existencia de tres grupos genéticos (Figura 7). La población de Junín de Los Andes presentó una elevada ancestría del grupo 1; Bariloche y El Bolsón mostraron ancestría mixta de los grupos 1 y 2 (violeta y rosa respectivamente), en iguales proporciones en el caso de Bariloche y en el caso de El Bolsón, con mayor proporción del grupo 2. Finalmente, Leleque y El Cajón mostraron una composición genética muy similar, con una elevada pertenencia individual al grupo 3 (naranja). Estos resultados son consistentes con aquéllos obtenidos con los fenogramas de NJ y UPGMA (Figuras 4a y 4b).

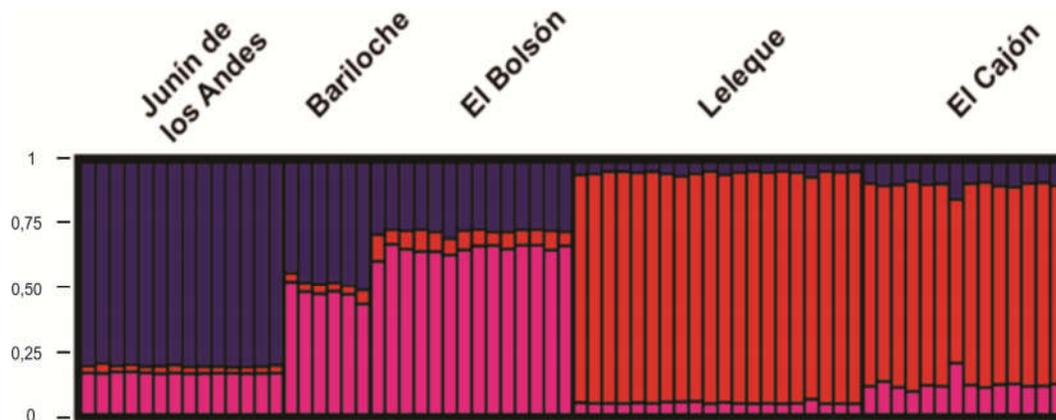


Figura 7: Representación de la composición genética basada en individuos de las poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala regional realizada por el programa Structure 2.3. Cada individuo está delimitado por una línea fina, mientras que las poblaciones se delimitan con líneas gruesas.

2.6. Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo, en concordancia con lo planteado en las hipótesis, sugieren la existencia de bajos niveles de dispersión actual entre las poblaciones de la región: 1) el test de Mantel no fue significativo, indicando que no existe un patrón de aislamiento por distancia; es decir, que las fuerzas opuestas ejercidas por el flujo génico y la deriva genética no están en equilibrio. Sin embargo, a través de otros análisis fue posible observar un gradiente de diferenciación latitudinal. 2) Los valores de F_{ST} a escala regional fueron moderados y todos significativos (F_{ST} promedio=0,067). 3) Los métodos de Neighbor-joining y UPGMA (Figuras 4 a y b) revelaron tres grupos de poblaciones que coinciden con los grupos genéticos ($K=3$) detectados por el programa Structure. 4) Tanto la disposición espacial de los grupos obtenidos como la frecuencia de pertenencia a cada uno de ellos siguieron un patrón latitudinal (Figura 7). El

programa Geneland, que combina datos genéticos y espaciales, separó a El Bolsón y Bariloche en dos grupos genéticos diferentes, dando como resultado un total de cuatro grupos distintos con sentido norte-sur ($K=4$) (Figura 5); sin embargo, el valor de pertenencia posterior de Bariloche fue bajo (0.6%), probablemente porque es la población con tamaño muestral más bajo. La diferencia en el número de grupos genéticos detectados entre Structure y Geneland puede deberse a los distintos algoritmos empleados por cada programa y las diferencias en la información que recaba cada uno (Geneland utiliza datos espaciales y genéticos, mientras que Structure sólo utiliza datos genéticos). En un estudio de simulación comparando diferentes métodos de agrupamiento, Safner *et al.* (2011) detectaron que para la misma combinación de parámetros Geneland tendió consistentemente a detectar mayor número de conglomerados espaciales que Structure, encontrando subdivisiones adicionales dentro de cada uno de ellos. Esto ocurrió especialmente en el escenario de aislamiento por distancia, en donde bajas tasas de dispersión en combinación con elevadas tasas de mutación resultan en una agregación espacial de alelos similares, dando la ilusión de barreras al movimiento cuando en realidad no existen. Por otro lado, Li y Liu (2018) indicaron que cuando el número de muestras entre las poblaciones estudiadas es desigual, el programa Structure tiene mayor dificultad para identificar de manera correcta el número de grupos genéticos que conforman la composición de las poblaciones en cuestión. De cualquier modo, a pesar del número de grupos genéticos inferido (3 o 4), los resultados muestran una diferenciación latitudinal de las poblaciones a escala regional. El método de asignación individual utilizando la salida de Geneland también reveló la existencia del mismo gradiente de diferenciación, apuntando a valores de flujo génico actual moderados a bajos. Este resultado también se obtuvo excluyendo del análisis a la población de Bariloche

que presenta un tamaño muestral reducido (resultados no mostrados).

En otros estudios realizados a esta escala, Palma *et al.* (2005) también encontraron un patrón latitudinal de divergencia genética en el lado occidental de los Andes en Chile utilizando el gen mtCyt-b. Sin embargo, concluyeron que el flujo génico entre localidades era elevado. En un estudio posterior, agregando nuevas poblaciones, Palma *et al.* (2012) obtuvieron un resultado muy diferente al del estudio anterior, puesto que se detectaron tres grupos genéticos a lo largo de la distribución geográfica de *O. longicaudatus* en Chile. Estos grupos coincidieron con las tres grandes regiones ecogeográficas chilenas: Mediterránea, Valdiviana y Bosques Patagónicos. Los autores propusieron un crecimiento poblacional repentino luego del retraimiento de los glaciares del Pleistoceno, seguido de un período de tamaño efectivo poblacional reducido y una diferenciación paulatina por regiones. Además, Torrez-Pérez (2011) encontraron una estructuración geográfica significativa en las poblaciones chilenas de *O. longicaudatus* a escala geográfica amplia (entre los 600-800 km), patrón que se atribuyó al flujo génico reducido entre poblaciones provenientes de diferentes refugios glaciares Pleistocénicos al oeste de los Andes. A pesar de que en esta Tesis se utilizaron escalas geográficas de menor magnitud y un marcador genético diferente, se encontró un patrón de estructuración genética similar. González-Ittig *et al.* (2010), realizaron un estudio filogeográfico utilizando la región control de ADN mitocondrial en poblaciones de Argentina y Chile y encontraron poca divergencia genética entre las poblaciones analizadas. Dado que durante el Último Máximo Glacial el área que ocupa *O. longicaudatus* al este de los Andes estuvo cubierto de hielo, los autores propusieron que durante la glaciación, la especie habría sobrevivido en un refugio libre de hielo sobre la costa sur del Pacífico en Sudamérica, asociado a las especies del género *Nothofagus*, y que luego habría expandido su rango

recolonizando Argentina desde ese refugio. Esto explicaría la menor diversidad genética encontrada en Junin de los Andes en aquel estudio, puesto que habría sido la última en ser colonizada. Respecto a otros roedores, Lessa *et al.* (2010) estudiaron la diversidad genética de catorce especies de ratones sigmodontinos de Tierra del Fuego y la Patagonia Argentina, utilizando ADN mitocondrial como marcador molecular, a fin de comparar sus patrones filogeográficos. Los autores encontraron que cuatro de estas especies estaban genéticamente fragmentadas dentro de la región y nueve de ellas tuvieron una huella genética similar de expansión reciente de rango a partir de un único refugio restringido espacialmente. Concluyeron que la inestabilidad demográfica en respuesta al cambio climático histórico fue la principal causante de la estructuración genética encontrada en la región Patagónica-Fueguina. La colonización desde latitudes elevadas (localidades australes) es un componente importante de la diversidad actual, pero la diferenciación *in situ* también contribuyó a que a nivel intraespecífico aparecieran muchos haplotipos nuevos, lo que produjo una divergencia poblacional en varias especies de roedores sigmodontinos de la región. Por otro lado, Sersic *et al.* (2011) encontraron patrones filogeográficos congruentes dentro y entre especies de plantas y vertebrados terrestres, sugiriendo que tanto los eventos geológicos del Pre-Cuaternario como los del Cuaternario habrían sido importantes impulsores en la historia evolutiva de las especies patagónicas. El patrón genético latitudinal detectado en las poblaciones de *O. longicaudatus* analizadas en este estudio, junto con el patrón similar encontrado en especies de *Nothofagus* por Soliani (2012), apoyan la idea de flujo génico restringido a escala regional como resultado del aislamiento entre las poblaciones a partir de los accidentes geográficos de la región. Los glaciares que afectaron esta área geográfica habrían modificado el paisaje produciendo múltiples barreras (como por ejemplo lagos y valles de origen postglacial) que

en la actualidad restringen el flujo génico entre las poblaciones allí presentes. En este escenario, las poblaciones se habrían diferenciado paulatinamente para originar la estructura genética que se observa en la actualidad en *O. longicaudatus* a escala regional.

Como ya se mencionara, la especie *O. longicaudatus* se encuentra fuertemente asociada a especies del género *Nothofagus* en los bosques templados de la Patagonia argentina; si las especies de árboles y el roedor experimentaron una historia evolutiva similar, se esperaría un patrón comparable en sus estructuras genéticas. Esto se infiere luego de que se encontraran diferentes grupos genéticos en las especies *N. pumilio* (lenga) y *N. antartica* (ñire) a lo largo de un gradiente latitudinal en la Patagonia (Soliani, 2012; Soliani *et al.*, 2012). Tanto los marcadores cloroplásticos como los nucleares (microsatélites), revelaron una divergencia genética en ambas especies de árboles en sentido norte-sur, en donde las poblaciones del norte (36–41°S) fueron significativamente diferentes de aquellas del resto del área de distribución. Los autores encontraron que Cholila (ubicada en el área de transición) fue la única población con mezcla de haplotipos del norte y del sur. La marcada división latitudinal alrededor de los 42°S indicaría una historia evolutiva distinta para estos grupos de poblaciones. En esta Tesis, las poblaciones Leleque y El Cajón (o sea todas las poblaciones ubicadas alrededor de los 42°S), siempre fueron recuperadas juntas en los distintos análisis estadísticos y fueron siempre diferentes de las tres localidades ubicadas más al norte. Este resultado no concuerda con el reportado por González-Ittig *et al.* (2010) donde, utilizando marcadores mitocondriales, no se encontró un quiebre o gap genético con las poblaciones del norte. Los autores tampoco detectaron correlación entre la distancia genética y geográfica, pero hallaron haplotipos exclusivos en la mayoría de las localidades, indicando flujo génico restringido entre ellas. Los mayores niveles en la diferenciación genética encontrada en esta Tesis con respecto al estudio de

González-Ittig *et al.* (2010) pueden atribuirse a la diferencia en el marcador empleado para el análisis. De hecho, aquí la población de Junín de los Andes fue tan polimórfica como las demás poblaciones. Los microsatélites son más variables que los marcadores mitocondriales, lo que permite detectar estructuración genética aún cuando ésta sea reciente. Además, los microsatélites son capaces de detectar niveles de diferenciación genética a escalas espaciales y temporales más reducidas, por lo que resultan mucho más adecuados para analizar procesos evolutivos contemporáneos (Selkoe y Toonen, 2006). En el presente estudio, la ausencia de correlación positiva y significativa entre la distancia genética y geográfica en las localidades muestreadas indica que no hay equilibrio entre el flujo génico y la deriva genética en las poblaciones de dichas localidades. El hecho de que todos los análisis en *O. longicaudatus*, tanto *a priori* como los *a posteriori*, revelaran una diferenciación norte-sur, siendo Leleque y El Cajón similares mientras que las otras tres localidades se diferenciaron entre sí en la mayoría de los análisis, indica que las poblaciones estudiadas se estarían diferenciando según un patrón de aislamiento por distancia y que probablemente todavía no transcurrió el tiempo suficiente para que la deriva genética y el flujo génico alcancen un equilibrio. Este mismo resultado fue obtenido para el roedor *Calomys musculinus* por Chiappero y Gardenal (2003) y Gonzalez-Ittig y Gardenal (2004), quienes estudiaron su estructura genética poblacional en el centro de Argentina en un rango de 10 a 700 kilómetros de extensión. Los autores detectaron niveles de diferenciación moderados a elevados sin encontrar correlación significativa entre las distancias geográfica y genética según el test de Mantel. Las poblaciones de *C. musculinus* habrían colonizado su rango de distribución actual en un período relativamente reciente (posiblemente asociada a la dispersión de la agricultura en el siglo XX). Posteriormente, el flujo génico entre poblaciones habría sido restringido con un predominio de la deriva genética que llevó a que

las poblacionales comiencen a diferenciarse de manera aleatoria. Algo similar estaría ocurriendo en *O. longicaudatus*. En los últimos años, los valles andino-patagónicos han sufrido efectos antrópicos por la introducción de especies invasoras y el reemplazo de bosque original por plantaciones de coníferas exóticas, lo cual podría haber influido en la estructura genética actual. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios genéticos comparativos entre poblaciones del roedor de los bosques autóctonos y de las plantaciones exóticas.

En resumen, en este estudio se encontró estructuración genética con disposición latitudinal a escala regional, indicando bajos niveles actuales de flujo génico entre las poblaciones de *O. longicaudatus* a escala regional. El elevado nivel de resolución de los microsatélites permitió la detección de brechas genéticas entre las poblaciones patagónicas.

3. Capítulo 3

Estructura genética de *O. longicaudatus* a escala de paisaje

3.1. Introducción

La ecología clásica considera que la distribución espacial de los organismos puede ser explicada por la variabilidad ambiental, la cual genera diferencias en términos de calidad de hábitat, concentrando a los organismos en áreas de recursos adecuados para ellos. En el caso de roedores, distintas poblaciones pueden tener comportamientos diferentes en cuanto a la preferencia de hábitats asociados a distintas variables ambientales (Schmidt y Ostfeld, 2001) y al contexto del paisaje (Ostfeld *et al.*, 2005). Mills y Childs (1998) y Mills (1999) sostienen que si cada situación epidemiológica presenta una característica ambiental diferente, se podría pensar que los distintos tipos de hábitats estarían relacionados con el riesgo de infección a humanos dentro de una región endémica. Es por ello muy importante determinar las relaciones entre los grupos de poblaciones dentro de un hábitat y entre diferentes hábitats, lo cual incluye conocer la dispersión de los individuos, la relación entre dispersión e infección del huésped con los patógenos, y los factores que la promueven. Algunos aspectos de este tipo de estudios pueden ser abordados desde una nueva interdisciplina denominada "genética del paisaje" que resulta de la interacción entre la genética de poblaciones a nivel molecular y la ecología del paisaje (Manel *et al.*, 2003). La genética del paisaje permite investigar cómo las características del paisaje a escala geográfica fina (ríos, rutas, barreras, etc.) afectan a procesos como migración, deriva genética, selección natural, extinción y recolonización. Este enfoque ofrece una manera eficiente de comprender dónde y cómo los reservorios naturales se mueven a través del paisaje, lo cual contribuye a entender cómo se disemina una enfermedad y a determinar el riesgo para humanos (Sloan *et al.*, 2009).

Estudios de genética del paisaje en roedores revelaron que ciertas modificaciones en el paisaje pueden producir restricciones en

el flujo génico y diferenciación entre las poblaciones en función de factores ambientales como corredores de dispersión, forma, tamaño y distancia entre los parches (remanentes del hábitat original favorable) y el contraste entre ellos y la matriz (área desfavorable para un organismo focal en particular, dentro de la cual se distribuyen los parches de hábitat óptimos; es considerada generalmente como una barrera para los movimientos del organismo), así como también factores intrínsecos de la especie como vagilidad, tasa reproductiva, grado de especificidad del hábitat, etc. (Aars *et al.*, 1998; 1999). Así por ejemplo, Aars *et al.* (1999) estudiaron los efectos de los corredores de hábitat sobre el grado de conexión y la dispersión entre poblaciones de *Microtus oeconomus* a través de técnicas genéticas y demográficas. Se encontró que los corredores facilitan la migración entre poblaciones, sobre todo en el caso de los machos, por ser el sexo dispersante de la especie. En otro estudio, McDonald y St. Clair (2004) analizaron los efectos de distintas barreras (naturales y artificiales) sobre la dispersión de tres especies de roedores de la misma familia: *Microtus pennsylvanicus*, *Peromyscus maniculatus* y *Clethrionomys gapperi* demostrándose que en los tres casos, tanto las barreras artificiales como las rutas ejercen mayor resistencia a la dispersión que las barreras naturales, como los bosques fragmentados.

Por su parte, Schweizer *et al.* (2007) combinaron métodos directos e indirectos para estimar la dispersión de *Microtus arvalis* en ambientes fragmentados. Se halló que los machos fueron quienes más se dispersaron entre las poblaciones estudiadas, mientras que las hembras tuvieron un comportamiento filopátrico en parches bien delimitados, manteniendo constante la diferenciación genética entre los parches. Booth *et al.* (2009) estudiaron el efecto de las distintas barreras en el paisaje sobre la estructura genética poblacional de *Apodemus sylvaticus* a través de 7 loci de microsatélites. Se detectó que a escala reducida no existen barreras para el flujo génico y que

en cambio, éste estaría limitado por la tendencia de los individuos de reproducirse cerca del grupo natal. En escalas más amplias, la resistencia estaría ejercida por las barreras naturales y artificiales presentes en el paisaje como lagos, ríos, rutas, campos de pastoreo y bosques manejados.

Mora *et al.* (2017), a través de un enfoque de genética del paisaje, evaluaron la estructura poblacional de *Ctenomys "chasiquensis"* en hábitats arenosos del centro de Argentina utilizando 9 loci de microsatélites. Se detectó que ciertas características del hábitat (tales como su calidad y ubicación geográfica) y discontinuidades en el paisaje (como salinas inundadas y cultivos agrícolas), junto con otras modificaciones antrópicas (como las plantaciones forestales), influyeron de gran manera sobre la diferenciación entre las poblaciones del roedor en la escala de paisaje.

En el caso de enfermedades originadas por Hantavirus, se han realizado estudios sobre la relación entre la proporción de individuos infectados del roedor *Peromyscus maniculatus* con el virus "Sin Nombre" y variables ambientales, a fin de confeccionar mapas de riesgo (Boone *et al.*, 1998; Langlois *et al.*, 2001); sin embargo, no se analizó la variabilidad genética en el virus ni en el reservorio natural. Respecto a *O. longicaudatus*, los estudios ecológicos realizados hasta el momento a escala de paisaje indicaron que la especie ocupa principalmente arbustales dominados por rosa mosqueta y zarzamora adyacentes a arroyos y caminos. En general muestra preferencia por zonas húmedas y con elevada cobertura vegetal aunque también ha sido capturada en hábitats disturbados como peridomicilios, bordes de cultivo, pastizales y pasturas (Pearson, 1983; Piudo *et al.*, 2011). Particularmente en la zona de Cholila, se realizaron los muestreos de las Tesis Doctorales de Francisco Polop y de Verónica Andreo. El interés principal fue elaborar un modelo predictivo que permita identificar los tiempos y lugares en donde las condiciones ambientales

faciliten incrementos en las poblaciones del roedor o aumentos de la infección en esas poblaciones. El estudio se desarrolló a través de muestreos que permitieron medir diferentes variables como: abundancia de roedores, actividad reproductiva, sobrevivencia y estructura etaria de la población, condición serológica de los animales y prevalencia de infección (Polop *et al.*, 2010; 2014; Andreo *et al.*, 2014). Los primeros resultados del estudio determinaron que hay mayor cantidad de roedores infectados en invierno y que los ambientes más importantes desde el punto de vista de la abundancia poblacional y la infección de *O. longicaudatus* fueron el arbustal y el bosque (Polop *et al.*, 2010). También se halló un elevado número de transeúntes en general y una importante dispersión estacional entre hábitats contiguos. Los roedores se moverían entre estos hábitats en función de la disponibilidad de recursos tales como espacio, cobertura vegetal, humedad y alimento (Polop, 2011). La cobertura de rosa mosqueta fue en particular, una de las variables más significativas a la hora de explicar la abundancia poblacional; esta planta aportaría no sólo alimento, sino muy probablemente refugio a *O. longicaudatus* y constituiría un importante recurso para la especie principalmente en años secos (Andreo, 2012). Ambas Tesis aportaron resultados sobre la ecología del paisaje de *O. longicaudatus*, los cuales en la presente Tesis se integran con la genética de poblaciones aportando al conocimiento de la genética del paisaje de la especie.

3.2. Objetivo específico

- Estimar niveles de flujo génico a escala de paisaje (entre valles Andino-Patagónicos y la estepa patagónica).

3.3. Hipótesis y predicciones

- A escala de paisaje, accidentes geográficos como cordones montañosos actúan de barrera para la dispersión de la especie.

Predicciones: El flujo génico entre los valles Andino-Patagónicos será elevado debido a la alta conectividad entre ellos. Por el contrario, el flujo génico entre las poblaciones de los valles y la estepa será bajo.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Muestreo

El procedimiento de trampeo para obtener las muestras correspondientes a la escala de paisaje fue el mismo que se describió anteriormente para Leleque y el valle El Cajón en la sección de muestreo a escala regional. Las muestras analizadas y sus correspondientes fechas fueron:

- Leleque (n=20): marzo-abril de 2007 y 2009.
- El Cajón (n=14): agosto de 2006.
- El Blanco (n=15): marzo-abril de 2007 y 2008.
- El Rincón (n=19): marzo-abril de 2007.
- Villa Lago Rivadavia (n=15): marzo-abril de 2007 (Figura 8).

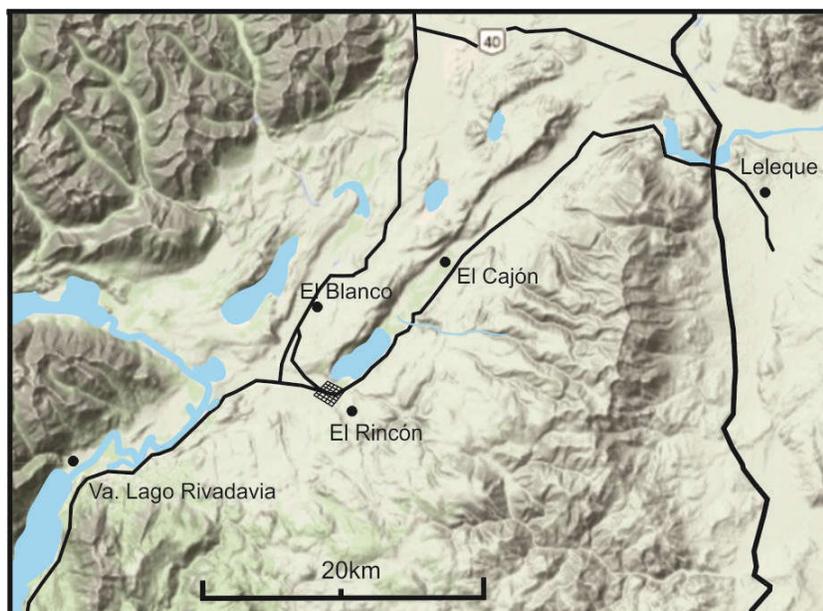


Figura 8: Ubicación geográfica del área de estudio mostrando los principales accidentes geográficos que forman parte del paisaje.

3.4.2. Análisis de datos

Para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones se realizó un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) y se calculó el estadístico F_{ST} entre pares de poblaciones con el programa Arlequin 3.5.1.2. Para ello, se realizaron 10000 permutaciones y se utilizó nivel de significación de 0,05. Para detectar posibles correlaciones entre la distancia genética ($F_{ST}/ [1-F_{ST}]$) y el logaritmo natural de la distancia geográfica (Rousset, 1997) entre las poblaciones de *O. longicaudatus*, se realizó un test de Mantel utilizando en programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997); la significación del test fue calculada a través de 10000 permutaciones. Las relaciones entre las poblaciones se representaron a través de los métodos de Neighbour-Joining y UPGMA con los programas Populations y TFPGA respectivamente. Para el método UPGMA se utilizó la distancia de Nei (1972).

Para inferir el número de grupos genéticos (K) y sus límites teniendo en cuenta la información geográfica, se utilizó la aproximación Bayesiana implementada por el programa Geneland 3.0 (Guillot *et al.*, 2005). Se realizó una primera corrida preliminar con un número de K entre 1 y 10, con 10000000 iteraciones MCMC y un *thinning* de 1000. Para los resultados finales, se realizaron cinco corridas independientes con un K fijado en 5 (a los fines de evitar poblaciones fantasmas) utilizando el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas y espacialmente explícitas. En cada corrida se computó la probabilidad posterior de pertenencia de cada población para cada pixel del dominio espacial (20*120 pixeles) utilizando un *burn-in* de 1000 iteraciones. Adicionalmente, para visualizar el porcentaje pertenencia de cada uno de los individuos al grupo genético asignado, se construyó un gráfico de barras en Excel con la salida basada en individuos obtenida a partir del programa Geneland. También se analizó la estructura genética con el programa Structure 2.3 de la misma manera que se hizo con los datos correspondientes a

la escala regional. Para determinar el grado de ancestría mixta se utilizó el criterio de 0,2 establecido por Vähä y Primer (2006).

Por otro lado, se realizaron dos análisis adicionales: (1) Se estimaron las tasas de migración simétrica y asimétrica entre pares de poblaciones para las últimas tres generaciones con el programa BayesAss 1.3 (Wilson y Rannala, 2003). (2) Para medir el efecto de la distancia geográfica y los distintos elementos del paisaje (lagos, ríos, montañas, rutas, zona urbana, etc.) sobre la diferenciación genética entre los individuos de *O. longicaudatus*, se realizó un análisis de "Causal Modeling" utilizando tests de Mantel parciales (Cushman *et al.*, 2006; 2013). Los mapas se dibujaron en una escala 1:1250 desde una imagen de *Google Earth* utilizando el complemento "OpenLayer plugin" del programa QGIS 2.14 (QGIS Development Team, 2014). Los elementos geográficos del paisaje se clasificaron en clases tales como lagos, ríos, cordones montañosos, colinas, rutas principales (asfaltadas), rutas secundarias (de tierra), bosques y zonas urbanas (incluyendo casas y asentamientos peri-domésticos) (Figura 9).

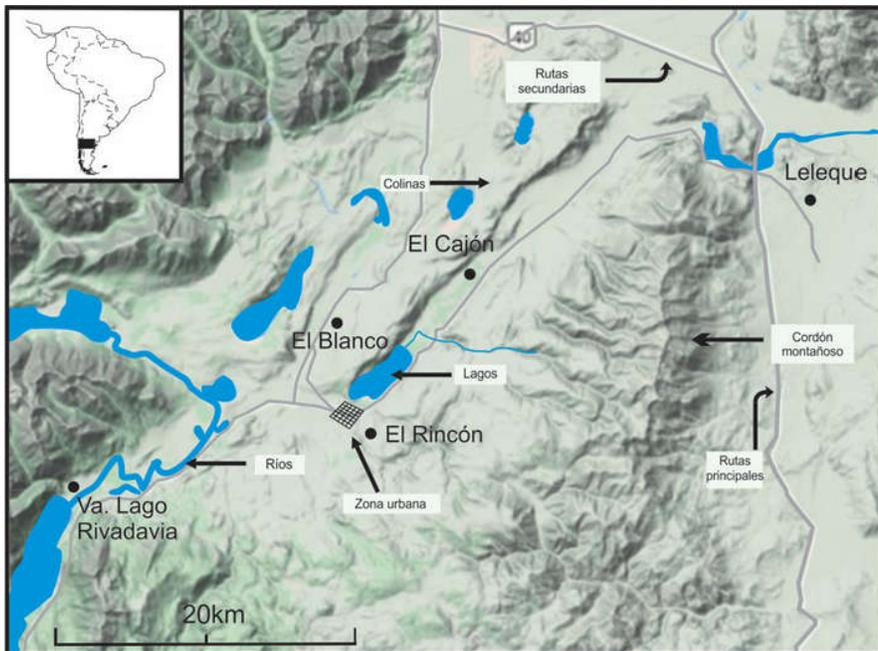


Figura 9: Elementos del paisaje evaluados con los análisis de *Causal Modeling*.

Se confeccionaron mapas de resistencia del área de estudio representando diferentes alternativas sobre la dificultad de los individuos de la especie para dispersarse a través de los elementos del paisaje. A cada elemento se le asignó un valor de resistencia distinto en función a estudios previos realizados en la zona (Polop, 2011; Andreo, 2012) y se generaron varias hipótesis sobre su influencia relativa en la conectividad de las poblaciones dentro del paisaje. De acuerdo a lo reportado por Polop, F; Juan, E y Andreo, V (comunicación personal) los individuos de la especie presentan elevada dificultad para cruzar cuerpos de agua, especialmente si son grandes; además, exhiben comportamientos evasivos con respecto a las zonas urbanas y áreas antropizadas en general, por lo que las rutas asfaltadas representarían un obstáculo mayor que una ruta secundaria de tierra. En base a esta información se evaluaron diferentes escenarios: (1) midiendo por separado el efecto de cada elemento del paisaje, donde se le asignó un valor de resistencia al elemento evaluando y se asignó un valor de 1 (resistencia nula) al resto de los elementos. (2) Combinando valores de resistencia de los distintos elementos en la misma hipótesis. Para este segundo escenario se elaboraron cinco hipótesis (ver Tabla 4): en la primera, se asignaron valores de resistencia elevados a lagos y zonas urbanas, mientras que a los ríos, cordones montañosos y rutas se les asignaron valores intermedios. En la segunda, los cordones montañosos y rutas recibieron valores más reducidos. En la tercera, se le asignó un valor de resistencia más reducido a la zona urbana; en la cuarta hipótesis, se le asignó un valor más elevado a los ríos y finalmente, en la quinta, se asignaron valores de resistencia elevados a los ríos y valores intermedios a la zona urbana. Los bosques y arbustales presentaron la resistencia mínima en todos los modelos debido a la fuerte preferencia de la especie por estos tipos de hábitat.

(Polop *et al.*, 2010; 2014). Finalmente, el modelo nulo consideró a la distancia geográfica euclídea como único predictor (Tabla 4).

Tabla 4: Valores de Resistencia al flujo génico entre las poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus* para cada hipótesis del paisaje.

| | Hipótesis 1 | Hipótesis 2 | Hipótesis 3 | Hipótesis 4 | Hipótesis 5 | Nula |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|
| Lagos | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 1 |
| Ríos | 50 | 50 | 50 | 80 | 80 | 1 |
| Cordones montañosos | 40 | 20 | 40 | 40 | 40 | 1 |
| Colinas | 20 | 10 | 20 | 20 | 20 | 1 |
| Rutas principales | 30 | 15 | 30 | 30 | 30 | 1 |
| Rutas secundarias | 10 | 5 | 10 | 10 | 10 | 1 |
| Bosques y arbustales | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Zona urbana | 80 | 80 | 40 | 80 | 60 | 1 |

Se utilizó el programa Circuitscape 4.0 (Mcrae *et al.*, 2014) para transformar los mapas de resistencia en matrices de resistencia entre pares de individuos. Las distancias genética y geográfica entre pares de individuos se estimaron con el programa Genalex 6.41. Con el programa zt (Bonnet y Van De Peer, 2002) se realizó un test de Mantel simple entre la distancia genética y cada matriz de resistencia. Para cada una de las hipótesis de resistencia del paisaje, se realizaron dos test de Mantel parciales con el mismo programa: uno para probar la correlación entre la distancia genética y la hipótesis de resistencia, descontando el efecto de la distancia geográfica y el otro, entre la distancia genética y la distancia geográfica, descontando el efecto de la hipótesis de resistencia. Para descartar la existencia de correlaciones espurias (más de una hipótesis de resistencia significativa debido a la falta de independencia entre ellas) los resultados se interpretaron según Cushman *et al.* (2013), quienes proveen una serie de aspectos a tener en cuenta. En primer lugar, cuando una hipótesis de resistencia está soportada independientemente de los modelos alternativos es altamente probable de que dicha hipótesis sea la correcta, dado que el error tipo

1 está sesgado en la dirección opuesta. Segundo, cuando el modelo alternativo es soportado independientemente de una hipótesis de resistencia pero no viceversa, sugiere que el flujo génico podría estar gobernado por el modelo alternativo u otro modelo no evaluado. Tercero, cuando ninguno de los modelos (ni el de resistencia ni el alternativo) son soportados independientemente uno de otro, sugiere que el flujo génico no está gobernado ni por el modelo de resistencia propuesto ni por el modelo alternativo., sino por una tercera hipótesis de resistencia no evaluada. Por último, cuando ambos modelos (tanto el de resistencia como el alternativo) son soportados independientemente uno de otro, se hace imposible determinar a través del análisis de *Causal Modeling* cuál de ellos es correcto y cuál es espurio o si existe un tercer modelo no probado que está correlacionado con ambos. Cuando existe más de una hipótesis significativa los autores proponen usar un nivel de alfa más restrictivo para evaluar la significación y analizar el soporte relativo de cada test, es decir, basar la comparación entre modelos en los valores de r en vez de utilizar los valores de p .

3.5. Resultados

La escala de paisaje incluyó 4 valles de la localidad de Cholila (separados en promedio por 14,48 km) y la población de Leleque en la estepa, ubicada a unos 32,85 km de distancia en promedio (Figura 8). El F_{ST} global fue moderado: 0,056. Los valores de a pares fueron todos significativos ($p < 0,05$) y oscilaron entre 0,01 y 0,1 (Tabla 5); el primer valor corresponde a la comparación entre Leleque y el valle El Cajón y el segundo, a El Blanco vs. Villa Lago Rivadavia.

Tabla 5: F_{ST} de a pares entre poblaciones *Oligoryzomys longicaudatus* a escala de paisaje.

| | Leleque | El Blanco | El Cajón | El Rincón | Va. Lago Rivadavia |
|--------------------|---------|-----------|----------|-----------|--------------------|
| Leleque | 0,00000 | --- | --- | --- | --- |
| El Blanco | 0,03053 | 0,00000 | --- | --- | --- |
| El Cajón | 0,01507 | 0,02892 | 0,00000 | --- | --- |
| El Rincón | 0,06434 | 0,06114 | 0,05439 | 0,00000 | --- |
| Va. Lago Rivadavia | 0,07754 | 0,10668 | 0,09152 | 0,03330 | 0,00000 |

El análisis de AMOVA reveló que el 94,39% de la varianza ocurre dentro de las poblaciones, mientras que el 5,61% entre ellas. El test de Mantel reveló la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia: $r=0,1754$; $p= 0,3651$. Las relaciones entre poblaciones obtenidas con los métodos Neighbor Joining y UPGMA fueron coincidentes. Ambos fenogramas mostraron 2 grupos: 1) Leleque, El Cajón y El Blanco y 2) El Rincón y Villa Lago Rivadavia (Figura 10 a y b).

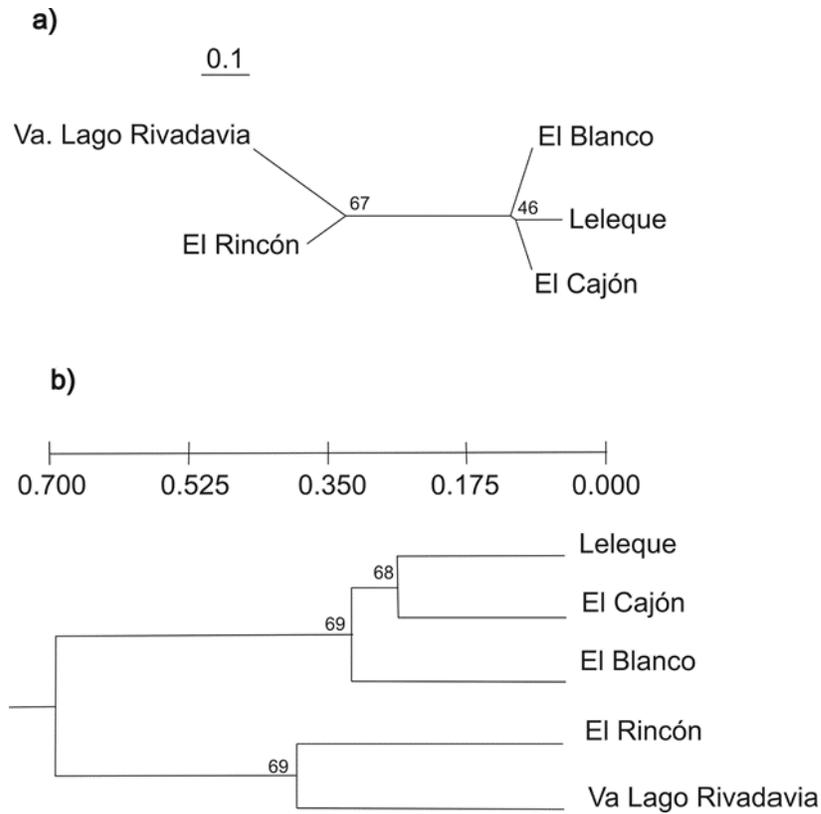


Figura 10: Representación de las relaciones entre poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala de paisaje mediante **a)** el método de NJ **b)** el método de UPGMA. Los soportes de bootstrap se indican en la base de cada nodo y la escala en el margen superior de la sección b representa la distancia genética de Nei (1972).

El análisis realizado con el programa Geneland reveló la existencia de 5 grupos genéticos, cada uno de ellos representado por una única población, con probabilidades posteriores entre 0,8 y 0,9 (Figura 11).

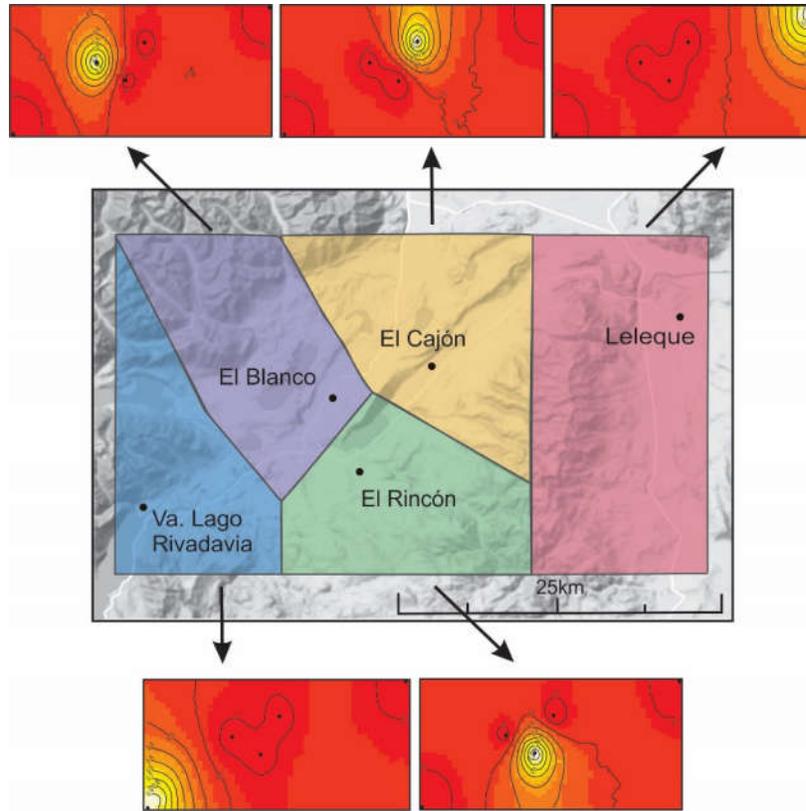


Figura 11: Distribución espacial de los grupos genéticos con sus probabilidades a escala de paisaje obtenida a partir del programa Geneland.

El gráfico de asignación individual reveló que los individuos de Va. Lago Rivadavia y Leleque tienen alta proporción de pertenencia a los grupos 4 y 5 respectivamente, mientras que los individuos de El Blanco, El Cajón y El Rincón presentan predominancia de los grupos genéticos 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 12). La composición genética individual obtenida con Structure 2.3 reveló un patrón de diferenciación latitudinal. Las poblaciones de Leleque y El Cajón mostraron una pertenencia elevada al grupo 1 (naranja); El Blanco presentó ancestría mixta entre los grupos 1 y 2 (naranja y rosa respectivamente) con mayor porcentaje de pertenencia al grupo 2. El Rincón mostró pertenencia elevada al grupo 2, mientras que Villa Lago Rivadavia estuvo mayormente representada por el grupo 3 (violeta) (Figura 13).

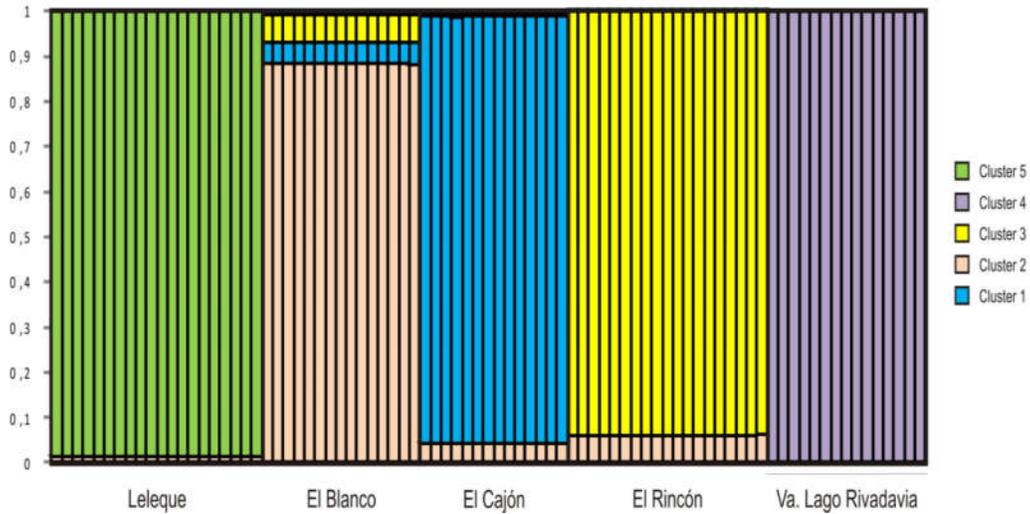


Figura 12: Representación individual de la composición genética en cada población de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala de paisaje realizada a partir de la salida del programa Geneland. Los individuos están delimitados por líneas finas mientras que las poblaciones se delimitan con líneas gruesas.

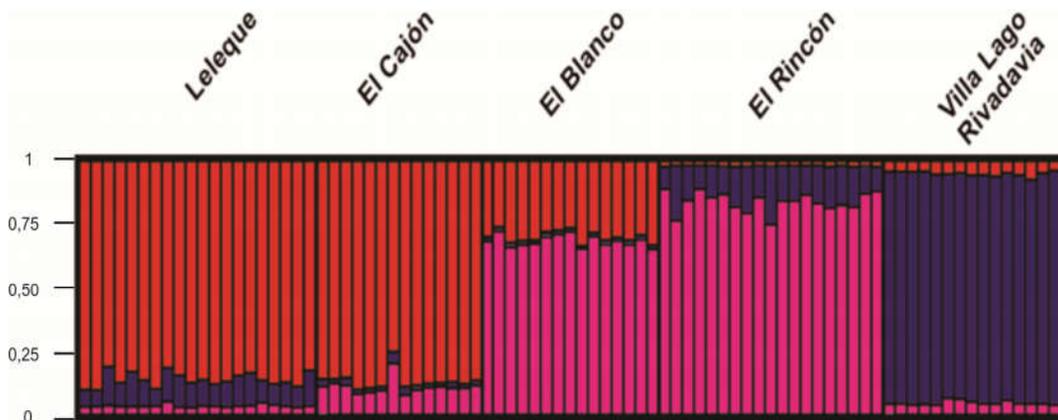


Figura 13: Representación individual de la composición genética en cada población de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala de paisaje realizada por el programa Structure 2.3. Los individuos están delimitados por líneas finas mientras que las poblaciones se delimitan con líneas gruesas.

El programa BayesAss 1.3 detectó, en la mayoría de los casos, tasas de migración bajas entre pares de poblaciones. En los pocos casos que la migración fue importante, mayor al 20% según Wilson y Rannala (2003), ocurrió entre poblaciones próximas y tuvo una dirección asimétrica. Leleque y Villa Lago Rivadavia revelaron

importantes tasas de migración. En el caso de Leleque, habría recibido migrantes provenientes de El Blanco y de El Cajón, mientras que Villa Lago Rivadavia habría recibido migrantes desde El Rincón (Tabla 6, Figura 14).

Tabla 6: Tasas de migración entre pares de poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus* (en paréntesis el intervalo de confianza del 95%) a escala de paisaje. Los valores elevados se resaltan en negrita. La diagonal representa la proporción de individuos pertenecientes a la población fuente.

| Desde/hacia | Leleque | El Blanco | El Cajón | El Rincón | Va. Lago Rivadavia |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Leleque | 0,8696 (0,7661 0,9731) | 0,0264 (-0,0295 0,0823) | 0,0709 (-0,0300 0,1718) | 0,0170 (-0,0153 0,0493) | 0,0161 (-0,0141 0,0463) |
| El Blanco | 0,2613 (0,1935 0,3291) | 0,6890 (0,6463 0,7317) | 0,0149 (-0,0135 0,0433) | 0,0159 (-0,0153 0,0471) | 0,0189 (-0,0164 0,0542) |
| El Cajón | 0,2606 (0,1916 0,3296) | 0,0155 (-0,0143 0,0453) | 0,6917 (0,6449 0,7385) | 0,0158 (-0,0142 0,0458) | 0,0164 (-0,0148 0,0476) |
| El Rincón | 0,0261 (-0,0241 0,0763) | 0,0371 (-0,0333 0,1075) | 0,0238 (-0,0209 0,0685) | 0,6938 (0,6458 0,7418) | 0,2192 (0,1300 0,3084) |
| Va. Lago Rivadavia | 0,0291 (-0,0172 0,0754) | 0,0191 (-0,0170 0,0552) | 0,0187 (-0,0160 0,0534) | 0,0214 (-0,0186 0,0614) | 0,9117 (0,8404 0,9830) |

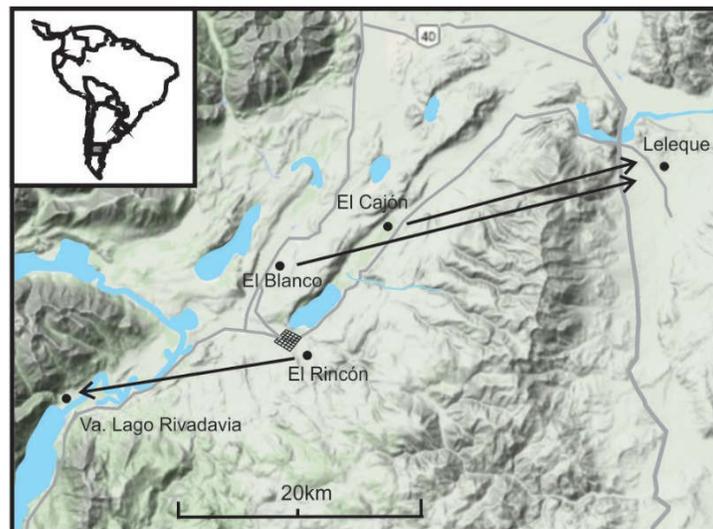


Figura 14: Representación de la dirección del flujo génico a escala de paisaje (sólo consideraron las tasas superiores al 20%).

Respecto a los análisis de *Causal Modeling*, ninguna de las hipótesis en las que se evaluaron los elementos del paisaje por separado fue significativa. En la Tabla 4 se muestran los valores de

resistencia otorgados para los diferentes elementos del paisaje. Al analizar el efecto combinado de estos elementos en el flujo génico, tanto el test de Mantel simple entre la distancia genética y las matrices de resistencia, como el test de Mantel parcial entre la distancia genética y geográfica o las matrices de resistencia, la hipótesis nula, 2, 3, 4 y 5 fueron no significativas (Tabla 7).

Tabla 7: Resultado de los tests de Mantel simple y parciales para los análisis de resistencia al flujo génico entre las poblaciones de *Oligoryzomys longicaudatus*. Los valores de $p < 0,05$ se destacan con un asterisco.

| Matriz 1 | Matriz 2 | Descontado | r | Valor P |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------|
| Test de Mantel Simple entre la distancia genética y cada una de las hipótesis | | | | |
| Distancia Genética | Hipótesis Nula | | -0,0220 | 0,1035 |
| Distancia Genética | Hipótesis 1 | | 0,1669 | 0,0001* |
| Distancia Genética | Hipótesis 2 | | -0,0155 | 0,1956 |
| Distancia Genética | Hipótesis 3 | | 0,0658 | 0,1305 |
| Distancia Genética | Hipótesis 4 | | 0,0623 | 0,1444 |
| Distancia Genética | Hipótesis 5 | | 0,0676 | 0,1256 |
| Test de mantel parcial entre la distancia genética y las hipótesis de resistencia descontando el efecto de la distancia geográfica | | | | |
| Distancia Genética | Hipótesis Nula | Distancia Geográfica | -0,0303 | 0,0603 |
| Distancia Genética | Hipótesis 1 | Distancia Geográfica | 0,1665 | 0,0001* |
| Distancia Genética | Hipótesis 2 | Distancia Geográfica | -0,0005 | 0,4906 |
| Distancia Genética | Hipótesis 3 | Distancia Geográfica | 0,0658 | 0,1289 |
| Distancia Genética | Hipótesis 4 | Distancia Geográfica | 0,0621 | 0,1429 |
| Distancia Genética | Hipótesis 5 | Distancia Geográfica | 0,0675 | 0,1271 |
| Test de Mantel parcial entre la distancia genética y la distancia geográfica, descontando el efecto de las hipótesis de resistencia | | | | |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis Nula | -0,0193 | 0,1320 |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis 1 | -0,0188 | 0,1423 |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis 2 | -0,0157 | 0,2012 |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis 3 | -0,0219 | 0,1043 |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis 4 | -0,0216 | 0,1067 |
| Distancia Genética | Distancia Geográfica | Hipótesis 5 | -0,0219 | 0,1034 |

Por el contrario, en el caso de la hipótesis 1, tanto el test de Mantel simple entre la distancia genética y esta hipótesis, como el test parcial entre la distancia genética y la hipótesis, descontando el efecto de la distancia geográfica, fueron significativos con coeficientes de correlación de 0,1665 y 0,1669, respectivamente. Por otro lado, el test de Mantel parcial entre la distancia genética y geográfica,

descontando el efecto de la hipótesis 1, no fue significativo (Tabla 7). Esto indica que la hipótesis 1 es la única que explica la restricción al flujo génico, es decir, de acuerdo con esta hipótesis la zona urbana y los lagos serían los elementos que más restringen el flujo génico, mientras que los bosques y arbustales serían los que menor resistencia imponen. En la Figura 15 se representa gráficamente la configuración del paisaje de resistencia para el flujo génico de *O. longicaudatus* en el área de Cholila y sus valles según la hipótesis 1.

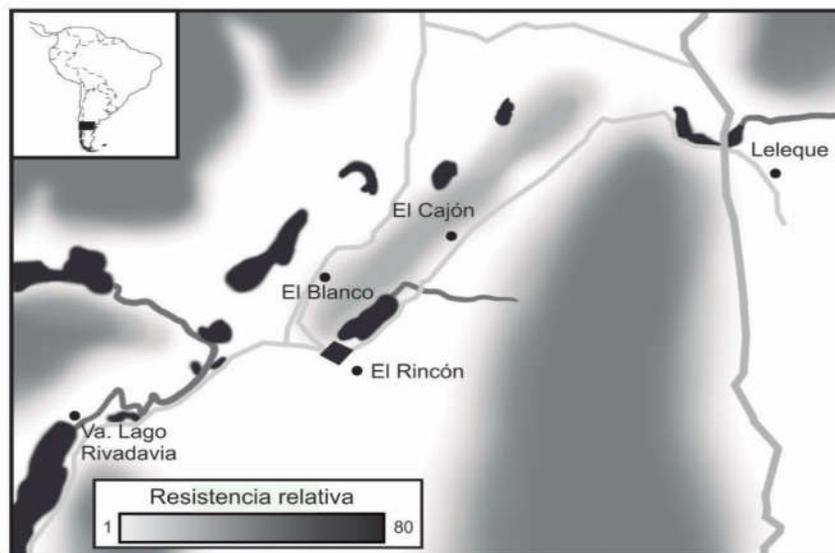


Figura 15: Representación de los valores de resistencia relativa asignados a cada elemento del paisaje en función de la hipótesis 1.

3.6. Discusión y conclusiones

La escala de paisaje incluyó a los 4 valles de la localidad de Cholila (Bosques subantárticos): El Cajón, El Blanco, El Rincón y Villa Lago Rivadavia separados en promedio por casi 15 km (desde 6 a 27 km). También se incorporó una muestra de la Estepa Patagónica (Leleque), ubicada a unos 33 km de Cholila (Figura 8). El índice F_{ST} global fue moderado y tanto el método de Neighbor-joining como el de UPGMA arrojaron dos grupos de poblaciones: 1) Leleque junto a El Blanco y El Cajón y 2) El Rincón junto a Villa Lago Rivadavia (Figura 10). El programa Structure reveló alta similitud entre El Cajón y Leleque (Figura 13). Sin embargo, poblaciones como El Cajón y El Rincón, separadas por tan sólo 6 km, tuvieron una composición genética distinta, sugiriendo la existencia de una barrera geográfica que las está diferenciando. Ambos análisis bayesianos (llevados a cabo por los programas Structure y Geneland) mostraron una diferenciación latitudinal, aunque Geneland mostró mayor divergencia genética que Structure, ya que asignó cada población a un grupo genético diferente. En la representación de la composición genética individual (Figura 13), se observó una elevada proporción de pertenencia a los grupos genéticos 1 y 3 para la mayoría de los individuos de dos de las poblaciones más distantes: Leleque y Va. Lago Rivadavia respectivamente, mientras que El Blanco, localidad de ubicación intermedia, presentó ancestría mixtra entre los grupos 1 y 2. Estos resultados, junto con las bajas tasas de migración encontradas en general entre las localidades estudiadas, indican flujo génico restringido a la escala geográfica aquí considerada. En las hipótesis se planteó flujo génico reducido entre las localidades de Leleque y Cholila y elevados niveles de conectividad entre los valles de Cholila. Los resultados obtenidos no apoyan estas hipótesis, sugiriendo la existencia de un paisaje complejo con distintas barreras de permeabilidad variable, que se combinan para producir la

estructuración aquí encontrada. En un estudio previo realizado sobre uno de los valles de Cholila (Va. Lago Rivadavia), González-Ittig *et al.* (2015) encontraron cambios temporales (a lo largo de 25 meses) en la composición genética y propusieron que el elevado nivel de flujo génico entre los distintos ambientes considerados (bosques y arbustales), sería el proceso determinante en la estructuración genética. Sin embargo, en el presente estudio, utilizando una escala geográfica más amplia, se detectó flujo génico restringido. Las tasas de migración fueron en general bajas, pero en los casos que fueron importantes ocurrieron entre poblaciones más cercanas y siguieron una dirección asimétrica (desde El Blanco y El Cajón hacia Leleque y desde El Rincón a Va. Lago Rivadavia) (Tabla 6, Figura 14). Contrariamente, las tasas de migración entre El Rincón y El Blanco (que también son poblaciones cercanas) fueron muy bajas, reforzando la idea de barreras locales que restringen el flujo génico entre estas poblaciones. Por ello, es altamente probable que el lago llamado "Mosquito", la zona urbana y la ruta secundaria localizados entre El Rincón y El Blanco, actúen como barreras, limitando el intercambio de individuos entre estas localidades (Figura 9). Respecto a las diferencias genéticas entre El Rincón y El Cajón, que también son localidades próximas, la combinación de elementos tales como el lago Mosquito y la ruta secundaria ubicada entre ellas, estarían restringiendo los niveles de flujo génico. Esta misma ruta y el río que costea a la localidad de Va. Lago Rivadavia, estarían ejerciendo el mismo efecto, al menos en condiciones de densidad poblacional normales (Figura 9). El análisis de *Causal Modeling* respaldó estos resultados; mostró una correlación significativa entre la distancia genética y la hipótesis 1 (Tabla 7), en donde los lagos y la zona urbana presentaron altos valores de resistencia al flujo génico, los cordones montañosos, ríos y rutas, valores intermedios y colinas junto con las rutas secundarias, presentaron valores de resistencia reducidos (Tabla 4; Figura 15). Esta hipótesis fue validada siguiendo

la guía provista en Cushman *et al.* (2013), por lo que se puede afirmar como conclusión general del análisis de Causal Modeling, que la zona urbana y los lagos serían los elementos del paisaje que más influencia ejercen sobre el flujo génico de la especie en la escala geográfica considerada (Figura 9, Figura 14). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los elementos mencionados podrían estar actuando en forma combinada para modelar la estructura genética poblacional de *O. longicaudatus*. El efecto de la combinación de ciertos elementos del paisaje sobre la estructura genética también fue examinado por Coulon *et al.* (2006), quienes estudiaron 1148 individuos pertenecientes a distintas poblaciones de la corzuela de Eurasia (*Capreolus capreolus*) en un paisaje de 40 x 55 km constituido por varias barreras putativas para la dispersión de la especie. A partir de los resultados obtenidos con el programa Geneland, los autores encontraron que no existían barreras absolutas para la dispersión de la especie sino que la combinación de elementos con distintos valores de permeabilidad tales como rutas, ríos y canales, provocaba la diferenciación poblacional observada a nivel de paisaje. Con respecto a roedores, Garrido-Garduño *et al.* (2015) estudiaron la estructura genética poblacional del ratón de cola pintada (*Liomys pictus*) para analizar el efecto de la heterogeneidad de hábitats y la conectividad del paisaje, en 6 locaciones dentro de los bosques de México, utilizando 14 loci de microsatélites. Los autores encontraron que las poblaciones formaron grupos bien delimitados en función de barreras geográficas del paisaje tales como canales de agua, mientras que en los corredores forestales detectaron elevados niveles de flujo génico. Por otro lado Gerlach y Musolf (2000) estudiaron los efectos de varias barreras sobre la subdivisión en poblaciones del topillo rojo (*Clethrionomys glareolus*) empleando 7 loci de microsatélites y encontraron que los ríos, lagos y rutas actuaban como importantes barreras al flujo génico,

diferenciando significativamente a las poblaciones ubicadas a ambos lados de estos elementos del paisaje.

En resumen, la elevada resolución de los microsatélites permitió realizar estudios a escala geográfica de paisaje. El flujo génico siguió una dirección asimétrica desde los valles cordilleranos hacia la población ubicada en la estepa patagónica. Se probó el efecto de ciertos elementos del paisaje con distinta permeabilidad al flujo génico y se encontró que la zona urbana y los lagos en el área lo restringen en gran medida, mientras que los ríos ejercerían una resistencia intermedia entre las poblaciones de *O. longicaudatus*. Este resultado explicaría por qué algunas poblaciones tan cercanas son tan disímiles en su composición genética. Como se mencionó previamente, *O. longicaudatus* es el reservorio natural del hantavirus Andes, que produce HPS, una seria enfermedad en humanos. De acuerdo con los resultados obtenidos, la probabilidad de transmisión de este virus entre los roedores desde sitios de emergencia local sería baja, al menos en el área contemplada en este estudio. Andreo *et al.* (2014) usaron modelos de distribución espacial para examinar la distribución potencial de HPS causada por el virus Andes en el sur de Argentina. Los autores encontraron una correspondencia elevada entre la ocurrencia de HPS y factores ambientales tales como elevada precipitación anual promedio, veranos secos, bajos porcentajes de suelo desnudo y bajas temperaturas en el mes más frío. La información espacial adicional provista en este estudio sobre los elementos del paisaje que ofrecen mayor limitación sobre la dispersión del roedor, deberían tenerse en cuenta para predecir la dirección de la expansión en el caso de un brote de infección. Estos resultados ayudarían a mejorar y reforzar medidas de esfuerzo y prevención.

4. Capítulo 4

Estructura genética de *O. longicaudatus* a escala local o microgeográfica

4.1. Introducción

En mamíferos, la actividad reproductiva y el uso del espacio están fuertemente afectados por la densidad poblacional (Priotto y Steinmann, 1999; Wolff, 2003). El comportamiento social de los mamíferos implica una compleja serie de mecanismos asociados con la competencia por el área de reproducción, con la dispersión y con las estrategias reproductivas. Debido a que los tamaños poblacionales fluctúan de forma estacional, estos comportamientos deben ser lo suficientemente flexibles como para adaptarse a entornos sociales cambiantes. En roedores las densidades poblacionales son especialmente sensibles a cambios ambientales, produciéndose fluctuaciones anuales y plurianuales (Wolff, 1997; Bond y Wolff, 1999). Estas fluctuaciones pueden ser debidas a que sus ciclos reproductivos están sincronizados con la disponibilidad de alimentos, los que a su vez se encuentran altamente relacionados con las variaciones ambientales estacionales. En el roedor *O. longicaudatus*, se han descrito tanto las fluctuaciones poblacionales intra-anales como las interanuales. Estudios realizados en el sur de Chile y Argentina indicaron que las poblaciones exhiben los mayores valores de abundancia en otoño e invierno y los más bajos en verano (Murúa *et al.*, 1986; Murúa *et al.*, 1996; 1998; Polop *et al.*, 2010; Piudo *et al.*, 2011). En este roedor también se han reportado explosiones poblacionales relacionadas al florecimiento de la caña Colihue (nombre común que incluye a *Chusquea quila* y *Chusquea coleou*; Murúa *et al.*, 1996; Murúa, 1998; González *et al.*, 2000; Jaksic y Lima, 2003; Piudo *et al.* 2011). En relación a los estudios de estructura genética y variación en la densidad de *O. longicaudatus*, Boric-Bargetto *et al.* (2012) estudiaron en bosques templados del sur de Chile la variación haplotípica de la región control del ADN mitocondrial antes, durante y después de una ratada. Los autores detectaron una elevada tasa de recambio de haplotipos entre las

distintas fases de la ratada, indicando una alta tasa de recambio individual a escala local. Es decir que habría altos niveles de dispersión temporal entre hábitats contiguos en función de la disponibilidad de alimento. La inmigración debido al florecimiento de la caña Colihue y la posterior mortandad y emigración una vez finalizado el recurso, produciría una dinámica de tipo fuente-sumidero entre las poblaciones del roedor. En otro estudio, González-Ittig *et al.* (2015) encontraron el mismo patrón en las poblaciones de Valle Rivadavia (Cholila); los autores concluyeron que la gran variabilidad en la composición genética de esta localidad a través del tiempo podía atribuirse a los elevados niveles de flujo génico entre hábitats contiguos a escala local. Los estudios ecológicos sugieren que los aumentos importantes de densidad poblacional de *O. longicaudatus*, provocadas por la mayor disponibilidad de alimento, producirían no sólo cambios en la estructura genética sino también en la estructura de edad, la proporción de sexos y hasta en la dinámica entre los sexos (Murúa *et al.*, 1996). En función de las área de acción de los machos y de las hembras, se cree que el sistema de apareamiento de *O. longicaudatus* es poligínico (Conteras, 1972; Pearson, 1983; Murúa *et al.*, 1986; Juan, 2015). En este tipo de sistema un macho se aparee con varias hembras de forma exclusiva, no permitiendo que otros machos del grupo accedan a ellas. La exclusividad puede darse por medio del monopolio directo de los machos sobre las hembras o a través de la defensa de recursos importantes tanto para las hembras como para las crías (alimento, territorio, lugar de nidificación, etc.) (Clutton-Broock, 1989). *O. longicaudatus*, cumpliría con las características mencionadas ya que los machos presentan áreas de acción de mayor magnitud que las hembras y las distancias recorridas por ellos son mayores. Además se describieron elevados niveles de agresividad intra-sexual para la especie, sobre todo entre machos, quienes prácticamente no solapan sus áreas de acción. A nivel inter-sexual en cambio se observó que hay alto grado de

solapamiento entre las áreas de un macho con varias hembras. (Conteras, 1972; Pearson, 1983; Murúa *et al.*, 1986; Juan, 2015). A diferencia de los sistemas de apareamiento, que son propios de las poblaciones y/o especies, las estrategias de apareamiento son propias de individuos. Así, la estrategia de los machos depende de la abundancia y distribución espacial y temporal de las hembras, y de sus habilidades competitivas intra-sexuales (Wolff, 2007; Wolff y Sherman, 2007). Hasta el momento no existen estudios en *O. longicaudatus* que describan los patrones de dispersión efectiva a escala local para cada fase del ciclo de densidad poblacional, ni cómo varía el patrón de dispersión de cada sexo durante esos ciclos.

4.2. Objetivos específicos

- Analizar la estructura genética de *O. longicaudatus* a escala local a fin de: a) inferir a partir del análisis de autocorrelación espacial, el patrón de dispersión de *O. longicaudatus* en las distintas fases del ciclo poblacional inter e intra-anual de la especie (con alta o baja densidad poblacional); b) comparar el patrón de autocorrelación espacial entre machos y hembras a fin de establecer si existen sesgos en la dispersión entre los sexos.

4.3. Hipótesis y predicciones

- A escala local, en períodos de alta densidad (tanto intra como inter-anual) los individuos presentan elevadas tasas de dispersión. Predicción: solo se detectará estructura genética espacial (EGE) en períodos de baja densidad, cuando las tasas de dispersión son menores.
- A escala local, debido al sistema de apareamiento propuesto para la especie, los machos presentan mayores tasas de dispersión que las hembras. Predicción: solo en las hembras se detectará EGE.

- A escala local, en períodos de alta densidad (intra e interanuales) los machos presentan mayores niveles de dispersión que la hembras. Predicción: las hembras mostrarán mayor EGE durante los períodos de baja densidad, cuando las tasas de dispersión son menores.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Muestreo

Como ya se mencionara en el Capítulo 1, los muestreos fueron llevados a cabo por integrantes del GIEPCO (UNRC). Particularmente, el muestreo a la escala geográfica local se realizó para la Tesis Doctoral del Biólogo Ernesto Juan, quién estudió el uso del espacio y dinámica poblacional en *O. longicaudatus*. El lugar de muestreo fue el valle Villa Lago Rivadavia (Figura 12) y se utilizaron las muestras de 2012 y 2013 para cumplir con los objetivos a escala local de la presente Tesis. En el año 2013 (del 1 al 15 de Octubre), realicé una colaboración en las actividades de dicha campaña de muestreo para adquirir experiencia en el trabajo de campo y profundizar en el conocimiento sobre el área de estudio, con sus accidentes geográficos y los ambientes que la componen.

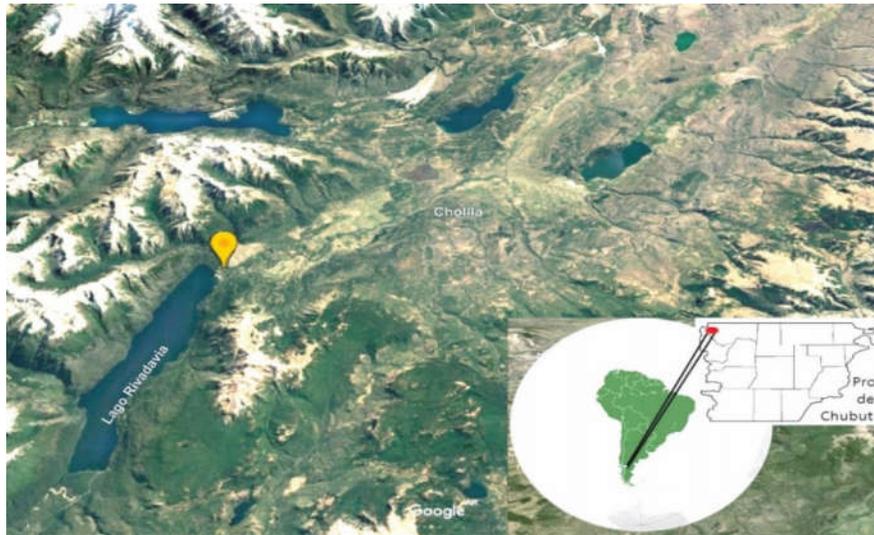


Figura 16: Ubicación geográfica del área de estudio a escala local.

Las muestras se obtuvieron a través de 2 grillas, distantes 150 m entre sí, de 10 x 10 estaciones de trampeo, donde cada estación de trampeo consistió en dos trampas contiguas de captura viva tipo Sherman. Las estaciones de trampeo estuvieron separadas entre sí por una distancia de 20 m. Cada estación de trampeo fue identificada por un sistema de coordenadas formadas por letras (A-J) y un número (1-10). Para proveer una estimación de dispersión se instaló una única línea de trampas entre las grillas. Esta línea de dispersión contó con 19 estaciones de trampeo, 1 trampa de captura viva tipo Sherman por estación, separada por una distancia de 15 m entre sí. (Figura 17) Cada muestreo se realizó por diez noches consecutivas

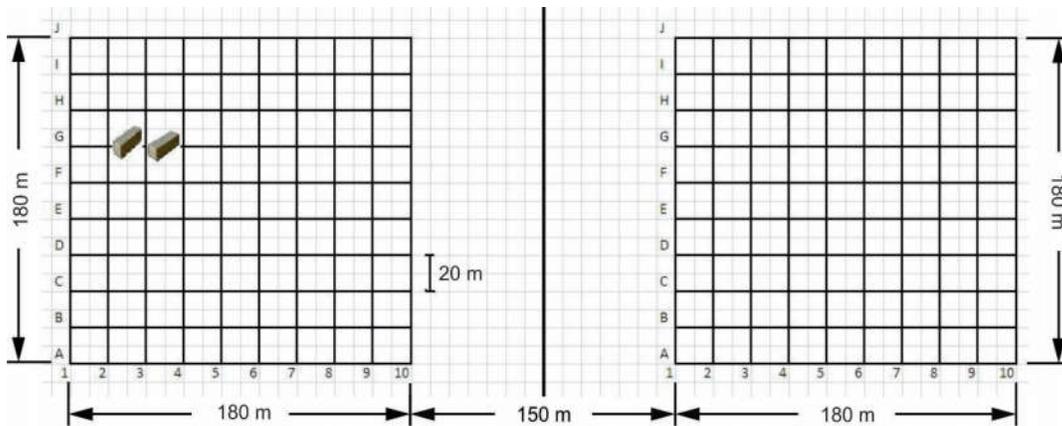


Figura 17: Representación del sistema de trampeo a escala local.

Las muestras utilizadas incluyeron tanto individuos adultos como juveniles, el número y temporada en que se tomaron fueron los siguientes:

- abril-mayo de 2012 (n=70; 35 hembras y 35 machos).
- abril-mayo de 2013 (n=57; 26 hembras y 31 machos).
- febrero de 2013 (n=33; 19 hembras y 14 machos).

4.4.2. Análisis de datos

Para el cumplimiento de los objetivos a escala local se realizaron análisis de autocorrelación espacial con el programa GenalEx 6.4 (Smouse y Peakall, 1999; Peakall y Smouse, 2006). Para cada estación se obtuvo un autocorrelograma general (sin discriminar machos de hembras) y uno para cada sexo. El programa GenalEx 6.4 utiliza la posición geográfica de cada individuo junto con los datos de genotipos individuales a nivel multilocus para calcular un coeficiente de autocorrelación "r", en grupos de individuos separados por una distancia geográfica determinada. Esta prueba estima la extensión geográfica en la cual los individuos están más relacionados que lo esperado por azar. Para este análisis se utilizaron las opciones "Adv. Single Pop" e "Even Sample Sizes", que comparan la distribución de

los genotipos entre pares de individuos separados en clases de distancias con número de muestras similares.

La estimación del coeficiente de autocorrelación espacial r se realizó sobre la hipótesis nula de la no existencia de autocorrelación ($r=0$). En cada análisis se realizaron 9999 permutaciones y se utilizó un intervalo de confianza del 95% para evaluar la significación estadística. Según Smouse y Peakall (1999), en este tipo de análisis, hay tres patrones generales: 1) Patrón clinal (Fig. 18A): r disminuye con la distancia y finalmente se hace negativo. La dispersión está muy restringida y es nula a larga distancia. La variación genética está fuertemente estructurada a nivel geográfica. Si muestreamos dos individuos tomados a distancias geográficas cortas, la probabilidad de que estén genéticamente relacionados es mayor que la esperada por azar. Por el contrario, dos individuos tomados al azar, separados por distancias geográficas grandes, estarán menos relacionados que lo esperado por azar. 2) Patrón estable (Fig. 18B): a distancias cortas, los individuos son más similares que lo esperado por azar, mientras que aquellos separados por distancias más grandes presentan un patrón aleatorio. Es decir, que a distancias geográficas mayores, hay una combinación de valores de r altos para algunos pares de individuos (originadas por dispersión y posterior reproducción de individuos emparentados) y valores de r bajos para otros pares de individuos (individuos no emparentados). Para estos dos patrones, la intercepción de r con el eje cero es una indicación del tamaño del "parche genético", es decir, la extensión geográfica en la cual los individuos están más relacionados que lo esperado por azar. 3) Patrón aleatorio (Fig. 18C): el coeficiente de autocorrelación es cero a cualquier distancia geográfica, es decir, no hay estructuración, los genotipos se distribuyen de manera aleatoria.

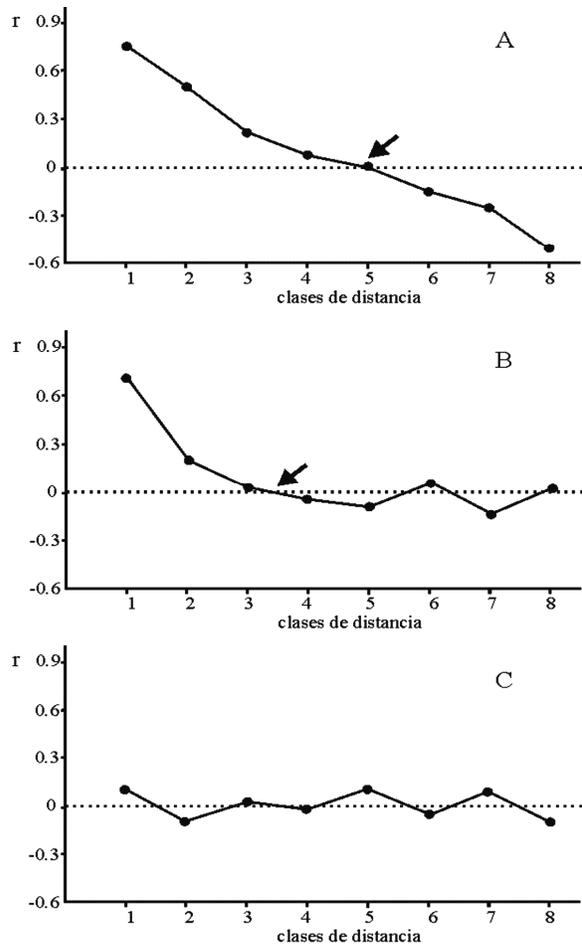


Figura 18: Patrones de autocorrelación espacial según Smouse y Peakall (1999).

4.5. Resultados

Otoño 2012

Los individuos presentaron EGE positiva y significativa en las tres primeras clases de distancia (hasta los 135 m) con un valor de r (coeficiente de autocorrelación espacial) que osciló entre 0,045 y 0,016. Luego de esta distancia, la distribución de los genotipos fue al azar (Figura 19).

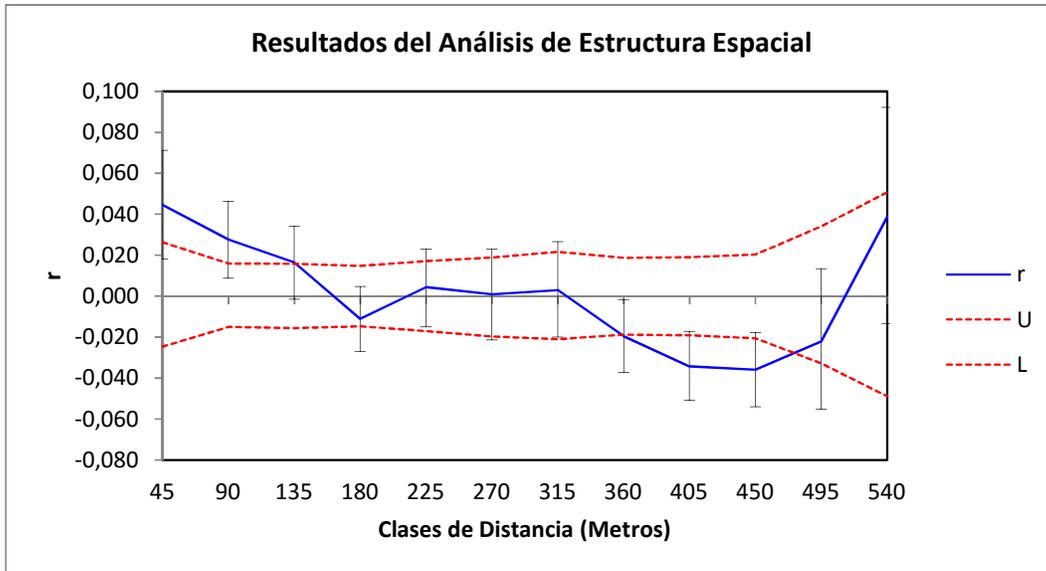


Figura 19: Análisis de autocorrelación espacial de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala local correspondiente a la estación de abril-mayo de 2012. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r. Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Hembras: Se encontró EGE significativa en las dos primeras clases de distancia (hasta los 90 m). Los valores del coeficiente r fueron de 0,1 y 0,069 para la primera y segunda clase de distancia respectivamente. Luego de esa distancia, la distribución de los genotipos fue al azar (Figura 20).

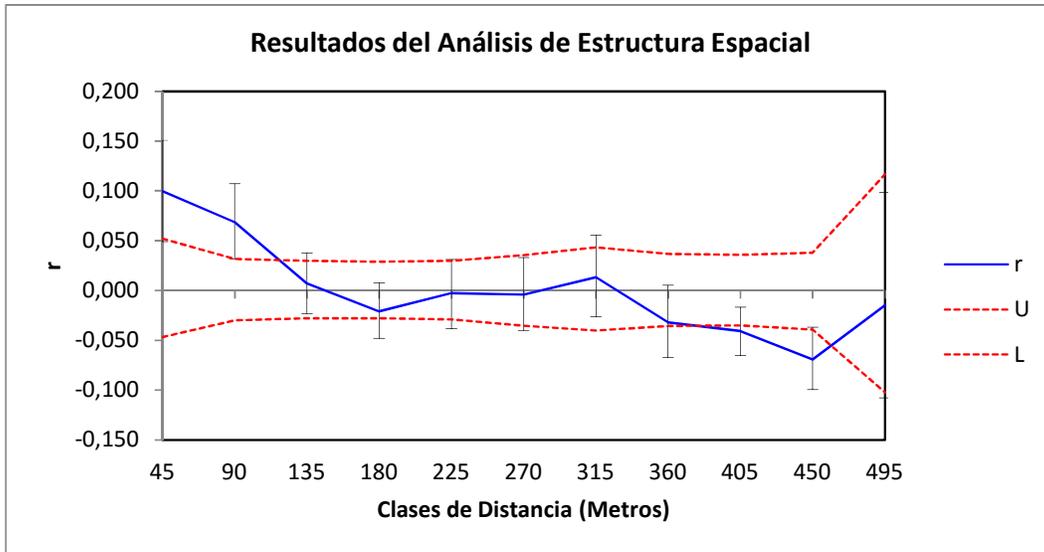


Figura 20: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a las hembras de la estación de abril-mayo de 2012. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Machos: La distribución de los genotipos fue al azar, es decir, no hay EGE (Figura 21).

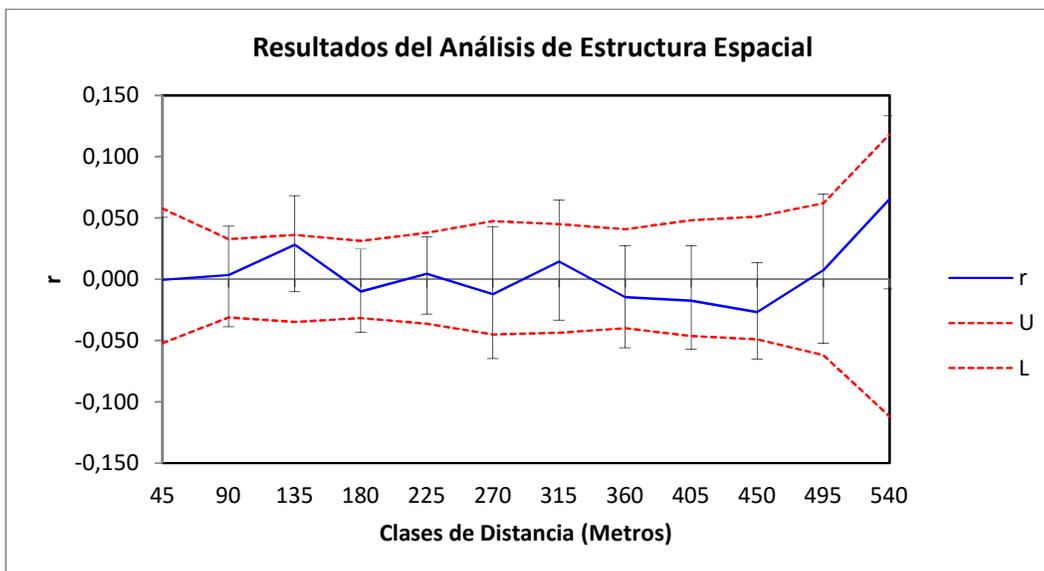


Figura 21: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a los machos de la estación de abril-mayo de 2012. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Otoño 2013

Las dos primeras clases de distancia fueron significativas (hasta los 90 m). El valor de r fue de 0,03 y 0,02 para la primera y segunda clase de distancia respectivamente. Luego de esa distancia la distribución de los genotipos fue al azar (Figura 22).

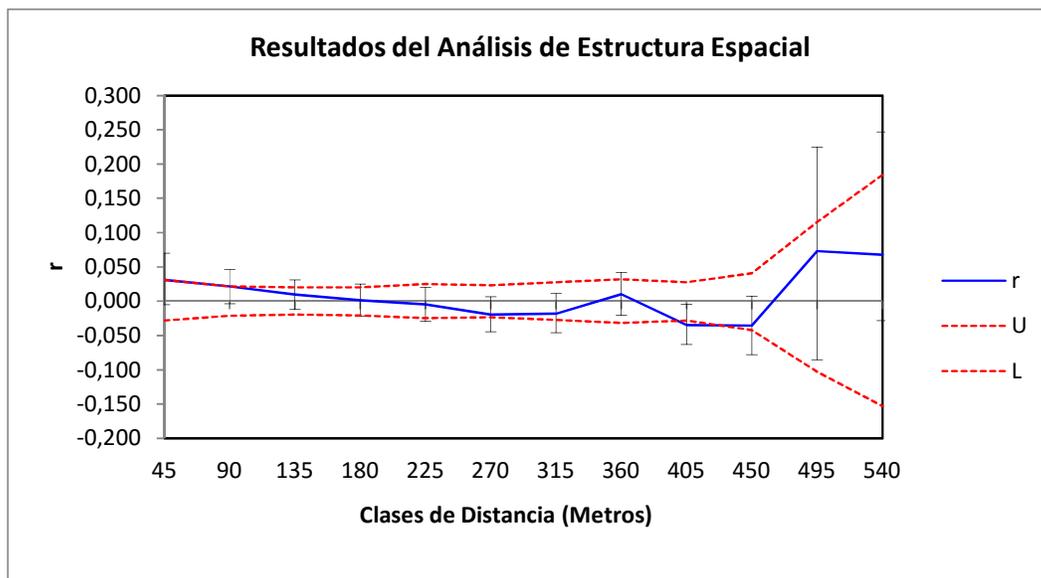


Figura 22: Análisis de autocorrelación espacial de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala local correspondiente a la estación de abril-mayo de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Hembras: Se detectó EGE positiva y significativa en la primera clase de distancia (hasta los 45 m) con un valor de r de 0,1; luego la distribución de los genotipos fue al azar (Figura 23).

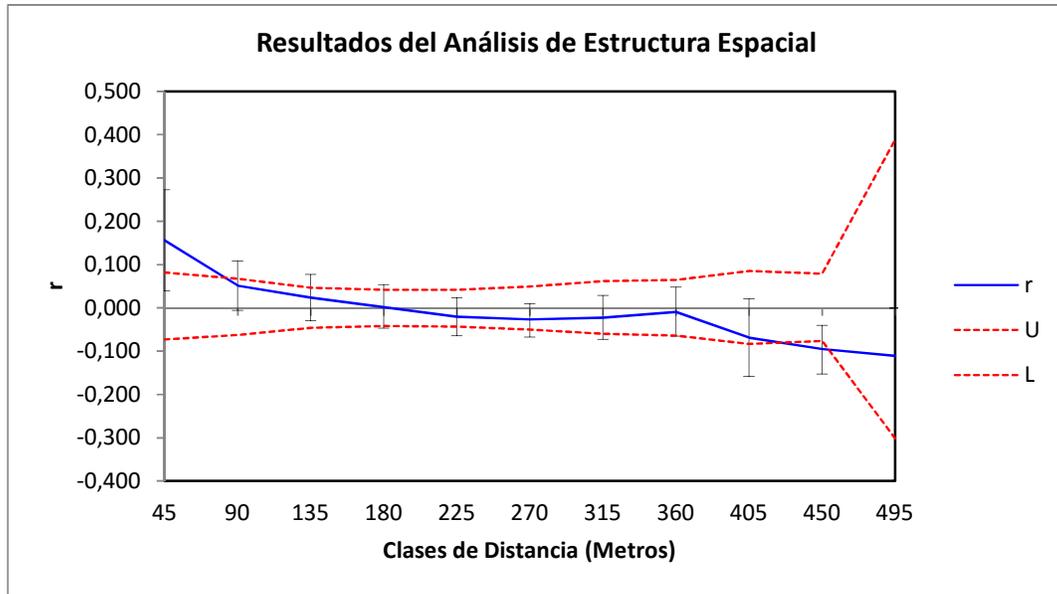


Figura 23: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a las hembras de la estación de abril-mayo de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Machos: No se observó EGE, la distribución de los genotipos fue al azar (Figura 24).

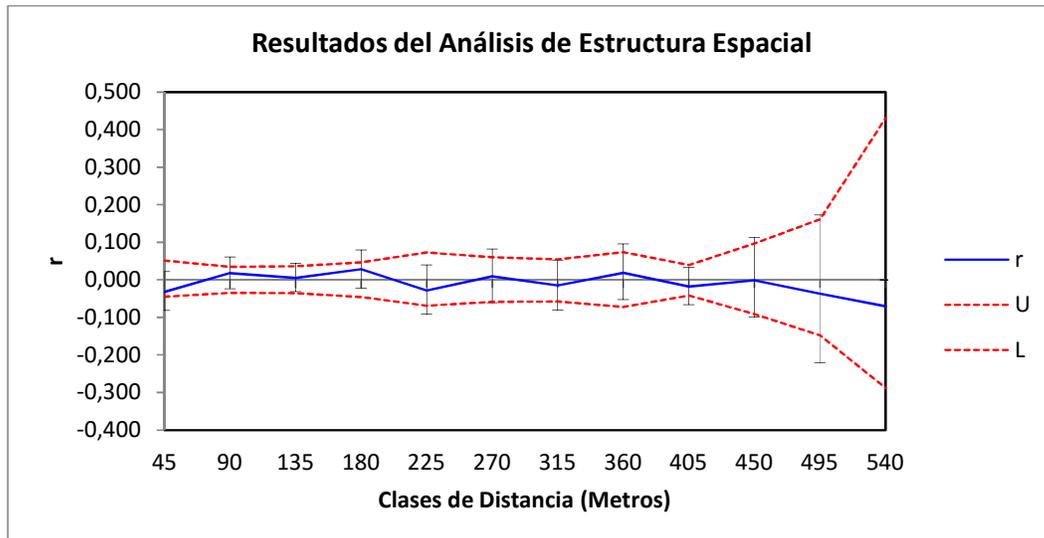


Figura 24: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a los machos de la temporada de abril-mayo de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Verano 2013

El autocorrelograma no reveló EGE para la población total. Ninguna clase de distancia fue significativa y la distribución de los genotipos fue totalmente al azar. Los valores de r oscilaron entre -0,128 y 0,024 (Figura 25).

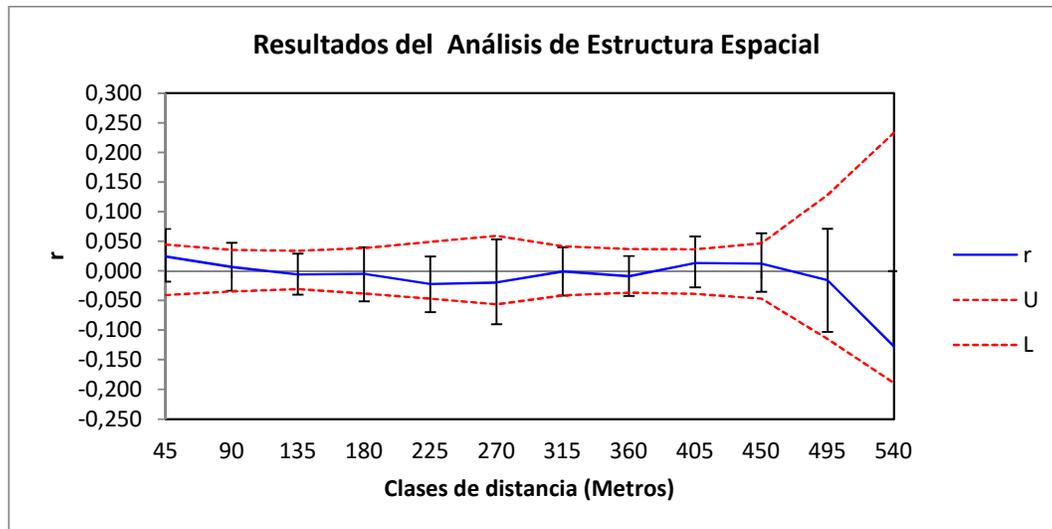


Figura 25: Análisis de autocorrelación espacial de *Oligoryzomys longicaudatus* a escala local correspondiente a la estación de febrero de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Hembras: No se detectó EGE. La distribución de los genotipos fue al azar con valores de r entre -0,091 y 0,109 (Figura 26).

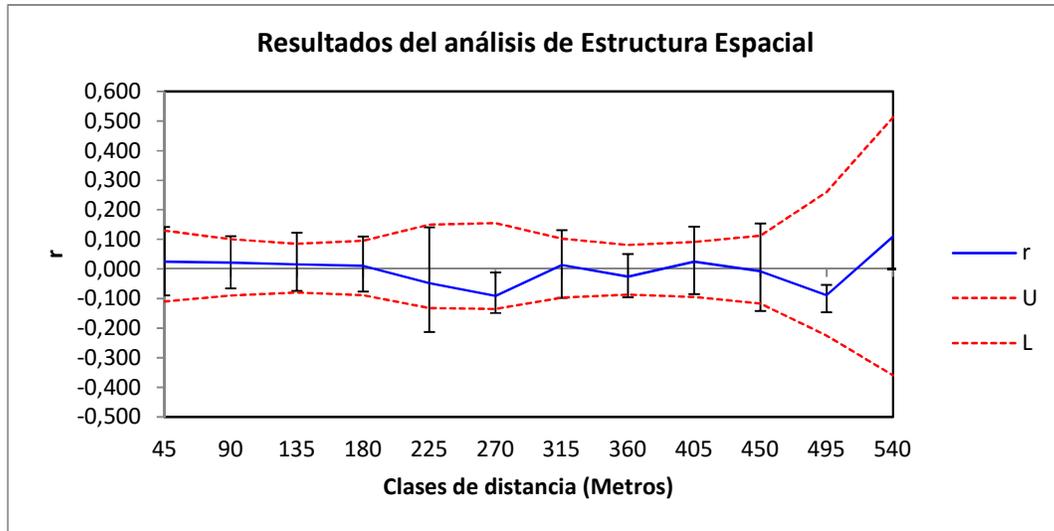


Figura 26: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a las hembras de la estación de febrero de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

Machos: No se detectó EGE. La distribución de los genotipos fue al azar con valores de r entre -0,062 y 0,066 (Figura 27).

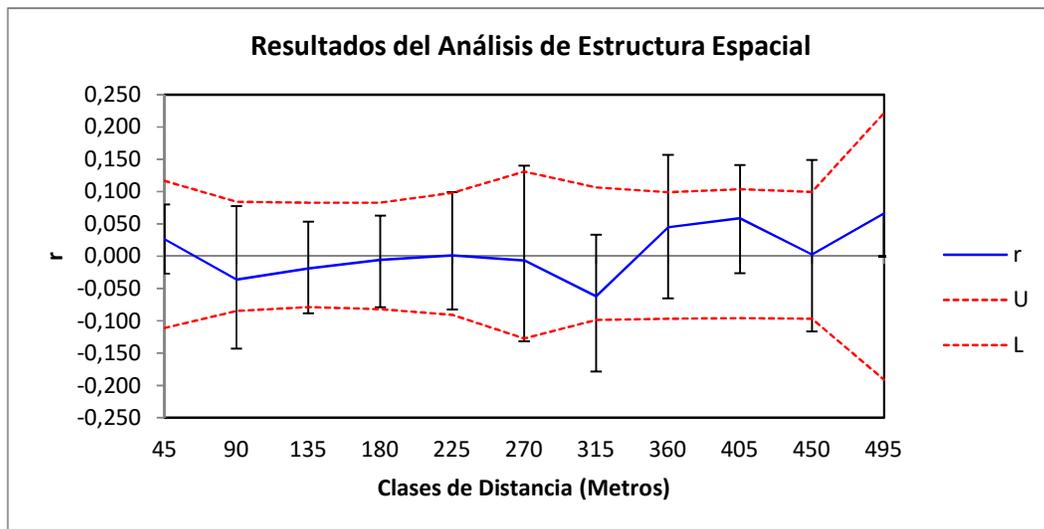


Figura 27: Análisis de autocorrelación espacial a escala local correspondiente a los machos de la estación de febrero de 2013. Línea continua: coeficiente de autocorrelación r . Líneas de puntos: límites del intervalo de confianza del 95%. En el eje x se encuentran las clases de distancias geográficas.

4.6. Discusión y conclusiones

En este Capítulo se analizó la estructura genética a escala local con muestreo realizados a través de un sistema de grillas en Villa Lago Rivadavia (Cholila, Chubut). Se comparó la estructura genética espacial en tres estaciones con distinta densidad poblacional a fin de conocer cómo influyen las variaciones en la densidad poblacional sobre los patrones de dispersión del roedor. En otoño de 2012 (alta densidad poblacional: 24,7 individuos por ha), las clases de distancia para la población general fueron significativas hasta los 135 m y luego de esta distancia se observó un patrón de distribución de genotipos al azar (Figura 19). Esto indica que los individuos emparentados se mantienen cerca unos de otros hasta los 135 m y luego de esta distancia se dispersan de manera aleatoria. Respecto a las diferencias entre hembras y machos, las hembras fueron quienes presentaron mayor EGE (Figura 20) dado que las dos primeras clases de distancia fueron significativas (hasta los 90 m). En cambio, los machos no presentaron estructuración genética significativa, es decir, la distribución de sus genotipos fue al azar (Figura 21). Estos resultados coinciden con lo propuesto en las hipótesis de este capítulo y podría atribuirse a que las hembras presentan comportamientos filopátricos, mientras que los machos serían el sexo dispersante. Estudios ecológicos apoyan esta hipótesis, Contreras (1972) estudió el área de acción de *O. longicaudatus* en poblaciones de la provincia de Neuquén y encontró valores de tamaño significativamente más elevados en los machos (1007 m² en promedio) que en las hembras (681 m² en promedio) y altos niveles de territorialidad en general. Estudios llevados a cabo en la localidad de Villa Lago Rivadavia (Cholila, Chubut) reforzaron estos resultados; Juan (2015) calculó la distancia máxima recorrida para machos y hembras en cada estación del año y comprobó que esta distancia fue mayor para los machos en

todas las estaciones. El valor obtenido para los machos fue de $102,5 \pm 36,34$ m, mientras que el de las hembras fue de $50 \pm 40,67$ m. Por otro lado, Murua *et al.* (1986) estudiaron la variación del área de acción en bosques y arbustales del sur de Chile y detectaron que los machos presentaron áreas de acción significativamente mayores que las hembras en ambos hábitats. Las magnitudes de las áreas de acción de los machos oscilaron entre 0,0872 y 0,4795 hectáreas (ha), mientras que aquellas de las hembras fluctuaron entre 0,0320 y 0,3979 ha. Además, los autores describieron alto solapamiento del área de acción de los machos con el de varias hembras, pero poco solapamiento intra-sexual (especialmente en machos). Según Wolf (1997) y Bond y Wolff (1999) la mayor tasa de dispersión por parte de los machos podría conducir al acceso y monopolización de un mayor número de hembras, mientras que las menores distancias de movimiento de las hembras revela un comportamiento territorial que podría estar dirigido a la protección de sus crías y/o del sitio de nidificación y de hembras potencialmente infanticidas. Este mismo comportamiento se observó en otras especies de cricétidos como *Akodon azarae* (Bonatto *et al.*, 2012; Vera, 2015), en la que los machos compiten por el recurso "hembra" y al ser territoriales, los machos juveniles abandonan el nido apenas alcanzan la madurez sexual, siendo por ende el sexo dispersante. Esto también ha sido observado en *Peromyscus leucopus* y *P. maniculatus* con sistemas de apareamiento poligínico (Wolff *et al.*, 1983; Brandt, 1992; Wolff *et al.*, 1993). En *Calomys venustus*, se encontró variación de acuerdo al sexo y estación. Se observó que en el periodo no reproductivo (alta densidad poblacional), los machos presentaron una estructuración al azar, que podría relacionarse con la dispersión de los machos juveniles de la cercanía de sus madres y con la baja tolerancia intra-sexual de los machos adultos de esta especie. En hembras, en cambio, se encontró estructura positiva hasta los 1100 m, lo cual podría estar relacionado con el final de la actividad reproductiva, que

hace que las hembras permanezcan filopátricas (Chiappero *et al.*, 2016).

Respecto a la comparación inter-anual para evaluar la EGE en función de la densidad en *O. longicaudatus*, en otoño del año 2013 (densidad intermedia: 16,8 individuos por ha) se observó menor EGE que en otoño de 2012 (alta densidad: 24,7 individuos por ha). Las clases de distancias fueron significativas para la población total hasta los 90 m (Figura 22), mientras que en 2012 fueron significativas hasta los 135 m (Figura 19). Sin embargo, los valores de r para las dos primeras clases de distancia (45 y 90 m) fueron mayores para el año 2012 en comparación con el 2013, indicando que a mayores densidades la dispersión disminuye debido a que los individuos emparentados permanecen más cerca unos de otros. Al haber mayor cantidad de individuos en el mismo espacio, el lugar disponible para cada uno resulta menor, aumentando las probabilidades de interacciones intra-específicas. Si bien estos resultados no concuerdan con lo propuesto en las hipótesis (respuesta denso-dependiente positiva), la disminución en la tasa de dispersión relacionada con densidades elevadas podría explicarse si se tiene en cuenta que los individuos establecidos en el área se toleran más entre sí debido al fenómeno de la "cerca social". La hipótesis relacionada con la cerca social (Hestbeck, 1982) predice que las densidades elevadas conducen a una reducción en la dispersión (particularmente en las tasas de inmigración) debido a la creciente posibilidad de encuentros agresivos entre los residentes y los inmigrantes. La cerca social actuará con más fuerza si los residentes no son solo intolerantes a los inmigrantes que intentan establecerse, sino también a los transeúntes que aún no lo han intentado. Cada grupo familiar posee roles de sumisión y dominancia bien establecidos; sin embargo la tolerancia intra-grupo aumentará con la densidad poblacional, que seguirá creciendo hasta que se alcance la capacidad de carga. A medida que los recursos escaseen, los niveles

poblacionales descenderán nuevamente y el fenómeno de cerca social perderá fuerza, dando lugar al comportamiento de espaciamiento. La agresividad intra-grupo por parte de los individuos dominantes provoca un desplazamiento de los sumisos hacia áreas vecinas, que ahora tendrán mayores oportunidades de establecerse, ya que los encuentros agresivos serán menos probables por haber menor cantidad de individuos en las áreas circundantes. Esta respuesta se denomina dependencia negativa de la densidad y puede ser causada por una atracción co-específica, es decir, una tendencia de los individuos a sentirse atraídos por áreas con muchos individuos de la misma especie. Esta atracción puede explicarse por los beneficios que conllevan las agregaciones sociales (por ejemplo el comportamiento anti-depredador y la búsqueda colectiva de alimento). Los aumentos en la densidad podrían entenderse como una señal de disponibilidad de recursos y/o compañeros para aparearse. Las densidades elevadas también podrían favorecer la filopatría, ya que la descendencia tendría la opción de permanecer en el territorio natal en lugar de dispersarse en un ambiente saturado (Matthysen, 2005). La respuesta de dependencia negativa de la densidad sería más marcada en las hembras, ya que los correlogramas de los machos revelaron dispersión al azar de sus genotipos para los dos años comparados. Sin embargo, aunque en menor magnitud, los machos también presentaron una respuesta de dependencia negativa de la densidad, debido a que los valores de autocorrelación r para las tres primeras clases de distancia fueron mayores en otoño de 2012, indicando que a altas densidades los individuos relacionados permanecen más cerca unos de otros. En el caso de las hembras, tanto en otoño de 2012 como de 2013 se observó EGE positiva y significativa, siendo ésta mayor en el primer año mencionado (Figura 23). El área total de hembras genéticamente relacionadas fue de 135 m para 2012 y los valores de autocorrelación fueron mayores para las dos primeras clases de distancia en comparación con los de 2013 (0,100 y 0,069

versus 0,157 y 0,052 para 2013). El menor valor del tamaño del parche genético para las hembras en 2013 (90 m) se debería a la mayor cantidad de espacio disponible que resulta de la menor densidad poblacional, por lo que tienen la posibilidad de dispersarse a mayores distancias sin que ocurran encuentros con otros individuos (es decir, la relación genética se diluye rápidamente y se detecta sólo hasta los 90 m). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por González *et al.* (2000), quienes hallaron que los tamaños promedio de las áreas de acción de *O. longicaudatus* están relacionados con la densidad poblacional, siendo mayores a menor densidad y menores cuando los valores de densidad son altos. Por otro lado, Juan (2015) encontró que para las poblaciones de este roedor en Villa Lago Rivadavia, los valores de distancia máxima recorrida se redujeron significativamente ante aumentos en la densidad poblacional tanto en machos como en hembras, por lo que sugirió la hipótesis de respuesta espacial de tipo "disco elástico" para la especie. Esta hipótesis propone que ante un incremento de la densidad poblacional los machos y/o las hembras disminuyen el tamaño y el grado de solapamiento intra-sexual de sus áreas de acción. Ante descensos posteriores en la densidad poblacional, el tamaño del área de acción se re-establecería hasta que ocurra un nuevo ciclo poblacional. Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyarían dicha hipótesis. La respuesta de disco tipo elástico ante aumentos en la densidad poblacional también se reportó para el roedor *Akodon azarae* (Avila, 2013).

Con respecto a las variaciones intra-anales en la densidad poblacional, en verano de 2013 no se encontró EGE en la población total (Figura 25), lo que indica elevados niveles de dispersión por parte de ambos sexos. Esta estación coincidió con los valores de densidad poblacional más bajos en todo el estudio: 5,71 individuos por ha (Juan, 2015). Una explicación plausible para este resultado sería el espaciamiento debido a la baja densidad sumado a la

migración temporal de individuos entre hábitats contiguos. Este comportamiento ya fue descrito para la especie por Contreras (1972) y Polop *et al.* (2010), quienes señalaron que *O. longicaudatus* presenta una elevada vagilidad y que generalmente, los individuos que se capturan en verano son transeúntes. Un resultado similar se encontró en Chile, donde Murúa *et al.* (1986) estudiaron la ecología poblacional del roedor y reportaron que los pocos animales que fueron capturados en verano eran “nuevos reclutas”. Encontraron que el porcentaje de residentes aumentaba durante la segunda mitad del año, aunque en general este porcentaje era más bien bajo debido a la elevada dispersión de la especie. Meserve *et al.* (1999) indicaron para ambientes arbustivos en Chile que *O. longicaudatus* no residiría de manera permanente en un sitio, sino que, por el contrario, su característica oportunista le permitiría desplazarse hacia hábitats periféricos (ej. durante años secos). Desde allí podrían restablecer nuevas poblaciones por inmigraciones cuando las condiciones climáticas se tornan favorables. Esto también ha sido observado en otras especies de roedores como *Clethrionomys glareolus* (Bondrup-Nielsen, 1986), *Clethrionomys rufocanus* (Ostfeld y Klosterman, 1986) y *Microtus oeconomus* (Lars y Steen, 2006). Factores como la cobertura vegetal, humedad, temperaturas mínimas y disponibilidad de semillas serían clave para la dispersión de los individuos entre hábitats. González-Ittig *et al.* (2015) en una comparación de la variabilidad genética intra-anual entre distintos hábitats, encontraron que el arbustal (donde se realizó el muestreo a escala local) presentó la mayor proporción de individuos con ancestría mixta en verano. Lidicker (1975) y Boonstra (1994) encontraron resultados similares en sus estudios sobre otros roedores, donde propusieron que la menor tasa de recaptura en verano se atribuye a las mayores tasas de movimiento, sobretodo en juveniles y subadultos. Estas clases de edades se dispersarían antes de que el área natal se sature y comience la competencia con sus padres; al evitar la competencia

habría una ganancia en aptitud (fitness) de los individuos dispersantes.

En resumen, en el presente estudio se determinó que el sexo dispersante sería principalmente el macho, quien recorrería mayores distancias para acceder a un mayor número de hembras, como resultado de un sistema de apareamiento poligínico. La estructura genética en otoño (tanto para el año 2012 como para el 2013) estaría determinada por las hembras, quienes se dispersarían menos por presentar comportamientos filopátricos. En verano, cuando la densidad es la más baja del año, tendría lugar el fenómeno de espaciamiento, aumentando los niveles de dispersión en ambos sexos. El elevado recambio poblacional descrito en esta estación sería producto del intercambio de individuos entre hábitats contiguos promovido por los cambios en las condiciones ambientales. Respecto a los cambios en densidad inter-anual, en 2012 (elevada densidad poblacional) se observó mayor EGE que en 2013 (densidad intermedia), especialmente en hembras, lo que podría deberse a una mayor tolerancia entre los individuos de un mismo grupo familiar que defiende agresivamente el territorio, evitando la inmigración de individuos foráneos (comportamiento conocido como cerca social). Estos resultados apoyan el modelo de disco elástico propuesto anteriormente para la especie.

5. Conclusiones finales

5. Conclusiones finales

A la hora de abordar el estudio sobre la dinámica de dispersión de los virus y sus reservorios es de fundamental importancia realizar estudios a múltiples escalas geográficas, ya que la distribución espacial se ve afectada por diferentes procesos y factores ambientales según la escala considerada (Pearson y Dawson, 2003). De acuerdo con esto, los estudios multiescala permiten conocer la estructura poblacional de una manera más integral y exhaustiva, ya que tienen en cuenta tanto los patrones históricos como ecológicos del proceso. En el presente trabajo se estudió la estructura genética poblacional de *O. longicaudatus* a tres escalas espaciales.

- Escala Regional: se encontró estructuración genética con disposición latitudinal, indicando bajos niveles actuales de flujo génico entre las poblaciones de *O. longicaudatus* a esta escala geográfica. El elevado nivel de resolución de los microsatélites permitió la detección de diferenciación genética entre las poblaciones patagónicas, que no había sido observada en el estudio filogeográfico de González Ittig *et al.* (2010) utilizando la Región Control del ADN mitocondrial.

- Escala de paisaje: a esta escala, se detectó diferenciación genética entre los cuatro valles de la localidad de Cholila. Además, el flujo génico seguiría una dirección asimétrica desde los valles cordilleranos hacia Leleque, ubicada en la estepa patagónica. Se evaluó el efecto de ciertos elementos del paisaje con distinta permeabilidad al flujo génico y se encontró que la zona urbana y los lagos restringen en gran medida la dispersión en el área, mientras que los ríos ejercerían una resistencia intermedia. Este resultado explicaría por qué algunas poblaciones tan cercanas son tan disímiles en su composición genética. De acuerdo con los resultados obtenidos, la probabilidad de transmisión del hantavirus Andes entre los roedores desde sitios de emergencia local sería baja, al menos en el área contemplada en este estudio. La información espacial adicional

provista respecto de los elementos del paisaje que ofrecen mayor limitación sobre la dispersión del roedor, deberían tenerse en cuenta para predecir la dirección de la expansión en el caso de un brote de infección, lo que ayudaría a mejorar y reforzar medidas de prevención.

- A escala local: se determinó que los machos presentaron mayores niveles de dispersión que las hembras en todas las estaciones, avalando los resultados detectados en los estudios ecológicos previos y que serían compatibles con el sistema de apareamiento poligínico propuesto para la especie. La estructura genética espacial en otoño estaría determinada por las hembras, que permanecerían filopátricas en defensa de sus nidos y crías. La temprana dispersión de los machos a partir de sus madres evitaría la competencia intra-sexual. En verano, ninguno de los sexos presentó estructura genética espacial, lo cual podría deberse al espaciamiento producto de las bajas densidades reportadas para la estación y a las elevadas tasas de recambio entre hábitats contiguos, en función de la variación en condiciones ambientales tales como disponibilidad de alimento y refugio. Respecto a los cambios inter-anales en la densidad se observó que, ante aumentos poblacionales, los individuos emparentados permanecían más cerca unos de otros, aumentando su tolerancia e inhibiendo la inmigración de individuos foráneos. Esto sería más evidente en las hembras debido a su comportamiento filopátrico.

En síntesis, este estudio resalta la importancia de las aproximaciones a varias escalas geográficas en el análisis de fenómenos como la estructura genética para obtener información potencialmente útil a la hora de establecer el área de riesgo para humanos y dirigir programas de prevención y control. También aportó a dilucidar los múltiples procesos, tanto históricos como contemporáneos, que ejercieron mayor influencia en la estructura genética actual de la especie.

6. Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliograficas

- Aars J, Ims MA, Liu HP, Mulvey M y Smith MH (1998) Bank voles in linear habitats show restricted gene flow as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **7**, 1393-1389.
- Aars J, Ims RA (1999) The effect of habitat corridors on rates of transfer and interbreeding between vole demes. *Ecology* **80**, 1648-1655.
- Andreo VC, Glass G, Shields T, Provencal C, Polop J (2011). Modeling potential distribution of *Oligoryzomys longicaudatus*, the Andes virus (Genus: Hantavirus) reservoir, in Argentina. *EcoHealth* **3**, 332-348.
- Andreo VC (2012) Variables ambientales en la dinámica espacial de *Oligoryzomys longicaudatus* (huésped del virus Andes) en la región Noroeste de Chubut, Argentina. Disertación doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Andreo VC, Neteler M, Rocchini D, Provencal C, Levis S, Rizzoli A, Porcasi X, Lanfri M, Scavuzzo M, Pini N, Enria D, Polop, J (2014) Estimating Hantavirus risk in southern Argentina: A GIS-Based approach combining Human cases and host distribution. *Viruses* **6**, 201-222.
- Avila AB (2013) Efecto de la densidad en el uso del espacio y la actividad reproductiva del ratón de pastizal, *Akodon azarae*. Tesis de licenciatura (56 pp.) UNRC, Córdoba.
- Awise JC (2000) Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Baró AM, Vergara OJ, Navarrete CM (1999) Hantavirus en Chile: revisión y análisis de casos desde 1975. *Revista Médica de Chile* **12**, 1513-1523.
- Bayes T (1763) An Essay towards solving a Problem in the Doctrine of Chances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **53**, 370-418.

- Bellomo C, Nudelman J, Kwaszka R, Vázquez G, Cantoni G, Weinzettel B et al. (2009) Expansión geográfica del síndrome pulmonar por hantavirus en la Argentina: Informe del caso más austral. *Medicina (Buenos Aires)* **6**, 647-650.
- Biek R, Real LA (2010) The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Molecular Ecology* **19**, 3515-3531.
- Bonato F, Gomez D, Steinmann A, Priotto J (2012) Mating strategies of pampean mouse males. *Animal Biology* **62**, 381-396.
- Bond ML y Wolff JO (1999) Does access to females or competition among males limit male home-ranges in a promiscuous rodent? *Journal of Mammalogy* **4**, 1243-1250.
- Bondrup-Nielsen S, Ims RA (1986) Reproduction and spacing behaviour of females in peak density population of *Clethrionomys glareolus*. *Holarctic Ecology* **9**, 109-112.
- Bonnet E, Van de Peer Y (2002) zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical software* **10**, 1-12.
- Boone JD, Otteson EW, McGwire KC, Villard P, Rowe JE, StJeor SC (1998) Ecology and demographics of hantavirus infections in rodent populations in the Walker river basin of Nevada and California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**, 445-451.
- Boonstra R (1994) Population cycles in microtines: The senescence hypothesis. *Evolutionary Ecology* **8**, 196-219.
- Booth W, Montgomery WI, Prodöhl PA (2009) Spatial genetic structuring in a vagile species, the European wood mouse. *Journal of Zoology* **279**, 219-228.
- Boric-Bargetto D, Rodríguez-Serrano E, Hernández CE, Jaksic FM, Palma RE (2012) Temporal variation in genetic diversity during an outbreak of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Sigmodontinae) in a temperate forest of southern Chile. *Biochemical Systematics and Ecology* **44**, 383-389.

- Brandt CA (1992) Social factors in immigration and emigration. In NC Stensth and WZ Lidicker Jr. (eds). Animal dispersal-small mammals as a model. Chapman and Hall, Ltd., London.
- Bruford ME, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. En: Molecular Genetic Analysis of Populations, a practical approach. Editado por Hoelzel AR, pp. 228. Oxford University Press.
- Cabrera AL, Willink A (1973) Biogeografía de América Latina. Serie de Biología. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 13,1-120.
- Calderón G, Pini N, Bolpe J, Levis S, Mills J, Segura E, Guthmann N, Cantoni G, Becker J, Fonollat A, Ripoll C, Bortman M, Benedetti R, Sabattini M, Enria D (1999) Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerging Infectious Diseases* **5**,792-797.
- Carbajo AE, Pardiñas UF (2007) Spatial distribution model of a Hantavirus reservoir, the long-tailed colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*), in Argentina. *Journal of Mammalogy* **88**, 1555-1568.
- Carbajo AE, Vera C, González PLM (2009) Hantavirus reservoir *Oligoryzomys longicaudatus* spatial distribution sensitivity to climate change scenarios in Argentine Patagonia. *International Journal of Health Geographics* **8**, 44 doi: 10.1186/1476-072X-8-44.
- Chiappero MB, Gardenal CN (2003). Restricted gene flow in *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae), the natural reservoir of Junin virus. *Journal of Heredity*. **94**, 490-495.
- Chiappero MB, Sommaro LV, Priotto JW, Wiernes MP, Steinmann AR, Gardenal CN (2016) Spatio-temporal genetic structure of the

- rodent *Calomys venustus* in linear, fragmented habitats. *Journal of Mammalogy* **97**, 424-435.
- Clutton-Brock TH (1989) Mammalian mating systems. *Proceedings of the Royal Society of London* **236**, 339-372.
- Contreras JR (1972) El home range en una población de *Oryzomys longicaudatus philippii* (Landbeck) (Rodentia, Cricetidae) *Physis* **31**, 353-361.
- Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, Hewison AJM (2004) Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* **13**, 2841-2850.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, Angibault JM, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M, Hewison AJM (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: Empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* **15**, 1669-1679.
- Cushman S, McKelvey K, Hayden J, Schwartz M (2006) Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with causal modeling. *The American Naturalist* **168**, 486-499.
- Cushman S, Wasserman, T, Landguth E, Shirk A (2013). Re-Evaluating Causal Modeling with Mantel Tests in Landscape Genetics. *Diversity* **5**, 51-72.
- Emlen ST, Oring LW (1977) Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science* **197**, 215-223.
- Enra DA, Pinheiro F (2000) Rodent-borne emerging viral zoonosis. Hemorrhagic fevers and Hantavirus infections in South America. *Infectious Disease Clinics of North America* **14**, 167-184.
- Enra DA, Levis (2004) Zoonosis virales emergentes: las infecciones por hantavirus. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* **23**, 595-611.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Resources* **7**, 574-578.
- Freeland JR, Kira H, Petersen SD (2011) *Molecular Ecology*. Wiley-Blackwell, Oxford Pp. 50-62 y 148-150.
- Gallardo MH, Mercado CL (1999) Mast seeding of bamboo shrubs and mouse outbreaks in Southern Chile. *Mastozoología Neotropical* **6**, 103-111.
- Garcia-Mudarra JL, Ibanez C, Juste J (2009) The Straits of Gibraltar: barrier or bridge to Ibero-Moroccan bat diversity. *Biological Journal of the Linnean Society* **96**, 434-450.
- Garrido-Garduño T, Vázquez-Domínguez E (2013) Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**, 1031-1054.
- Garrido-Garduño T, Tellez-Valdez O, Manel S, Vazquez-Dominguez E (2015) Role of habitat heterogeneity and landscape connectivity in shaping gene flow and spatial population structure of a dominant rodent species in a tropical dry forest. *Journal of Zoology* **298**, 293-301.
- Gerlach G, Musolf KF (2000) Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* **14**, 1066-1074.
- Gonzalez LA, Murúa R, Cofre C (2000) Habitat utilization of two species in relation to population outbreaks in southern temperate forests of Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* **73**, 489-495.
- González Ayala S (2004) Síndrome pulmonar por hantavirus en niños. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **4**, 537-44.
- González-Ittig RE, Theiler GR, Gardenal CN (2002) A contribution to the subgeneric systematics of *Oligoryzomys* (Rodentia, Muridae) from Argentina by means of PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology*. **1**, 23-33.

- González-Ittig RE, Gardenal CN. (2004). Recent range expansion and low levels of contemporary gene flow in *Calomys musculus*: its relationship with the emergence and spread of Argentine hemorrhagic fever. *Heredity*. **93**, 535.
- González-Ittig RE, Salazar-Bravo J, Polop JJ, Gardenal CN (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers in *Oligoryzomys longicaudatus* (Muridae, Sigmodontinae, Oryzomini), the natural reservoir of genotype Andes hantavirus. *Molecular Ecology* **8**, 1466-1468.
- González-Ittig RE, Rossi-Fraire HJ, Cantoni GE, Herrero ER, Benedetti R, Gardenal CN (2010) Population genetic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Cricetidae) from Argentina and Chile based on the mitochondrial control region. *Canadian Journal of Zoology* **88**, 23-35.
- González-Ittig RE, Polop FJ, Andreo VC, Chiappero MB, Levis S, Calderón G, Provencal MC, Polop JJ, Gardenal CN (2015) Temporal fine-scale genetic variation in the zoonosis-carrying long-tailed pygmy rice rat in Patagonia, Argentina. *Journal of Zoology* **296**, 216-224.
- Goudet J (2002) FSTAT 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indexes. Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guillot GA, Estoup F, Mortier J, Cosson J (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.
- Guillot G, Leblois R, Coulon A, Frantz AC (2009) Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* **23**, 4734-4756.
- Guivier E, Galan M, Chaval Y, Xuéreb A, Ribas-Salvador A, Pouille ML, Voutilainen L, Henttonen H, Charbonnel N, Cosson JF (2011) Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Molecular Ecology* **20**, 3569-3583.

- Hartl DL y Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. 3rd edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Hestbeck JB (1982) Population regulation of cyclic mammals: the social fence hypothesis. *Oikos*, 157-163.
- Hutchinson DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Jaksic FM y Lima M (2003) Myths and facts on ratadas: Bamboo blooms, rainfall peaks and rodent outbreaks in South America. *Austral Ecology* **28**, 237-251.
- Juan E (2015) Uso del espacio y dinámica poblacional de *Oligoryzomys longicaudatus* en el valle Lago Rivadavia (Provincia de Chubut), área endémica de Síndrome Pulmonar por Hantavirus (HPS) Disertación doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Kimura M, Weiss G (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**, 561-576.
- Krebs CJ, Wingatej LeDuc J, Redfield JA, Taitt M, Hilborn R (1976) *Microtus* population biology: Dispersal in fluctuating population of *M townsendii*. *Canadian Journal of Zoology* **56**, 2253-2262.
- Langella, O (1999) Populations 1.2.30: a population genetic software. CNRS UPR9034. Disponible en:
<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>.
- Langlois JP, Fahrig L, Merriam G, Artsob H (2001) Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. *Landscape Ecology* **16**, 255-266.

- Lars K, Steen H (2006) Small rodent winter survival: Snow conditions limit access to food resources. *Journal of Animal Ecology* **75**, 156-166.
- Lázaro ME, Resa AJ, Barclay CM, Calanni L, Samengo L, Martínez L, Padula PJ, Pini N, Lasala MB, Elsner B, Enría DA (2000) Síndrome pulmonar por Hantavirus en el sur andino argentino. *Medicina* **60**, 289-301.
- Lessa, EP, D'Elía G, Pardinas UFJ (2010) Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology* **19**, 3031-3037.
- Levis S, Morzunov SP, Rowe JE, Enria, D, Pini, N, Calderón, G, Sabattini, M, Jeor SC (1998) Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *Journal of Infectious Diseases* **177**, 529-538.
- Li Y-L, Liu J-X (2018) StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*.**18**, 176–177.
- Lidicker WZ Jr (1975) The role of dispersal in the demography of small mammal population. Pp. 103-128, en: Small Mammals: Their production and population dynamic (FB Golley, K Petruszewicz y L Ryszkowskieds, eds.). Cambridge University Press, London.
- Lidicker WZ, Stenseth NC (1992) To disperse or not to isperse: who does it and why? Pp 21-33 en Animal dispersal, samall mammals as a model (Stenseth and WZ Lidicker eds.). Chapman & Hall.
- Lima M, Marquet PA, Jaksic FM (1999) El Niño events, precipitation and rodent outbreak are statistically associated in semiarid Chile. *Ecography* **22**, 213-218.
- Manaster CJ (2002) Allelogram: a program for normalizing and binning microsatellite genotypes [Internet]. Disponible en: <http://code.google.com/p/allelogram/>.

- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 189-197.
- Matthysen E (2005) Density-dependent dispersal in birds and mammals. *Ecography*. **28**, 403-416.
- McDonald RW, St Clair C (2004) The effects of artificial and natural barriers on the movement of small mammals in Banff National Park, Canada. *Oikos* **105**, 397-407.
- Mcrae B, Shah V, Mohapatra T (2014) Circuitscape 4 User Guide. The Nature Conservancy. Disponible en: <http://www.circuitscape.org>.
- Meserve LP, Martinez DR, Rau JR, Murúa R, Lang BK, Muñoz-Pedreros A (1999) Comparative demography and diversity of small mammals in precordilleran temperate rainforest of southern Chile. *Journal of Mammalogy* **80**, 880-890.
- Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA), version **1.3**. Department of Biological Sciences, Northern Arizona.
- Mills JN, Childs JE, Ksiazek, TG, Peters, CJ, Velleca WM (1995) Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta (GA), U.S. Department of Health and Human Services. 60 pp.
- Mills JN, Childs JE (1998) Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 529-537.
- Mills JN (1999) The role of rodents in emerging human disease: examples from the hantaviruses and arenaviruses. *Ecologically-based rodent management*. pp 134-160. Editado por Singleton GR, Hinds LA, Leirs H, Zhang Z. Arrawang Commun Group, Canberra, Australia.
- Mills JN (2005) Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease. *Archives of Virology* **19**, 45-57.

- Mora MS, Mapelli FJ, López A, Fernández MJ, Mirol PM, Kittlein MJ. (2017) Landscape genetics in the subterranean rodent *Ctenomys "chasicuensis"* associated with highly disturbed habitats from the southeastern Pampas region, Argentina. *Genética* **145**, 575-91.
- Morrone JJ (2015) Regionalisation of the Andean region. *Zootaxa* **3936**, 207-236.
- Murúa R, González LA (1982) Microhabitat selection of two Chilean cricetid rodents. *Oecologia* **52**, 12-15.
- Murúa R, González LA, Meserve PL (1986) Population ecology of *Oryzomys longicaudatus philippi* (Rodentia: Cricetidae) in southern Chile. *Journal of Animal Ecology* **55**, 281-293.
- Murúa R, González LA, González M, Jofré C (1996) Efectos del florecimiento del arbusto *Chusquea quila Kunth* (Poacea) sobre la demografía de poblaciones de roedores de los bosques templados fríos del sur chileno. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* (Chile) **67**, 37-42.
- Murúa R, Briones M (2005) Abundance of the sigmodont mouse *Oligoryzomys longicaudatus* and patterns of tree seeding in Chilean temperate forest. *Mammalian Biology* **70**, 321-326.
- Murúa R (1998) Ecología de los reservorios silvestres de Hantavirus en Chile. *Revista Chilena de Infectología* **15**, 79-83.
- Nei M, Roychoudhury AK (1972) Gene differences between Caucasian, Negro, and Japanese populations. *Science* **177**, 434-436.
- Neilan BA, Leigh DA, Rapley E y McDonald BL (1994) Microsatellite genome screening: rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeat analysis. *Biotechniques* **17**, 708-712.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecology Evolution* **20**, 328-336.

- Ostfeld RS, Klosterman L (1986) Demographic substructure in a California vole population inhabiting a patchy environment. *Journal of Mammalogy* **67**, 693-704.
- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD (1998). Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* **241**, 323-30.
- Padula PJ, Colavecchia SB, Martínez VP, González Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SDL, Russi J, Mora riquelme J, Colucci N, Almirón M, Rabinovich RD (2000) Genetic diversity, distribution, and serological features of Hantavirus infection in five countries in South America. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3029-3035.
- Padula P, Figueroa R, Navarrete M, Pizarro E, Cadiz R, Bellomo C, Jofre C, Zaror L, Rodriguez E, Murúa R (2004) Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *Journal of Virology* **78**, 11972-11979.
- Padula P, Martinez VP, Bellomo C, Maidana S, San Juan J, Tagliaferri P, Bargardi S, Vazquez C, Colucci N, Estévez J, Almirón M (2007) Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 1211-1214.
- Palma RE, Rivera-Milla E, Salazar-Bravo J, Torres-Pérez F, Pardiñas UFJ, Marquet PA, Spotorno AE, Meynard AP, Yates TL (2005) Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy* **86**, 191-200.
- Palma E, Cancino R, Rodriguez-Serrano E (2010) Molecular systematics of *Abrothrix longipilis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Chile. *Journal of Mammalogy* **5**, 1102-1111.
- Palma RE, Boric-Bargetto D, Torres-Pérez F, Hernández CE (2012) Glaciation effects on the phylogeographic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the southern Andes. *PLoS One* **7**, e32206.

doi:10.1371/journal.pone.0032206.

- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6.0: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**,288-295.
- Pearson O (1983) Characteristics of a mammalian fauna from forests in Patagonia, southern Argentina. *Journal of Mammalogy*. **64**, 476-492.
- Pearson RG, Dawson TP (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* **12**, 361-371.
- Pinna DM, Martínez VP, Bellomo CM, López C, Padula P (2004) New epidemiologic and molecular evidence of person to person transmission of Hantavirus Andes South. *Medicina* **64**, 43-46.
- Piudo L, Monteverde MJ, Walker RS, Douglass RJ (2011) Rodent community structure and Andes virus infection in sylvan and peridomestic habitats in Northwestern Patagonia, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 315-324.
- Polop F, Provencal MC, Pini N, Calderón G, Priotto J, Enría D, Polop J (2010) Temporal and spatial host abundance and prevalence of Andes hantavirus in Argentina. *Southern Ecohealth* **7**, 176-84.
- Polop F (2011). Dinámica del sistema virus-huésped-enfermedad en Hantavirus para Cholila (Chubut). Disertación doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Polop F, Juan E, Polop J, Provencal M (2014) Spatial and temporal variation of terrestrial rodent assemblages in Cholila, Chubut Province, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **49**, 151-157.
- Polop F, Sepúlveda L, Pelliza-Sbriller A, Polop J, Provencal M (2014) Food habits of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia) in a steppe-forest transitional area of Argentinean Patagonia. *Ecología Austral* **24**, 304-310.

- Priotto JW, Steinmann AR (1999) Factors affecting home range size and overlap in *Akodon azarae* (Muridae: Sigmodontinae) in natural pasture of Argentina. *Acta Theriologica* **44**, 37-44.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Purves K *et al.* Vida. La ciencia de la biología. 6a ed. Buenos Aires: Ed médica panamericana, 2004.1133 p. ISBN 950-06-1803-6.
- QGIS Development Team. 2014. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Disponible en: <http://qgis.osgeo.org>.
- Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A (2014) Tracer v1.6. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rivera PC, González-Ittig RE, Rossi-Fraire HJ, Levis S, Gardenal CN (2007) Molecular identification of species of the genus *Oligoryzomys*, putative reservoirs of hantaviruses and phylogenetic relationships among the species present in Argentina. *Zoologica Scripta* **36**, 231-239.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Resources* **4**, 137-138.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Safner T, Miller MP, McRae BH, Fortin MJ, Manel S (2011) Comparison of Bayesian clustering and edge detection methods for inferring boundaries in landscape genetics. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**, 865-89.
- Schmidt KA, Ostfeld RS (2001) Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* **82**, 609-619.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000.

Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.

- Schweizer M, Excoffier L, Heckel G (2007) Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular ecology* **16**, 2463-2473.
- Selkoe AK, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Sersic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Morando M (2011) Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**, 475-494.
- Sloan CD, Duell EJ, Xun Shi RI, Andrew AS, Williams SM, Moore JH (2009) Ecogeographic genetic epidemiology. *Genetic Epidemiology* **4**, 281-289.
- Smouse OE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**, 561-573.
- Soliani C (2012) Historia Evolutiva de dos especies forestales nativas de la Patagonia Argentina y su Relación con la Conservación y Manejo de sus Recursos Genéticos. Disertación doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Soliani C, Gallo L, Marchelli P (2012) Phylogeography of two hybridizing southern beeches (*Nothofagus* spp.) with differential adaptative abilities. *Tree Genetics & Genomes* **8**, 659-673.
- Torres-Pérez F, Palma E, Hjelle B, Homes EC, Cook JA (2011) Spatial but not temporal co-divergence of a virus and its mammalian host. *Molecular Ecology* **20**, 4109-4122.
- Vähä JP, Primmer CR (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*. **15**, 63-72.

- Vera NS (2015) Estructura genética poblacional de roedores de la especie *Akodon Azarae* en ambientes fragmentados de la pampa. Disertación doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology* **15**, 1419-39.
- White E, Sahota R, Edes S (2002) Rapid microsatellite analysis using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis. *Genome* **45**, 1107-1109.
- Whitlock MC, Mccauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1 / (4Nm + 1)$. *Heredity* **82**, 117-125.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **3**, 1177-1191.
- Wolff JO, Freeberg MH, Dueser RD (1983) Intra- and interspecific territoriality in two sympatric species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Behaviour of Ecology and Sociobiology* **12**, 237-242.
- Wolff, JO, Summerlin CT (1993) Agonistic behavior in organized and disorganized cotton rat populations. *Science* **160**, 98-99.
- Wolff JO, Sherman PW (2007) Rodent Societies as Model systems. En: JO Wolff y PW Sherman (Eds.), *Rodent Societies: An ecological and evolutionary perspective*, pp. 3-7. The University of Chicago Press, United States of America.
- Wolff JO (1997) Population regulation in mammals: an evolutionary perspective. *Journal of Animal Ecology* **66**, 1-13.
- Wolff JO (2003) Density-dependence and the socioecology of space use in rodents. En: Singleton GR, Hinds LA, Krebs C, Spratt D (Eds.), *Rats, Mice and People: Rodent Biology and Management*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 124-130.

Wolff JO (2007) Social biology of rodents. *Integrative Zoology* **2**, 193-204.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. **1**, 323-334.

7. Material suplementario: Publicaciones derivadas de la Tesis.

Genetic population structure of the long-tailed pygmy rice rat (Rodentia, Cricetidae) at different geographic scales in the Argentinean Patagonia

N. Ortiz¹, F. J. Polop², V. C. Andreo², M. C. Provencal², J. J. Polop², C. N. Gardenal¹ & R. E. Gonzalez-Iltig¹

¹ Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), CONICET and Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

² Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Keywords

Oligoryzomys longicaudatus; regional genetic structure; Argentinean Patagonia; microsatellites; hantavirus pulmonary syndrome; landscape genetics; migration rate; dispersal.

Correspondence

Raul E. Gonzalez-Iltig, Instituto de Diversidad y Ecología Animal, CONICET- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Av. VelezSarsfield 299, 5000 Córdoba, Argentina. Tel: 54 3515353800; Fax: 54 351 4332097

Emails: raul.gonzaleziltig@unc.edu.ar and raulgonzaleziltig@yahoo.com.ar

Editor: Jean-Nicolas Volff

Received 29 March 2016; revised 9 September 2016; accepted 19 September 2016

doi:10.1111/jzo.12410

Abstract

The population genetic structure of *Oligoryzomys longicaudatus colilargo* was examined at two geographical scales: (a) regional, including five populations of the Argentinean Patagonia separated by 60–315 km and (b) landscape scale, using five populations from different valleys of the locality of Cholila in the subantarctic for-est separated by 6–27 km, and a nearby locality of the Patagonian steppe, with an average distance from Cholila of 33 km. Eight microsatellite loci specific for *O. longicaudatus* were used as genetic markers. At the regional scale, four genetic clusters were detected by the Geneland software. The genetic structure was found to follow a latitudinal pattern. This result was supported by the F_{ST} statistic, indicating low levels of current gene flow within the region. At the landscape level, genetic differentiation among the five populations was also found. Estimated migration rates were, in general, low and asymmetrical between nearby populations. Using a causal modeling approach, we detected that the combination of landscape features such as lakes, rivers, urban settlements and roads appear to constrain the dispersal of *O. longicaudatus* at this scale. This result would explain why nearby populations were so different in their genetic composition. The information about geographic features limiting rodent dispersal provided here could help to design more accurate prevention measures against the expansion of hantavirus pulmonary syndrome.

Introduction

Species are rarely fully panmictic, but are often divided into genetic subgroups. This non-random distribution of genetic variation in space and time is referred to as the genetic structure of a population (Wright, 1938). Several methods have been developed to combine geographic and genetic information to estimate the number of populations in a dataset and to delineate their spatial organization (Guillot et al., 2009). Small mammals having an extensive geographic distribution and variable density, dispersal and space use at different scales provide a good opportunity to investigate the relative impact of spatial scale in the genetic structure, since it reflects the influence of both historic and recent evolutionary processes. In addition, in species acting as reservoirs of etiological agents of human diseases, the knowledge of the processes shaping the distribution of allele frequencies in space is very important to predict the spread and persistence of zoonoses (Guivier et al., 2011).

The long-tailed pygmy rice rat *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia, Cricetidae) is the major reservoir of Andes hantavirus

genotype, associated with hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in southern Argentina and Chile (Levis et al., 1998; Padula et al., 2004). The species inhabits environments that include rivers, lakes and mountains which could reduce the connectivity among populations; therefore, it is a good model to study this phenomenon at various geographic scales. *O. longicaudatus* is common in *Nothofagus* temperate forests and shrubland areas at both sides of the Patagonian Andes range in Argentina and Chile. In Argentina, it is distributed from 36°S to 51°S in both the Eastern slope of the Andes Mountains and the Patagonian steppe (Carbajo & Pardiñas, 2007; Andreo et al., 2011). The species is characterized by a high vagility and flexibility in habitat use, which causes important fluctuations in its home range along the year (Murua, Gonzalez & Meserve, 1986); it experiments density fluctuations among seasons, which increases during autumn/winter (April/June) and decreases in summer (December/February) (Contreras, 1972; Murua et al., 1986; Polop et al., 2010, 2014a). The generation time of *O. longicaudatus* is approximately 1 year, but it varies according to environmental conditions, climatic factors and

intraspecific competence (Pearson, 1983; Murua et al., 1986). Another phenomenon observed in this species is the explosive outbreaks or 'ratadas' generated by several conditions such as warm winters, rainfall peaks and the cyclic blooming and seeding of bamboo plants (*Chusquea quila*, *C. coleou* and *C. valdiviensis*) (Gallardo & Mercado, 1999; Lima, Marquet & Jaksic, 1999). As a consequence, *O. longicaudatus* invasions to human settlements are more likely to occur, increasing the probability of infection with the Andes hantavirus (Calderon et al., 1999). The study of the genetic structure of *O. longicaudatus* would allow the evaluation of the degree of contact between populations which, in turn, would lead to the estimation of the risk of virus dispersion.

Concerning the genetic structure, several studies were carried out at macrogeographic scale. Palma et al. (2005) and Gonzalez-Ittig et al. (2010) proposed that *O. longicaudatus* would have undergone a recent geographic range expansion. Torres-Perez et al. (2011) and Palma et al. (2012) detected a strong north–south geographic structuring in populations of *O. longicaudatus* from Chile, while on the Argentinean side, Gonzalez-Ittig et al. (2010) and Lessa, D'Elia & Pardiñas (2010) reported high genetic similarity among localities. However, Gonzalez-Ittig et al. (2010) found private haplotypes in several populations, suggesting low to moderate current gene flow among them. To elucidate micro-evolutionary processes like dispersal, mitochondrial markers are not the most appropriate, since they usually reveal long time processes comprising large spatial scales (Avice, 2000). Microsatellites instead, have proved to be more accurate to detect short time changes in the genetic composition, given their high mutation rate (De-Xing & Godfrey, 2003; Selkoe & Toonen, 2006; Gonzalez-Ittig et al., 2015). In this study, we use microsatellites to

characterize the population genetic structure of *O. longicaudatus* at different spatial scales: (1) regional, in different localities of the Argentinean Patagonia and (2) a finer scale, using a landscape genetics approach. This last discipline is based on the detection of genetic discontinuities and the correlation of these discontinuities with landscape and environmental features, such as barriers to gene flow (e.g. mountains, rivers, gradients of humidity, etc.) (Manel et al., 2003). The analyses proposed here would provide useful information to understand the dispersal patterns of the natural host of Andes hantavirus.

Materials and methods

Study area, habitat description and sample collection

The study area ranges between $39^{\circ}56'07.62''$ S, $71^{\circ}05'21.84''$ W and $42^{\circ}33'27.90''$ S, $73^{\circ}08'03.42''$ W (Fig. 1), encompassing two main phytogeographic regions: subantarctic forest and Patagonian steppe. To get a better understanding of dispersal patterns, two geographic scales were used: (1) a regional scale, including five populations separated from each other by 60–315 km: Junin de los Andes (Neuquen province), Bariloche and El Bolson (Rio Negro province), Leleque and the valley El Cajon of the locality of Cholila (Chubut province); (2) a landscape scale, including four valleys of Cholila separated by an average distance of 14.48 km: El Cajon, El Blanco, El Rincon, Villa Lago Rivadavia and Leleque, a nearby location in the Patagonian steppe separated from the valleys by an average distance of 32.85 km (Fig. 1; Table 2). Junin de los Andes, Bariloche, El Bolson and Cholila are located in the deciduous district of the subantarctic forest region.

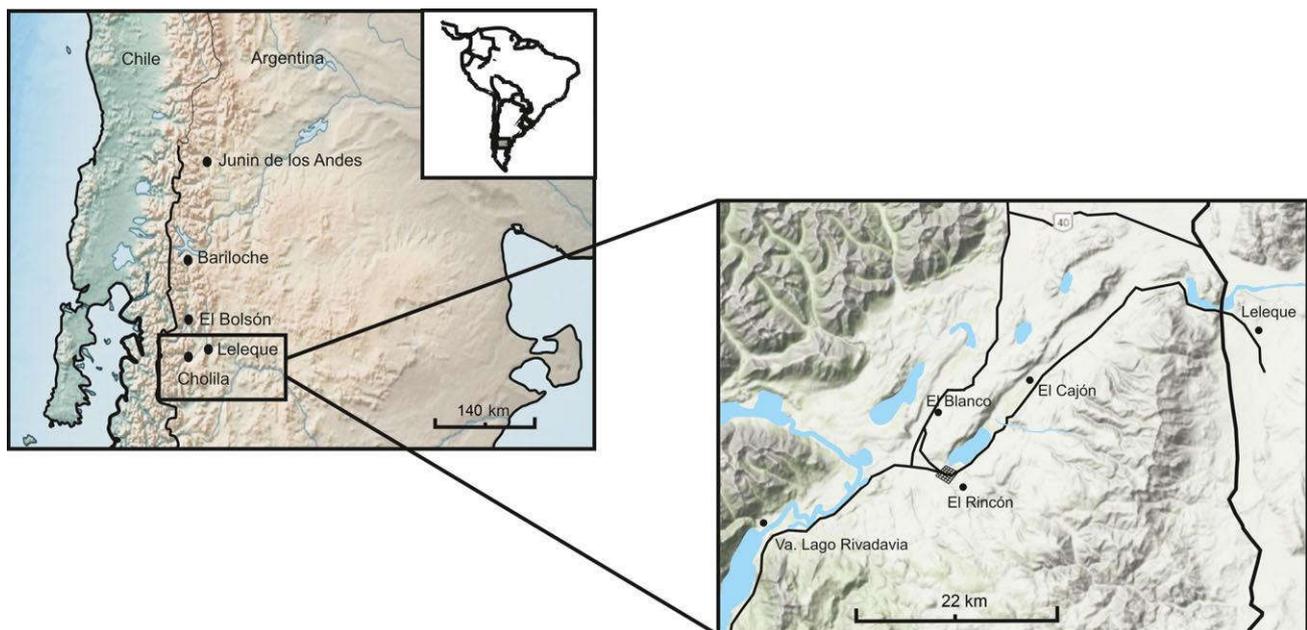


Figure 1 Geographic distribution of sampled *Oligoryzomys longicaudatus* populations at regional (left) and landscape (right) scales.

In Cholila, Junm de los Andes, Bariloche and El Bolson sampling was performed in the shrublands with predominance of arbustive specimens (mainly the exotic sweet briar, *Rosa rubiginosa*), whereas in Leleque, specimens were obtained from its unique component: the Patagonian steppe. Sampling was performed between 2006 and 2009 using a removal system, in lines separated by about 200 m; each consisted of 40 traps (20 live capture and 20 snap traps alternated) with a distance of 5 m between them. The baiting mixture was peanut butter and cow fat. The procedure was performed for 3 consecutive nights. Individuals were transferred in hermetic bags to the field laboratory for processing. Tail tips were conserved in 85% ethanol for DNA analysis. Rodent handling followed standardized safety guidelines recommended by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Mills et al., 1995).

Microsatellite genotyping

DNA from each individual was extracted using standard phenol/chloroform methods. Samples were manipulated in a biosafety level 1 cabinet to deal with potentially infected animals. Eight microsatellite loci specific for *O. longicaudatus* were amplified as described in Gonzalez-Ittig et al. (2008): Olong_1, Olong_4, Olong_5, Olong_6, Olong_7, Olong_9, Olong_10 and Olong_12. Procedures for allele separation by electrophoresis were performed according to Gonzalez-Ittig et al. (2015). To confirm genotypes and to minimize allele scoring errors, all amplifications were run a second and/or a third time, together with individuals presenting similar genotypes in the first run.

Statistical analyses

Microsatellite data were checked for potential stuttering, large allele drop out or presence of null alleles using Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). HW equilibrium was tested by estimating the differences between observed and expected heterozygosities using the program Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Different indexes estimating the degree of polymorphism in each population were calculated with the program Genalex 6.41 (Peakall & Smouse, 2006) (Table 2).

Regional scale

To evaluate the genetic differentiation among populations, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed and population pairwise F_{ST} were calculated with the program Arlequin 3.5.1.2. For this purpose, 10 000 permutations and a statistical significance level of 0.05 were used.

To detect possible correlations between genetic ($F_{ST}/[1 - F_{ST}]$) and the natural logarithm of geographic distances (Rousset, 1997) in *O. longicaudatus* populations, we performed a Mantel test using TFPGA 1.3 (Miller, 1997); to assess the significance of the test, 10 000 permutations were computed.

To infer the number of genetic clusters (K) and their boundaries taking into account geographic information, we used the Bayesian approach implemented in Geneland 3.0

(Guillot, Mortier & Estoup, 2005). Preliminarily, we estimated the number of K from 1 to 10, using 10 000 000 MCMC iterations and 1000 thinnings. For the final results, five independent runs with fixed K (to avoid ghost populations) were performed for the spatially explicit and correlated allelic frequencies model. For each run, the posterior probability of subpopulation membership was computed for each pixel of the spatial domain (20*120 pixels) using a burn-in of 1000 iterations. Additionally, to visualize each individual's membership to the assigned genetic clusters, we built a bar plot in Excel with the summarized individual-based output given by Geneland.

Landscape scale

We performed all the analyses already described for the regional scale and we added two extra analyses. With BayesAss 1.3 (Wilson & Rannala, 2003), we estimated symmetric and asymmetric migration rates in the last three generations between pairs of populations. Analyses were performed with 100 000 000 iterations, sampled every 100 000. We used a burn-in of 25 000 000 iterations and the estimator values for migration rate (m), allele frequency (a) and endogamy coefficient (f) were fixed at 0.5. Migration rates that exceeded 20% were considered important. Convergence was checked with Tracer 1.6. (Rambaut et al., 2014).

The effect of both geographic distance and different elements of the landscape (lakes, rivers, mountain ranges, roads, urban zones) on genetic differentiation between *O. longicaudatus* individuals were evaluated with a causal modeling approach using partial Mantel tests (Cushman et al., 2006, 2013). Maps were drawn at the scale 1:1250 from a Google Earth image using the OpenLayer plugin within QGIS 2.14 (QGIS Development Team, 2014). The geographic elements of the landscape were classified in classes such as lakes, rivers, mountain ranges [on average, 2000 meters above sea level (masl)], hills (on average 900 masl), main (paved) and secondary (dirt) roads, forests and urban zones (including houses and peri-urban settlements) (Fig. 2a). Resistance maps of the study site were generated, representing different hypotheses about the difficulty of *O. longicaudatus* individuals to disperse through landscape elements. Different resistance values were assigned to lakes, rivers, mountains, hills, roads and urban zones in order to generate hypotheses about their relative influence on populations' connectivity in the landscape. Different scenarios were tested: (1) Measuring separately the effect of each geographic feature, in which a resistance value was assigned to the evaluated landscape element, and a value of 1 (no resistance) was assigned to the rest of the elements. (2) Combining resistance values of the different elements in the same hypothesis. For this last group, five hypotheses were generated considering combined geographic features (Table 1). In the first hypothesis, high resistance values were assigned to lakes and urban zones, while intermediate values were given to rivers, mountain ranges and main roads. In the second hypothesis, the same resistance values were used for lakes and urban zones, but mountain ranges and roads received lower values. Hypothesis 3 was similar to hypothesis 1, except for the urban zone,

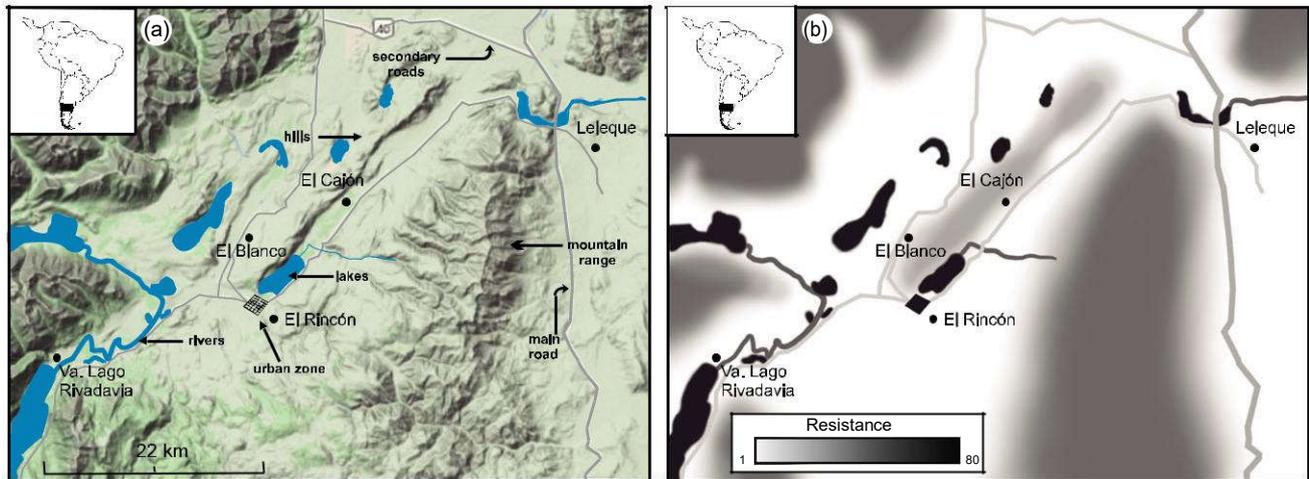


Figure 2 (a) Geographic features and (b) their relative resistance values for each landscape hypothesis tested in the causal modeling analysis.

to which a lower value was assigned. In hypothesis 4, all resistance values were the same as in hypothesis 1, but higher values were given to rivers. Lastly, in hypothesis 5, high resistance values were assigned to rivers and an intermediate value to the urban zone, being the rest as in hypothesis 1. Forests and shrublands presented the minimum resistance in all models, due to the strong preference of the species for these types of habitats (Polop et al., 2010, 2014b). Finally, the null model considered only Euclidean geographic distances as predictor. The program Circuitscape 4.0 (Mcrae, Shah & Mohapatra, 2014) was employed to transform resistance maps into resistance distance matrices between pairs of individuals using a four-neighbor connection scheme. Genetic and geographic distances between pairs of individuals were estimated using Genalex 6.41. With the program zt (Bonnet & Van De Peer, 2002), a simple Mantel test was conducted between genetic distance and each of the distance matrices (null and landscape resistance hypotheses). For each of the five landscape resistance hypotheses, two partial Mantel tests were performed with the same program: one to test for the correlation between genetic distance and the resistance hypothesis, partialing out the effect of the null hypothesis (geographic distance) and, the other between genetic distance and geographic distance, discounting the effects of the resistance hypotheses. Results were interpreted according to Cushman et al. (2013) who provided a guidance to interpret the outcomes of the diagnostic partial Mantel tests and advices to avoid Type I errors or spurious correlations.

Results

Micro-Checker analysis showed no evidence of scoring errors due to stuttering, large allele dropouts and null alleles for all loci and all populations. Observed and expected heterozygosities did not differ significantly from zero, indicating that all populations were at Hardy–Weinberg equilibrium (Table 2). The average number of different alleles ranged from 7.375 to 11.5, the average number of private alleles ranged from 0.125

to 1.125 (Table 2). The locus by locus observed and expected heterozygosities and allele number are shown in Supporting Information Table S1.

Regional scale

The average F_{ST} value was moderate (0.067), with values ranging from 0.015 to 0.097 (all were significant at $P < 0.05$). The lowest differentiation occurred between Leleque and El Cajon valley from Cholila, whereas the highest was between Bariloche and Leleque (Table 3). The AMOVA analysis revealed that 94.84% of the variance occurred within populations and 5.16% among them ($P < 0.05$). The isolation by distance test revealed a non-significant correlation ($r = 0.0105$; $P = 0.4150$) between genetic and geographic distances among all *O. longicaudatus* populations.

The combination of genetic and spatial data performed by the program Geneland revealed the existence of four genetic clusters; each K was represented by a single population except for the last one, which comprised Leleque and El Cajon valley (Fig. 3). Posterior probabilities to belong to each cluster of Junin de los Andes, Bariloche, El Bolson, and Leleque plus El Cajon were 0.7, 0.6, 0.8 and 0.9, respectively. The individual-based plot showed a similar result: individuals from Leleque and El Cajon presented a very similar genetic composition; individuals from Junin de los Andes, Bariloche and El Bolson showed admixed ancestry but with high membership to cluster 2, 4 and 1, respectively (Fig. 4).

Landscape scale

As stated above, this scale comprised the four valleys in Cholila (separated by 14.48 km on average) and Leleque population in the steppe, 32.85 km on average away from them (Fig. 1). The overall F_{ST} value was moderate: 0.056. Pairwise values between populations ranged from 0.01 to 0.1; the former corresponded to the comparison between Leleque and El Cajon valley, and the latter to El Blanco–Villa Lago Rivadavia comparison (Table 4).

Table 1 Resistance values to gene flow among *Oligoryzomys longicaudatus* populations for each landscape hypothesis

| | Hypothesis 1 | Hypothesis 2 | Hypothesis 3 | Hypothesis 4 | Hypothesis 5 | Null |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|
| Lakes | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 1 |
| Rivers | 50 | 50 | 50 | 80 | 80 | 1 |
| Mountain ranges | 40 | 20 | 40 | 40 | 40 | 1 |
| Hills | 20 | 10 | 20 | 20 | 20 | 1 |
| Main roads (paved roads) | 30 | 15 | 30 | 30 | 30 | 1 |
| Secondary roads (dirt roads) | 10 | 5 | 10 | 10 | 10 | 1 |
| Forests and shrublands | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Urban zone | 80 | 80 | 40 | 80 | 60 | 1 |

The AMOVA analysis revealed that 94.39% of the variance occurred within populations, while 5.61% occurred among them ($P < 0.05$). The Mantel test showed absence of isolation by distance: $r = 0.1754$; $P = 0.3651$.

The Geneland analysis revealed the existence of five clusters; each of them represented by a single population, with posterior probabilities ranging from 0.8 to 0.9 (Fig. 5). The individual assignments supported this result; where individuals from Va. Lago Rivadavia and Leleque showed high membership to clusters 4 and 5, respectively. In contrast, individuals from El Blanco, El Cajon and El Rincon presented admixed ancestry with predominance of clusters 1, 2 and 3, respectively (Fig. 6).

The program BayesAss 1.3 reached convergence and found, in general, low migration rates between population pairs. In general, migration was found to occur between nearby populations and to follow an asymmetrical direction. Leleque and Villa Lago Rivadavia showed mixed ancestry, with important migration rates. In the case of Leleque, the population was composed by migrants coming from El Blanco and from El Cajon, while Villa Lago Rivadavia received migrants from El Rincon (Fig. 7). All the results of BayesAss are shown in Supporting Information Table S2.

Regarding the causal modeling analysis, none of the hypotheses in which the landscape elements were evaluated separately was significant (results not shown). When evaluating the effect of combined geographic features on gene flow, simple Mantel tests between genetic distance and resistance hypotheses, as well as partial Mantel tests between genetic distance and geographic distance or resistance hypotheses were non-significant for the null hypothesis and for hypothesis 2, 3, 4 and 5. On the contrary, both the simple Mantel test between genetic distance and hypothesis 1, and the partial Mantel test between genetic distance and hypothesis 1, partialing out the effects of geographic distance, were significant, with correlation coefficients of 0.1665 and 0.1669, respectively, while the partial Mantel test between genetic distance and geographic distance, partialing out hypothesis 1 was not significant (Table 5).

Discussion

Regional scale

We used two different geographic scales to characterize the genetic structure of *O. longicaudatus*. At the regional scale, pairwise F_{ST} values were all significant (average $F_{ST} = 0.067$),

indicating a restricted gene flow among populations in the area. The analysis performed with Geneland revealed a total of four latitudinal groups ($K = 4$). Our results show a significant genetic differentiation of populations with increasing latitude at a regional scale, reinforcing the idea of low current dispersal levels among populations in the region.

Torres-Perez et al. (2011) found significant geographic structure in Chilean *O. longicaudatus* populations at a macrogeographic geographic scale (over 600–800 km); the pattern was attributed to reduced gene flow among Pleistocene glacial refuges in the western Andes. Moreover, in a study comprising most of the species geographic distribution in Chile, Palma et al. (2012) detected three clusters using the mtCyt-b gene, which mostly agreed with the three major Chilean ecogeographic regions: Mediterranean, Valdivian and Patagonian Forests. In the Argentinean Patagonia, on the other hand, *O. longicaudatus* is strongly associated with *Nothofagus* species of the subantarctic forests. If both (*Nothofagus* species and the rodent) experienced a similar evolutionary history, a comparable pattern in their genetic structure would be expected. In fact, for Argentinean *Nothofagus pumilio* and *N. antarctica*, different clusters were found along latitudinal regions in Patagonia (Soliani, 2012; Soliani, Gallo & Marchelli, 2012). Both chloroplastic and microsatellite markers revealed a north–south pattern of genetic variation, which could be associated with the effect of glaciers on a particular landscape configuration (a north–south-orientated mountain chain at 42–43°S and west–east orientated watershed at 44°S). The latitudinal genetic pattern found over the sampled *O. longicaudatus* populations in this study and the similar pattern found in *Nothofagus* species support the assumption that similar processes have shaped the genetic structure in these species.

Gonzalez-Ittig et al. (2010) proposed that during the Last Glacial Maximum, *O. longicaudatus* would have survived on a putative south ice-free Pacific coast refuge, then expanding its range from that refuge. Although the authors reported a weak genetic divergence among populations, several private haplotypes were detected in most localities, suggesting spatial restriction to gene flow in recent times. The strong genetic differentiation found here in populations from the same area, would confirm this assumption.

Landscape scale

In this study, we also compared the genetic structure of *O. longicaudatus* populations from four valleys in the vicinity

Oligoryzomys longicaudatus populations

| Locus | LN | | Priv | | Neh | | HeP-value | | UHealleles | | %P | | F | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-----|-----------|------|------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|
| | 4 | 25011 | 688 | 857 | 842 | 410 | 873 | 1251 | 3597 | 1.1960 | 0.0270 | 0.0290 | 0.0301 | 0.295 | 100 | | | | |
| 607.S | L7105c | "821.W | 4 | 25011 | 688 | 857 | 842 | 410 | 873 | 1251 | 3597 | 1.1960 | 0.0270 | 0.0290 | 0.0301 | 0.295 | 100 | 0.021 | 0.011 |
| 060.S | L7127c | "000.W | 6 | 3757 | 050 | 792 | 786 | 480 | 858 | 250 | 0410 | 97406 | 0.9740 | 0.1210 | 0.0470 | 0.0510 | 0.164 | 1000 | 0.147 |
| 41159c | "720.S | L7133c | "939.W | 14 | 50010 | 935 | 813 | 828 | 859 | 375 | 0291 | 08666 | 0.9370 | 0.0620 | 0.0310 | 0.0320 | 0.183 | 1000 | 0.050 |
| 035.S | L7104c | "716.W | 20 | 62510 | 860 | 825 | 808 | 420 | 828 | 6251 | 5236 | 0.9330 | 0.0430 | 0.0540 | 0.0560 | 0.498 | 100 | 0.038 | 0.043 |
| 917.S | L7126c | "155.W | 15 | 00010 | 527 | 783 | 771 | 382 | 797 | 2501 | 0696 | 1.2250 | 0.0800 | 0.0710 | 0.0740 | 0.250 | 100 | 0.010 | 0.043 |
| 42126c | "155.S | L7120c | "043.W | 14 | 2509 | 345 | 741 | 796 | 826 | 375 | 0951 | 3066 | 0.9920 | 0.03590 | 0.0510 | 0.0530 | 0.263 | 1000 | 0.085 |
| 742.S | 3 | "416.W | 9 | 50011 | 744 | 894 | 859 | 414 | 883 | 6250 | 9457 | 0.8490 | 0.0500 | 0.0160 | 0.0170 | 0.375 | 100 | 0.037 | 0.044 |
| 927.S | L7138c | "403.W | 14 | 2508 | 347 | 705 | 757 | 486 | 785 | 125 | 0651 | 1145 | 0.7920 | 0.0680 | 0.0570 | 0.0590 | 0.125 | 1000 | 0.059 |

Rivadavia

effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; P-value, statistical significance between Ho and He; L of alleles unique to a single population; %P, percentage of polymorphic loci; F, fixation index.

Table 3 Pairwise F_{ST} values among *Oligoryzomys longicaudatus* populations at a regional scale

| | Junin | Bariloche | Bolson | Leleque | Cajon |
|-----------|---------|-----------|---------|---------|---------|
| Junin | 0.00000 | | | | |
| Bariloche | 0.02708 | 0.00000 | | | |
| Bolson | 0.02814 | 0.02843 | 0.00000 | | |
| Leleque | 0.05887 | 0.09737 | 0.08045 | 0.00000 | |
| Cajon | 0.04161 | 0.06940 | 0.06533 | 0.01507 | 0.00000 |

of Cholila separated, on average, by 15 km. We included a sample from the Patagonian steppe (Leleque), about 33 km aside from Cholila (Fig. 1). Geneland assigned each population to a different cluster (Fig. 5) and individuals from the two most distant localities presented high membership to clusters 4 and 5, while individuals from intermediate localities presented admixed ancestry (Fig. 6) indicating restricted gene flow at the geographic scale here considered.

In a previous study performed in one of the valleys of Cholila (Villa Lago Rivadavia), Gonzalez-Ittig et al. (2015) found that high levels of gene flow encompassing different habitats (forests and shrublands) would be a major process producing fine-scale temporal changes in the genetic composition of the studied population. However, in this study using a wider geographic scale, we detected restricted gene flow; migration rates proved to be higher between closer populations and to follow an asymmetrical direction (from el Blanco and El Cajon to Leleque and from El Rincon to Villa Lago Rivadavia) (Fig. 7). In contrast, migration rates between El Rincon and El Blanco (which are also nearby populations) were very low, reinforcing the idea of local barriers preventing gene flow between these populations. Thus, it is highly probable that the lake named Mosquito, the urban zone and the secondary road located between El Rincon and El Blanco, act as barriers, limiting individual exchange between the two populations (Fig. 2a). Regarding the genetic differences found between El Rincon and El Cajon, which are also nearby locations, the combination of features like the lake Mosquito and the secondary road would be restricting gene flow levels. This road and the river that coasts Villa Lago Rivadavia population could be exerting the same effect, at least under normal population density levels. All these results were supported by the causal modeling analysis, which showed significant correlation between genetic distance and hypothesis 1 (Table 5), where lakes and the urban zone have high resistance values to gene flow, mountain ranges, rivers and main roads have intermediate resistance values, and hills together with secondary roads, low resistance values (Fig. 2b). Cushman et al. (2013) provided a guide, with four steps, to interpret the results of the diagnostic partial Man-tel tests. Our results are in accordance with step 1, this is: '...when one finds that a particular resistance hypothesis is supported independently of alternative models using causal modeling with partial Mantel tests, this is likely to be correct, given that the elevated Type I error is a bias in the opposite direction.' The other three steps are applied when there is more than one significant resistance hypothesis, which is not our case. Besides, Cushman et al. (2013) proposed two additional methods to reduce Type I error in the implementation of

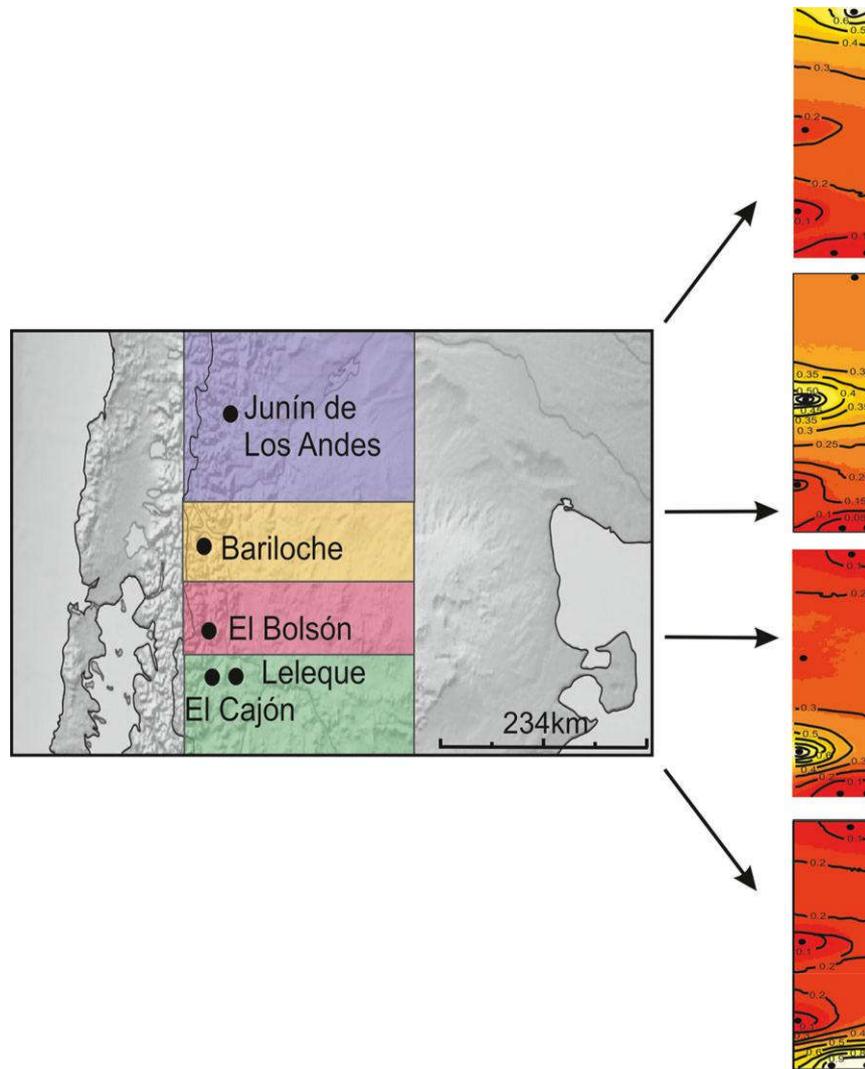


Figure 3 Spatial distribution of *Oligoryzomys longicaudatus* genetic clusters estimated by Geneland at a regional scale and their posterior belonging probabilities. The highest membership values are in white.

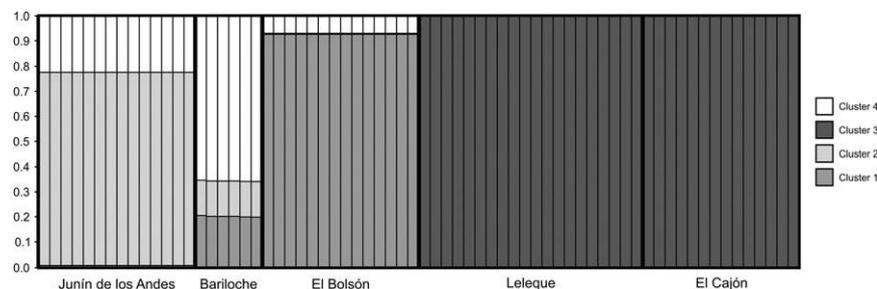


Figure 4 Geneland Bayesian cluster analysis of multilocus microsatellite genotypes of *Oligoryzomys longicaudatus* specimens at a regional scale. Each individual within a population is represented by a thin vertical line, partitioned into segments that represent the probability of an individual to belong to one of the four estimated genetic clusters.

the causal modeling analysis: (a) To use a more stringent alpha level to evaluate significance of hypotheses; in our study, the 'P' value of hypothesis 1 is 0.0001, which means that even

using a lower alpha level it will still be significant. (b) To compare the relative magnitude of the Mantel r values from the different hypotheses rather than the P-values; here, the

Table 4 Pairwise F_{ST} values among *Oligoryzomys longicaudatus* populations at a landscape scale

| | Leleque | Blanco | Cajon | Rincon | Rivadavia |
|-----------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| Leleque | 0.00000 | | | | |
| Blanco | 0.03053 | 0.00000 | | | |
| Cajon | 0.01507 | 0.02892 | 0.00000 | | |
| Rincon | 0.06434 | 0.06114 | 0.05439 | 0.00000 | |
| Rivadavia | 0.07754 | 0.10668 | 0.09152 | 0.03330 | 0.00000 |

$r = 0.1665$ for hypothesis 1 (Table 5) is an order of magnitude or a 2.5-fold higher than the second highest r ($r = 0.0675$ for hypothesis 5). Hence, hypothesis 1 best explains the restrictions to *O. longicaudatus* dispersal at a landscape scale. None of the other partial Mantel tests was significant (Table 5).

In periods of population outbreaks ('ratadas'), most barriers are easily surpassed (V. Andreo & F. Polop, pers. obs.); however, these phenomena occur occasionally and last for very short periods (Sage et al., 2007), probably having a weak

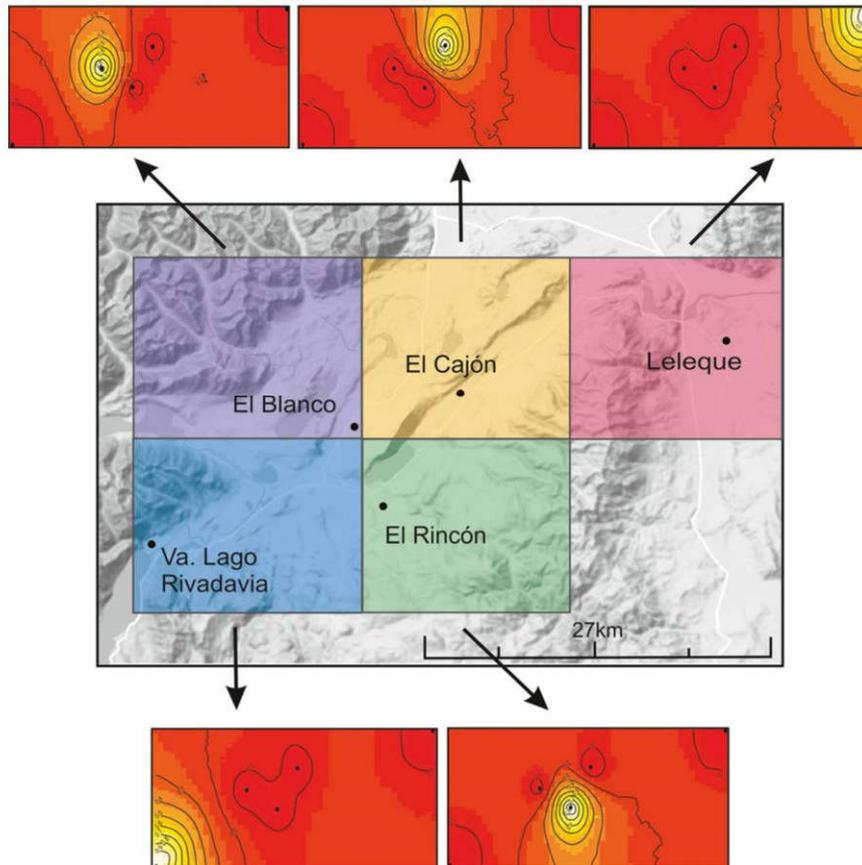


Figure 5 Spatial distribution of *Oligoryzomys longicaudatus* genetic clusters estimated by Geneland at a landscape scale and their posterior belonging probabilities. The highest membership values are in white.

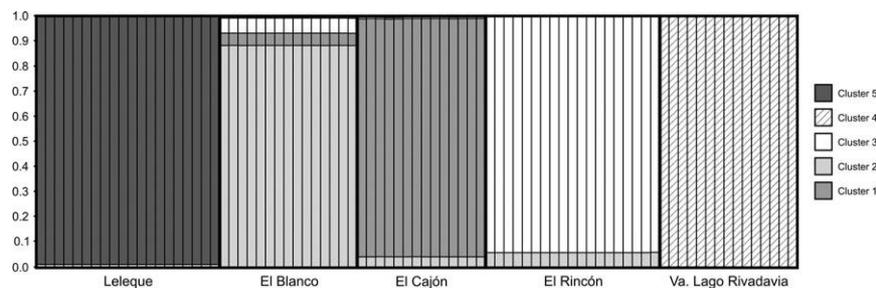


Figure 6 Geneland Bayesian cluster analysis of multilocus microsatellite genotypes of *Oligoryzomys longicaudatus* specimens at a landscape scale. Each individual within a population is represented by a thin vertical line, partitioned into segments that represent the probability of an individual to belong to one of the five estimated genetic clusters

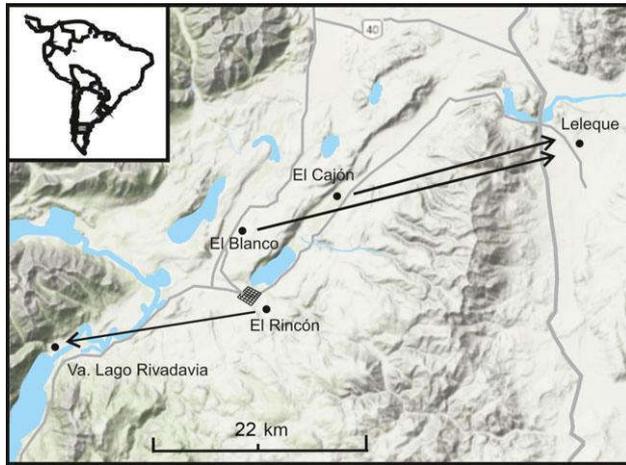


Figure 7 Representation of migration rates between pairs of *Oligoryzomys longicaudatus* populations at a landscape scale. Each arrow represents the direction of the migration, and its width is proportional to the magnitude of the estimated rate. Only migration rates higher than 0.20 are represented: El Blanco-Leleque (0.2613), El Cajón-Leleque (0.2606) and El Rincón-Va Lago Rivadavia (0.2192). All the results of BayesAss are shown in Supporting Information Table S2.

effect on the genetic population structure of the species in the area. As a conclusion of the overall causal modeling analysis, the urban zone and lakes were identified as the most important barriers to gene flow (Fig. 2b); hypothesis 1 was the only significant (where resistance for both the urban zone and lakes had a value of 80). Nevertheless, it is important to bear in

mind that the mentioned features may act in combination to model the population genetic structure of *O. longicaudatus*. The effect of the combination of certain geographic features over population genetic structure was also examined by Coulon et al. (2006), which studied the roe deer *Capreolus capreolus* on a landscape containing several putative barriers to dispersal. The authors found that the combination of features such as highways, rivers and canals with different permeability values can lead to population differentiation. Regarding rodents, Garrido-Garduño et al. (2016) studied the genetic structure of the Painted spiny pocket mouse *Liomys pictus* and found that populations were clustered according to clear landscape boundaries, mainly defined by precipitation and stream channels. Furthermore, Gerlach & Musolf (2000) found the same pattern for the bank vole *Clethrionomys glareolus*, where rivers and highways acted as strong barriers to gene flow.

In conclusion, a latitudinal genetic structure was found at the regional scale, indicating low levels of current gene flow among *O. longicaudatus* populations. The high resolution of microsatellites markers enabled the detection of genetic gaps among Patagonian populations. Besides, it also allowed performing the study with a landscape genetic approach. At this scale, gene flow followed an asymmetrical direction, and was of variable magnitude among geographically nearby populations. We tested the effect of certain geographic features with different permeability to gene flow and found that the urban zone and lakes restricted gene flow in the area, while rivers would exert an intermediate resistance. Hills would be the less restrictive barriers to gene flow on *O. longicaudatus* populations. This result would explain why populations separated by few kilometers were so different in their genetic composition.

Table 5 Results of the Mantel and partial Mantel tests for the analyses of isolation by resistance to gene flow among *Oligoryzomys longicaudatus* populations

| Matrix 1 | Matrix 2 | Partialled out | r | P-value |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|--------|---------|
| Simple Mantel test between genetic distance and all hypotheses | | | | |
| Genetic distance | Null hypothesis | | 0.0220 | 0.1035 |
| Genetic distance | Hypothesis 1 | | 0.1669 | 0.0001* |
| Genetic distance | Hypothesis 2 | | 0.0155 | 0.1956 |
| Genetic distance | Hypothesis 3 | | 0.0658 | 0.1305 |
| Genetic distance | Hypothesis 4 | | 0.0623 | 0.1444 |
| Genetic distance | Hypothesis 5 | | 0.0676 | 0.1256 |
| Partial Mantel tests between genetic distance and resistance hypotheses, discounting the effect of geographic distance | | | | |
| Genetic distance | Null hypothesis | Geographic distance | 0.0303 | 0.0603 |
| Genetic distance | Hypothesis 1 | Geographic distance | 0.1665 | 0.0001* |
| Genetic distance | Hypothesis 2 | Geographic distance | 0.0005 | 0.4906 |
| Genetic distance | Hypothesis 3 | Geographic distance | 0.0658 | 0.1289 |
| Genetic distance | Hypothesis 4 | Geographic distance | 0.0621 | 0.1429 |
| Genetic distance | Hypothesis 5 | Geographic distance | 0.0675 | 0.1271 |
| Partial Mantel tests between genetic distance and geographic distance, discounting the effect of resistance hypotheses | | | | |
| Genetic distance | Geographic distance | Null hypothesis | 0.0193 | 0.1320 |
| Genetic distance | Geographic distance | Hypothesis 1 | 0.0188 | 0.1423 |
| Genetic distance | Geographic distance | Hypothesis 2 | 0.0157 | 0.2012 |
| Genetic distance | Geographic distance | Hypothesis 3 | 0.0219 | 0.1043 |
| Genetic distance | Geographic distance | Hypothesis 4 | 0.0216 | 0.1067 |
| Genetic distance | Geographic distance | Hypothesis 5 | 0.0219 | 0.1034 |

P < 0.05 are shown with an asterisk.

As mentioned before, *O. longicaudatus* is the natural reservoir of Andes hantavirus, which produces HPS, a serious disease in humans. According to our results, the probability of transmission of this virus among rodents is expected to be low from local emergence sites, at least in the area comprised by this study. Andreo et al. (2014) used species distribution modeling techniques to examine the potential distribution of HPS caused by Andes virus in southern Argentina. The authors found a high and positive correspondence among HPS occurrence and environmental features such as high annual mean precipitation, dry summers, low percentages of bare soil and low temperatures in the coldest month. The additional spatial and mechanistic information provided here, about landscape features limiting rodent dispersal, should be taken into account when building models to predict the expansion direction of a disease outbreak. These results will then help to enhance and focus surveillance efforts and prevention measures.

Acknowledgements

We thank Silvana Levis from INEVH (Pergamino, Argentina) for providing some of the specimens used in this study, and Marina Chiappero (IDEA, CONICET-UNC, Argentina) for her advice on the causal modeling analyses. The following institutions supported this study: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 11220150100474CO), Secretaria de Ciencia y Tecnología (SECYT) of the Universidad Nacional de Córdoba and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2012-1275). C.N.G. and R.E.G.-I. are career researchers of CONICET.

References

- Andreo, V., Glass, G., Shields, T., Provencal, C. & Polop, J. (2011). Modeling potential distribution of *Oligoryzomys longicaudatus*, the Andes virus (Genus: Hantavirus) reservoir, in Argentina. *EcoHealth* **3**, 332–348.
- Andreo, V., Neteler, M., Rocchini, D., Provencal, C., Levis, S., Rizzoli, A., Porcasi, X., Lanfri, M., Scavuzzo, M., Pini, N., Enria, D. & Polop, J. (2014). Estimating Hantavirus risk in southern Argentina: a GIS-based approach combining Human cases and host distribution. *Viruses* **6**, 201–222.
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Bonnet, E. & Van De Peer, Y. (2002). Zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *J. Stat. Softw.* **7**, 1–12.
- Calderon, G., Pini, N., Bolpe, J., Levis, S., Mills, J., Segura, E., Guthmann, N., Cantoni, G., Becker, J., Fonollat, A., Ripoll, C., Bortman, M., Benedetti, R., Sabbatini, M. & Enria, D. (1999). Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 792–797.
- Carbajo, A.E. & Pardiñas, U.F. (2007). Spatial distribution model of a Hantavirus reservoir, the long-tailed colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*), in Argentina. *J. Mammal.* **88**, 1555–1568.
- Contreras, J.R. (1972). El home range en una población de *Oryzomys longicaudatus philippi* (Landbeck) (Rodentia, Cricetidae). *Physis* **31**, 353–361.
- Coulon, A., Guillot, G., Cosson, J.F., Angibault, J.M., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M. & Hewison, A.J. (2006). Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Mol. Ecol.* **15**, 1669–1679.
- Cushman, S.A., McKelvey, K.S., Hayden, J. & Schwartz, M.K. (2006). Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with causal modeling. *Am. Nat.* **168**, 486–499.
- Cushman, S.A., Wasserman, T.N., Landguth, E.L. & Shirk, A.J. (2013). Re-evaluating causal modeling with mantel tests in landscape genetics. *Diversity* **5**, 51–72.
- De-Xing, Z. & Godfrey, M.H. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* **12**, 563–584.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 564–567.
- Gallardo, M.H. & Mercado, C.L. (1999). Mast seeding of bamboo shrubs and mouse outbreaks in Southern Chile. *Mastozool. Neotrop.* **6**, 103–111.
- Garrido-Garduño, T., Tellez-Valdes, O., Manel, S. & Vazquez-Dominguez, E. (2016). Role of habitat heterogeneity and landscape connectivity in shaping gene flow and spatial population structure of a dominant rodent species in a tropical dry forest. *J. Zool.* **298**, 293–302.
- Gerlach, G. & Musolf, K. (2000). Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conserv. Biol.* **14**, 1066–1074.
- Gonzalez-Ittig, R.E., Salazar-Bravo, J., Polop, J.J. & Gardenal, C.N. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers in *Oligoryzomys longicaudatus* (Muridae, Sigmodontinae, Oryzomyini), the natural reservoir of genotype Andes hantavirus. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 1466–1468.
- Gonzalez-Ittig, R.E., Rossi-Fraire, H.J., Cantoni, G.E., Herrero, E.R., Benedetti, R., Gallardo, M.H. & Gardenal, C.N. (2010). Population genetic structure of long-tailed pygmy rice rats (*Oligoryzomys longicaudatus*) from Argentina and Chile based on the mitochondrial control region. *Can. J. Zool.* **88**, 23–35.
- Gonzalez-Ittig, R.E., Polop, F.J., Andreo, V.C., Chiappero, M.B., Levis, S., Calderon, G., Provencal, M.C., Polop, J.J. & Gardenal, C.N. (2015). Temporal fine-scale genetic variation in the zoonosis-carrying long-tailed pygmy rice rat in Patagonia, Argentina. *J. Zool.* **296**, 216–224.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). Geneland: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 708–711.
- Guillot, G., Leblois, R., Coulon, A. & Frantz, A.C. (2009). Statistical methods in spatial genetics. *Mol. Ecol.* **23**, 4734–4756.

- Guivier, E., Galan, M., Chaval, Y., Xuereb, A., Ribas-Salvador, A., Poulle, M.L., Voutilainen, L., Henttonen, H., Charbonnel, N. & Cosson, J.F. (2011). Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Mol. Ecol.* **20**, 3569–3583.
- Lessa, E.P., D'Elia, G. & Pardiñas, U.F. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Mol. Ecol.* **19**, 3031–3037.
- Levis, S., Morzunov, S.P., Rowe, J.E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M. & Jeor, S.C. (1998). Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J. Infect. Dis.* **177**, 529–538.
- Lima, M., Marquet, P.A. & Jaksic, F.M. (1999). El Niño events, precipitation and rodent outbreak are statistically associated in semiarid Chile. *Ecography* **22**, 213–218.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 189–197.
- Mcrae, B.H., Shah, V.B. & Mohapatra, T.K. (2014). Circuitscape 4 User Guide. The Nature Conservancy. Available at: <http://www.circuitscape.org>
- Miller, M.P. (1997). Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Available at: <http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>
- Mills, J.N., Childs, J.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J. & Velleca, W.M. (1995). Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services. 60 pp.
- Murua, R., Gonzalez, L.A. & Meserve, P.L. (1986). Population ecology of *Oryzomys longicaudatus philippi* (Rodentia: Cricetidae) in southern Chile. *J. Anim. Ecol.* **55**, 281–293.
- Padula, P., Figueroa, R., Navarrete, M., Pizarro, E., Cadiz, R., Bellomo, C., Jofre, C., Zoror, L., Rodriguez, E. & Murua, R. (2004). Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *J. Virol.* **78**, 11972–11979.
- Palma, R.E., Rivera-Milla, E., Salazar-Bravo, J., Torres-Perez, F., Pardiñas, U.F., Marquet, P.A., Spotorno, A.E., Meynard, A.P. & Yates, T.L. (2005). Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *J. Mammal.* **86**, 191–200.
- Palma, R.E., Boric-Bargetto, D., Torres-Perez, F. & Hernandez, C.E. (2012). Glaciation effects on the phylogeographic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the southern Andes. *PLoS ONE* **7**, e32206. doi:10.1371/journal.pone.0032206.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6.41: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 288–295.
- Pearson, O. (1983). Characteristics of a mammalian fauna from forests in Patagonia, southern Argentina. *J. Mammal.* **64**, 476–492.
- Polop, F., Provencal, M.C., Pini, N., Calderon, G., Priotto, J., Enria, D. & Polop, J. (2010). Temporal and spatial host abundance and prevalence of Andes hantavirus in Southern Argentina. *EcoHealth* **2**, 176–184.
- Polop, F.J., Juan, E.E., Polop, J.J. & Provencal, M.C. (2014a). Spatial and temporal variation of terrestrial rodent assemblages in Cholila, Chubut Province, Argentina. *Stud. Neotrop. Fauna. Environ.* **49**, 151–157.
- Polop, F.J., Sepulveda, L., Pelliza-Sbriller, A., Polop, J.J. & Provencal, M.C. (2014b). Food habits of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia) in a steppe-forest transitional area of Argentinean Patagonia. *Ecol. Austral* **24**, 304–310.
- QGIS Development Team. (2014). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Available at: <http://qgis.osgeo.org>
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014). Tracer v1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **4**, 1219–1228.
- Sage, R.D., Pearson, O.P., Sanguinetti, J. & Pearson, A.K. (2007). Ratada 2001: a rodent outbreak following the flowering of bamboo (*Chusquea culeou*) in southern Argentina. In *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson: 177–224*. Kelt, D.A., Lessa, E.P., Salazar-Bravo, J. & Patton, J.L. (Eds). Berkeley: University of California Press, pp. 1–981. Univ. California Pub. Zool. 134.
- Selkoe, A.K. & Toonen, R.J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* **9**, 615–629.
- Soliani, C. (2012). Historia evolutiva de *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus antarctica*, especies forestales nativas de la Patagonia Argentina, y su relacion con la conservacion y manejo de sus recursos geneticos. PhD thesis, Universidad Nacional de Cordoba, Cordoba, Argentina.
- Soliani, C., Gallo, L. & Marchelli, P. (2012). Phylogeography of two hybridizing southern beeches (*Nothofagus* spp.) with differential adaptative abilities. *Tree Genet. Genomes* **8**, 659–673.
- Torres-Perez, F., Palma, E., Hjelle, B., Homes, E.C. & Cook, J.A. (2011). Spatial but not temporal co-divergence of a virus and its mammalian host. *Mol. Ecol.* **20**, 4109–4122.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P. & Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538.
- Wilson, G.A. & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**, 1177–1191.
- Wright, S. (1938). Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* **87**, 430–431.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Allelic range, observed and expected heterozygosities for each locus in all populations of *O. longicaudatus*.

Table S2. Pairwise migration rates (in parenthesis, the 95% confidence interval) among *O. longicaudatus* populations at landscape scale.

Graphical Abstract

The contents of this page will be used as part of the graphical abstract of html only. It will not be published as part of main article.



The population genetic structure of *Oligoryzomys longicaudatus colilargo* was examined at two geographical scales: (a) regional, including five populations of the Argentinean Patagonia and (b) landscape scale, using five populations from different valleys of the locality of Cholila in the subantarctic forest and a nearby locality of the Patagonian steppe. At the regional scale, several genetic clusters were detected which follow a latitudinal pattern and indicate low levels of current gene flow within the region. At the landscape level, genetic differentiation among the five populations was also found; migration rates were low and asymmetrical between nearby populations. Using a causal modeling approach, we detected landscape features, such as lakes, rivers, urban settlements and roads, which appear to constrain the dispersal of *O. longicaudatus* at the landscape scale.