



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Biología

PÉRDIDA DE DIVERSIDAD GENÉTICA: IMPLICACIONES PARA
LA EVOLUCIÓN Y LA CONSERVACIÓN DE DOS ESPECIES DE
CTENOMYS (RODENTIA: CTENOMYIDAE) EN PATAGONIA
NORTE



Autor: Mauro Nicolás Tammone

Director: Eileen Anne Lacey

Codirector: Ulyses Francisco José Pardiñas

2016

RESUMEN

La diversidad genética es una medida del potencial evolutivo de las especies y poblaciones ya que les permite adaptarse a cambios en su entorno, tanto naturales como antrópicos. En este sentido, este aspecto se relaciona con la vulnerabilidad de las especies y poblaciones, y es útil para evaluar el riesgo de extinción de las mismas. En poblaciones con baja diversidad genética, el riesgo de extinción aumenta debido a su potencialmente limitada capacidad para responder a los cambios en su entorno. De esta manera, estudiar los cambios genéticos es útil, no sólo para la planificación de la conservación sino también para estudiar el cambio evolutivo de las especies. A partir del análisis de ADN antiguo extraído de fósiles, es posible estudiar de manera directa los cambios de diversidad genética de las poblaciones a lo largo del tiempo y evaluar el efecto de los cambios ambientales sobre la evolución de las especies. En el noroeste de Patagonia, dos especies de roedores subterráneos del género *Ctenomys* -*C. sociabilis* y *C. haigi*- proporcionan una oportunidad para evaluar los cambios genéticos a una escala temporal y espacial amplia. Ambas especies se distribuyen en el valle del río Limay -entre el lago Nahuel Huapi y el río Traful- bajo condiciones ambientales similares. Debido a sus hábitos subterráneos y a su similitud en cuanto a forma y tamaño corporal en el contexto de los pequeños mamíferos, estas especies comparten varias características asociadas a la historia de vida. Sin embargo, sus poblaciones actuales difieren marcadamente en cuanto a distribución geográfica y diversidad genética. *C. sociabilis* es una especie endémica de la Sierra de Cuyín Manzano, al oeste del río Limay en el Parque Nacional Nahuel Huapi, provincia del Neuquén. Si bien en la actualidad sus poblaciones muestran una ausencia de variabilidad genética en el gen que codifica el citocromo b, muestras fósiles recuperadas del yacimiento arqueológico Cueva Traful I (CTI) indican una mayor variabilidad genética durante parte del Holoceno en esa localidad. En contraste, *C. haigi* se distribuye ampliamente al este del río Limay, provincia de Río Negro. En CTI, las muestras fósiles de esta especie no evidencian pérdida de diversidad genética durante el Holoceno. Estas especies difieren también en el uso del hábitat y comportamiento. *C. sociabilis* es endémica del ecotono, principalmente en los bordes de mallín y áreas arbustivas con amplia cobertura de hierbas y gramíneas y es la única especie del género con hábitos gregarios. En cambio, *C. haigi* se distribuye ampliamente en casi todos los hábitats de la estepa y el ecotono -parapátricamente respecto a *C. sociabilis*- y muestra un comportamiento

solitario. En esta tesis se utilizan muestras fósiles de dos depósitos paleontológicos novedosos, Arroyo Corral (ACo) y Cueva del Caballo (CdC) -ambos emplazados en el valle del río Limay- para analizar mediante el uso de ADN antiguo los cambios en la variabilidad genética de *C. sociabilis* (n = 26) y *C. haigi* (n = 23). Los datos obtenidos son comparados con los disponibles para CTI (*C. sociabilis*, N = 34; *C. haigi*, N = 31) y, además, se complementaron con datos de ADN actual de especímenes de *C. sociabilis* (n = 9) y *C. haigi* (n = 18) capturados en las inmediaciones de los sitios estudiados. De esta forma se logró un muestreo moderadamente razonable en cobertura espacial y temporal para evaluar la evolución de la variación genética del citocromo b durante los últimos 12 mil años. Para esto, se construyó un marco cronológico robusto mediante 28 fechados radiocarbónicos. Por otra parte, se explora la potencial vinculación entre los patrones de diversidad genética y los cambios ambientales ocurridos durante el Pleistoceno más tardío-Holoceno. Los datos genéticos de *C. sociabilis* de los sitios ACo, CdC y CTI mostraron evidencias directas de disminución de abundancia relativa y pérdida de variabilidad genética a nivel haplotípico y nucleotídico durante el Holoceno. Estos resultados indican que la variabilidad genética en esta especie se vio afectada en múltiples localidades de su rango geográfico. Por el contrario, para *C. haigi* los datos genéticos sugieren que esta especie ha aumentado su abundancia relativa y no muestra evidencias de pérdida de variabilidad genética. Para estudiar las causas de la pérdida de variabilidad genética y disminución de abundancia relativa de *C. sociabilis* se evaluaron tres hipótesis: (1) se vinculan con cambios ambientales catastróficos (erupciones volcánicas y caída de tefras asociadas), (2) se vinculan con competencia interespecífica entre *C. sociabilis* y *C. haigi*, o (3) se vinculan con cambios ambientales graduales (variaciones en la precipitación media y consecuente cambio en el límite del ecotono). Mediante los fechados radiocarbónicos se pudo determinar que entre los sitios analizados la pérdida de variabilidad genética de *C. sociabilis* ocurrió en diferentes segmentos temporales. Además, que la misma resulta previa al mayor evento de lluvia de tefras y que tampoco parece vincularse con la presencia de *C. haigi*. Todo esto permitió descartar las hipótesis (1) y (2). El patrón de cambio en los niveles de variabilidad genética de *C. sociabilis* fue más consistente con un proceso de cambio ambiental gradual. Los cambios de hábitat asociados con la evolución climática del Holoceno en Patagonia serían la explicación más plausible para la declinación detectada en *C. sociabilis*. Las diferencias en el uso del hábitat y comportamentales entre estas especies están asociadas con diferencias interespecíficas sustanciales en la demografía (e.g. dispersión y flujo genético). En consecuencia, los distintos patrones de variabilidad genética detectados a lo largo del tiempo

podrían ser explicados por una respuesta diferencial de cada especie a los cambios de hábitat. Este estudio demuestra que incluso especies con altos niveles de variabilidad genética pueden ser afectadas significativamente ante un escenario de cambio ambiental gradual cuando las restricciones en el uso del hábitat y demográficas limitan su adaptabilidad.

ABSTRACT

Genetic diversity is a measure of the evolutionary potential of species and populations that allows them to adapt to changes in their environment, both natural and anthropogenic. In this manner, this aspect is related to the vulnerability of species and populations and is useful for evaluating their risk of extinction. In populations with low genetic diversity, the risk of extinction is enhanced due to their potentially limited capacity to respond to environmental changes. For this reason, study the genetic changes is useful not only for conservation planning but also for understanding evolutionary change. Analyses of ancient DNA extracted from fossils make it possible to study directly changes in the genetic diversity of populations over time and to evaluate the effects of environmental changes on the evolution of those species. In northwestern Patagonia, two species of subterranean rodents in the genus *Ctenomys* –*C. sociabilis* and *C. haigi*- provide an opportunity to evaluate changes in genetic diversity over large temporal and spatial distances. Both species occur in the Limay River Valley between Lago Nahuel Huapi and Lago Traful, where they experience similar environmental conditions. As small mammals with the same subterranean lifestyle and similar morphologies and body sizes, these species share multiple life history characteristics. Nevertheless, their extant populations differ markedly in their geographic distribution and genetic diversity. *C. sociabilis* is endemic to the Sierra de Cuyín Manzano, to the west of the Rio Limay in Parque Nacional Nahuel Huapi (Neuquén Province). Although extant populations of this species lack genetic variability at the cytochrome B locus, fossil samples recovered from the archaeological deposit Cueva Traful I (CTI) indicate a higher level of cytochrome b variability at this location during part of the Holocene. In contrast, *C. haigi* is widely distributed to the east of the Rio Limay (Rio Negro Province). At CTI, fossil specimens of this species do not reveal a loss of genetic diversity during the Holocene. These two species also differ in their habitat use and behavior. *C. sociabilis* is endemic to the ecotone, occurring primarily along the borders of wet meadows and shrubby areas characterized by abundant herb and grass cover; it is the only species in the genus that has been shown to be group living. In contrast, *C. haigi*, which is parapatric to *C. sociabilis*, is widely distributed in nearly all steppe and ecotone habitats and is solitary. This thesis uses analyses of ancient DNA from fossil samples collected at two novel paleontological deposits, Arroyo Corral (ACo) and Cueva de Caballo (CdC) -both located

in the Limay River Valley- to analyze changes in genetic variability in *C. sociabilis* (N = 26) and *C. haigi* (N = 23). These results are compared to available data from CTI (*C. sociabilis*, N = 34; *C. haigi*, N = 31) as well as to genetic data from modern specimens of *C. sociabilis* (N = 9) and *C. haigi* (N = 18) collected in the vicinities of the study sites. These samples generate reasonable spatial and temporal coverage for evaluating cytochrome b diversity over the past 12,000 years. To do this, a robust chronological framework consisting of 28 radiocarbon dates was constructed. Further, potential links between patterns of genetic diversity and environmental changes during the Pleistocene and late Holocene were explored. Genetic data for *C. sociabilis* from ACo, CdC and CTI revealed direct evidence of a decrease in the relative abundance of this species and loss of genetic variability at the haplotype and nucleotide levels during the Holocene. These results indicate that genetic variability in this species was affected on multiple localities of its geographic range. By the contrary, genetic data for *C. haigi* suggest that this species increased in relative abundance, with no evidence of a loss of genetic variability. To study the causes of the loss of genetic variability and decrease in relative abundance in *C. sociabilis*, three hypotheses were evaluated, specifically that these changes were linked to: (1) catastrophic environmental changes (volcanic eruptions and associated ashfall), (2) interspecific competition between *C. sociabilis* and *C. haigi*, and (3) gradual environmental changes (variation in mean rainfall and resulting changes to the limits of the ecotone). Through radiocarbon dating, it was determined that among the sites analyzed, the loss of genetic variability in *C. sociabilis* occurred at different time points. Further, this loss occurred prior to the main ashfall event during this period and was not associated with the presence of *C. haigi*. Collectively, this information contradicts hypotheses (1) and (2). Instead, the pattern of loss of genetic variability in *C. sociabilis* was most consistent with a gradual process of environmental change. Habitat changes associated with climatic modifications during the Holocene in Patagonia provide the most plausible explanation for the decline detected for *C. sociabilis*. The differences in habitat use and behavior between the study species are associated with substantial interspecific differences in demography (e.g. dispersal and gene flow). As a result, the distinct patterns of genetic variability detected over time may represent a differential response by these species to habitat changes. This study demonstrates that even species with high levels of genetic variability can be significantly affected by gradual environmental change when constraints on habitat use and demography limit their adaptability.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a quienes me guiaron a lo largo de este estudio, mis directores de tesis Eileen Lacey y Ulyses Pardiñas, con quienes además hemos establecido un vínculo humano, muchas veces por encima del académico.

Agradezco al CONICET por haberme otorgado las Becas Internas de Postgrado que me permitieron iniciar y finalizar esta tesis doctoral. Al Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET), por haberme brindado lugar de trabajo.

Al Departamento de Postgrado y a la Comisión de Doctorado del Doctorado en Biología del Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

A los miembros del Jurado, Paula Mathiasen, Patricia Mirol y Susan Walker, sus comentarios y sugerencias han enriquecido significativamente el manuscrito de la tesis.

Quiero agradecer especialmente a Martina, que me acompaña firmemente hace mucho tiempo y me apoyó durante esta etapa. A nuestra hija Carmela, que ha compartido algunos momentos de este trabajo, en la lupa mirando huesos y en el campo con los tuco-tucos. A Pedro, nuestro segundo hijo.

A mis padres, Oscar y Marga que me apoyaron a lo largo de mis estudios. A mis abuelas, tíos y primos. A Liliana, Carlos y Mónica. A los tíos y a la tía de Carmela y de Pedro.

Al grupo de arqueología y etnohistoria del Museo de la Patagonia “Francisco Pascasio Moreno”, en especial a Adán Hajduk, Ana Albornoz, Maximiliano Lezcano, Emmanuel Vargas y Solange Fernández Do Rio, que me invitaron a participar del proyecto que proporcionó las muestras fósiles incluidas en esta tesis y también me cedieron libremente muestras de egagrópilas actuales. Al grupo de arqueología del Instituto Internacional de Investigaciones Prehistóricas de la Universidad de Cantabria, en particular a Pablo Arias, Ángel Armendáriz Gutiérrez, Marián Cueto Rapado, Luis César Teira Mayolini, Jesús Tapia Sagarna, Miriam Cubas, Patricia Fernández Sánchez, Inés López Dóriga y Beatriz Sánchez.

Al Parque Nacional Nahuel Huapi por brindarme un espacio de trabajo en el CENAC-Programa de estudios aplicados a la conservación del Parque Nacional (PN) Nahuel Huapi.

Al Departamento de Conservación del PN Nahuel Huapi.

Al grupo de trabajo del CENAC, Susana Seijas, Julieta Massafarro, Carla Pozzi,

Fernanda Montes de Oca, Flavia Quintana, Gloria Fernández Cánepa, Luciana Motta, María Noel Serra, Sebastián Balari y Noelia Barrios.

A la Delegación Regional Patagonia, Administración de Parque Nacionales (APN).

A la Dirección de Fauna de la provincia de Río Negro.

A la Dirección de Fauna y Flora Silvestre de la provincia del Chubut

Al Grupo de Estudios de Mamíferos Australes (GEMA-CENPAT) por haberme brindado el espacio de laboratorio.

A la Colección de Mamíferos y a la Colección de Egagrópilas y Afines “Elio Massoia”, ambas del CENPAT.

A Susan Jones Frey y Juan Carlos Perez de la estancia La Lonja. A los propietarios de las estancias Valle Encantado, Nahuel Huapi, San Ramón, Fortín Chacabuco y Altos del Fortín, que siempre me permitieron acceder a los mismos.

Al Museo de Zoología de Vertebrados (MVZ) y al Laboratorio de Genética Evolutiva (EGL) de la Universidad de California, Berkeley (EE.UU.).

Al Laboratorio de ADN antiguo de Elizabeth Hadly (Hadly Lab), Universidad de Stanford, California (EE.UU.).

Al Laboratorio de Biología Molecular y Genética Forense del CENPAT.

A la Sociedad Naturalista Andino Patagónica (SNAP).

A la Sociedad Americana de Mastozoología (AMS).

Al Cleveland Metroparks Zoo y la Sociedad Zoológica de Cleveland (CZS).

Al PICT 2008-0547 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

A toda las personas que me acompañaron en alguna de las campañas, que me ayudaron en las tareas de laboratorio y que, por compartir alguna charla, contribuyeron de diferente forma en esta tesis: Adela Bernardis, Anahí Formoso, Carola Cañon, Daniel Udriزار Sauthier, Daniela De Tommaso, Eileen Lacey, Elizabeth Hadly, Enrique Lessa, Erika Cuéllar, Fernando Fernández, Gustavo Simoes Libardi, Hernán Pastore, Hannah Frank, Jeremy Crawford, Jeremy Hsu, Joaquin Pardiñas, Juan Ochoa, Julie Woodruff, Julio Torres, Li (Lily) Cheng, Lydia Smith, Miguel Christie, Melissa Kemp, Néstor Basso, Nicolás Seoane, Oscar Tammone, Pablo Teta, Richard Sage y Ulyses Pardiñas.

Este trabajo fue financiado con un “Latin American Fellowship” otorgado por la Sociedad Americana de Mastozoología (AMS) y con un subsidio del “Scott Neotropical Fund” otorgado por Cleveland Metroparks Zoo y la Sociedad Zoológica de Cleveland (CZS). También fue solventado parcialmente por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del PICT 2008-0547.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	iv
Agradecimientos	vi
CAPÍTULO 1: Introducción General, Área de Estudio y Metodología General	
Introducción general	2
El género <i>Ctenomys</i>	3
Comportamiento y estructura genética poblacional	4
Modelo de estudio	5
Objetivo general	7
Preguntas que motivaron la tesis	7
Área de estudio	8
Metodología general	10
Depósitos fosilíferos	10
Arroyo Corral	11
Cueva del Caballo	12
Cueva Traful I	13
Procesamiento del material fósil	18
Tafonomía	18
Cronología	24
Dataciones radiocarbónicas	25
Calibración de fechas radiocarbónicas	26
Modelado de edad basado en profundidad	29
Análisis genéticos	31
Muestras actuales	31
Muestras fósiles	32
Elección del marcador molecular	36
Extracción de ADN de tejido actual	36
Extracción de ADN de tejido fósil	37
Amplificación de ADN	40

Secuenciación	43
CAPÍTULO 2: Variación genética durante el Holoceno en poblaciones de <i>Ctenomys sociabilis</i> y <i>Ctenomys haigi</i>	
Introducción	45
Materiales y métodos	47
Muestras analizadas	47
Cronología	47
Análisis moleculares	48
ADN antiguo	48
Identificación taxonómica de las muestras fósiles	49
ADN actual	50
Abundancia relativa	50
Variabilidad genética espacial y temporal	51
Variación genética a nivel de haplotipos	52
Variación genética a nivel de nucleótidos	52
Evaluación del tamaño de muestra	53
Resultados	54
Identificación taxonómica de las muestras fósiles	54
Abundancia relativa	57
Variabilidad genética del conjunto de muestras	59
Variación genética a nivel de haplotipos	61
Variación genética a nivel de nucleótidos	66
Evaluación del tamaño de muestra	68
Discusión	69
Patrones genéticos históricos: posibles explicaciones	70
Comportamiento social	72
Conclusiones	73
CAPÍTULO 3: Evaluación de factores promotores de la historia poblacional de <i>Ctenomys sociabilis</i>	
Introducción	75
Hipótesis 1: Erupciones volcánicas	78

Hipótesis 2: Competencia entre <i>C. sociabilis</i> y <i>C. haigi</i>	84
Hipótesis 3: Cambios ambientales	87
Conclusiones finales	91
CAPÍTULO 4: Conclusiones	
Cambios de diversidad genética en <i>Ctenomys</i> durante el Holoceno	94
Especificidad de hábitat y comportamiento social	94
Extinciones cuaternarias en Patagonia	96
Implicaciones para la conservación	98
Bibliografía	100

Trabajo de respaldo

TAMMONE, M.N., A. HAJDUK, P. ARIAS, P. TETA, E.A. LACEY Y U.F.J. PARDIÑAS.
2014. Last glacial maximum environments in northwestern Patagonia revealed by
fossil small mammals. *Quaternary Research* 82:198-208.

Figura de carátula y portada de capítulos.

Carátula: *Ctenomys sociabilis* (izquierda), *C. haigi* (derecha) [Fotografías: Anand Varma y Mauro Tammone, respectivamente]. Capítulo 1: Cráneo de *C. sociabilis*. Espécimen fósil del yacimiento Arroyo Corral II [Fotografía: Mauro Tammone]. Capítulo 2: Paisaje del Valle del Río Limay [Fotografía: Mauro Tammone]. Capítulo 3: Vista del Valle Encantado. Sitio de emplazamiento del yacimiento Cueva del Caballo [Fotografía: Adán Hajduk]. Capítulo 4: Vista parcial del alero Arroyo Corral II [Fotografía: Mauro Tammone].

CAPÍTULO 1

Introducción General, Área de Estudio y Metodología General



INTRODUCCIÓN GENERAL

La diversidad genética tiene un papel importante en la supervivencia de las especies y las poblaciones. Cuando las condiciones del entorno se alteran, ya sea por cambios climáticos, contaminación y fragmentación de hábitat, introducción de especies exóticas, enfermedades, plagas o parásitos, las poblaciones deben adaptarse a las nuevas condiciones, cambiar su rango de distribución o afrontar la extinción (Lacy 1997; Frankham y Kingslover 2004; Bradshaw y Holzapfel 2006; Allendorf et al. 2013). En poblaciones con escasa diversidad genética es muy poco probable que ocurran cambios en la composición genética; por lo tanto, su adaptabilidad resulta a primera vista pobre y, en consecuencia, su riesgo de extinción aumenta debido a su limitada capacidad de responder a las nuevas condiciones. Es por esto que la pérdida de diversidad genética significa un riesgo para las poblaciones y especies (Lacy 1997; Landweber y Dobson 1999). En este sentido, la investigación de los cambios en la variabilidad genética a través del tiempo proporciona un contexto adecuado para comprender las implicancias evolutivas de estas perturbaciones. Al mismo tiempo, permite hacer predicciones respecto a la respuesta de la población frente al cambio climático global, bajo una perspectiva evolutiva (van Tuinen et al. 2004; Prost et al. 2013).

El estudio de los patrones de variación genética de los organismos en relación a su distribución geográfica se ha convertido en un poderoso medio para deducir los mecanismos evolutivos que modelaron la disposición espacial de los linajes de genes entre las especies y poblaciones actuales utilizando secuencias de ADN de los organismos vivos (Avice 1998, 2009). Estos estudios también se han utilizado para inferir sobre procesos demográficos, reconstrucción histórica poblacional y efectos de cambios ambientales pasados sobre las poblaciones contemporáneas (e.g. Himes et al. 2008; Cosacov et al. 2010; Lessa et al. 2010; Mapelli et al. 2012a; Palma et al. 2012). Sin embargo, la información genética actual es un balance de los procesos evolutivos poblacionales ocurridos en el tiempo y muy probablemente está reflejando eventos ocurridos recientemente, ocultando procesos del pasado (Ramakrishnan y Hadly 2009). Con las mejoras en las técnicas de extracción de ADN de los últimos años, ahora es posible recuperar fragmentos nucleotídicos a partir de restos fósiles, en particular de huesos y dientes, para tener un conocimiento más preciso sobre el pasado evolutivo de las especies (Pääbo et al. 1989; Cooper y Poinar 2000; Hofreiter et al. 2001). La investigación del ADN antiguo junto con datos genéticos actuales nos permite

reconstruir la historia de las poblaciones utilizando información genética temporal, incluyendo cambios en la variación genética, niveles de flujo genético y relaciones interpopulacionales en tiempo real a lo largo de cientos de miles de generaciones (Drummond et al. 2003; Ramakrishnan et al. 2005; Barbujani 2010). Estos estudios pueden, además, ser vinculados a los cambios climáticos, proporcionando información clave para implementar estrategias de conservación.

El género *Ctenomys*

Ctenomys Blainville, 1826 (Blainville 1826) es un género de roedores subterráneos que constituye uno de los elementos más diversificados de fauna endémica de América del Sur (Lacey et al. 2000; Woods y Kilpatrick 2005; Patton et al. 2015). Se trata del único género viviente de la familia Ctenomyidae y es, sin dudas, el género más especioso de roedores subterráneos -con 63 especies reconocidas como válidas (Bidau 2015)- y uno de los géneros más especiosos de mamíferos (Reig et al. 1990; Mascheretti et al. 2000; Castillo et al. 2005).

Los tuco-tucos, como se los conoce vulgarmente en algunas regiones por su típica vocalización "tuc-a-tuc", ocupan una gran variedad de hábitats, desde pastizales y praderas húmedas a estepas arbustiva, desiertos y montañas (Reig et al. 1990). Se distribuyen a lo largo de la mitad austral de América del Sur, desde el extremo sur de Brasil y Perú hasta el extremo insular de Argentina y Chile, extendiéndose desde el nivel del mar hasta el Altiplano andino (Reig et al. 1990; Lacey et al. 2000). Como sucede en la mayoría de los roedores subterráneos, la distribución espacial de los tuco-tucos ocurre por lo general en parches de hábitat, donde el costo energético de la excavación y obtención de alimento no supere los beneficios energéticos brindados por ese hábitat (Reig et al. 1990; Busch et al. 2000). La distribución fragmentada de los hábitats favorables hace que sus poblaciones se distribuyan en unidades genéticamente diferentes (Steinberg y Patton 2000) y, en muchos casos, se cree que este factor ha generado grandes variaciones a nivel molecular y de cariotipo, lo cual ha sido destacado como el principal factor de la radiación específica del grupo (Reig 1989; Patton y Smith 1990; Smith 1998; Lessa y Cook 1998). Junto con la tendencia de ocupar ambientes fragmentados, estos animales se caracterizan por una baja tasa de dispersión asociada principalmente con el hábito de vida subterráneo que los caracteriza. Estas condiciones han facilitado también la diversificación del género mediante la diferenciación, en términos evolutivos, de pequeños grupos o demes aislados que caracterizan la estructura

poblacional de muchas de sus especies (Reig et al. 1990; Wlasiuk et al. 2003; Gonçalves y de Freitas 2009; Mirol et al. 2010; Mapelli et al. 2012b; Mora et al. 2013).

Comportamiento y estructura genética poblacional

Los tuco-tucos construyen sistemas de túneles y madrigueras subterráneas, las cuales mantienen de manera exclusiva durante toda su vida. Esta actividad se ve reflejada en el comportamiento altamente territorial de estos animales, que a su vez estaría relacionado con la tendencia de la gran mayoría de las especies a vivir de manera solitaria (Nevo 1979; Lacey 2000). Debido a esto, como ocurre en otros mamíferos subterráneos, la distribución geográfica de las especies de *Ctenomys* generalmente no se solapan (Nevo 1979; Reig et al. 1990) aunque se han documentado casos de simpatria o parapatria a escalas espaciales muy pequeñas (Cutrera et al. 2010; Kubiak et al. 2015).

La tendencia a mantener territorios exclusivos a nivel individual junto con la limitada capacidad de dispersión favorece la ocurrencia de patrones de estructuración genética poblacional pronunciados, que se caracterizan por una baja variación genética intrapoblacional y una elevada divergencia entre poblaciones (Sage et al. 1986; Steinberg y Patton 2000; Lacey 2001). Por otro lado, la distribución espacial de la variación genética está influenciada no sólo por las restricciones ecológicas sino también por la estructura social de las especies (Lacey 2000; Cutrera et al. 2005).

Uno de los factores que afecta la variación genética de las poblaciones naturales es la tendencia de los individuos emparentados a vivir agrupados (Dobson 1998; Storz 1999; Lacey y Wiczorek 2004). Esta conducta tiene consecuencias importantes en el comportamiento social, el comportamiento reproductivo y la dispersión de los individuos y, por lo tanto, es de esperar que influya notablemente en la estructura genética de las poblaciones (Lacey 2000; Dobson 2007). En general, como resultado de este comportamiento, la variación genética entre grupos sociales aumenta a medida que los individuos del grupo están más emparentados. Diversos estudios realizados en mamíferos que viven en grupos demuestran que dentro de una población, los grupos sociales son genéticamente diferentes y reflejan en buena medida su estructura social (e.g. Dobson et al. 1998; Richardson et al. 2002; Spong et al. 2002; Lacey y Wiczorek 2004; Arnold y Wilkinson 2015).

Modelo de estudio

Este estudio está enfocado en dos especies del género *Ctenomys*: *Ctenomys sociabilis* Pearson y Christie, 1985 (Pearson y Christie 1985) y *Ctenomys haigi* Thomas, 1919 (Thomas 1919), conocidas comúnmente con el nombre "tuco-tuco colonial" (o sociable) y "tuco-tuco patagónico", respectivamente (Figura 1.1). Ambos son roedores de tamaño pequeño a mediano (peso medio de adultos, *C. sociabilis*: 265 g; *C. haigi*: 145 g) y se distribuyen en el ecotono y la estepa de la Patagonia, entre los 39° y 42° de latitud sur. *Ctenomys sociabilis* es una especie endémica del Parque Nacional Nahuel Huapi, distribuida en un área aproximada de 700 km² en la Sierra de Cuyín Manzano, provincia del Neuquén (Tammone et al. 2012), está declarada en peligro crítico por la UICN (Bidau et al. 2008). *Ctenomys haigi* está ampliamente distribuida en el noroeste de la Patagonia y declarada de preocupación menor por la UICN (Bidau et al. 2008). Ambas especies se encuentran separadas por el río Limay en el tramo comprendido entre el lago Nahuel Huapi y el río Traful, con poblaciones de *C. sociabilis* al oeste y de *C. haigi* al este del río (Pearson y Christie 1985; Lacey y Wieczorek 2003; Tammone et al. 2012). A ambos lados de esta vía fluvial, de ~100 m de ancho, las condiciones ambientales a las cuales están sujetas las poblaciones de *Ctenomys* son similares; sin embargo y pese a que las dos especies ocupan nichos ecológicos semejantes, utilizan microhabitats diferentes. *C. sociabilis* se distribuye exclusivamente en el ecotono en bordes de mallín y áreas arbustivas con cobertura de hierbas y gramíneas (Tammone et al. 2012), mientras que *C. haigi* se distribuye tanto en la estepa y la precordillera como en el ecotono, en áreas con variada composición vegetal incluyendo bordes de mallín, estepas arbustivas y matorrales (Lacey y Wieczorek 2003).

Estos *Ctenomys* también exhiben marcadas diferencias demográficas, comportamentales y genéticas (Lacey y Wieczorek 2003). *Ctenomys sociabilis* vive en grupos con múltiples individuos por sistema de madrigueras, los cuales se forman por filopatría natal de hembras (Lacey et al. 1997; Lacey y Wieczorek 2004), mientras que los individuos de *C. haigi* son solitarios con un único individuo por sistema de madrigueras (Lacey et al. 1998). Aunque actualmente las poblaciones de *C. sociabilis* manifiestan una ausencia casi completa de variabilidad genética en algunos segmentos de su genoma (Lacey 2001; Hadly et al. 2003; Chan et al. 2005), en el pasado la situación fue diferente. Especímenes fósiles recuperados de un depósito de restos producido por la actividad trófica de lechuzas muestran que durante el Holoceno esta especie tuvo una variabilidad genética considerablemente mayor, proporcionando así la evidencia de una pérdida sustancial de la

variación genética hacia el Holoceno tardío (Chan et al. 2005). En forma contrastante, el parapatrico y ampliamente distribuido *C. haigi* no muestra evidencias de una pérdida de variación genética comparable durante el mismo segmento temporal (Chan y Hadly 2011).

Las hipótesis propuestas para explicar la pérdida de variación genética en *C. sociabilis* incluyen cambios en el hábitat, vulcanismo y competencia con *C. haigi* (Chan et al. 2005). Sin embargo, hasta la fecha, la capacidad para inferir las bases causales de esta pérdida son limitadas debido a que todos los datos históricos de esta especie provienen de una única localidad. En este contexto, resulta decisivo ampliar la base fáctica sumando otros depósitos de la región para discutir con una mayor profundidad y, llegado el caso, optar por alguna de estas hipótesis a la hora de explicar el empobrecimiento genético de *C. sociabilis*.



Figura 1.1. Apariencia externa de *Ctenomys sociabilis* (izquierda) y *Ctenomys haigi* (derecha) fotografiados en libertad en el norte de Patagonia. Nótese la diferencia de coloración [Fotografías: Anand Varma y Mauro Tammone, respectivamente].

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral es determinar la amplitud geográfica de la pérdida de variabilidad genética de *Ctenomys sociabilis* y explorar las hipótesis en su respecto a partir del análisis de material óseo y dentario de fósiles de *Ctenomys* recuperado en varios depósitos arqueológicos con adecuada cobertura geográfica y temporal. Asimismo, mediante la combinación de datos de variabilidad genética y abundancia relativa de *Ctenomys sociabilis* y *Ctenomys haigi*, esta tesis permitirá comparar los patrones de variación genética en relación a los cambios ambientales regionales ocurridos durante el Holoceno y evaluar el papel de las diferencias en el uso del hábitat, la demografía y el comportamiento en la persistencia de las poblaciones a lo largo de escalas temporales amplias.

Preguntas que motivaron esta tesis

- 1) ¿Qué factor o factores determinaron la pérdida de diversidad genética en *C. sociabilis*?
- 2) ¿El empobrecimiento genético ocurrió en diferentes localidades, afectando todo el rango de la especie o de forma local?
- 3) ¿Por qué el factor o los factores que afectaron la diversidad genética en *C. sociabilis* no afectaron la diversidad genética en *C. haigi*, dado que ambas especies ocupan ambientes similares y son parapátricas?

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se ubica al noroeste de la Patagonia, específicamente en el valle del río Limay desde su nacimiento en el lago Nahuel Huapi hasta la confluencia del río Traful, tributario de su margen norte. Se extiende hacia el este y al oeste del valle, aproximadamente 10 km dentro de la provincia de Río Negro y del Neuquén (Figuras 1.2, 1.3 y 1.6).

Regionalmente, se trata de un paisaje de influencia predominantemente fluvial con numerosos valles con perfil transversal pronunciado. A lo largo de los grandes valles, los de los ríos Limay y Traful, se aprecian las huellas de los diferentes periodos glaciares, a través de morrenas frontales y dos pisos de morrenas laterales colgadas respecto al fondo de valle actual.

El área de estudio corresponde al Distrito Fitogeográfico Patagónico Occidental denominado precordillera de la provincia Patagónica, desde el límite de los bosques andino-patagónicos hasta la isohieta de los 300 mm (Cabrera y Willink 1980; Bran 2000). En su fisonomía predominan las estepas bajas de pequeños arbustos y coirones, con *Festuca pallescens* (St.-Yves) Parodi (coirón dulce), *Pappostipa speciosa* (Trin. y Rupr.) Romasch. (coirón amargo), *Mulinum spinosum* Pers. (neneo) y *Acaena splendens* Hook. y Arn. (cepa caballo) como especies dominantes; hacia el extremo norte y occidental aparece un importante componente de ambiente ecotonal, siendo común el ingreso de formaciones de bosquecillos monoespecíficos de *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. y Bizzarri (ciprés) o matorrales mixtos de *A. chilensis*, *Lomatia hirsuta* (Lam.) Diels (radal), *Maytenus boaria* Molina (maitén), *Discaria chacaya* (G. Don) Tortosa (chacay) y *D. articulata* Kuntze (espino negro); a mayores alturas son frecuentes los bosque caducifolios de *Nothofagus pumilio* (Poepp. y Endl.) Krasser (lenga) (León et al. 1998; Bran 2000; Mermoz et al. 2009).

Biogeográficamente, el ecotono o bosque de transición es relevante porque al ser un área de engranaje entre dos biomas tan diferenciales, en este caso el bosque y la estepa, genera un incremento de la diversidad, tanto de formas como de ambientes (Barnosky et al. 2001; Mermoz et al. 2009).

El área se encuentra asociada a un clima árido a semiárido con una isoterma media anual que no supera los 8°C. Las precipitaciones oscilan entre los 1000 mm anuales en su extremo occidental, hasta los 500 mm anuales al este concentrándose alrededor del 65%

entre los meses de mayo y agosto, periodo en el que se destaca un importante aporte nival principalmente en las alta cumbres (Mermoz et al. 2009).

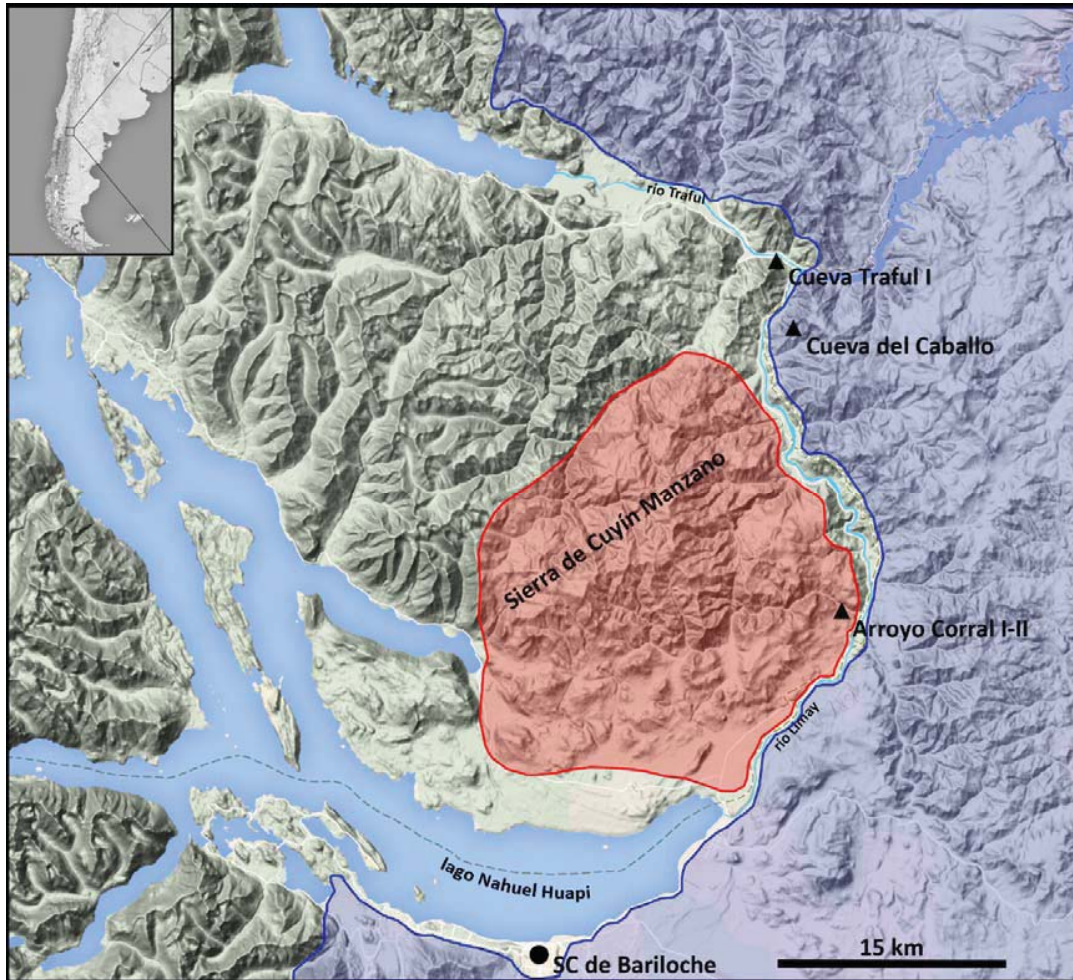


Figura 1.2. Área de estudio y ubicación de los depósitos fosilíferos estudiados (triángulos). Los rangos de distribución de *C. sociabilis* (en rojo) y *C. haigi* (en azul) se indican de acuerdo a Pearson y Christie (1985).

METODOLOGÍA GENERAL

Depósitos fosilíferos

Se analizó el material fósil de *Ctenomys* spp. recolectado en dos sitios arqueológicos y paleontológicos, denominados Arroyo Corral y Cueva del Caballo (Hajduk et al. 2007; Arias Cabal et al. 2013; Tammone et al. 2014). También se incorporaron en el estudio los datos publicados sobre fósiles de *C. sociabilis* y *C. haigi* para el sitio Cueva Traful I (Crivelli Montero et al. 1993; Pearson y Pearson 1993; Chan et al. 2005; Chan y Hadly 2011). Arroyo Corral se emplaza dentro del rango geográfico actual de *C. sociabilis*, mientras que Cueva del Caballo lo hace dentro del rango geográfico actual de *C. haigi*. Este es un aspecto importante ya que los datos obtenidos en Cueva Traful I provienen de un área en donde -en la actualidad- ninguna de las especies está presente (Figura 1.2).

Los depósitos de Arroyo Corral y Cueva del Caballo fueron excavados durante los años 2006 a 2012 por un grupo binacional integrado por el Equipo de Arqueología y Etnohistoria del Museo de la Patagonia “Francisco Pascasio Moreno” (CONICET-APN, S. C. de Bariloche, Río Negro, Argentina) y el equipo de arqueología del Instituto Internacional de Investigaciones Prehistóricas de Cantabria (IIIPC, Universidad de Cantabria, Santander, España).

Para la excavación de los yacimientos se empleó cucharines y pinces y se procedió por niveles (= artificiales) de 10 cm de espesor, tratando de respetar en la medida de lo posible las unidades estratigráficas (= naturales). El sedimento se extrajo en cubetas de plástico y se tamizó en el campo usando un cernidor con una luz de malla de 2 mm. De esta forma se eliminó el sedimento más fino, mientras que en forma manual se descartaron del tamiz los clastos mayores. La muestra concentrada en el cernidor se guardó en bolsas de plástico etiquetadas con su correspondiente procedencia estratigráfica para su posterior procesamiento. Durante las excavaciones se utilizó una estación total Leica TCRM 1205 para registrar la topografía de cada nivel.

A continuación se describen los depósitos analizados y se brinda información respecto a la excavación, estratigrafía y relaciones cronológicas.

Arroyo Corral

El sitio Arroyo Corral (de ahora en más, ACo) incluye los depósitos Arroyo Corral I (de ahora en más, ACo I, 40°55'52"S, 71°03'19"W, WGS84; 820 m snm) y Arroyo Corral II (de ahora en más, ACo II, 40°56'06"S, 71°03'06"W, WGS84; 860 m snm). Esta localidad se encuentra unos 33 km al noreste de S. C. de Bariloche, sobre la margen sur del arroyo Carbón, a 1,5 km de su desembocadura en el río Limay, en campos de la Estancia La Lonja, Parque Nacional Nahuel Huapi, provincia del Neuquén, Argentina (Figuras 1.3 A y B). A lo largo de la tesis, cuando se indica ACo debe entenderse como una referencia para ambos yacimientos, ACo I y ACo II.

ACo I es un abrigo rocoso abierto al norte a media altura de la vertiente meridional (sur) del arroyo Corral. Está desarrollado en forma de cueva con una altura de techo de ca. 3 m y dos lóbulos bastante desarrollados (Figura 1.4 A). Sobre la entrada principal se planteó una cuadrícula de 3 m x 2 m, la cual se excavó en 7 niveles sedimentarios naturales denominados estrato I a VII (Figura 1.4 B). La excavación se extendió hasta los 2,80 m de profundidad donde se alcanzó la roca de caja. Los fechados radiocarbónicos indican que el depósito de ACo I comenzó a formarse en el Último Máximo Glacial (~23000-19000 años AP) al final del Pleistoceno (Tammone et al. 2014). La capa basal es un estrato arenoso de probable origen fluvial, en el que se han documentado abundantes materiales paleontológicos, que incluyen megafauna extinta (*Mylodontinae*) y abundantes restos de *Ctenomys* y otros pequeños mamíferos (estratos VII a V). En el tránsito al Holoceno se constata ocupación antrópica, a través de los restos líticos y óseos, en los estratos IV a II y posterior registro de cerámica en el estrato I.

ACo II es un gran abrigo rocoso orientado al norte, localizado en la parte alta de la vertiente meridional (sur) del arroyo Corral, 40 m por encima de ACo I (Figura 1.3 B). Su amplia abertura, de unos 22 m de alto y 45 m de ancho, le confiere una forma de alero. Las excavaciones se centraron en dos zonas opuestas del abrigo (Figura 1.5 A): una cuadrícula en el extremo occidental, donde se excavó una superficie de 9 m² (cuadrícula 1) y otra cuadrícula en la zona más profunda del abrigo en su parte oriental, en la que se abrió una superficie de 3 m² (cuadrícula 2). Los perfiles expuestos proporcionaron una secuencia estratigráfica de 6 estratos naturales (I-VI). La roca de base se alcanzó a una profundidad de 1,32 m en la cuadrícula 1 y de 1,50 m en la cuadrícula 2 (Figura 1.5 A-C). De acuerdo con las interpretaciones arqueológicas y las características de los estratos sedimentarios se estableció una correlación entre las dos cuadrículas de excavación. Posteriormente, se

confirmó la relación entre las cuadrículas excavadas mediante fechados radiocarbónicos. Según éstos, la historia sedimentaria de ACo II comienza entre el Pleistoceno tardío y el Holoceno temprano (ca. 12000 años cal AP) donde ya se aprecian las primeras ocupaciones humanas y se extiende hasta la actualidad. La acumulación de restos de pequeños mamíferos (roedores y marsupiales) es regular a lo largo de todo el depósito y se puede atribuir a egagrópilas de lechuzas (Tammone et al. 2014); el lugar sigue siendo hoy en día frecuentado por la Lechuza del Campanario (*Tyto furcata*; Nijman y Aliabadian 2013), de la cual se ha avistado un ejemplar durante la excavación.

Cueva del Caballo

Cueva del Caballo (de ahora en más, CdC; 40°45'36"S, 71°05'56"W, WGS84, 830 m snm) está ubicado sobre la margen derecha del río Limay, ca. 62 km al noreste de S. C. de Bariloche, en el área conocida como Valle Encantado, provincia de Río Negro, Argentina (Figura 1.6 A). El paisaje regional muestra numerosas formaciones rocosas de origen volcánico (Figura 1.6 C). CdC es un amplio abrigo formado en una brecha cuya boca se orienta al noreste; mide aproximadamente unos 13 m de ancho por 8 m de profundidad. Internamente adquiere forma de cueva compuesta por dos lóbulos. En una de estas cámaras, durante los meses de noviembre y diciembre de 2008, el mismo grupo de arqueólogos que trabajó en ACo, excavó una cuadrícula de 2 m x 1 m (Figura 1.7 A). La excavación se completó en 16 niveles estratigráficos naturales alcanzando la roca de base a los 3,68 m de profundidad. Siguiendo las características sedimentarias y los fechados radiocarbónicos, la estratigrafía se ordenó en 7 unidades para los propósitos analíticos de esta tesis (Figura 1.7 B). El depósito es principalmente de origen volcánico y biológico, compuesto por diferentes capas de ceniza mezclada con sedimento, arena y clastos. La presencia de elementos esqueléticos de pequeños mamíferos resultó recurrente a lo largo de toda la secuencia; de hecho, estos elementos constituyen el componente orgánico principal del depósito (Figura 1.8). La ocupación humana fue escasa e irregular. De acuerdo con los fechados radiocarbónicos, el relleno basal comienza su deposición durante el Holoceno temprano (ca. 12000 años cal AP). y continúa hasta el presente. En el sitio hay al menos 3 posaderos de lechuzas, actualmente activos, situación que sumado a otros rasgos del depósito y su contenido sugieren que la incorporación de restos de pequeños vertebrados tuvo su origen en la acción trófica de aves rapaces estrigiformes.

Cueva Trafal I

Cueva Trafal I (de ahora en más, CTI; 40°42'55"S, 71°06'30"W, WGS84, 730 m snm) fue excavado por los arqueólogos Eduardo Crivelli Montero y Mario Silveira durante los años 1978 a 1983 (Crivelli Montero et al. 1993). Se ubica sobre la margen sur del río Trafal, ca. 2 km de su confluencia con el río Limay, provincia del Neuquén, Argentina (Figura 1.6 B). Se trata de una cueva con escasa iluminación natural, situada a unos 5 km al norte de CdC y a unos 25 km al norte de ACo I-II y presenta una superficie de relleno de 15 m x 7 m la cual fue excavada en su totalidad, alcanzando una profundidad promedio de 2 m. Se identificaron 21 estratos sedimentarios que, de acuerdo con los fechados radiocarbónicos, representan un segmento temporal que va desde el Pleistoceno tardío y el Holoceno temprano (ca. 12000 años cal AP) hasta la actualidad (Crivelli Montero et al. 1993; Chan et al. 2005; Pardiñas y Teta 2013). El depósito muestra la recurrente ocupación de grupos humanos durante todo el Holoceno a través de la presencia de numerosos instrumentos líticos y restos de fauna consumida (Crivelli Montero et al. 1993). Otro componente importante y extendido casi constantemente a lo largo de la secuencia sedimentaria son los restos de pequeños mamíferos producto de la actividad trófica de búhos y lechuzas (Pearson 1987; Pearson y Pearson 1993; Pardiñas y Teta 2013).

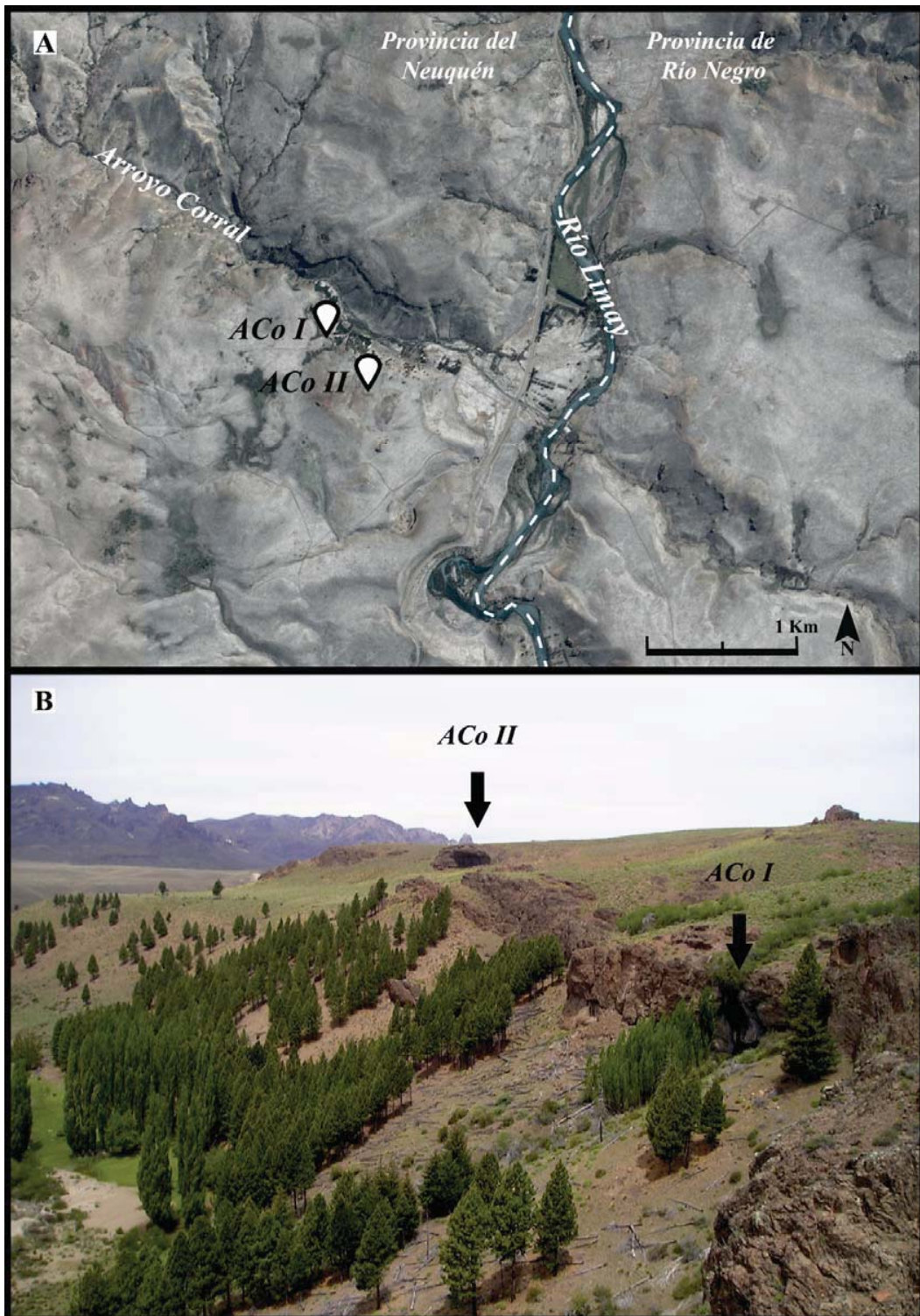


Figura 1.3. A) Ubicación geográfica de los depósitos Arroyo Corral I (ACo I) y II (ACo II) sobre la base de una imagen satelital. B) Paisaje regional de los sitios en dirección sur. La forestación corresponde a plantaciones alóctonas de álamo y pino [Fotografía: Adán Hajduk].

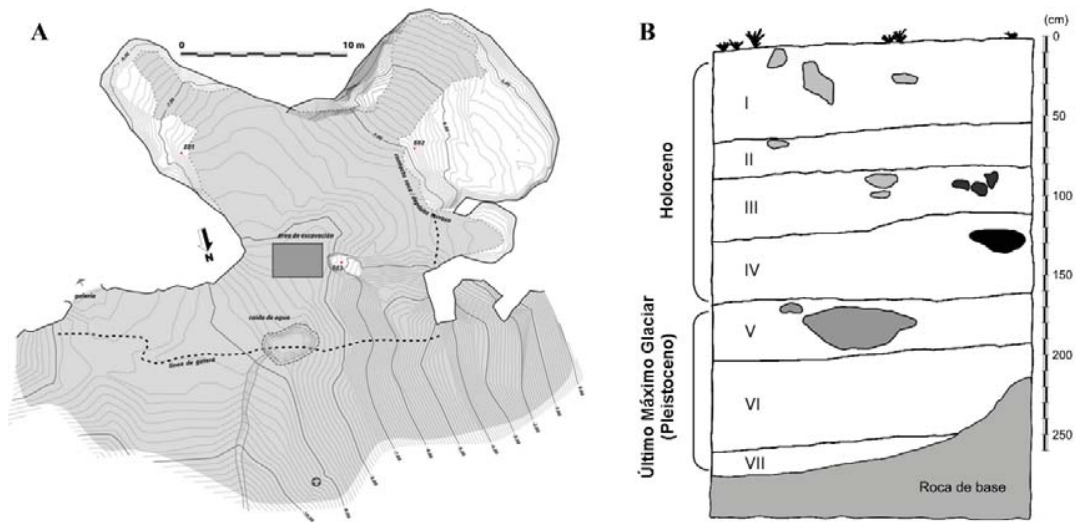


Figura 1.4. A) Vista en planta del yacimiento Arroyo Corral I (ACo I). Área de excavación indicada en recuadro gris. B) Secuencia estratigráfica esquemática del pozo de excavación, perfil este. [Digitalización: Luis C. Teira Mayolini]

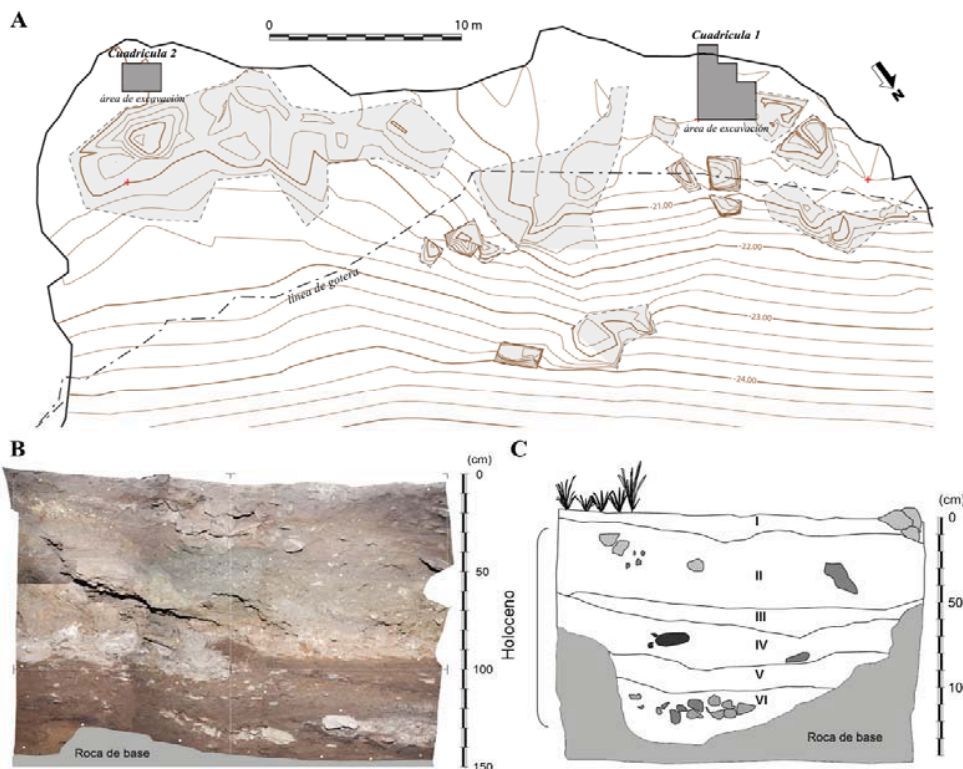


Figura 1.5. A) Vista en planta del yacimiento Arroyo Corral II (ACo II). Áreas de excavación indicadas en gris. B) Secuencia estratigráfica del pozo de excavación cuadrícula 2, perfil norte. C) Secuencia estratigráfica esquemática del pozo de excavación de la cuadrícula 1, perfil este. [Digitalización: Luis C. Teira Mayolini].

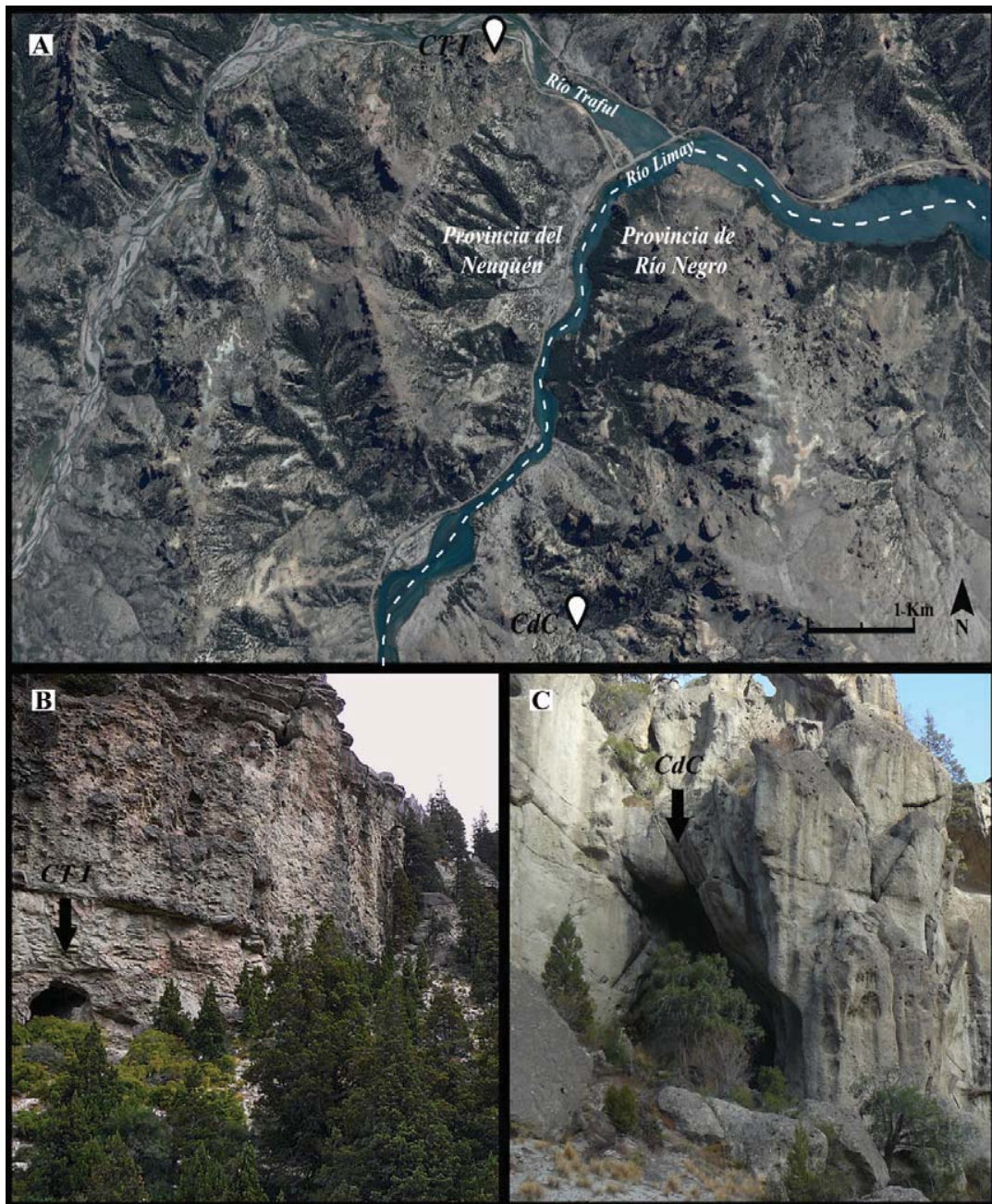


Figura 1.6. A) Ubicación geográfica de los yacimientos Cueva del Caballo (CdC) y Cueva Traful I (CTI) sobre una imagen satelital. Paisaje local de los sitios B) CTI y C) CdC. La forestación corresponde a bosques naturales de ciprés. [Fotografías: Mauro Tammone].

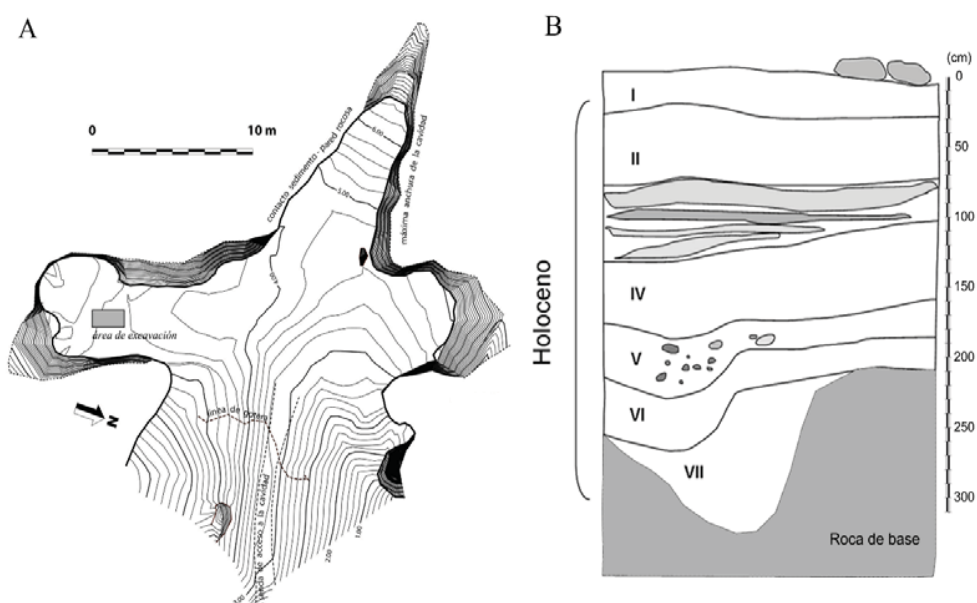


Figura 1.7. A) Vista en planta del yacimiento Cueva del Caballo (CdC). Área de excavación indicada en recuadro gris. B) Secuencia estratigráfica esquemática del pozo de excavación, perfil este. [Digitalización: Luis C. Teira Mayolini].

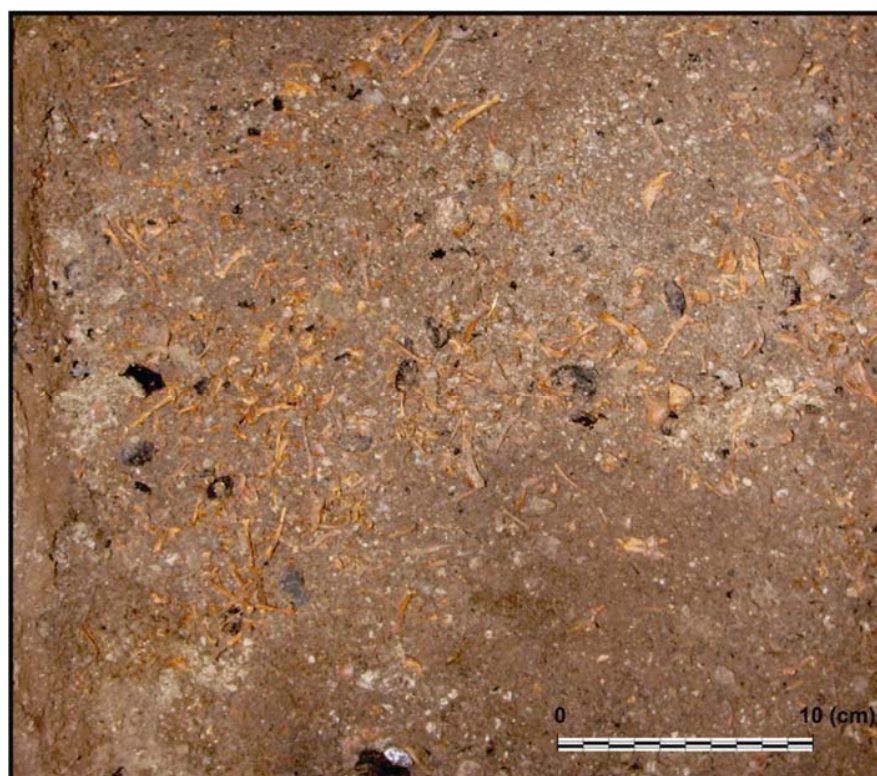


Figura 1.8. Restos óseos y dentarios de pequeños vertebrados, vista en planta, Cueva del Caballo (CdC), estrato IV. [Fotografía: Adán Hajduk].

Procesamiento del material fósil

En el laboratorio, el sedimento concentrado en el tamiz se volcó en una bandeja y mediante pinzas se separó todo el material óseo y dentario de *Ctenomys* y de otros pequeños vertebrados (Figura 1.9). Los componentes arqueológicos, de fauna media y mayor y el carbón vegetal (envuelto en papel aluminio), se guardó en bolsas de plástico rotuladas con la denominación del depósito y su correspondiente procedencia estratigráfica. Los elementos esqueléticos de *Ctenomys* y de otros pequeños vertebrados se liberaron de sedimento utilizando cepillos y pinza de disección. Los cráneos, maxilares y mandíbulas de los pequeños mamíferos se determinaron a nivel de especie utilizando claves (Pearson 1995; Fernández et al. 2011) y material comparativo de la colección de mamíferos del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Chubut. El criterio taxonómico y sistemático general adoptado en esta tesis corresponde a Patton et al. (2015). Dada la dificultad para identificar las especies de *Ctenomys* utilizando las claves dicotómicas, a partir del estudio de material comparativo se identificaron cuatro indicadores morfológicos para diferenciar *Ctenomys sociabilis* y *Ctenomys haigi* (Figura 1.10). Los cráneos, maxilares y mandíbulas de todos los taxones de pequeños mamíferos se cuantificaron y estos valores se utilizaron para estimar la abundancia relativa de cada taxón por estrato sedimentario a partir del número mínimo de individuos (MNI¹; Grayson 1984; Lyman 2008). Las estimaciones del MNI se basaron en la frecuencia del elemento esquelético más abundante entre cráneo, maxilar y mandíbula, teniendo en cuenta lateralidad. Los valores totales de MNI analizados fueron para ACo = 2513 y para CdC = 9085. A cada elemento craneodentario de *Ctenomys* spp. se le asignó un número de referencia y se lo guardó en bolsas individuales con cierre tipo ziploc (Figura 1.11). Los elementos esqueléticos postcraneales se conservaron en bolsas de plástico rotuladas con el nombre del depósito y la procedencia estratigráfica a los fines de estudios tafonómicos ulteriores. Para la identificación taxonómica y el análisis tafonómico, el material se observó bajo lupa estereoscópica con 40 aumentos.

Tafonomía

En los depósitos fósiles de pequeños mamíferos, el análisis tafonómico permite determinar si el conjunto taxonómico estudiado (tanatocenosis) preserva de manera precisa

¹ Del inglés, Minimum Number of Individuals.

la estructura de la comunidad (biocenosis) durante el lapso temporal que abarca la secuencia (Lyman 2008; Terry 2008). Un factor clave es determinar si el depredador responsable de la acumulación ósea y dentaria se ha mantenido constante a lo largo de la historia deposicional del sitio, ya que diferentes depredadores pueden imponer sellos diferenciales a la estructura de la muestra, principalmente si exhiben diferentes patrones de actividad y selección de presas (Grayson 1981; Andrews 1990; Terry 2007). Los depósitos fósiles de pequeños mamíferos son mayormente producidos por la acción depredatoria de aves rapaces o mamíferos (Andrews 1990; Pardiñas 1999a). Cada tipo de depredador produce una proporción de elementos esqueléticos de las presas y un grado de corrosión digestiva que permite distinguir diferentes tipos de depredadores (Andrews 1990; Terry 2007). En este estudio se analizó el material fósil para determinar el origen de su acumulación utilizando dos indicadores: proporción de elementos esqueléticos y grado de corrosión digestiva en superficies óseas.

En cada depósito y para cada unidad estratigráfica, se tomaron al azar submuestras de los elementos esqueléticos. Para determinar la proporción de elementos esqueléticos se calculó la abundancia relativa de 9 elementos (maxilar, mandíbula, escápula, húmero, radio, pelvis, fémur, tibia y calcáneo) utilizando la siguiente fórmula (Andrews 1990):

$$R_i = N_i / (E_i \times MNI) \times 100,$$

donde:

R_i = abundancia relativa de elemento i en la submuestra; N_i = número del elemento i en la submuestra; E_i = número esperado del elemento i por individuo; MNI = número mínimo de individuos.

En las submuestras se identificó el grado de corrosión digestiva sobre los fémures y húmeros, clasificándola en base a cuatro clases, según el porcentaje de huesos afectados (Andrews 1990; Fernández et al. 2012; Fernandez-Jalvo et al. 2014), (1) ligera: entre el 6% y 20%, desgaste restringido a la superficie articular y ocasionalmente sobre la epífisis del hueso, que casi nunca están fracturados, (2) moderada: entre el 25% y 50%, el desgaste afecta completamente la epífisis y se extiende parcialmente a la diáfisis, aparecen huesos fracturados con bordes redondeados, (3) fuerte: entre el 60% y 100%, el desgaste afecta todo el hueso, la mayor parte de los mismos están fracturados con bordes completamente ondulados, (4) extrema: 100%, el desgaste es completamente ondulado, todos los huesos están fracturado.

Ambos indicadores -abundancias relativas y marcas de corrosión- fueron consistentes con las características de las acumulaciones de presas generadas por aves rapaces (Andrews 1990). El patrón general de abundancia relativa de los elementos esqueléticos fue constante a lo largo del tiempo -entre unidades estratigráficas- y similar entre los depósitos (Figura 1.12) lo cual indica la acción del mismo depredador y su constancia en el tiempo. El grado de corrosión observado en fémures y húmeros (>50% ligera en todos los casos) robustece esta interpretación (Tabla 1.1). De acuerdo con estas observaciones se puede considerar a *Tyto furcata* como principal agente que formó las concentraciones de materiales esqueléticos en los yacimientos estudiados (ver Pearson y Pearson 1993; Pardiñas 1999a, 2000; Teta et al. 2005; Fernández et al. 2012; Pardiñas y Teta 2013; Tammone et al. 2014).



Figura 1.9. Selección de elementos esqueléticos de pequeños vertebrados, sedimento concentrado de Cueva del Caballo (CdC).

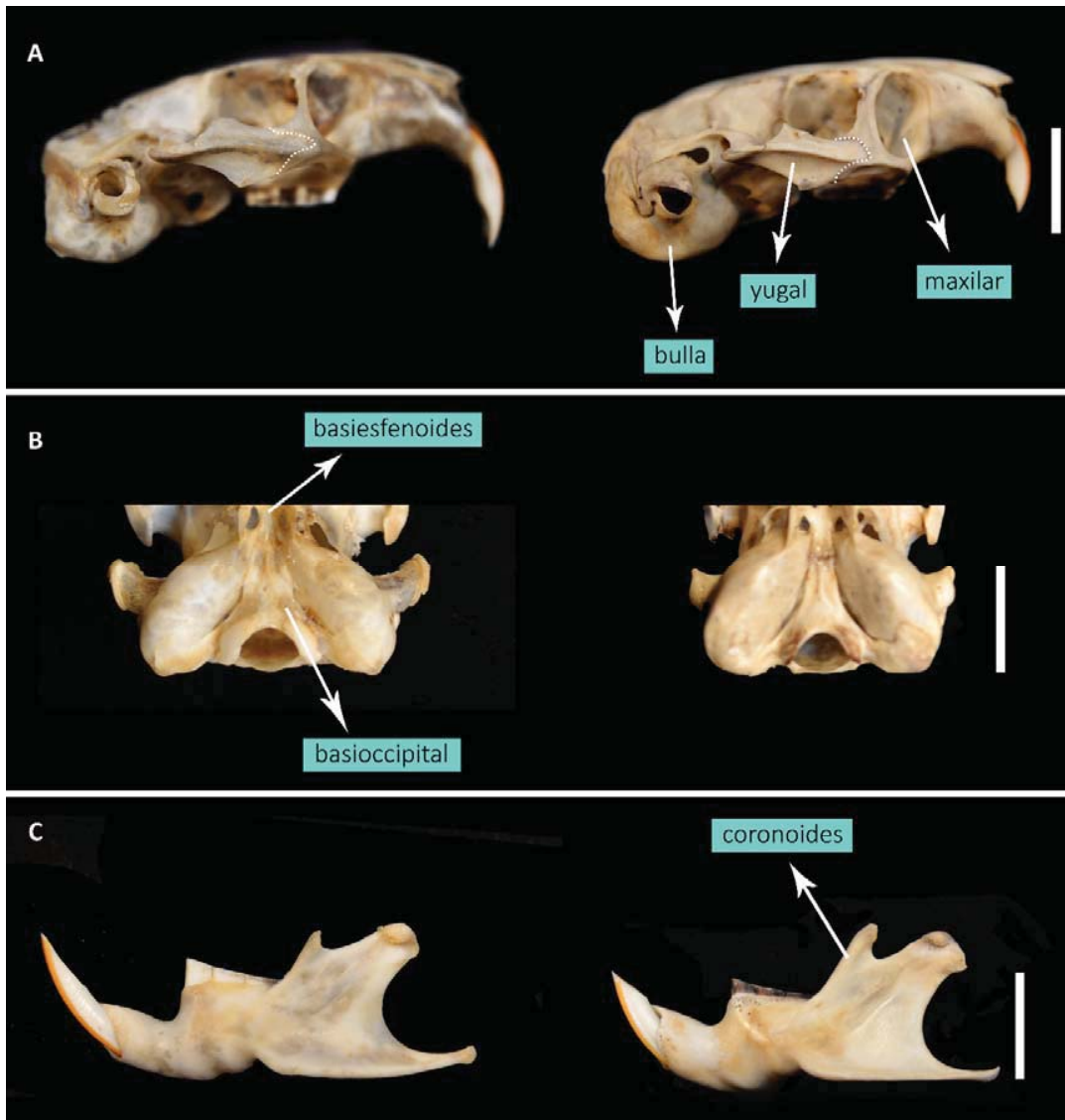


Figura 1.10. Rasgos anatómicos (indicados con flechas) diferenciales en cráneo y mandíbula entre *C. sociabilis* (izquierda) y *C. haigi* (derecha): **A)** desarrollo de bula timpánica (en norma lateral) y morfología de la sutura yugal-maxilar; **B)** morfología y desarrollo del basioccipital; **C)** desarrollo del proceso coronoides. Escala = 10 mm.

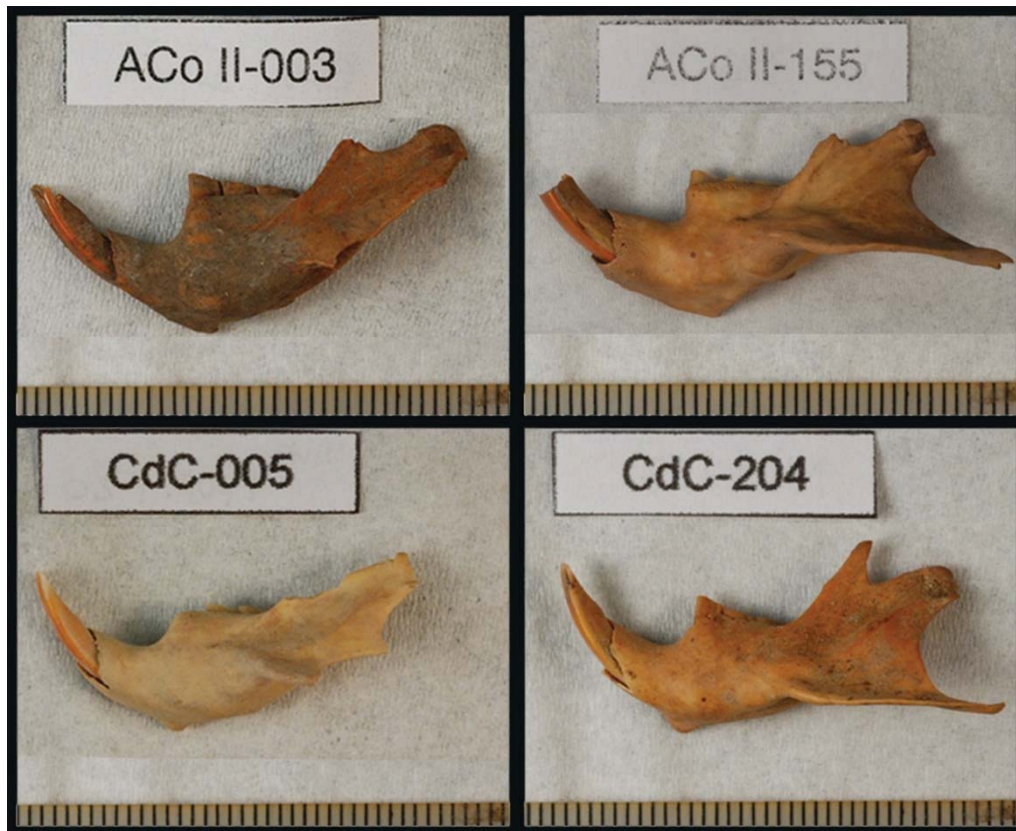


Figura 1.11. Especímenes fósiles de *C. sociabilis* (arriba) y *C. haigi* (abajo) recuperados de los depósitos Arroyo Corral II (ACo II) y Cueva del Caballo (CdC). Los dientes incisivos de estos materiales fueron utilizados para la extracción de ADN. Los especímenes fueron catalogados utilizando el acrónimo del depósito seguido de un número de orden para el espécimen.

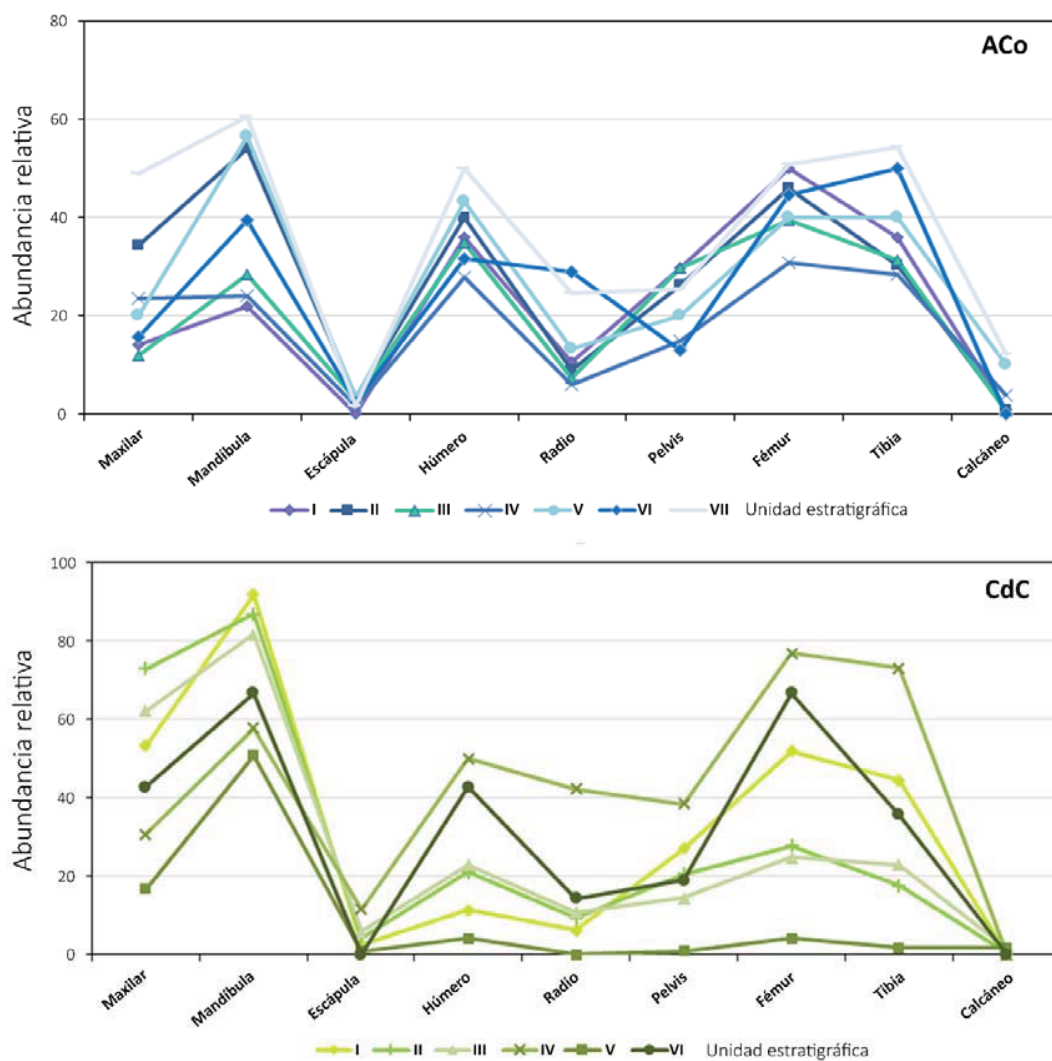


Figura 1.12. Abundancia relativa de los elementos esqueléticos de las unidades estratigráficas de Arroyo Corral (ACo) y Cueva del Caballo (CdC).

Tabla 1.1. Representación de las distintas categorías de corrosión en el material esquelético de pequeños mamíferos de los depósitos Arroyo Corral (ACo) y Cueva del Caballo (CdC). Valores expresados en porcentaje sobre el total de la muestra. Entre paréntesis se indica el tamaño de muestra.

		Clases de digestión <i>sensu</i> Andrews (1990)			
		Ligera	Moderada	Fuerte	Extrema
Arroyo Corral		% (n)	% (n)	% (n)	
V-VII	Fémur	78,5 (44)	16 (9)	5,5 (3)	-
	Húmero	84,3 (43)	15,7 (8)	-	-
III-IV	Fémur	77,8 (63)	8,6 (7)	13,6 (11)	-
	Húmero	75,4 (49)	12,3 (8)	12,3 (8)	-
I-II	Fémur	66,4 (75)	24,8 (28)	8,8 (10)	-
	Húmero	83,3 (75)	7,8 (7)	8,9 (8)	-
Cueva del Caballo					
VI-VII	Fémur	58,3 (88)	30,5 (46)	11,2 (17)	-
	Húmero	58,7 (78)	31,5 (42)	9,8 (13)	-
IV-V	Fémur	63,9 (110)	33,7 (58)	2,4 (4)	-
	Húmero	73,3 (96)	22,9 (30)	3,8 (5)	-
I-II	Fémur	77,1 (108)	15,1 (21)	7,8 (11)	-
	Húmero	90,4 (28)	6,4 (2)	3,2 (1)	-

Cronología

Un prerrequisito esencial para cualquier estudio paleoecológico es contar con un marco cronológico robusto de las secuencias estratigráficas incluidos en el análisis (Blaauw 2010; Parnell et al. 2011). Esto permite relacionar temporalmente los estratos de los diferentes depósitos, comparar espacialmente el curso temporal de eventos y evaluar la respuesta de poblaciones naturales a estos eventos prehistóricos en un contexto temporal preciso. Para depósitos Cuaternarios, la cronología se construye a partir de dataciones o fechados por radiocarbono de elementos esqueléticos, carbón vegetal o material orgánico. En el contexto estratigráfico se asume que los materiales de cada estrato sedimentario tienen la misma antigüedad, lo que permite inferir la edad de un material a partir del fechado de otro material. A su vez, el principio de superposición de estratos -que establece que los estratos sedimentarios se depositan en una secuencia temporal- proporciona una herramienta para determinar el grado de perturbación del depósito. La asociación de las fechas radiocarbónicas con la abundancia relativa y las secuencias de ADN permite la calibración de tasas evolutivas poblacionales (Lambert et al. 2002).

Dataciones radiocarbónicas

La datación radiocarbónica es el método más utilizado en la actualidad para estimar la fecha en la cual ocurrió la muerte de un organismo (el momento en el cual el objeto quedo sepultado). Este método se basa en la tasa de decaimiento de la concentración del isótopo inestable Carbono 14 (^{14}C).

En la naturaleza existen 3 isótopos de carbono, dos son estables el Carbono 12 (^{12}C) y el Carbono 13 (^{13}C), mientras que el ^{14}C es inestable (radioactivo) y con el paso del tiempo se desintegra en un producto estable. El ^{14}C es generado en la atmósfera mediante la reacción entre neutrones generados por la incidencia de rayos cósmicos y átomos de Nitrógeno 14 (^{14}N) dando como resultado dióxido de carbono $^{14}\text{CO}_2$ (Currier 2004). El átomo radioactivo ^{14}C es incorporado por las plantas durante el proceso de fotosíntesis y a través de las plantas pasa a los animales por vía alimenticia. Cuando los organismos mueren dejan de incorporar el isótopo radioactivo ^{14}C y a partir de ese momento la concentración del isótopo comienza a disminuir a medida que se transforma en el producto estable ^{14}N por decaimiento radioactivo.

La tasa de decaimiento radioactivo del ^{14}C , medida por primera vez por Libby et al. (1949), permite estimar la fecha en la cual el organismo murió calculando la cantidad de ^{14}C que contiene la muestra y sabiendo que la "vida media" del ^{14}C (el tiempo en el cual la mitad del ^{14}C que contiene una muestra se transforma) es de 5568 años \pm 30 años (Libby et al. 1949). La fecha estimada es la edad absoluta en años radiocarbónicos que equivale a los años transcurridos desde la muerte del organismo hasta el año 1950 de nuestro calendario, establecido por convención en honor a la fecha de descubrimiento del método. La fecha se expresa en "años antes del presente (de ahora en más, años ^{14}C AP)". Así, por ejemplo una fecha radiocarbónica de 2000 años ^{14}C AP equivale a 50 años antes de Cristo. Sin embargo y dado a que la concentración de ^{14}C en la atmósfera no fue constante en el tiempo es necesario hacer lo que se conoce como "calibración" de la fecha radiocarbónica (Reimer et al. 2009).

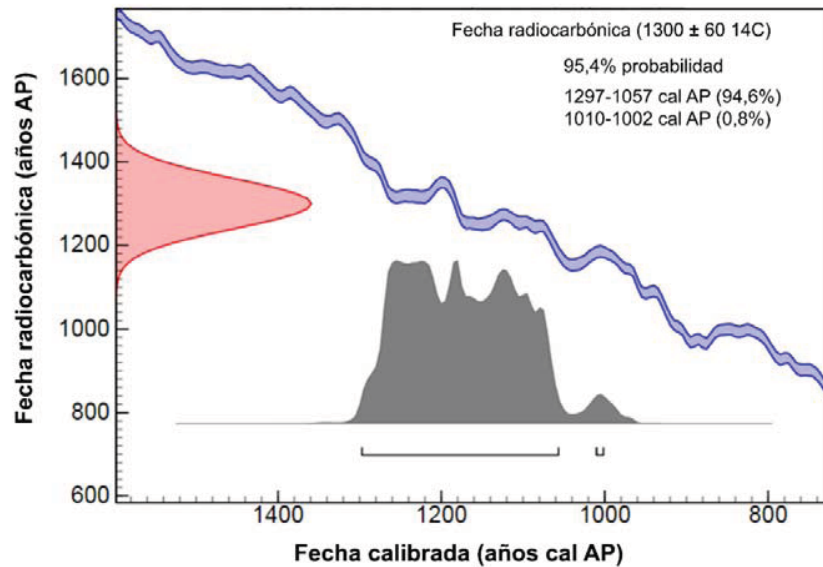


Figura 1.13. Calibración de una fecha radiocarbónica. El eje Y muestra en rojo la distribución normal de la fecha radiocarbónica de la muestra (1300 ± 60 años ^{14}C AP.), el eje X muestra en gris la fecha expresada en años calibrados AP. En azul se grafica la curva de calibración para el hemisferio sur (SHCal13). El valor calibrado se expresa en rango de 2σ . En este ejemplo, 1297-1002 años cal AP.

Calibración de fechas radiocarbónicas

El método de estimación de la fecha radiocarbónica de una muestra asume que la concentración de ^{14}C en la atmósfera es constante. Sin embargo, luego del descubrimiento del método se conoció que la concentración del ^{14}C no es estable en el tiempo (de Vries 1958) incluso el mismo Libby había mencionado la supuesta constancia del ^{14}C atmosférico era probablemente incorrecta. Este problema se resuelve utilizando curvas de calibración construidas principalmente a partir del análisis dendrocronológico de los anillos de crecimiento de árboles y también de valvas de moluscos. La calibración se realiza interceptando la curva de distribución normal de la fecha radiocarbónica de la muestra con la curva de calibración dendrocronológica (Figura 1.13), para obtener así una fecha expresada en "años calibrados antes del presente (de ahora en más, años cal AP)".

Debido a que las condiciones atmosféricas en el Hemisferio Norte y Sur son diferentes existen curvas de calibración específica para cada hemisferio y por lo tanto la

calibración es más precisa si se utiliza una curva de calibración derivada del hemisferio del cual provienen las muestras (McCormac et al. 2004; Hogg et al. 2013).

En la Tabla 1.2 se muestran los valores calibrados (años cal AP) y no-calibrados (años ^{14}C AP) de las muestras datadas usadas en esta tesis. Para la calibración se utilizó la curva del Hemisferio Sur, SHCal13 (Hogg et al. 2013) con un intervalo de calibración del 95,4% (2σ). Las calibraciones se realizaron con el programa de calibración OxCal 4.2 (Bronk Ramsey 2009). Las dataciones fueron realizadas utilizando dos métodos, espectrometría de centelleo líquido (LSC²) en el Laboratorio de Tritio y Radiocarbono (LATYR) de La Plata y espectrometría de masa (AMS³) en el Laboratorio de AMS de Arizona y en la Unidad de AMS de Oxford.

² Del inglés, Liquid Scintillation Counting.

³ Del inglés, Accelerator Mass Spectrometry.

Tabla 1.2. Fechas radiocarbónicas de las muestras datadas para los depósitos fosilíferos estudiados en esta tesis.

Depósito	Estrato	Material	Método	Fecha no-calibrada (años ¹⁴ C AP)	Fecha calibrada (años cal AP) intervalo del 95,4%	Identificación
CdC	I	Carbón vegetal	LSC	510 ± 40	552 - 469	LP-2553
CdC	III	Carbón vegetal	LSC	1300 ± 60	1297 - 1002	LP-2658
CdC	III	Carbón vegetal	LSC	2740 ± 50	2925 - 2741	LP-2539
CdC	IV	Postcráneo Roedores	LSC	3920 ± 60	4508 - 4095	LP-2832
CdC	V	Postcráneo Roedores	LSC	5510 ± 100	6453 - 5994	LP-2669
CdC	VI	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	9720 ± 100	11247 - 10725	AA 103026
CdC	VI	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	10620 ± 100	12713 - 12105	AA-100205
ACo I	I	Hueso <i>Lama</i>	AMS	2524 ± 48	2728-2365	AA-75676*
ACo I	II	Hueso <i>Lama</i>	AMS	4384 ± 64	5279-4729	AA-75671*
ACo I	III	Hueso <i>Lama</i>	AMS	4905 ± 59	5740-5339	AA-75672*
ACo I	III	Hueso <i>Lama</i>	AMS	6257 ± 34	7248-7005	OxA-24590*
ACo I	IV	Hueso <i>Lama</i>	AMS	6100 ± 65	7156-6746	AA-75673*
ACo I	V	Hueso <i>Mylodon</i>	AMS	18700 ± 260	23149-21902	AA-75674**
ACo I	VII	Hueso <i>Mylodon</i>	AMS	19410 ± 280	24006-22650	AA-75675**
ACo I	VII	Hueso <i>Lama</i>	AMS	19520 ± 100	23770-23094	OxA-19478**
ACo II	I	Carbón vegetal	LSC	1620 ± 90	1700-1305	LP-2939
ACo II	II	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	1712 ± 47	1704-1433	AA-103030
ACo II	II	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	1725 ± 49	1713-1433	AA-100201
ACo II	II	Carbón vegetal	LSC	2100 ± 80	2305-1836	LP-2815
ACo II	IV	Carbón vegetal	LSC	4320 ± 50	5033-4628	LP-2797
ACo II	IV	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	5253 ± 62	6185-5760	AA-103029
ACo II	IV	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	5056 ± 62	5905-5613	AA-100204
ACo II	IV	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	7117 ± 72	8025-7709	AA-100203
ACo II	IV	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	7179 ± 75	8160-7796	AA-100202
ACo II	IV	Hueso <i>Lama</i>	AMS	10020 ± 96	10007-9294	AA-75677**
ACo II	V	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	9890 ± 97	9802-9216	AA-100200**
ACo II	V	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	10720 ± 110	12796-12176	AA-103027
ACo II	V	Maxilar <i>Ctenomys</i>	AMS	10780 ± 110	12844-12425	AA-103028

* Arias y Hajduk datos no publicados, ** Tammone et al. 2014

Modelado de edad basado en profundidad

Idealmente, para estudiar una secuencia estratigráfica, se busca datar todos los niveles de la excavación, pero esto rara vez se logra debido a los elevados costos del servicio de datación radiocarbónica o a la potencial carencia de material datable. Alternativamente, se pueden aplicar modelos de edad en función de la profundidad del sedimento, utilizando una serie de dataciones radiocarbónicas (Bennett 1994; Blaauw 2010). Estos modelos se construyen para estimar la edad de los estratos sedimentarios de un depósito de fecha desconocida (no datados) a partir de una serie de estratos que fueron datados, siguiendo el supuesto de superposición de estratos sedimentarios, el cual establece que los estratos más antiguos están por debajo de los estratos más modernos (Harris 1989). En esta situación, por lo general se selecciona una serie de muestras de diferentes niveles estratigráficos y se datan por radiocarbono; preferentemente en la serie se incluye el estrato de base, uno de la parte media y otro superficial. Luego se relaciona la profundidad de las fechas radiocarbónicas obtenidas con el perfil estratigráfico completo para estimar la edad de cada uno de los niveles de la secuencia estratigráfica según su profundidad, mediante el modelado de la acumulación del sedimento a través del tiempo.

Para generar los modelos, en esta tesis se utilizó el programa CLAM⁴ (Blaauw 2010) en el entorno de programación para análisis estadísticos y gráficos R versión 3.0.3 (R Core Team 2014). A diferencia de otros programas, CLAM, en su proceso de modelado utiliza las edades calibradas y considera su error asociado, además, proporciona un gráfico de las edades y el intervalo de confianza estimadas por el modelo en función de las profundidades estratigráficas. Dado que las fechas calibradas en general resultan en curvas de probabilidad bastante amplias, asimétricas y con múltiples cimas (Figura 1.13), reducir la curva de probabilidad a un único valor pueden resultar en fechas poco probables (Telford et al. 2004). Para evitar esto, CLAM utiliza todos los valores de la curva de probabilidad de las fechas calibradas mediante un muestreo iterativo en el cual, la probabilidad de muestreo de un valor es proporcional a su altura en la distribución de densidad, en cada repetición selecciona un valor de cada curva y construye un modelo (Blaauw 2010). En esta tesis, los modelos se realizaron con gráficos de líneas suavizadas⁵ mediante un muestreo Monte Carlo de 10000 repeticiones. El mejor modelo, que representa la cronología final utilizada en cada depósito, se determinó calculando para cada profundidad la media ponderada de todas las fechas muestreadas. Las cronologías resultantes se muestran en la Figura 1.14.

⁴ Del inglés, Classic Age-depth Modelling.

⁵ En inglés, smoothing splines.

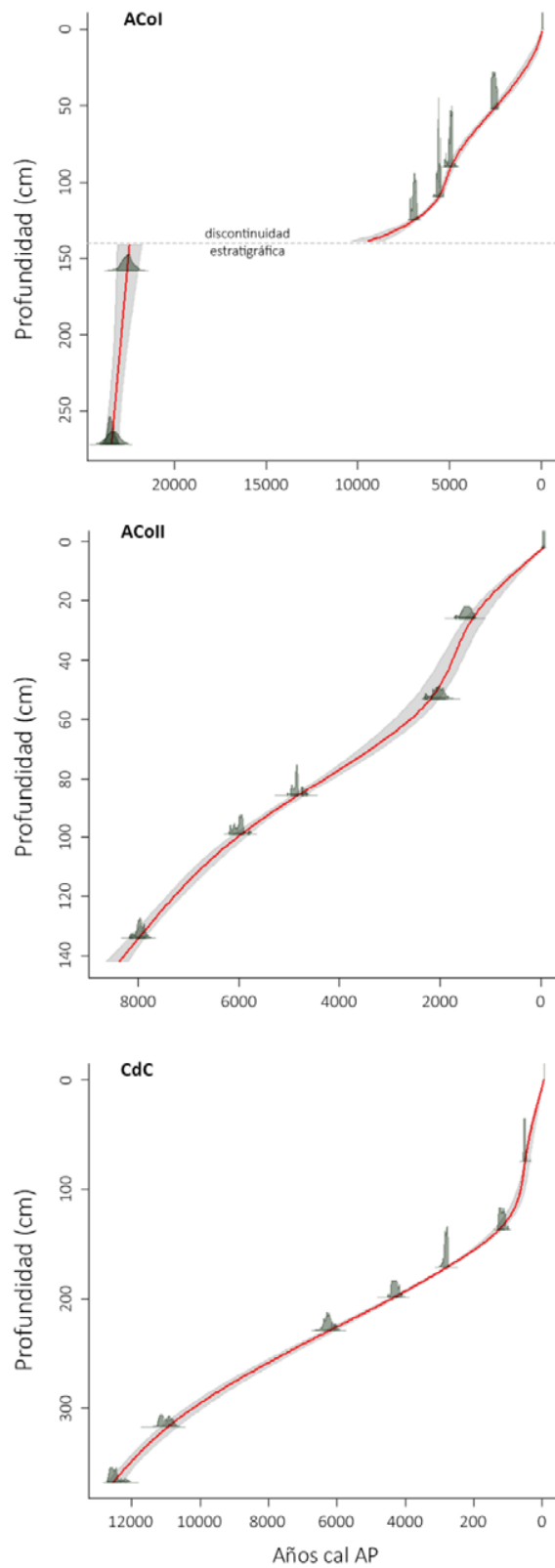


Figura 1.14. Modelos de edad/profundidad generados con CLAM para los depósitos Arroyo Corral I (ACoI), Arroyo Corral II (ACoII) y Cueva del Caballo (CdC).

Análisis genéticos

Para estudiar los cambios en la variación genética poblacional de *Ctenomys sociabilis* y *C. haigi* a través del tiempo, se realizaron extracciones de ADN mitocondrial de individuos actuales y fósiles que en combinación abarcan aproximadamente los últimos 10 mil años. En la Tabla 1.3 se resumen las muestras analizadas en esta tesis. Los análisis de ADN actual se realizaron en el Laboratorio de Genética Evolutiva del Museo de Zoología de Vertebrados, Universidad de California, Berkeley, Estado Unidos. Los análisis de ADN antiguo se realizaron en el Laboratorio de ADN antiguo de Elizabeth Hadly, Departamento de Biología, Universidad de Stanford, Stanford.

Muestras actuales

Las muestras actuales fueron obtenidas de individuos capturados vivos en el campo durante 2008 y 2014. Debido a la diferencia en el comportamiento exhibido entre las dos especies de *Ctenomys*, fue necesario utilizar dos métodos de captura (Figuras 1.15 A y B). Para *C. sociabilis*, se utilizaron lazos fabricados con cordones de algodón, armados sobre el perímetro de la entradas de madrigueras para enlazar a los animales al momento que emergen de estas para alimentarse (Lacey et al. 1997). En el caso de *C. haigi* se utilizaron trampas de tubo, colocadas en las entradas de madrigueras activas mediante la remoción del tapón de tierra fresca que estos animales utilizan en las entradas de forrajeo de uso diario (Lacey et al. 1998). El tubo se ubicó de manera horizontal sobre el suelo del túnel y se cubrió con tierra para simular una entrada tapada. Las trampas fueron revisadas cada 1-2 horas. Para ambas especies, se registró el peso, la edad (juvenil o adulto), el sexo y el estado reproductivo de las hembras adultas (lactante o no lactante) de todos los animales capturados. Utilizando un alicate esterilizado se removió 1-2 mm distales del dedo posterior externo de la pata derecha de cada individuo (Cutrera et al. 2005). Las muestras de tejido se conservaron en DMSO+EDTA (Seutin et al. 1991) para análisis genéticos subsecuentes. Los métodos de captura y remoción de tejido ha sido utilizado en varios estudios de *Ctenomys* sin resultados negativos para los animales (Lacey et al. 1997, 1998; Zenuto et al. 2002; Cutrera et al. 2005; Fasanella et al. 2013). Luego de la remoción del dígito se aplicó antiséptico de uso tópico sobre la herida y el animal fue liberado en la misma entrada de madriguera donde había sido capturado. Todos los procedimientos utilizados durante la captura y manipulación de los

animales fueron basados en las recomendaciones de la Sociedad Americana de Mastozoología para el uso de mamíferos salvajes en la investigación (Sikes et al. 2011).

La variabilidad genética actual se evaluó a partir de un total 27 *Ctenomys* capturados en la vecindad de los sitios ACo (n = 9, todos *C. sociabilis*), CdC (n = 8, todos *C. haigi*) y 5 km noroeste de CTI (n = 10, todos *C. haigi*) (Tabla 1.3).



Figura 1.15. Lazos utilizados para capturar *C. sociabilis* (izquierda). Trampas de tubo utilizadas para capturar *C. haigi* (derecha).

Muestras fósiles

Las muestras fósiles de *Ctenomys* spp fueron obtenidas de materiales recuperados en los sitios arqueológicos ACo y CdC. La extracción de ADN se realizó a partir de elementos craneales y mandibulares. Dada la fragmentación de los especímenes, para asegurar que los individuos muestreados fueran diferentes dentro de cada nivel estratigráfico, se utilizó un procedimiento de selección de muestras basado tanto en la disponibilidad de hemimandíbulas completas (provistas de sus dientes incisivos y molares) y la selección de

hemimandíbulas de la misma lateralidad. De acuerdo con esto, se seleccionaron hemimandíbulas izquierdas, aunque en algunos niveles estratigráficos, debido a la fragmentación y la presencia de materiales edéntulos, se utilizaron hemimandíbulas derechas o fragmentos de cráneos. En los casos en los que se incluyeron tanto hemimandíbulas de ambos laterales como cráneos en un mismo nivel estratigráfico, se examinó la coincidencia morfológica de los materiales óseo: sínfisis mentoniana, tamaño de los especímenes y de los incisivos, desgaste molar y coloración del hueso. Este examen permitió descartar elementos asignables a un mismo individuo. Para la extracción de ADN se utilizaron los dientes incisivos y/o molares de dichos elementos. El peso promedio de cada muestra fue de $0,139 \pm 0,067$ g (rango: 0,407-0,044 g, n = 49).

Se seleccionaron 89 especímenes de ambos depósitos (ACo y CdC) para la extracción de ADN, de los cuales sólo 49 amplificaron producto ADN (55% de extracciones positivas), 26 *C. sociabilis* y 23 *C. haigi* (Tabla 1.3). Los restantes 40 especímenes no mostraron producto de ADN, a pesar de que se probaron diferentes condiciones de extracción y de amplificación.

Tabla 1.3. Muestras fósiles y actuales de *Ctenomys* utilizadas para los análisis genéticos.

Espécimen	Sitio	Elemento / muestra	Fecha radiocarbónica / estimada (95% IC)	Especie
ACo II-105	Arroyo Corral	HM* Derecha	824 (CI 621-954)	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-051	Arroyo Corral	HM Izquierda	1198 (CI 1100-1273)	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-046	Arroyo Corral	HM Izquierda	1367 (CI 1256-1452)	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-040	Arroyo Corral	Cráneo	1725 ± 49	<i>C. sociabilis</i>
ACo I-169	Arroyo Corral	Cráneo	2524 ± 48	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-038	Arroyo Corral	Cráneo	4167 (CI 4037-4293)	<i>C. sociabilis</i>
ACo I-159	Arroyo Corral	HM Izquierda	4905 ± 59	<i>C. sociabilis</i>
ACo I-160	Arroyo Corral	HM Izquierda	4905 ± 59	<i>C. sociabilis</i>
ACo I-161	Arroyo Corral	HM Izquierda	4905 ± 59	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-146	Arroyo Corral	Cráneo	5056 ± 67	<i>C. sociabilis</i>
ACo I-157	Arroyo Corral	HM Izquierda	6100 ± 65	<i>C. sociabilis</i>
ACo II-119	Arroyo Corral	Cráneo	7117 ± 76	<i>C. sociabilis</i>
CdC-001	Cueva del Caballo	HM Izquierda	10620 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-002	Cueva del Caballo	HM Derecha	10621 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-003	Cueva del Caballo	HM Derecha	10622 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-005	Cueva del Caballo	HM Izquierda	9720 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-007	Cueva del Caballo	HM Izquierda	9720 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-008	Cueva del Caballo	HM Izquierda	9720 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-010	Cueva del Caballo	HM Izquierda	9720 ± 100	<i>C. haigi</i>
CdC-013	Cueva del Caballo	HM Derecha	5510 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-014	Cueva del Caballo	HM Derecha	5510 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-020	Cueva del Caballo	HM Izquierda	5510 ± 100	<i>C. haigi</i>
CdC-047	Cueva del Caballo	HM Derecha	5510 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-066	Cueva del Caballo	HM Izquierda	5510 ± 100	<i>C. haigi</i>
CdC-081	Cueva del Caballo	HM Derecha	5510 ± 100	<i>C. sociabilis</i>
CdC-093	Cueva del Caballo	HM Izquierda	4976 (CI 4844-5073)	<i>C. haigi</i>
CdC-104	Cueva del Caballo	HM Izquierda	4976 (CI 4844-5073)	<i>C. haigi</i>
CdC-137	Cueva del Caballo	HM Izquierda	3920 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-153	Cueva del Caballo	HM Izquierda	3920 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-160	Cueva del Caballo	HM Izquierda	3920 ± 60	<i>C. sociabilis</i>
CdC-184	Cueva del Caballo	HM Derecha	3920 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-204	Cueva del Caballo	HM Izquierda	3920 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-288	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. haigi</i>
CdC-303	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. haigi</i>
CdC-304	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. haigi</i>
CdC-310	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. haigi</i>
CdC-378	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. sociabilis</i>
CdC-429	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. sociabilis</i>
CdC-443	Cueva del Caballo	HM Izquierda	2740 ± 50	<i>C. sociabilis</i>
CdC-528	Cueva del Caballo	Cráneo	1976 (CI 1893-2105)	<i>C. haigi</i>

* HM = hemimandíbula.

Tabla 1.3. Continuación.

Espécimen	Sitio	Elemento / muestra	Fecha radiocarbónica / estimada (95% IC)	Especie
CdC-621	Cueva del Caballo	HM* Izquierda	1300 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-685	Cueva del Caballo	HM Derecha	1300 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-712	Cueva del Caballo	HM Izquierda	1300 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-735	Cueva del Caballo	HM Izquierda	1300 ± 60	<i>C. haigi</i>
CdC-765	Cueva del Caballo	HM Izquierda	510 ± 40	<i>C. haigi</i>
CdC-766	Cueva del Caballo	HM Izquierda	510 ± 40	<i>C. haigi</i>
CdC-767	Cueva del Caballo	HM Izquierda	510 ± 40	<i>C. haigi</i>
CdC-769	Cueva del Caballo	HM Izquierda	510 ± 40	<i>C. haigi</i>
CdC-776	Cueva del Caballo	HM Izquierda	510 ± 40	<i>C. haigi</i>
LL-1	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-2	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-3	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-4	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-5	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-6	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-7	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-8	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
LL-9	Arroyo Corral	Dígito 5to	actual	<i>C. sociabilis</i>
VE-1	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-2	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-3	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-4	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-5	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-6	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-7	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
VE-8	Cueva del Caballo	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-1	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-2	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-3	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-4	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-5	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-6	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-7	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-8	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-9	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>
RT-10	5 km N río Traful	Dígito 5to	actual	<i>C. haigi</i>

* HM = hemimandíbula.

Elección del marcador molecular

Para los análisis moleculares se utilizó el gen mitocondrial que codifica para el citocromo b, una proteína de membrana que desempeña una función vital en la generación de energía celular. Esta proteína es un componente del complejo citocromo bc₁ involucrado en el transporte de electrones durante el proceso de respiración celular, en la membrana interna mitocondrial. A pesar de su importancia funcional que supone una alta estabilidad de su secuencia de aminoácidos, esta molécula es uno de los marcadores más empleados en filogenia y filogeografía de mamíferos (Irwin et al. 1991), y particularmente es muy útil dentro del género *Ctenomys* para resolver relaciones filogenéticas (e.g. Lessa y Cook 1998; D'Elía et al. 1999; Mascheretti et al. 2000; Parada et al. 2011), y en conjunto con otros marcadores moleculares para estudios de variación intraespecífica y estructura poblacional (Wlasiuk et al. 2003; Gonçalves y de Freitas 2009; Fasanella et al. 2013). Debido a que en las células el material genético mitocondrial, incluido el del citocromo b, es miles de veces más abundante que el material genético nuclear; cuando se extrae ADN de una muestra la cantidad de ADN mitocondrial (ADNmt) es mucho mayor que el ADN nuclear. Considerando este factor y dado que el ADN de las muestras fósiles está altamente fragmentado y, dependiendo de las condiciones de conservación de las muestra, muy degradado, las secuencias de ADNmt son más probables de sobrevivir en muestras de ADN antiguo, material genético extraído de muestras fósiles o subfósiles (Hofreiter et al. 2001; Rizzi et al. 2012). Debido a estas características, el ADNmt ha sido utilizado con éxito en una gran variedad de estudios de reconstrucción filogenética basado en ADN antiguo y para investigar la historia genética poblacional (Rizzi et al. 2012 y las referencias allí citadas; Ramakrishnan y Hadly 2009). Por otro lado, los datos genéticos existentes de ADN antiguo de muestras fósiles de *C. sociabilis* y *C. haigi* de CTI están basados en el mismo gen mitocondrial (Chan y Hadly 2011) y, por lo tanto, utilizar este mismo marcador permite establecer las comparaciones requeridas en este proyecto de investigación.

Extracción de ADN de tejido actual

La extracción de ADN de tejido actual se realizó usando el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue de QIAGEN (Qiagen Inc., Valencia, California). El protocolo se describe a continuación. En un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL se colocaron entre 20 mg y 25 mg de tejido (dígito 5^{to}) cortado en pequeños trozos con bisturí junto con 180 µL de buffer ATL.

Luego de agitar 10 s se agregaron 20 μ L de Proteinasa K para la digestión de las proteínas. La mezcla se dejó en incubadora a 56°C sobre una plataforma rotadora durante toda la noche. Luego de la incubación, los tubos se agitaron durante 15 s, se agregaron 200 μ L de buffer AL a cada tubo, se mezcló y se agregaron 200 μ L de etanol (96-100%). La mezcla se agitó durante 10 s. Utilizando una pipeta se pasó la mezcla de cada tubo a una columna DNeasy colocada en un tubo de recolección 2 mL. La columna se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. El tubo de colecta con el sobrenadante fue descartado. La columna DNeasy se ubicó en un nuevo tubo de recolección de 2 mL. A continuación se agregaron 500 μ L de buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; el tubo de recolección con el sobrenadante fue descartado. Este paso se repitió pero utilizando 500 μ L de buffer AW2 y un centrifugado de 14000 rpm durante 3 min para secar la membrana de la columna DNAeasy. Luego del centrifugado, la columna DNeasy se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL agregando 200 μ L de buffer AE directamente sobre la membrana para liberar el ADN. Luego de 1 min, la columna con el tubo de microcentrífuga se centrifugó a 8000 rpm por 1 min para extraer el ADN de la membrana. Este paso se repitió con un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Los tubos con el stock de ADN se guardaron a -20 °C.

Extracción de ADN de tejido fósil

Los estudios basados en ADN antiguo son técnicamente muy difíciles de realizar debido principalmente a dos factores: (1) la baja concentración y degradación del ADN endógeno y (2) la presencia de contaminantes exógenos (Cooper y Poinar 2000; Willerslev y Cooper 2005). Específicamente, durante los pasos sucesivos del procedimiento de extracción de ADN, se siguieron protocolos específicos para asegurar la obtención de secuencias nucleotídicas auténticas (Figura 1.16). Los principales criterios aplicados fueron los siguientes (Cooper y Poinar 2000; Hadly et al. 2003; Gilbert et al. 2005):

- El procedimiento de extracción de ADN se realizó en una sala aislada de la sala de amplificación de ADN y dedicada exclusivamente para el estudio de ADN de baja preservación.
- No se permitió el ingreso a la sala de extracción de ADN antiguo a ninguna persona que hubiera estado en la sala de amplificación en las últimas 24 horas.
- La contaminación se monitoreó mediante controles negativos, en la extracción y amplificación, para detectar contaminantes en cualquier etapa del proceso.

- Antes de cada extracción de ADN antiguo, todas las superficies de la sala se limpiaron con lavandina al 10%, incluidas las pipetas y las superficies de instrumentales.
- La sala de extracción, todos los instrumentales y los reactivos se irradiaron con Luz-Ultravioleta (UV) durante un tiempo mínimo de 12 horas (Figura 1.16).
- La extracción y preparación de las mezclas para amplificación se realizaron en una campana de flujo laminar Clase II provista de luz-UV.
- En el laboratorio no se extrajo ni se amplificó previamente ADN actual de *Ctenomys*.
- Se utilizaron primers diseñados exclusivamente para *Ctenomys*.
- Durante todo el proceso de extracción, el operador utilizó indumentaria descartable (cofia, barbijo, guantes, protector de calzados y guardapolvo).
- Las extracciones que amplificaron producto de ADN (i.e. mostraron bandas en el gel de agarosa) fueron secuenciadas dos veces.

Para la extracción de ADN de material fósil se utilizó el kit de purificación QIAquick PCR purification kit con columnas de sílica de QIAGEN (Qiagen Inc., Valencia, California) siguiendo los protocolos de Yang et al. (1998) y Hadly et al. (2003) como se describe a continuación. La extracción se realizó en lotes de 5 muestras por vez, más 2 controles negativos. Antes de la extracción, los especímenes (cráneo y mandíbulas) seleccionados para la extracción se fotografiaron. A cada espécimen se le retiró un incisivo o 2 molares, se registró el peso de la muestra y se la colocó en un tubo de microcentrífuga rotulado. En este paso se agregó un control negativo (tubo de microcentrífuga sin muestra) para detectar posibles contaminantes durante el proceso de extracción. Los guantes, los materiales y las superficies de trabajo se limpiaron con lavandina al 10% entre el procesamiento de cada muestra.

Cada muestra se envolvió en papel aluminio, se ubicó en un mortero de porcelana (uno por muestra) (Figura 1.16), donde se vertió nitrógeno líquido hasta que la muestra quedo sumergida. Una vez que el nitrógeno líquido se evaporó, utilizando un pilón de porcelana (uno por muestra), la muestra se pulverizó presionando el papel aluminio con el pilón. El papel aluminio se abrió cuidadosamente dentro de un embudo y la muestra pulverizada se depositó dentro de un tubo de microcentrífuga SAFELOCK utilizando 300

μL de buffer de digestión proteica Proteinasa K⁶. Este procedimiento se repitió para las 5 muestras y para la muestra control negativo. Los tubos se agitaron y se incubaron a 55°C sobre una plataforma rotadora durante toda la noche. Los morteros y pilones se dejaron sumergidos en lavandina al 10% durante la noche para su limpieza. Luego se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar para utilizar en extracciones ulteriores.

Luego de la incubación, los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min. Utilizando una pipeta, el sobrenadante se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Para cada muestra, una columna de sílica QIAquick se ubicó dentro de un tubo de recolección. Se agregaron 625 μL de buffer PB dentro de la columna seguido de 125 μL de sobrenadante, mezclando con la pipeta cuidadosamente sin tocar la membrana de la columna. Luego de 1 min, la columna y el tubo de recolección se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min. El sobrenadante se descartó. La columna de sílica se colocó nuevamente en el tubo de recolección, se agregaron 750 μL de buffer PE dentro de la columna. Luego de 1 min, la columna y el tubo de recolección se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min. El sobrenadante se descartó. La columna de sílica se colocó nuevamente en el tubo de recolección y se centrifugó a 11000 rpm por 1 min. El sobrenadante y el tubo de recolección se descartaron. La columna de sílica se colocó en un tubo de microcentrífuga recubierto de silicona de 1,5 mL. La silicona previene que el ADN se adhiera a la pared del tubo. Cuidadosamente, se agregaron 38 μL de buffer TE a 55°C en el centro de la membrana de la columna para extraer el ADN atrapado en la membrana de sílica. Luego de 5 min, la columna y el tubo se centrifugaron a 12000 rpm por 1 min. El fluido contenido en el tubo de microcentrífuga contiene el stock de ADN. Esto se repitió con otros 38 μL de buffer TE utilizando otro tubo de microcentrífuga para extraer un segundo stock de ADN. Las extracciones de ADN se guardaron a -20°C.

Durante el procedimiento de extracción, los guantes y las superficies de trabajo se limpiaron repetidamente utilizando lavandina al 10%. Luego de cada extracción, la indumentaria del operario se descartó y reemplazó por otra nueva.

⁶ El buffer de digestión proteica Proteinasa K se preparó mezclando 30 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, 24 μL de Proteinasa K y 2346 μL de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M. Se preparó un buffer nuevo para cada lote de extracción de 5 muestras más la muestra control negativo.



Figura 1.16. Sala de extracción de ADN antiguo del laboratorio de Elizabeth Hadly (Universidad de Stanford): se muestra la luz UV (izquierda). Instrumental y materiales usados para la extracción de ADN luego de la exposición a luz UV dentro de la campana (derecha); se muestra el papel aluminio y los morteros utilizados para moler las muestras y otros materiales.

Amplificación de ADN

Se amplificó un fragmento de 136 pares de bases (de ahora en más, pb; excluyendo los primers) del gen mitocondrial citocromo b utilizando los primers, *Ctenomys1* 5'_CTT TGG CTC TTT ATT AGG AGT ATG_3' y *Ctenomys2* 5'_GGA GCA TCA ATA TTC TTC ATT TTC_3' (Hadly et al. 2003). Los primers fueron diseñados por Hadly et al. (2003) mediante el análisis de secuencias nucleotídicas de citocromo b de *Ctenomys* y *Octodon* depositadas en GenBank, seleccionando el fragmento más informativo para separar *C. sociabilis* y *C. haigi*. La posición del fragmento dentro del gen es entre las bases 96 y 279 (incluidos los primers). La amplificación se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR⁷) en un volumen total de 25 μ L y 10 μ L para las muestras actuales y fósiles, respectivamente. Los volúmenes se preparan bajo campana de flujo laminar y se trasladaron a la sala de PCR. En cada reacción de PCR se incluyó un segundo control negativo (sin ADN) para detectar posibles contaminantes en los componentes de la reacción, por lo que cada reacción de PCR consistió en 7 reacciones individuales (5 muestras y 2 controles negativos, extracción y PCR). La reacción de PCR se realizó usando termocicladoras BioRad iCycler para las muestras actuales y Eppendorf Mastercycler[®] pro para las muestras fósiles.

⁷ Del inglés, Polymerase Chain Reaction.

Los componentes para la reacción y las condiciones de PCR se detallan en las Tablas 1.4 y 1.5 para las muestras actuales y fósiles, respectivamente.

Luego de la reacción de PCR, 3,6 μ L del producto de cada reacción fue sembrado en gel de agarosa 2%, en buffer TBE 1X, junto con un marcador de 100 pb y un control positivo (muestra que amplificó previamente). El gel se corrió a 170 volts, se tiñó con bromuro de etidio y se documentó con cámara digital (Figura 1.17). Las reacciones que arrojaron bandas del tamaño adecuado se conservaron a -20°C hasta el proceso de secuenciación. Ninguno de los controles negativos produjo bandas visibles en el gel de agarosa. En una oportunidad se observaron bandas múltiples.

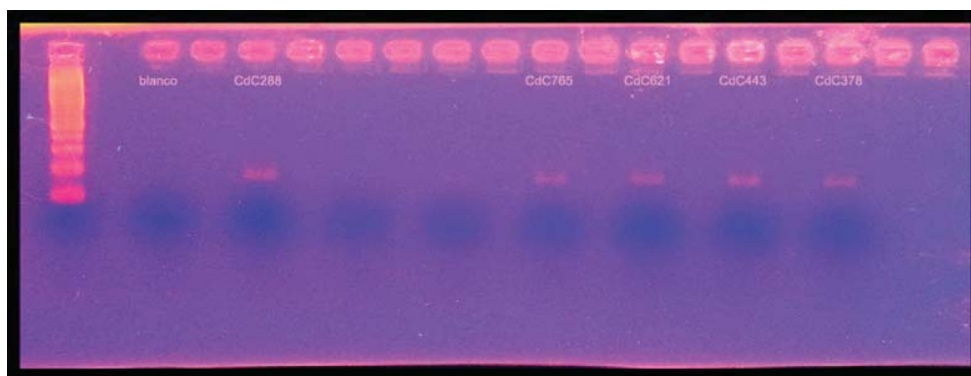


Figura 1.17. Gel de agarosa 2% en buffer TBE 1X corriendo ADN antiguo, se observan 5 bandas de ~ 200 pb. La primera calle corresponde al marcador de 100 pb, la segunda al control negativo -sin banda- (blanco). Con rotulo los especímenes que rindieron producto de ADN fechados entre 2749-1300 años ^{14}C AP.

Tabla 1.4. Componentes para la reacción y condiciones de PCR utilizadas para las muestras actuales.

Reacción de PCR (x muestra)			
	Componente	Volumen (µL)	Concentración final
	H ₂ O	14,3	
	dNTP's (10mM c/u)	2,5	1mM c/u
	Platinum Buffer 10x	3,5	1,4x
	MgCl ₂ (25mM)	0,6	0,6mM
	Primer1 (10uM)	0,55	0,22uM
	Primer2 (10uM)	0,55	0,22uM
	Platinum® Taq (5U)	0,30	1,5U
	ADN molde	3	
	Volumen total x reacción	25	
Condiciones de PCR			
	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
35 ciclos	Desnaturalización inicial	94	2 min
	Desnaturalización	94	30 s
	Annealing	48	30 s
	Extensión	72	1 min
	Extensión final	72	5 min
	Final	4	∞

Tabla 1.5. Componentes para la reacción y condiciones de PCR utilizadas para las muestras fósiles.

Reacción de PCR (x muestra)			
	Componente	Volumen (µL)	Concentración final
	H ₂ O	5	
	BSA (13mg/mL)	1,2	1,56mg/mL
	dNTP's (10mM c/u)	0,38	0,38mM c/u
	Gold Buffer 10x	1,15	1,15x
	MgCl ₂ (25mM)	1,15	2,8mM
	Primer1 (10uM)	0,21	0,21uM
	Primer2 (10uM)	0,21	0,21uM
	AmpliTaq Gold® 360 (5U)	0,50	0,25U
	ADN molde	0,7	
	Volumen total x reacción	10	
Condiciones de PCR			
	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
45 ciclos	Desnaturalización inicial	95	10 min
	Desnaturalización	95	30 s
	Annealing	48	30 s
	Extensión	72	1 min
	Extensión final	72	5 min
	Final	4	∞

Secuenciación

Los fragmentos de ADN actuales se purificaron utilizando el tratamiento enzimático con Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina ExoSap-IT[®] (USB Corporation, Cleveland, Ohio). Luego se realizó el ciclo de secuenciación estándar del kit BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California). El producto se limpió con Sephadex G-50. Los fragmentos de ADN se secuenciaron utilizando el secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California). La purificación y secuenciación se realizó en el Laboratorio de Genética Evolutiva del Museo de Zoología de Vertebrados, Universidad de California, Berkeley, California.

Los fragmentos de ADN antiguos que amplificaron se purificaron y secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse) por el servicio de secuenciación de Elim Biopharmaceuticals, Inc., Hayward, California.

Las secuencias se alinearon manualmente utilizando el programa Sequencher[®] (versión 3.1.1, Gene Code Corporation, Ann Arbor, Michigan). Las secuencias alineadas se compararon con la base de datos de secuencias nucleotídicas de GenBank utilizando el programa BLAST^{®8} (Altschul et al. 1990, 1997; Johnson et al. 2008) para detección de la secuencia disponible más similar. Todas las secuencias, fósiles y actuales, se identificaron con *Ctenomys sociabilis* o *Ctenomys haigi*.

⁸ Del inglés, Basic Local Alignment Search Tool.

CAPÍTULO 2

Variación genética durante el Holoceno en poblaciones de
Ctenomys sociabilis y *Ctenomys haigi*



INTRODUCCIÓN

El análisis de los patrones de variación de las secuencias de ADN en organismos vivos es utilizado actualmente en la genética de la conservación para mapear la distribución contemporánea de la variación genética en el espacio (Avise et al. 1987; Avise 2009). Esta información es muy útil, en particular para especies raras y en peligro de extinción, ya que sirve para evaluar los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones, identificar poblaciones genéticamente diferentes e inferir sobre las consecuencias evolutivas probables a corto plazo (Allendorf et al. 2013). Hoy en día, con los avances tecnológicos en la extracción y análisis de ADN antiguo es posible obtener datos sobre los niveles de variabilidad genética de poblaciones durante el pasado y compararlos con los que se registran actualmente. A partir de estos análisis es posible estimar de manera directa parámetros poblacionales tales como tamaño efectivo poblacional y niveles de flujo genético (Shapiro et al. 2004; Barbujani 2010), así como la tasas de cambio evolutivo a nivel poblacional (Lambert et al. 2002). Estas características poblacionales son importantes para el desarrollo apropiado de planes de manejo y estrategias de conservación (Leonard 2008), ya que permiten conocer las relaciones interpopulacionales a través del tiempo y detectar interrupciones recientes de conectividad o poblaciones con historia evolutiva independiente (e.g. Miller y Waits 2003, Kuhn et al. 2010). Estos análisis temporales -en conjunto con datos paleoambientales- pueden servir además para evaluar la respuesta de las poblaciones a los cambios ambientales, brindando información valiosa para la protección de las especies frente a cambio futuros (Van Tuinen et al. 2004).

Una de las principales virtudes del estudio del ADN antiguo, combinado con el del ADN actual, es que nos permite, además de cuantificar directamente los niveles de variación genética en una población, detectar cualquier pérdida de diversidad genética mediante la combinación de análisis moleculares y dataciones radiocarbónicas. Estos estudios proporcionan, a su vez, un conocimiento más preciso acerca de la historia poblacional y evolutiva de las especies y ayudan a resolver hipótesis sobre los procesos que moldearon los cambios genéticos a través del tiempo (e.g. Dalén et al. 2007; Prost 2009; Campos et al. 2010a; b; Kuhn et al. 2010; Chan y Hadly 2011). Cuando los datos genéticos antiguos están disponibles para múltiples puntos geográficos, también es posible determinar si los procesos que afectaron el patrón genético fueron de escala local o regional y al mismo tiempo detectar

extinciones locales y/o avances geográficos recientes (e.g. Dalén 2005; Collins et al. 2013, 2014; Prost et al. 2013). El estudio de ADN antiguo permite potencialmente explorar la respuesta de las especies a los cambios ambientales y eventos naturales del pasado, proporcionando información para evaluar cómo podrían reaccionar las poblaciones a cambios futuros.

Los análisis de ADN antiguo de especímenes fósiles de *C. sociabilis* y *C. haigi* del sitio Cueva Trafal I (CTI) indican que *C. sociabilis* sufrió una pérdida de diversidad genética entre los 3000 a 5000 años AP, mientras que durante el mismo periodo *C. haigi* no mostró cambios genéticos importantes (Chan et al. 2005; Chan y Hadly 2011). Según estos resultados y en combinación con la ausencia de variabilidad genética actual de *C. sociabilis*, a lo largo de su distribución geográfica, Chan et al. (2006) concluyeron que *C. sociabilis* ha pasado por uno o varios cuellos de botella, probablemente como resultado de eventos catastróficos naturales. Si esto fuese correcto, la pérdida de diversidad genética debería también detectarse en otros sitios dentro de la distribución actual de *C. sociabilis* y próximos a CTI. Para poner a prueba la hipótesis adelantada por Chan et al. (2006) es necesario analizar nuevos sitios fosilíferos y estudiar si la pérdida de diversidad de *C. sociabilis* fue un evento extendido espacialmente, lo cual a la vez, proporcionara nuevos datos sobre la dinámica espacial y temporal de la diversidad genética en esta especie.

En este capítulo se analizarán, mediante el estudio de ADN antiguo, los cambios ocurridos en la variación genética y la abundancia relativa de *Ctenomys sociabilis* y *Ctenomys haigi* durante el Pleistoceno tardío-Holoceno utilizando fósiles de dos depósitos arqueológicos novedosos, Arroyo Corral (de ahora en más, ACo; incluye los depósitos ACo I y ACo II) y Cueva del Caballo (de ahora en más, CdC). Estos datos son analizados y confrontados con los datos ya existentes para ambas especies en el sitio Cueva Trafal I (de ahora en más, CTI; Chan et al. 2005; Chan y Hadly 2011). De este modo este análisis permitirá estudiar los cambios en la variabilidad genética poblacional de *Ctenomys* spp. en una escala geográfica y temporal amplia. A su vez permitirá evaluar si la pérdida de variabilidad genética observada en CTI para *C. sociabilis* fue un proceso poblacional específico del sitio o fue un hecho general que sucedió en otras poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Para cuantificar los niveles de abundancia relativa y de variación genética de *C. sociabilis* y *C. haigi* a través del tiempo se utilizaron muestras fósiles recolectadas en los depósitos ACo y CdC y muestras actuales colectadas de animales vivos trampeados en las proximidades de los yacimientos mencionados (ver Capítulo 1). El material fósil de ambos depósitos fue recolectado por un equipo de arqueólogos mediante excavaciones sistemáticas, llevando un registro preciso de los datos de procedencia estratigráfica (ver Capítulo 1). Para cada depósito se identificaron todos los restos cráneo-mandibulares de *Ctenomys* spp. Los especímenes se catalogaron utilizando un código de letras y números y se almacenaron en bolsas con cierre hermético. Las muestras actuales se obtuvieron de individuos capturados con trampas de tubo y lazo (Lacey et al. 1997, 1998; Figura 1.15 A y B) a los cuales se les tomó una muestra de 1-2 mm distales del dígito 5to (Cutrera et al. 2005). Las muestras se conservaron en buffer de DMSO₄-EDTA (Seutin et al. 1991). El análisis se complementó con los datos obtenidos Chan y Hadly (2011) para los restos fósiles de *C. sociabilis* y *C. haigi* del sitio CTI.

Cronología

Debido a que los datos provienen de diferentes depósitos, se combinó la información estratigráfica de cada depósito con dataciones radiocarbónicas (¹⁴C) y modelos de edad-profundidad (Blaauw 2010) para generar un contexto cronológico general e identificar, si existieran, cambios sincrónicos extendidos espacialmente. Se evaluaron 28 dataciones radiocarbónicas (Capítulo 1: Tabla 1.2) de las cuales 11 fueron fechados-taxón sobre especímenes de *Ctenomys* que a su vez fueron analizados genéticamente. Las dataciones restantes fueron fechas de nivel estratigráfico (datación de carbón vegetal u otro material orgánico del nivel).

Una vez establecida la cronología, esta fue dividida en 4 intervalos temporales (Tabla 2.1). Los intervalos fueron utilizados para analizar los datos en cada uno de los depósitos. Esta metodología permitió controlar los cambios genéticos de manera precisa

(Ramakrishnan y Hadly 2009). Los intervalos temporales fueron definidos siguiendo las fechas estimadas para los principales cambios ambientales identificados para el área de estudio (Villarosa et al. 2006; Whitlock et al. 2006; Iglesias et al. 2012a), según el detalle que se brinda en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Definición de intervalos temporales y sus principales características ambientales. También se proporciona el número de secuencias de ADN analizadas de cada especie de *Ctenomys* para cada sitio. ACo = Arroyo Corral, CdC = Cueva del Caballo, CTI = Cueva Trafal I. * = Datos tomados de Chan y Haldly (2011).

Intervalo Temporal	Características ambientales	<i>C. sociabilis</i>			<i>C. haigi</i>	
		ACo	CdC	CTI*	CdC	CTI*
A actual (0-500 AP)	Impacto antrópico actual	9	-	-	8	10
B Holoceno tardío (500-3000 AP)	Vulcanismo sobre los 2500 AP, posterior avance de bosque <i>Austrocedrus</i> y <i>Nothofagus</i>	5	3	-	14	8
C Holoceno medio (3000-6000 AP)	Avance de <i>Nothofagus</i> , desplazamiento del ecotono al este, establecimiento de <i>Austrocedrus</i>	5	5	16	8	20
D Holoceno temprano (6000-12000 AP)	Post glacial, abundante vegetación arbustiva y esteparia, bosques abiertos de <i>Nothofagus</i>	2	6	18	1	3

Análisis moleculares

Para evaluar el cambio en la variación genética de *C. sociabilis* y *C. haigi* se utilizaron secuencias de ADN mitocondrial extraídas de especímenes fósiles y actuales de los sitios ACo, CdC y CTI, dentro del rango de distribución de ambas especies.

ADN antiguo

Para la extracción de ADN antiguo, se seleccionaron al azar 89 especímenes fósiles a lo largo de la secuencia estratigráfica, 51 del depósito ACo y 38 del depósito CdC. Los especímenes utilizados fueron aquellos mejor conservados y con mayor cantidad de dientes in situ (incisivo y molares). Preferentemente, se utilizaron hemimandíbulas izquierdas excepto en algunos niveles donde este elemento fue muy escaso, siendo entonces remplazado por hemimandíbulas derechas y/o fragmentos de cráneos. Todos los especímenes fueron fotografiados y pesados previamente a su procesamiento.

Para la extracción y amplificación de ADN antiguo se siguieron pautas y protocolos específicos, los cuales se pueden consultar en la metodología general (ver Capítulo 1). Los análisis se focalizaron en un fragmento de 136 pares de bases (de ahora en más, pb) del gen mitocondrial que amplifica para citocromo b (bases 96 a 279 incluyendo los primers). Los especímenes que dieron productos de ADN (n = 49) fueron secuenciados y luego alineados con el programa Sequencher® (versión 3.1.1, Gene Code Corporation, Ann Arbor, Michigan).

Se utilizó el programa BLAST® (Altschul et al. 1990, 1997; Johnson et al. 2008) para comparar la secuencia nucleotídica de cada fósil contra la base de datos de secuencias nucleotídicas disponibles en GenBank. Este procedimiento permitió determinar la calidad de las secuencias fósiles y la presencia de contaminación, a la par que identificar taxonómicamente el fragmento amplificado mediante similitud con los datos disponibles.

Identificación taxonómica de las muestras fósiles

Para comprobar la identificación taxonómica de los especímenes fósiles determinada con BLAST® según su similitud con las secuencias de GenBank, se analizaron las secuencias nucleotídicas del citocromo b utilizando un método filogenético en el programa PAUP* 4.0 (Swofford 2003). Se construyó un árbol filogenético utilizando el método de agrupamiento del vecino más próximo, (NJ⁹; Saitou y Nei 1987) según la matriz de distancia genética basada en la proporción de sitios que difieren (p-distance¹⁰) entre los pares de secuencia para los 136 pb del citocromo b de las 49 secuencias fósiles. En el análisis se incluyeron 11 secuencias obtenidas de GenBank, a saber: *C. sociabilis* (HM544129), *C. haigi* (AF007063, HM777476), otras especies de *Ctenomys* con distribución en Patagonia (*C. magellanicus*, HM777479; *C. maulinus*, AF370702; *C. mendocinus*, HM777480; *C. sericeus*, HM777496), *C. talarum* (HM777498) y dos secuencias de *Ctenomys* fósiles de Cueva Trafal I (*C. sociabilis*, JN629090.1 y *C. haigi*, GU433043.1). Se utilizó como grupo externo a *Octodon degus* (AF007058). Luego de generar el árbol NJ se realizó un análisis de bootstrap de 1000 réplicas para verificar el soporte de los agrupamientos que incluyen a los fósiles.

⁹ Del inglés, Neighbor-Joining.

¹⁰ Proporción de sitios que difieren entre dos secuencias (Felsenstein 1988).

ADN actual

Se analizaron 27 secuencias de ADN actual (*C. sociabilis* n = 9, *C. haigi* n = 18) del mismo fragmento obtenido para los especímenes fósiles. Las secuencias de ADN se obtuvieron a partir de muestras del extremo distal del 5to dígito de individuos capturados en las inmediaciones de los sitios arqueológicos (ACo: n = 9, CdC: n = 8, CTI¹¹: n = 10; Tabla 1.3). Los individuos fueron fotografiados y liberados en el lugar de captura.

Abundancia relativa

La fragmentación de los restos fósiles de mandíbulas y maxilares de *Ctenomys* en ambos depósitos dificultó la determinación taxonómica de los especímenes sobre la base de indicadores morfológicos. Los rasgos anatómicos que se usaron para distinguir entre individuos de *C. sociabilis* y *C. haigi* (e.g. desarrollo de bula timpánica y del proceso coronoides, Capítulo 1: Figura 1.10) generalmente no se pueden verificar en los fósiles, ya que implican estructuras anatómicas delicadas (e.g. proceso coronoides) cuya pérdida por fragmentación es usual durante el ciclo tafonómico (Pardiñas 1999b). En consecuencia, para estimar la abundancia relativa de cada especie en los depósitos estudiados, se utilizó la identificación taxonómica obtenida a partir de las secuencias de ADN antiguo.

En cada depósito (ACo y CdC) se calculó, para cada intervalo temporal, la abundancia relativa de *C. sociabilis* y *C. haigi* basada en el conjunto de especímenes fósiles identificados taxonómicamente a partir de las secuencias de ADN antiguo. De esta manera, se obtuvo un valor de abundancia relativa para cada especie dentro de cada intervalo temporal, respecto al valor total del número mínimo de individuos (MNI, Capítulo 1: pág. 18) de *Ctenomys* spp. Este procedimiento fue utilizado con el mismo propósito por Chan y Hadly (2011) para los datos de *Ctenomys* spp. de CTI. De este modo fue posible comparar directamente las abundancias relativas de cada especie de *Ctenomys* entre los tres depósitos: ACo, CdC y CTI.

Para estimar la abundancia relativa actual (intervalo temporal A) se colectaron egagrópilas frescas de *Tyto furcata* de la superficie de cada uno de los yacimientos durante el periodo 2010 a 2013. Se calculó el valor de MNI de cada especie de *Ctenomys* presente en las egagrópilas sobre la base de los rasgos anatómicos indicados en las Figura 1.10 (ver

¹¹ 5 km al norte de CTI.

Capítulo 1). Dado que la acumulación del material fósil de pequeños mamíferos de ACo, CdC y CTI ha sido atribuida a la acumulación de restos esqueléticos producida por la actividad trófica de las aves rapaces (Pearson y Pearson 1993; Pardiñas y Teta 2013; Tammone et al. 2014 y datos no publicados), la estimación de la abundancia relativa actual a través de egagrópilas proporcionó un parámetro equivalente para comparar muestras actuales y fósiles.

Dado que el esquema temporal definido en esta tesis difiere ligeramente del esquema utilizado por Chan y Hadly (2011), los datos de abundancia relativa se analizaron utilizando ambos esquemas temporales en los tres sitios (ACo, CdC y CTI).

Variabilidad genética espacial y temporal

El análisis de la variabilidad genética de una especie en el espacio puede dar indicios acerca de la historia de las poblaciones y sus relaciones evolutivas. La posibilidad de combinar estos datos con datos de variabilidad genética de diferentes puntos en el pasado, a través del análisis de ADN antiguo, permite detectar los cambios de variabilidad genética y ordenarlos en una escala cronológica.

Para estudiar la variabilidad genética temporal de ambas especies de *Ctenomys* se utilizaron las secuencias de ADN extraídas de las muestras fósiles de ACo y CdC. Los análisis se realizaron para el fragmento de 136 pb del gen mitocondrial que amplifica para citocromo b. Las secuencias fueron estudiadas utilizando dos tipos de análisis, (1) variación a nivel de haplotipos, para identificar y representar gráficamente el patrón de la variación y (2) variación a nivel de nucleótidos, para cuantificar la variación a partir de medidas de diversidad genética. Ambos métodos dan información diferente y, por lo tanto, pueden reflejar procesos evolutivos distintos (Goodall-Copestake et al. 2012). En el análisis se incluyeron las secuencias fósiles de *Ctenomys* para el sitio CTI disponibles en GenBank, a saber: *C. sociabilis* (números de acceso JN629090-JN629094 y DQ402060-DQ402066), *C. haigi* (GU433041-GU433046; Chan y Hadly 2011), restringiendo el uso de estas secuencias al mismo fragmento de 136 pb.

Se calculó también la divergencia genética para el conjunto completo de secuencias de *C. sociabilis* y *C. haigi*, tanto fósiles como actuales, en forma intraespecífica e interespecífica. El cálculo de divergencia se realizó con el programa DnaSP v5.00 (Libardo y Rozas 2009) según el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre los grupos analizados con la corrección de Jukes y Cantor (K(JC), Nei 1987).

Variación genética a nivel de haplotipos

Para analizar la variabilidad genética a nivel de haplotipos, a partir de los fragmentos alineados se identificaron los haplotipos utilizando el programa DnaSP v5.00. Mediante la construcción de redes de haplotipos se calculó el número y la frecuencia relativa de los haplotipos y su relación dentro de cada población (ACo, CdC y CTI). Para evaluar la trayectoria temporal de los haplotipos a lo largo de los intervalos definidos, en cada población se utilizaron redes temporales mediante el uso de figuras en tres dimensiones en donde cada haplotipo es identificado con un color distinto, las redes de cada intervalo temporal de muestreo son ubicadas en niveles horizontales, mientras que los haplotipos compartidos entre intervalos son conectados en columnas verticales (Prost y Anderson 2011). Además, para evaluar la relación y la trayectoria espacial y temporal de los haplotipos de *C. sociabilis*, se elaboró una red de haplotipos a lo largo del tiempo incluyendo todas las secuencias nucleotídicas. Las redes temporales de haplotipos se construyeron implementando el análisis de parsimonia estadística (Templeton et al. 1992) con el script de R TempNet v1.4. (Prost y Anderson 2011).

Variación genética a nivel de nucleótidos

La variabilidad genética a nivel de nucleótidos se cuantificó para cada intervalo temporal utilizando las siguientes medidas de diversidad genética: número de sitios variables (S), diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica (Pi), todos calculados con el programa DnaSP v5.00. Debido a que las muestras fósiles dentro de un intervalo temporal de análisis pueden tener diferente antigüedad también se calculó la diversidad nucleotídica corregida por heterocronía (Pi_h) utilizando la siguiente fórmula (Depaulis et al. 2009, fórmula 1):

$$Pi_h = \frac{\sum_{i,j=1, i>j}^n d_{i,j}}{n(n-1)/2 + \sum_{i,j=1, i>j}^n |t_i - t_j|}$$

donde:

$d_{i,j}$ = número de diferencias entre las secuencias i y j ; $t_i - t_j$ = suma de la diferencia de tiempo (calibrado) entre pares de secuencias; n = número de secuencias incluidas en el intervalo temporal de análisis.

Evaluación del tamaño de muestra

El análisis de tamaños muestrales pequeños puede subestimar la variabilidad genética de una población (Pruett y Winker 2008; Goodall-Copestake et al. 2012). Esto puede afectar los resultados de variabilidad genética cuando se comparan poblaciones con tamaños muestrales diferentes. En este sentido, debido a que el sitio CTI presentó un tamaño de muestra mayor que los de ACo y CdC, se realizó un remuestreo sobre el tamaño de muestra original de CTI. El remuestreo consistió en reducir el tamaño de muestras de CTI al valor del sitio CdC mediante el método de Bootstrap con 1000 repeticiones (con reposición) utilizando un script en R (e.g. Mondol et al. 2013). Para cada repetición se calculó el número de haplotipos y las medidas genéticas S , H y P_i . El mismo método se utilizó para comprobar si la frecuencia relativa de cada haplotipo en los intervalos temporales resultó afectado por una reducción en el tamaño de muestra.

RESULTADOS

Se extrajo exitosamente ADN mitocondrial de 49 especímenes fósiles de *Ctenomys* de los depósitos arqueológicos ACo (n = 12) y CdC (n = 37). Los restantes 40 especímenes no brindaron producto amplificable. A partir del ADN extraído se amplificó y secuenció un fragmento de 136 pb de la región que codifica para el gen citocromo b. Estos datos se complementaron con secuencias de ADN mitocondrial del mismo fragmento de 27 animales actuales provenientes de las inmediaciones de los depósitos arqueológicos ACo (n = 9), CdC (n = 8) y 5 km noroeste de CTI (n = 10). En la Tabla 2.1 se detalla el número de especímenes secuenciados para cada intervalo temporal según fueron definidos en esta tesis.

Identificación taxonómica de las muestras fósiles

Los análisis realizados en BLAST® identificaron a las secuencias fósiles, o bien con secuencias de *C. sociabilis*, o bien con secuencias de *C. haigi*; en ningún caso se obtuvo concordancia con otras especies de *Ctenomys* disponibles en GenBank (número de especies representadas ~45). El análisis filogenético de las secuencias fósiles resultó congruente con las determinaciones alcanzadas en BLAST®. En el cladograma obtenido (Figura 2.1) se observa que, de las 49 secuencias fósiles, 26 se agruparon con *C. sociabilis* y 23 con *C. haigi*, con valores de soporte de Bootstrap del 98% y 65%, respectivamente. Las secuencias fósiles de *C. sociabilis* se obtuvieron tanto en ACo (n = 12) como en CdC (n = 14), mientras que las secuencias fósiles de *C. haigi* sólo estuvieron presentes en CdC (n = 23).

La divergencia genética entre el conjunto completo de secuencias de *C. sociabilis* y de *C. haigi* fue de 13,64%. Este porcentaje de divergencia se mantuvo entre las especies tanto entre las secuencias fósiles como entre las actuales, y entre actuales y fósiles (Tabla 2.2). La divergencia genética entre las secuencias fósiles y actuales de *C. sociabilis* fue de 1,22%, mientras que en *C. haigi* la divergencia fue de 0,61%. Estos resultados se ven reflejados en el análisis de NJ, el cual indica claramente que las secuencias fósiles asignadas a cada especie forman grupos monofiléticos con las secuencias actuales conocidas para *C. sociabilis* y *C. haigi* (Figura 2.1). La topología muestra dos clados para *C. sociabilis*, uno constituido por especímenes de CdC (001-003, 005, 007) que, de acuerdo con los fechados, correspondería a un grupo más antiguo extinto. El otro clado incluye los restantes

especímenes fósiles junto con el espécimen actual y uno fósil de CTI. Para *C. haigi* el grupo monofilético incluye al espécimen actual de Bariloche y uno fósil de CTI, mientras que el espécimen de El Maitén (topotipo de *C. haigi*) se encuentra por fuera de este grupo. Estos resultados sugieren que el estatus taxonómico de los *Ctenomys* considerados como *C. haigi* debería ser reconsiderado tal como lo sugirió Parada (2007). Sin embargo, esto ha estado fuera del alcance de los objetivos de esta tesis. Los porcentajes de divergencia interespecíficos e intraespecíficos obtenidos para las especies de *Ctenomys* estudiadas se encontraron dentro de los valores reportados para otros *Ctenomys* (D'Elía et al. 1999; Mascheretti et al. 2000; Parada et al. 2011) así como para otras especies de mamíferos (Johns y Avise 1998; Bradley y Baker 2001). El mayor porcentaje de divergencia genética hallado entre los especímenes de *C. sociabilis* (fósiles y actuales) refleja los dos clados identificados para esta especie (Figura 2.1).

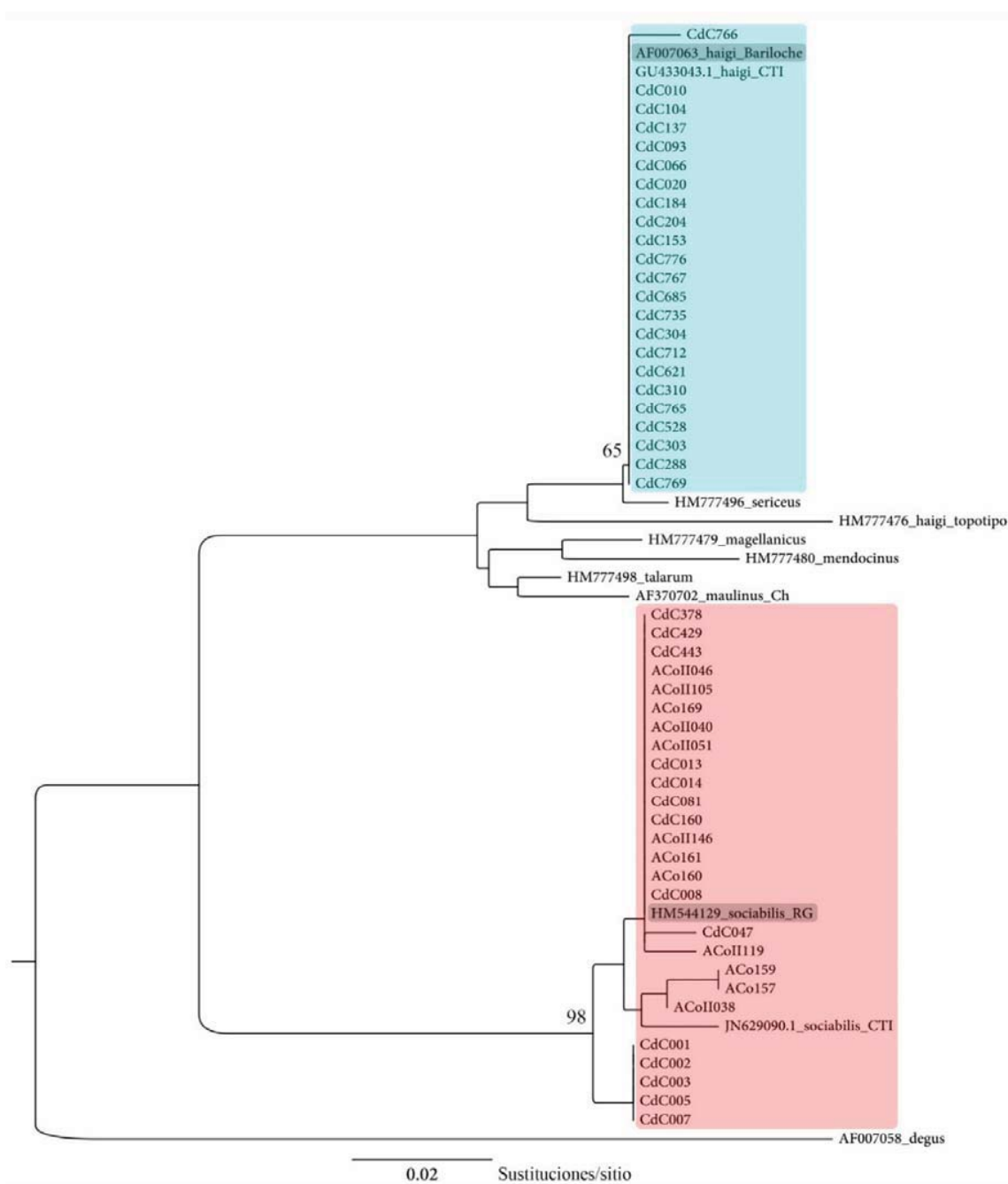


Figura 2.1. Árbol NJ basado en la proporción de sitios variables de los 136 pb del citocromo b. En azul, las secuencias fósiles identificadas con *C. haigi* (resaltado). En rojo, las secuencias fósiles identificadas con *C. sociabilis* (resaltado). Los números sobre ramas indican el soporte de Bootstrap para los nodos que contienen las secuencias fósiles.

Tabla 2.2. Divergencia genética entre las secuencias fósiles y actuales de *C. sociabilis* y *C. haigi*.

		Fósil		Actual	
		<i>C. sociabilis</i>	<i>C. haigi</i>	<i>C. sociabilis</i>	<i>C. haigi</i>
Fósil	<i>C. sociabilis</i>	-	-	-	-
	<i>C. haigi</i>	13,729	-	-	-
Actual	<i>C. sociabilis</i>	1,223	13,690	-	-
	<i>C. haigi</i>	13,404	0,615	13,381	-

Abundancia relativa

La relación de abundancia relativa de ambas especies de *Ctenomys* a lo largo del tiempo es similar en los sitios CdC y CTI (Figura 2.2 A). En ambos, el registro fósil indica que la abundancia relativa de *C. sociabilis* supera a la de *C. haigi* en los niveles más antiguos, intervalo temporal D (12000-6000 años AP), siendo del 85,7% en ambos casos. Durante el intervalo temporal C (6000-3000 años AP) se verifica un incremento de *C. haigi*, que supera el 50% tanto en CdC (61,5%) como en CTI (55,5%). Durante el intervalo temporal B (3000-500 años AP) *C. haigi* alcanza el 82,4% en CdC, mientras que en CTI resulta exclusivo (i.e., el 100% de los individuos identificados genéticamente son de esta especie). En la actualidad, las egagrópilas de *Tyto furcata* analizadas (CdC: MNI = 1007, CTI: MNI = 229) muestran que en ambos sitios *C. haigi* comprende el 100% de la abundancia. *C. sociabilis* está ausente en la actualidad en las inmediaciones de los sitios CdC y CTI¹². En ACo, la relación de abundancia relativa es diferente a la descrita para estos dos sitios (Figura 2.2 A). En este yacimiento la abundancia de *C. sociabilis* es del 100% durante todo el período abarcado en el depósito (12364-824 años cal AP), incluyendo los intervalos temporales D-B, mientras que en la actualidad la abundancia relativa representada por las egagrópilas de *Tyto furcata* (n = 178) indican que *C. sociabilis* es la especie dominante (70%) aunque no exclusiva, ya que el 30% restante corresponde a *C. haigi*.

El patrón general de variación en la abundancia relativa de ambos taxones fue el mismo usando ya fuera el esquema temporal definido por esta tesis o aquel de Chan y Hadly (2011). En los tres sitios, la abundancia relativa de *C. sociabilis* disminuye mientras que la de *C. haigi* aumenta desde los intervalos antiguos hacia la actualidad (Figura 2.2 A y B).

¹² Este resultado es apoyado por los muestreos de campo realizados en esta tesis, como así también por los realizados por Pearson (1987), Pearson y Christie (1985) y Pearson y Pearson (1993).

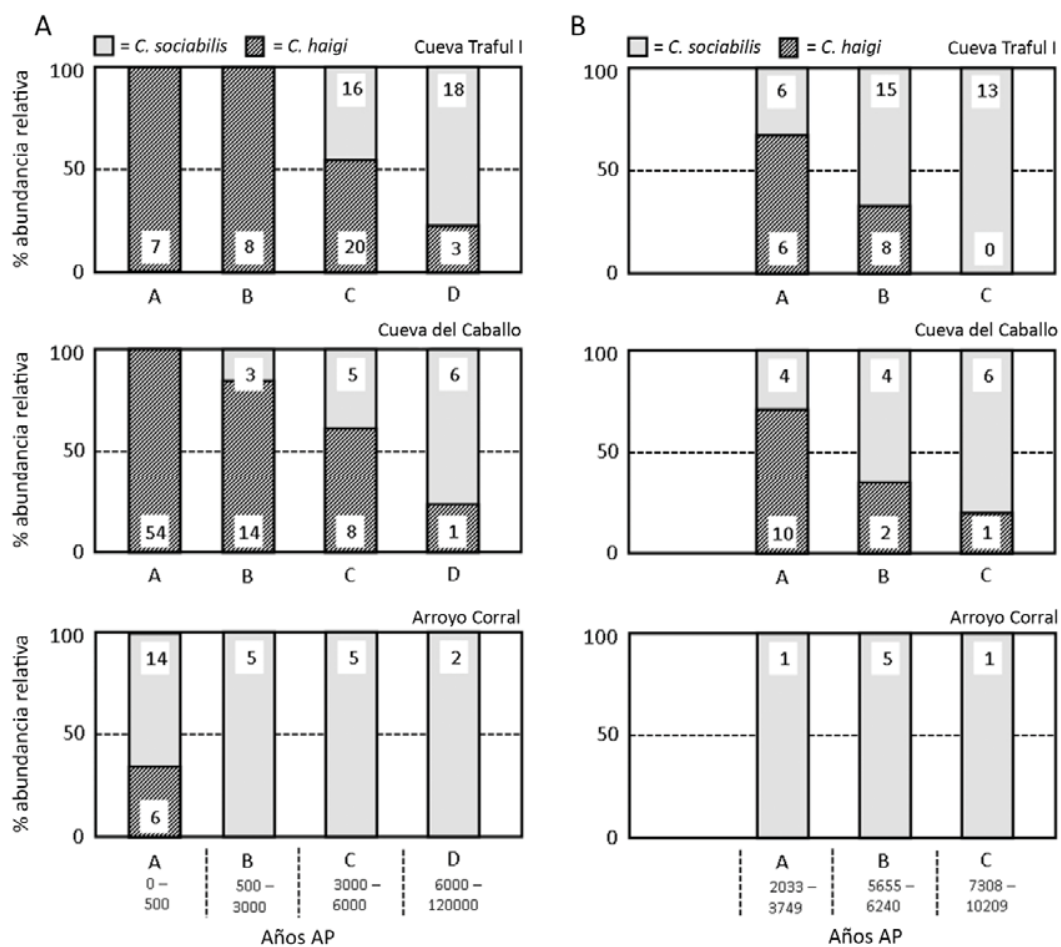


Figura 2.2. Abundancia relativa de los especímenes de *C. sociabilis* y *C. haigi* identificados genéticamente sobre el valor total de MNI de *Ctenomys* spp. en cada sitio. **A)** intervalos temporales definidos en esta tesis. **B)** intervalos temporales utilizados por Chan y Hadly (2011). Los números dentro de las barras indican el número de especímenes: intervalos B-C identificados genéticamente; intervalo A identificados morfológicamente. Los datos de Cueva Trafal I corresponden a Chan y Hadly (2011).

Variabilidad genética del conjunto de muestras

Para el fragmento de 136 pb se detectaron, para *C. sociabilis* incluyendo las secuencias fósiles y actuales de ACo (n = 12 fósiles, n = 9 actuales), CdC (n = 14) y CTI (n = 34¹³), un total de 12 mutaciones (11 transiciones y 1 transversión) y 12 sitios variables, 6 de estos sitios fueron parsimoniosamente informativos¹⁴. En el mismo fragmento, para las muestras fósiles y actuales de *C. haigi*, incluyendo CdC (n = 23 fósiles, n = 8 actuales) y CTI (n = 31 fósiles, n = 10 actuales¹⁵), se detectaron 10 mutaciones (7 transiciones y 3 transversiones) y 10 sitios variables, 7 de los sitios fueron parsimoniosamente informativos. Para el conjunto completo de datos, incluyendo todas las secuencias de *C. sociabilis* y de *C. haigi* (n = 141), se detectaron 30 mutaciones y 28 sitios variables, de las cuales 21 fueron parsimoniosamente informativos (Tabla 2.3).

¹³ Datos de Chan y Hadly (2011).

¹⁴ Posición nucleotídica en la cual hay como mínimo dos nucleótidos que están presentes al menos dos veces.

¹⁵ 5 km al norte de CTI.

Tabla 2.3. Posiciones nucleotídicas del citocromo b de los sitios variables detectados en el fragmento de 136 pb para los especímenes fósiles y actuales de *C. sociabilis* y *C. haigi*. Se detallan los haplotipos identificados para cada especie.

		Posición nucleotídica																																			
Especie	Haplotipo	120	121	124	127	141	142	144	145	151	159	162	165	166	168	177	198	209	210	213	216	222	225	231	232	237	241	245	255								
<i>C. sociabilis</i>	S1	T	C	G	C	A	G	A	T	T	A	T	A	C	T	C	G	T	A	T	T	A	T	A	C	T	T	T	T	T							
	S2	C	.						
	S3	C						
	S4	T	C						
	S5	C	C	C						
	S6	.	.	A	A						
	S7	C	C	C	.	.	.	C						
	S8	C	C	.	.	.	C						
	S9	C	C	C						
	S10	C	.					
	S11	C	C					
	S12	C	C					
	S13	C	A	.	C	C					
<i>C. haigi</i>	H1	C	.	.	T	T	.	C	.	C	G	C	C	.	A	C	C	.	.	T	C	C	C	.	.	C	.	.	.	C							
	H2	C	T	.	.	C	.	.	C	.	C	C	.	.	C	T	.	.	T	C	C	C	.	.	C	C							
	H3	C	.	.	T	T	.	C	.	C	G	C	C	.	A	C	A	.	.	T	C	C	C	G	.	C	.	.	.	C							
	H4	C	.	.	T	T	.	C	.	C	G	C	C	.	A	C	A	.	.	T	C	C	C	.	.	T	C	.	.	C							

Variación genética a nivel de haplotipos

El número total de haplotipos (antiguos y actuales) para el fragmento (136 pb) de citocromo b analizado fue de 13 para *C. sociabilis* y 4 para *C. haigi* (Tabla 2.3). Para *C. sociabilis*, de los 13 haplotipos, 12 fueron haplotipos únicos¹⁶ (92,3%), con la siguiente distribución espacial: 7 en CTI, 3 en ACo y 2 en CdC. Solamente un haplotipo fue común entre los tres sitios y, a su vez, es el presente en las poblaciones actuales en los sitios con presencia de la especie (haplotipo azul en Figuras 2.3 y 2.4). Los haplotipos exclusivos de *C. sociabilis* en ACo y CdC son 5 haplotipos nuevos respecto a los reportados por Chan y Hadly (2011) en CTI. En el caso de *C. haigi*, de los 4 haplotipos registrados, 2 fueron únicos de CdC, 1 exclusivo de CTI y 1 fue compartido entre los dos sitios (haplotipo rojo en Figuras 2.3 y 2.5). Los 2 haplotipos exclusivos de *C. haigi* en CdC representan haplotipos nuevos respecto a los reportados por Chan y Hadly (2011) en CTI. En resumen, en los sitios donde cada especie estuvo presente, se encontró un único haplotipo distribuido ampliamente en todas las poblaciones, mientras que los restantes haplotipos fueron únicos de alguna de las poblaciones estudiadas.

La trayectoria de los haplotipos a través del tiempo fue más compleja para *C. sociabilis* que para *C. haigi* (Figuras 2.4 y 2.5). Durante los intervalos temporales más antiguos D-C, las poblaciones de *C. sociabilis* mostraron un cambio en la frecuencia de los haplotipos, expresado a través de la pérdida y la aparición de variantes haplotípicas en todos los sitios (Figura 2.3). En el intervalo temporal B, en ACo y CdC se detectó una pérdida casi completa de haplotipos (haplotipos extintos) indicado por la presencia de una única variante haplotípica, la cual persiste en ACo hasta la actualidad (Figuras 2.4 y 2.6). La falta de datos para *C. sociabilis* en los intervalos B-A en CTI y en el intervalo A en CdC se debe a la ausencia de esta especie en el registro fósil de los sitios. En *C. haigi* no se observaron grandes cambios en el número y la frecuencia de los haplotipos durante todo el segmento temporal, excepto la aparición en la actualidad de un haplotipo más divergente que los anteriores (Figura 2.5).

¹⁶ Haplotipos que están presente únicamente en una población.

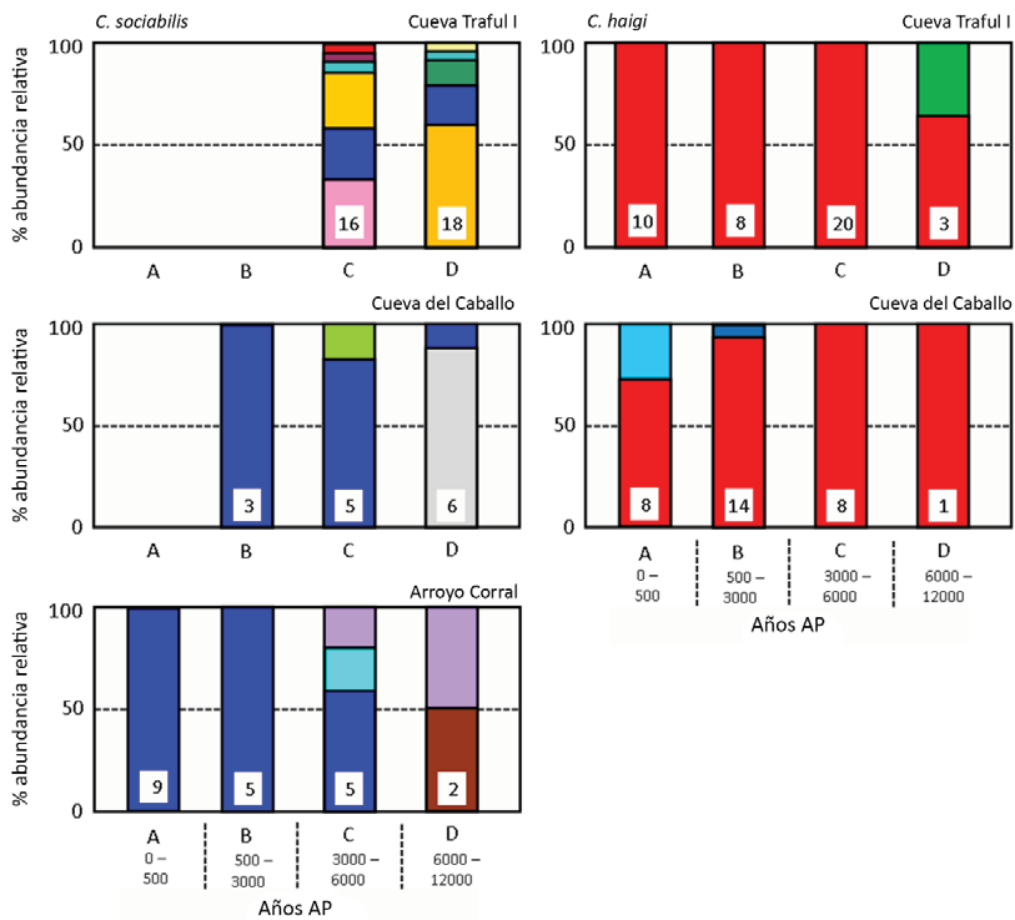


Figura 2.3. Porcentaje de abundancia relativa de los haplotipos para cada sitio y cada intervalo temporal. Los colores representan haplotipos diferentes para cada especie. Los números dentro de las barras indican el número de secuencias analizadas.

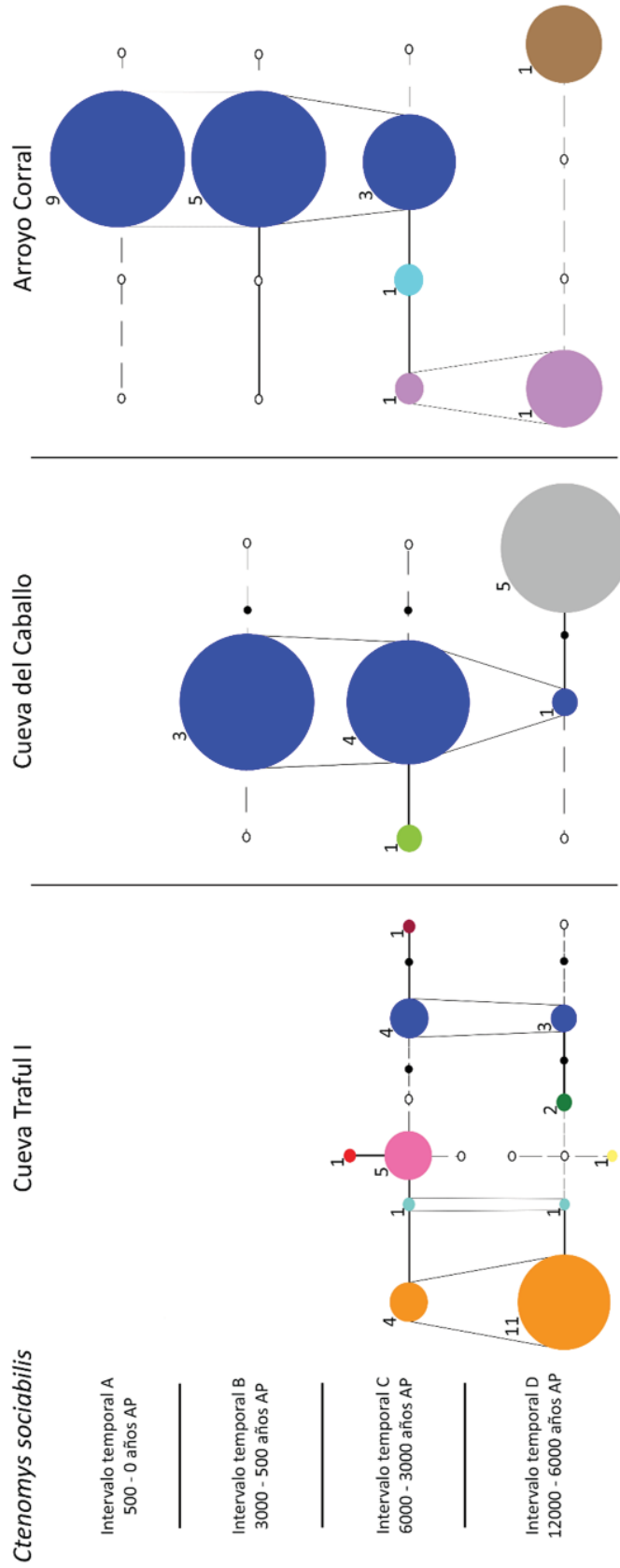


Figura 2.4. Red temporal de haplotipos (136 pb) de *C. sociabilis* en CTI, CdC y ACo. Los círculos de colores representan haplotipos, su área indica la frecuencia haplotípica. Círculos sin relleno indican haplotipos ausentes. Las líneas entre círculos indican una sustitución nucleotídica, sustituciones adicionales se indican con punto. Las líneas verticales unen haplotipos presentes en más de un intervalo temporal. Los números indican secuencias que comparten haplotipos. Las secuencias de CTI fueron tomadas de Chan y Hadly (2011).

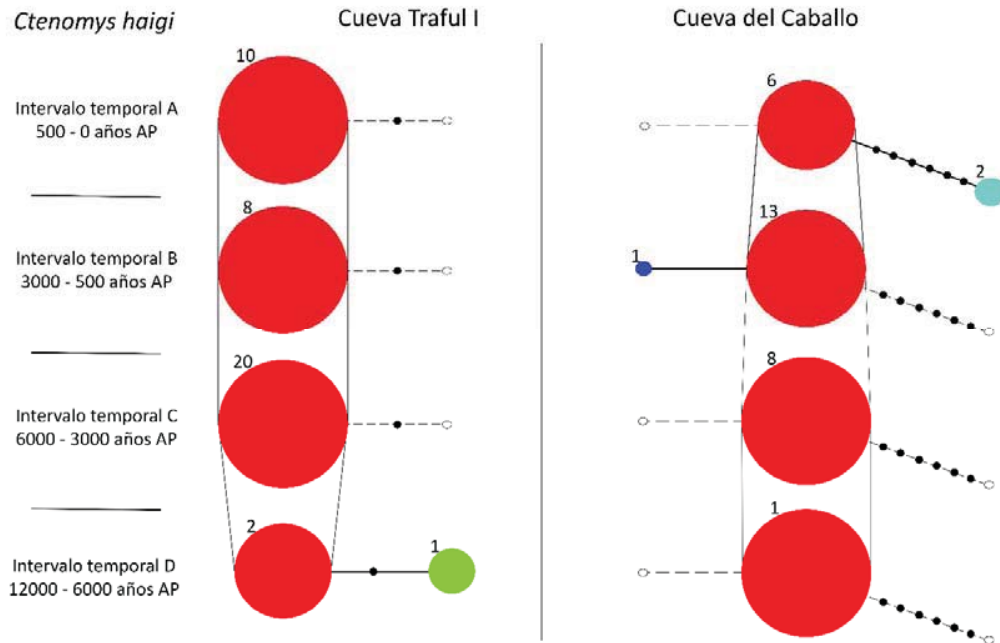


Figura 2.5. Red temporal de haplotipos (136 pb) de *C. haigi* en CTI y CdC. Los círculos de colores representan haplotipos, su área indica la frecuencia haplotípica. Círculos sin relleno indican haplotipos ausentes. Las líneas entre círculos indican una sustitución nucleotídica, sustituciones adicionales se indican con punto. Las líneas verticales unen haplotipos presentes en más de un intervalo temporal. Los números indican secuencias que comparten haplotipos. Las secuencias de CTI fueron tomados de Chan y Hadly (2011).

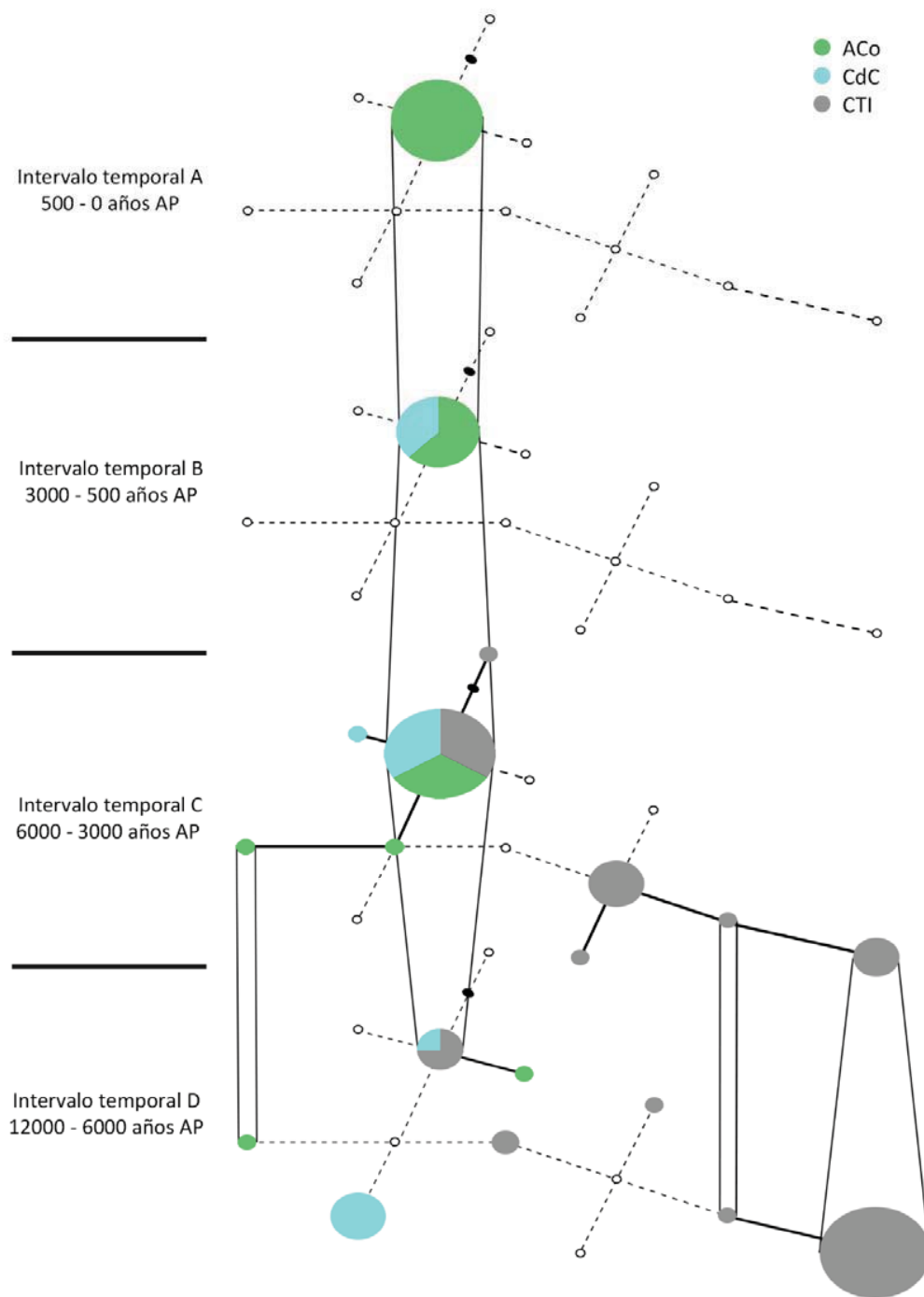


Figura 2.6. Red temporal de haplotipos (136 pb) para el conjunto completo de datos de *C. sociabilis*. Los círculos representan un haplotipo, su área indica la frecuencia haplotípica y el color la localidad. Círculos sin relleno indican haplotipos ausentes. Las líneas entre círculos indican una sustitución nucleotídica, sustituciones adicionales se indican con punto. Las líneas verticales unen haplotipos presentes en más de un intervalo temporal. Las secuencias de CTI fueron tomadas de Chan y Hadly (2011).

Variación genética a nivel de nucleótidos

De acuerdo con las medidas de diversidad genética analizadas, en los tres sitios la variabilidad genética a nivel nucleotídica fue mayor para *C. sociabilis* que para *C. haigi* en los intervalos temporal más antiguos D-C (Tabla 2.4), mientras que en los intervalos más recientes B-A se verifica lo contrario. A nivel de especie, en el intervalo temporal D las medidas de diversidad genética de *C. sociabilis* fueron más altas en ACo, mientras que en el intervalo temporal C los valores más altos se registraron en CTI. En estos dos intervalos los valores encontrados en CdC fueron los más bajos. En el intervalo temporal B, en ACo y CdC, *C. sociabilis* muestra una pérdida completa de variabilidad genética tanto en diversidad haplotípica como nucleotídica, mientras que para el mismo segmento temporal esta especie desaparece del registro fósil de CTI. En la actualidad (intervalo temporal A), la ausencia de variabilidad de *C. sociabilis* detectada durante el Holoceno tardío en ACo se sigue manteniendo, mientras que en CdC la especie se extingue localmente (Tabla 2.4). En *C. haigi*, no se observan cambios importantes en los niveles de variabilidad genética excepto para el sitio CdC en el cual se detectó un ligero aumento en los intervalos temporales B y A. Comparativamente, los cambios en la variabilidad genética fueron mayores en *C. sociabilis* que en *C. haigi*. La relación entre estos resultados y los cambios ambientales que definen el esquema temporal analizado se trata en la discusión de este capítulo y, con mayor detalle, en el Capítulo 3.

Tabla 2.4. Resumen de medidas de diversidad genética para cada intervalo temporal por especies y por sitio. Acrónimos: ACo = Arroyo Corral, CdC = Cueva del Caballo, CTI = Cueva Trafal I.

<i>Ctenomys sociabilis</i>							
Intervalo temporal (Ka)	Sitio	N	# Haplotipos	S	H	Pi	Pi(h)
A	0-0.5	9	1	0	0	0	-
	0-0.5	-	-	-	-	-	-
	0-0.5	-	-	-	-	-	-
B	0.5-3	5	1	0	0	0	0
	0.5-3	3	1	0	0	0	0
	0.5-3	0	0	0	0	0	0
C	3-6	5	3	2	0,70000	0,00735	0,001566907
	3-6	5	2	1	0,40000	0,00294	0,000520427
	3-6	16	6	7	0,81667	0,01673	0,001559323
D	6-12	2	2	3	1,00000	0,02206	0,003271538
	6-12	6	2	2	0,33333	0,00490	0,000785361
	6-12	18	5	5	0,61438	0,01028	0,000555793
<i>Ctenomys haigi</i>							
Intervalo temporal (Ka)	Sitio	N	# Haplotipos	S	H	Pi	Pi(h)
A	0-0.5	8	2	7	0,42900	0,02206	-
	0-0.5	10	1	0	0	0	-
B	0.5-3	14	2	1	0,14300	0,00105	0,000125231
	0.5-3	8	1	0	0	0	0
C	3-6	8	1	0	0	0	0
	3-6	20	1	0	0	0	0
D	6-12	1	1	0	0	0	0
	6-12	3	2	2	0,66700	0,00980	0,00886918

Evaluación del tamaño de muestra

Los mayores valores en los índices de diversidad genética y el patrón más complejo de estructura haplotípica detectada en CTI para *C. sociabilis* podrían ser atribuidos al mayor número de muestras (i.e., secuencias analizadas) en este sitio respecto al de ACo y CdC. Sin embargo, el análisis de remuestreo sugiere que este resultado no estaría afectado por el mayor tamaño muestral en CTI, dado que no se observó variación en las frecuencias de los haplotipos en los intervalos temporales C y D de CTI utilizando el número de muestra total ($n = 34$) y un número de muestra reducido ($n = 15$) similar al de ACo y CdC calculado a partir del remuestreo (Tabla 2.5). Del mismo modo, los valores de los índices de diversidad haplotípico y nucleotídico no sugieren un efecto dependiente del número muestral para los números de muestra evaluados (Tabla 2.6).

Tabla 2.5. Efecto del tamaño de muestra sobre la frecuencia de haplotipos en los datos de CTI.

Intervalo temporal	Haplotipos	Muestra original		Remuestreo (100 bootstrap)	
		# muestra	% frec.	# muestra	% frec.
C 3000 – 6000 años AP	S1	4	25	1,5 ± 0,93	23,14
	S5	5	31,25	2,2 ± 1,15	32,8
	S6	1	6,25	0,4 ± 0,50	6,75
	S7	1	6,25	0,4 ± 0,48	5,27
	S8	4	25	1,6 ± 0,99	25,27
	S9	1	6,25	0,4 ± 0,49	6,77
	total	16	100	6,6 ± 1,42	100
D 6000 - 12000 años AP	S1	3	16,7	1,3 ± 0,86	18,4
	S7	1	5,55	0,4 ± 0,49	5,7
	S8	11	61,1	4,3 ± 1,38	59,1
	S12	2	11,1	0,8 ± 0,68	11,6
	S13	1	5,55	0,3 ± 0,48	5,2
	total	18	100	7,3 ± 1,42	100

Tabla 2.6. Efecto del tamaño de muestra sobre las medidas de diversidad genética para el conjunto total de datos fósiles de CTI.

Sitio	# muestra	# Haplotipos	S	H	Pi
ACo	12	4	3	0,56061	0,00646
CdC	14	3	3	0,58242	0,00832
CTI	34	8	8	0,75401	0,01392
CTI remuestreo	14	5,52 ± 1,00	5,69 ± 1,13	0,76 ± 0,07	0,01 ± 0,00

DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo proporcionan nuevas evidencias en relación a la variabilidad genética y la abundancia relativa de *C. sociabilis* y *C. haigi* durante el Pleistoceno tardío y Holoceno en la región del Nahuel Huapi. A partir del análisis de las muestras fósiles y actuales de los sitios ACo, CdC y CTI, este estudio demuestra que la pérdida de variación genética en *C. sociabilis* fue espacialmente extendida, mientras que en *C. haigi* se mantuvo estable y congruente con los valores actualmente conocidos para otras especies de *Ctenomys* (Mora et al. 2007; Gonçalves y de Freitas 2009; Mapelli et al. 2012a). Por lo tanto, para *C. sociabilis* la pérdida de variabilidad genética detectada originalmente por Chan et al. (2005) en CTI no constituye un fenómeno local y exclusivo. En este sentido, los datos genéticos de ACo y CdC analizados en esta tesis proporcionan evidencias concretas de disminución y pérdida de diversidad genética en *C. sociabilis* a nivel haplotípico y nucleotídico in situ, culminando con la supervivencia de un único haplotipo en las poblaciones actuales. Estos resultados, combinados con los de CTI indican que en *C. sociabilis* la variabilidad genética se vio afectada en múltiples sitios. Por el contrario, para la especie congénérica *C. haigi* los datos genéticos de CdC presentados en esta tesis, al igual que los de CTI (ver Chan y Hadly 2011), sugieren una estabilidad genética durante el mismo período temporal. Además del diferente patrón de variabilidad genética observado entre estas especies durante los últimos 12000 años cal AP, también se observó un patrón diferente de cambio de abundancia relativa. Para *C. sociabilis* el registro fósil y los análisis de egagrópilas de *Tyto furcata* indican una disminución de su abundancia relativa hacia la actualidad, mientras que para *C. haigi* estos datos indican un aumento de su abundancia relativa.

Si bien los resultados de esta tesis muestran diferentes patrones de variabilidad genética y abundancia relativa entre las especies de *Ctenomys*, ciertos factores tales como diferencias en los tamaños muestrales podrían estar afectando los resultados (e.g. Goodall-Copestake et al. 2012; Mondol et al. 2013). El análisis de remuestreo, sin embargo, indicó que los valores más altos hallados en los índices de diversidad genética para *C. sociabilis* en CTI no se debieron al mayor tamaño muestral de este sitio. Al reducir el tamaño muestral en CTI la frecuencia y diversidad haplotípicas así como la diversidad nucleotídica no se vieron afectados. Por lo tanto, los mayores niveles de diversidad

genética hallados en *C. sociabilis* no fueron un resultado de diferencias en los tamaños muestrales. Por otro lado, el cambio en la proporción de *C. sociabilis* y *C. haigi* hallado en los especímenes secuenciados a lo largo del registro fósil tampoco se debió a un efecto de muestreo. En este caso, la selección al azar de los especímenes sin considerar rasgos morfológicos interespecíficos reflejó el patrón de abundancia relativa experimentado por estas especies. Por último, el conjunto de datos utilizados en esta tesis, el cual incluye además del registro fósil, muestras actuales (egagrópilas de lechuga y animales capturados) para los tres yacimientos, permitió confirmar el patrón revelado por los datos fósiles. En conjunto, lo expuesto en este párrafo permite afirmar que el patrón genético temporal y de abundancia relativa registrado en esta investigación refleja un proceso biológico real y no sesgos metodológicos.

Por otro lado, los bajos niveles de variabilidad genética encontrados para *C. haigi* podrían estar relacionados con el fragmento (136 pb) del gen de citocromo b que fue secuenciado. Si bien este fragmento presentó valores de divergencia interespecífica dentro del rango reportado para el gen completo (1140 pb) en *Ctenomys* (D'Elia et al. 1999; Castillo et al. 2005; Parada et al. 2011), la baja divergencia intraespecífica (i.e. bajos niveles de variabilidad nucleotídica) observada entre los intervalos temporales podrían ser el resultado de que el fragmento secuenciado es menos variable en *C. haigi* que en *C. sociabilis*. El análisis de diversidad genética a nivel de citocromo b de *C. haigi* respecto a otras especies de *Ctenomys*, como así también de otros fragmentos y de otros genes aportaría información relevante en este aspecto.

Patrones genéticos históricos: posibles explicaciones

Los distintos patrones de variabilidad genética y abundancia relativa detectados a través del tiempo entre *C. sociabilis* y *C. haigi* podrían ser atribuidos a distintos factores: diferencias en la tasa de evolución molecular del citocromo b, diferencias en el ambiente en el cual estas especies se distribuyen y/o diferencias en el uso del hábitat y la demografía. Si bien se ha observado que diferentes patrones y tasas de mutación pueden afectar los niveles de diversidad genética entre especies congénicas (Johns y Avise 1998; Sunyaev et al. 2003; Strandberg y Salter 2004), en este estudio el número de mutaciones detectadas fue similar entre las dos especies de *Ctenomys*. Esto sugiere que los diferentes niveles de variabilidad genética observados en el fragmento de citocromo b analizado no están asociados con diferencias en su tasa de mutación entre estas especies.

Por otro lado, diferencias en las condiciones ambientales generales (e.g. temperatura y precipitación) pueden causar distintos patrones de diversidad genética en especies y poblaciones debido a procesos adaptativos y/o estocásticos (Pamilo 1988). No obstante, dada la proximidad geográfica de *C. sociabilis* y *C. haigi* en el área de estudio (se encuentran separadas por el cauce del río Limay ~100 m; Pearson y Christie 1985; Lacey y Wieczorek 2003) estas especies han estado expuestas a las mismas condiciones ambientales generales y eventos naturales durante todo el período temporal examinado en este estudio. En consecuencia, las diferencias entre estas especies en los patrones de diversidad genética tampoco parecen estar relacionadas con diferentes presiones ambientales experimentadas por estas especies. Además, es razonable esperar que cualquier tipo de cambio en las condiciones ambientales generales hubiera tenido un impacto semejante en especies de tamaño corporal similar y con los mismos hábitos de vida, en este caso subterráneos (Nevo 1979).

Ctenomys sociabilis y *C. haigi* muestran diferencias en el uso del hábitat y en su demografía (Lacey et al. 1997, 1998; Lacey y Wieczorek 2003; Tammone et al. 2012); estas diferencias se consideran relevantes en los niveles poblacionales de variación genética de estas especies (Lacey 2001). Ambos aspectos estarían asociados con los diferentes patrones genéticos observados. *Ctenomys sociabilis* se distribuye exclusivamente en el ecotono de la región del Nahuel Huapi, principalmente en los bordes de mallín y áreas arbustivas con amplia cobertura de hierbas y gramíneas, mientras que *C. haigi* se distribuye ampliamente en casi todos los hábitats de la estepa y el ecotono por fuera de la distribución de *C. sociabilis* (Pearson y Christie 1985; Lacey y Wieczorek 2003; Tammone et al. 2012). Estas diferencias en el uso del hábitat probablemente están asociadas con diferencias interespecíficas sustanciales en la demografía, incluyendo patrones de dispersión y flujo genético entre poblaciones locales. Específicamente, la distribución espacial irregular de los hábitats utilizados por *C. sociabilis* hace que la dispersión esté restringida a los parches de hábitats (Lacey y Wieczorek 2003; Tammone et al. 2012), con el resultado de que el flujo de genes en esta especie debería verse reducido en comparación a *C. haigi*. Estas diferencias demográficas, a su vez, se espera que hubieran originado diferentes patrones de variabilidad genética históricos en estas especie, tal cual han sido reportadas en microsátélites (Lacey 2001). En consecuencia, la variación genética intrapoblacional en *C. sociabilis* es menor que en *C. haigi*. Sin embargo, el flujo genético reducido típicamente resulta en un incremento de la variación genética interpoblacional (Felsenstein 1976) y por lo tanto, la ausencia de variación

genética actual observada en *C. sociabilis* resulta inusual. En este sentido y considerando la aparente ausencia de selección para el haplotipo actual de *C. sociabilis*, este resultado parece más probable que refleje la interacción entre las frecuencias de haplotipos históricas y los patrones demográficos en relación al hábitat.

Comportamiento social

Un aspecto demográfico distintivo entre *C. sociabilis* y *C. haigi*, que ha sido objeto de especial atención, es la diferencia pronunciada en la estructura social (Lacey et al. 1997, 1998). Mientras que la vida solitaria es una característica común de casi todas las especies de *Ctenomys* incluida *C. haigi* (Reig et al. 1990; Lacey y Ebersperger 2007), *C. sociabilis* es una especie gregaria en la cual los grupos sociales surgen por filopatría natal de hembras (Lacey y Wiczorek 2004). En este caso, la formación de grupos sociales en esta especie, constituye un fenómeno demográfico que se espera que afecte la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones. Particularmente, la formación de grupos sociales matriarcales por filopatría natal estaría asociado con altos niveles de estructuración genética interpoblacionales, particularmente en marcadores de herencia materna como el citocromo b, generada por la agregación de individuos emparentados (Dobson 1998; Storz 1999).

Con el tiempo, la filopatría natal tendría al menos dos efectos importantes sobre los niveles de variabilidad genética en *C. sociabilis*. Primero, un movimiento reducido de individuos entre poblaciones locales que aumentaría las probabilidades de ocurrencia de endogamia y segundo, como se mencionó anteriormente, un flujo genético reducido que conduciría a una mayor diferenciación genética entre las poblaciones de esta especie en función de las mutaciones y la deriva genética. Ambos aspectos darían como resultado la presencia de diferentes combinaciones de haplotipos dentro de cada población. En los intervalos temporales más antiguos, esto se vio reflejado en el alto porcentaje de haplotipos exclusivos (92,3%) en las poblaciones de *C. sociabilis*. Sin embargo, la persistencia de un único haplotipo ampliamente distribuido en las poblaciones actuales (ver también Chan et al. 2005) contradice esta predicción y plantea otros interrogantes sobre la falta de variabilidad genética entre las poblaciones modernas de esta especie. Por el contrario, la vida solitaria de *C. haigi*, caracterizada por una alta frecuencia de dispersión de individuos emparentados estaría relacionado con bajos

niveles de divergencia entre poblaciones (i.e. bajos porcentajes de haplotipos exclusivos) y un elevado flujo genético comparados con los de *C. sociabilis* (Lacey 2001).

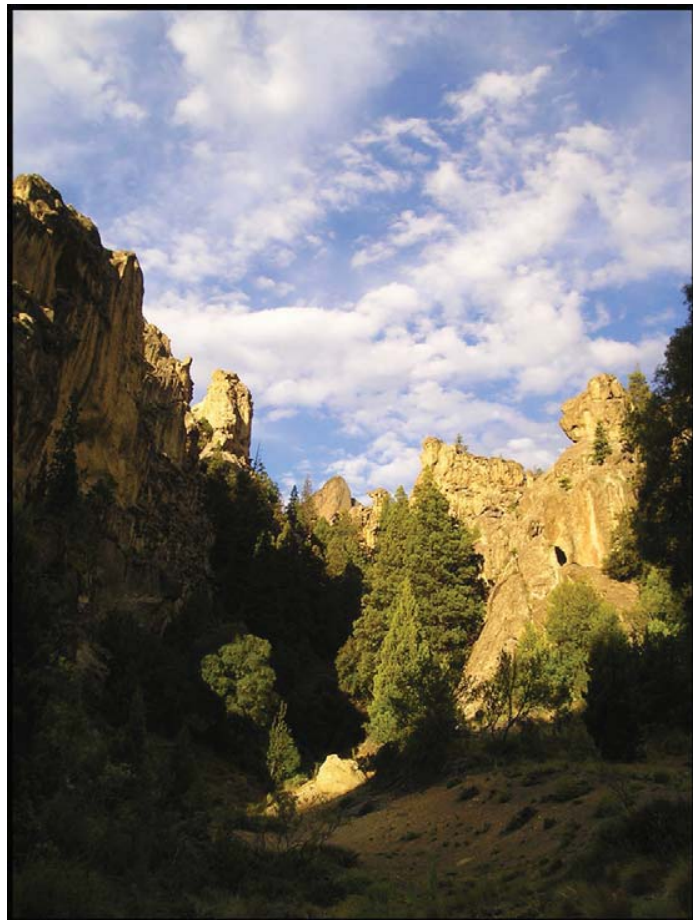
Las marcadas diferencias en el uso del hábitat, la demografía (e.g. dispersión) y la estructura social estarían causando un impacto sustancial sobre los niveles de variabilidad genética observados en estas especies de *Ctenomys*. Una vez que la sociabilidad (i.e. vida en grupo) evolucionó, esta probablemente aumento las diferencias demográficas de las especies debido a un aumento de la filopatría (disminución de la frecuencia de dispersión) favoreciendo la ocurrencia de diferentes patrones de estructura genética. Esto, combinado con un uso del hábitat más restringido en la especie social, podría ser la base de diferencias interespecíficas en respuesta a cambios ambientales, es decir que, cualquier cambio ambiental en el área de estudio afectaría a ambas especies y muy probablemente cada una estaría respondiendo de manera diferente. En este sentido, los distintos patrones de variabilidad genética detectados a lo largo del tiempo en *C. sociabilis* y *C. haigi* podrían ser explicados por una respuesta diferencial específica a los cambios externos.

Conclusiones

En resumen, los análisis desarrollados sugieren que *C. sociabilis* ha sufrido una pérdida de variabilidad genética y un decrecimiento en su abundancia relativa en diferentes localidades de su distribución geográfica. La cronología, a su vez, sugiere que estos cambios sucedieron previamente al impacto antrópico más reciente, pero no permitió determinar si el proceso ha pasado o continua sucediendo actualmente. Si bien, en el Capítulo 3 de esta tesis se exploran algunas hipótesis que podrían haber disparado la declinación poblacional de *C. sociabilis*, ciertos aspectos de la biología y la ecología de esta especie (e.i. uso del hábitat, demografía y estructura social) estarían involucrados en este proceso. Los datos temporales generados en esta tesis, combinados con modelos poblacionales que incluyan procesos demográficos y microevolutivos aportarían información importante para entender por qué *C. sociabilis* y *C. haigi* muestran distintos patrones temporales de variabilidad genética y abundancia relativa, como así también servirían para evaluar si estos factores representan una preocupación para la conservación de estas especies.

CAPÍTULO 3

Evaluación de factores promotores de la historia poblacional de
Ctenomys sociabilis



INTRODUCCIÓN

Los procesos de extinción biológica¹⁷ son un tema de importancia en el ámbito de la biología de la conservación y la biología evolutiva. El registro paleontológico junto con los datos actuales sobre extinción de especies indican que la tasa de extinción actual es de al menos dos órdenes de magnitud mayor que la tasa de extinción basal (Leakey y Lewin 1995; Barnosky et al. 2011; Proença y Pereira 2013). Para los mamíferos se reconoce que durante el Cuaternario tardío (Holoceno y tiempo histórico) se han extinguido alrededor de 255 especies (MacPhee y Flemming 1999; Turvey 2009), mientras que muchas otras se encuentran ya extintas en la naturaleza y/o en peligro crítico (Frankham et al. 2010; UICN 2015). En este sentido, el estudio de los procesos de extinción (i.e. determinar los factores que se relacionan con la declinación poblacional y/o extinción de especies), proporciona información útil para predecir futuros escenarios frente al cambio climático global y para elaborar estrategias de conservación para especies amenazadas (Willis et al. 2010).

Las extinciones pueden ser la consecuencia de una combinación de factores de tipo determinísticos (pérdida de hábitat, sobre explotación, introducción de especies) y/o estocásticos (genéticos, demográficos, ambientales y catastróficos; Lande 1999; Frankham 2005; Allendorf et al. 2013). La importancia de un tipo de factor sobre otro ha sido muy discutida (Lande 1988; Spielman et al. 2004; Koch y Barnosky 2006); un ejemplo claro de esto es el de las extinciones de la megafauna durante el Pleistoceno (e.g. Grayson y Meltzer 2003; Barnosky et al. 2004; Nogués-Bravo et al. 2010).

Sin duda, un aspecto importante en los procesos de extinción es la adaptabilidad o habilidad de las especies para adaptarse a diferentes entornos en un ambiente natural (Lynch y Lande 1993; Willi y Hoffmann 2009). Esta característica es clave para la persistencia de las poblaciones en un escenario de cambio ambiental como el actual (Bradshaw y Holzapfel 2006; Chevin et al. 2010; Chevin y Lande 2010). Aspectos relacionados con la biología de las especies, como por ejemplo las características demográficas y estructura social, pueden afectar las características genéticas de las poblaciones y, por lo tanto, afectar la persistencia de las poblaciones (Lande 1988; Willi y Hoffmann 2009). La adaptabilidad también está muy ligada a los procesos genéticos que sufrieron las poblaciones en el pasado, como por

¹⁷ Desaparición definitiva de todos los individuos de una especie (MacPhee 2013).

ejemplo una pérdida de variabilidad genética, ya que estos condicionan su capacidad de poder enfrentar los cambios ambientales actuales y futuros (Chevin et al. 2010).

En general, los estudios moleculares en especies en peligro de extinción están orientados a determinar la variación que presentan actualmente las poblaciones y, en menor medida, la magnitud o la tasa de pérdida de variación a través del tiempo. Este último aspecto ha recibido un énfasis limitado debido a la dificultad de detectar evidencias de cambios temporales en la diversidad genética a partir de muestras actuales (Matocq y Villablanca 2001; Drummond et al. 2003; Ramakrishnan y Hadly 2009). El análisis de series temporales de fósiles junto con sus datos genéticos permite inferir la historia evolutiva de una población o especie y detectar evidencias directas de cambios genéticos y demográficos en una escala temporal amplia (Drummond et al. 2003; van Tuinen et al. 2004; Beadell et al. 2009). Cuando nos enfrentamos con datos que sugieren tales cambios, es útil, además de analizar el registro fósil, estudiar la evolución climática y ambiental de la región con el fin de detectar eventos que pudieran estar asociados con los cambios genéticos y demográficos observados en el registro fósil de la población o poblaciones (van Tuinen et al. 2004; Ramakrishnan y Hadly 2009). Esto permite hipotetizar de qué manera la evolución de una población está impulsada por cambios en el ambiente (e.g. Hadly et al. 2004; Campos et al. 2010b; Brace et al. 2012; Rawlence et al. 2012).

Dado que las características ambientales limitan las áreas en donde una especie puede vivir y reproducirse, a nivel poblacional los cambios en los factores ambientales significan un impacto que puede afectar tanto la distribución geográfica como la abundancia de los individuos, e incluso provocar eventos de extinción (e.g. Chen et al. 2011; Brace et al. 2012; Prost et al. 2013). Cuando se dispone de datos sobre la abundancia relativa y la variabilidad genética de una especie en diferentes puntos en el tiempo y en el espacio, es posible poner a prueba hipótesis respecto a los procesos que moldearon la evolución de las poblaciones (Drummond et al. 2003; Ramakrishnan y Hadly 2009). Por ejemplo, si se considera que un cambio ambiental catastrófico (e.g. deforestación, evento volcánico), ocasionó la pérdida de haplotipos detectada en una especie cuya variación genética era mayor en el pasado -en comparación con la observada actualmente- se puede predecir que el evento de disminución de haplotipos será contemporáneo entre varias localidades. Contrariamente, si fue motivada por un cambio ambiental gradual (e.g. cambios de hábitat producto de variaciones climáticas no abruptas) se espera encontrar que la pérdida de variabilidad genética suceda de manera progresiva y asincrónica entre las localidades separadas espacialmente.

Utilizando la información proporcionada por los datos de ADN antiguo y los fechados radiocarbónicos obtenidos de fósiles de *Ctenomys* en los sitios Arroyo Corral I y II (en conjunto, ACo, de ahora en más) y Cueva del Caballo (CdC, de ahora en más), este capítulo explora, a partir de un análisis temporal, las posibles causas de la declinación poblacional y la pérdida de variabilidad genética para *C. sociabilis* durante el Holoceno, originalmente detectada en el yacimiento Cueva Traful I (CTI, de ahora en más; Chan et al. 2005; ver Capítulo 2).

En estos yacimientos, los datos genéticos de *C. sociabilis* muestran que durante el Holoceno esta especie sufrió una disminución en la abundancia relativa, pérdida de diversidad genética y extinciones locales (ver Capítulo 2). Los estudios realizados por Chan et al. (2005, 2006) en CTI sugieren que la pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* ocurrió entre los 3292-850 años ¹⁴C AP debido a un cuello de botella acaecido hace aproximadamente 2600 años cal AP. Estos autores propusieron las siguientes hipótesis para explicar el cuello de botella detectado en *C. sociabilis*: (1) una erupción volcánica ocurrida aproximadamente entre los 2350-2050 años cal AP; (2) competencia y reemplazo geográfico con *C. haigi*; y (3) cambios ambientales (i.e. declinación de los pastizales de estepa e incremento de ambientes boscosos). Sin embargo, estas hipótesis no fueron contrastadas.

En este capítulo, las hipótesis enunciadas por Chan et al. (2005, 2006) fueron reformuladas y puestas a prueba utilizando los datos combinados de *C. sociabilis* y *C. haigi* de los tres yacimientos estudiados. Se comparó la cronología de los datos paleogenéticos y los registros paleoambientales a través de los sitios y las especies. Particularmente, se examinó la potencial relación temporal de los cambios ambientales, ya fuere catastróficos o graduales ocurridos durante el Pleistoceno tardío-Holoceno con el patrón de cambio genético y abundancia relativa detectados en las dos especies de *Ctenomys* en ACo, CdC y CTI. Se evaluó también el papel de la competencia interespecífica entre ambas especies.

HIPÓTESIS 1: ERUPCIONES VOLCÁNICAS

La Zona Volcánica Sur (SVZ¹⁸, de ahora en más) de los Andes, en la región noroeste de Patagonia, está compuesta por un cinturón de volcanes activos entre los 33-46°S (Stern 2004). Su actividad volcánica es muy evidente en el registro geológico, principalmente al este de los Andes, en Argentina, cuyo suelo está compuesto en buena medida por andisoles, resultado de la acumulación de ceniza volcánica transportada por los vientos dominantes del oeste (Villarosa et al. 2006; Corbella y Lara 2008; Daga et al. 2010). Los volcanes de la SVZ han estado intensamente activos durante el período postglaciar (Gerlach et al. 1988; Villarosa et al. 2006). Su área de influencia ha cubierto con capas de tefra¹⁹ gran parte del rango geográfico de *C. sociabilis* y, en menor medida, *Chaigi*, en la región del Nahuel Huapi (Figura 3.1A). El Complejo Volcánico Puyehue-Córdon Caulle (CVPCC, de ahora en más) es un centro de actividad volcánica recurrente de la SVZ. El CVPCC presentó registros de actividad durante el Pleistoceno superior-Holoceno y tiempos históricos (Gerlach et al. 1988; Lara et al. 2006), con una reciente erupción el 4 de julio de 2011 (Collini et al. 2013). Gran parte de las tefras que cubren la región al norte del lago Nahuel Huapi, incluidas las correspondientes a las erupciones históricas de 1921, 1960 y 2011, corresponden al CVPCC (Villarosa et al. 2006; Singer et al. 2008; Daga et al. 2010).

Los cambios ambientales generados por la caída de tefra durante una erupción volcánica pueden ser desde leves a muy severos, según sea su índice de explosividad volcánica (VEI²⁰, de ahora en más). El VEI (Newhall y Self 1982) es un índice utilizado para cuantificar la magnitud de un episodio eruptivo. De acuerdo al mismo, un VEI = 0 corresponde a una erupción no explosiva, un VEI ≥ 1 , explosiva y así en aumento en magnitud hasta 10. En general, cuanto mayor es el tiempo entre erupciones, más explosiva y por lo tanto de mayor magnitud es la siguiente erupción (Simkin y Siebert 1994). En Patagonia, la erupción de los volcanes Hudson en 1991 y Chaitén en 2008 fueron VEI ~ 5 , causando daños graves en la ganadería y agricultura local y regional (Tilling 2009; Wilson et al. 2011). Por su lado, la fauna nativa de mamíferos medianos y grandes, se vio poco afectada y meses después de la erupción, las poblaciones ya se encontraban en sus niveles

¹⁸ Del inglés, Southern Volcanic Zone

¹⁹ Fragmentos menudos de roca ígnea volcánica expulsados por la columna eruptiva de un volcán en erupción. En el área de estudio se encuentran tefras de tipo ceniza ($< 2 \text{ mm } \varnothing$) y lapilli (entre 2 y 64 mm \varnothing).

²⁰ Del inglés, Volcanic Explosivity Index.

demográficos normales; incluso la población de pequeños mamíferos aumentó debido a la ausencia de ganado, que había sido diezmada por la ceniza (Pearson 1994; Saba y de Lamo 1994). Por el contrario, en diferentes poblaciones de *Ctenomys* se ha encontrado que la caída de tefra provocada por las erupciones de los volcanes Hudson en 1991 y Lonquimay en 1988, generaron una reducción importante del tamaño efectivo poblacional y la variación genética alozímica en poblaciones próximas a estos volcanes (Gallardo y Kohler 1994; Gallardo et al. 1996).

Las capas de tefra depositadas al norte del lago Nahuel Huapi proporcionan marcadores cronológicos que pueden ser utilizados para correlacionar eventos geológicos y climáticos (Villarosa et al. 2006). En esta zona, una capa de tefra muy característica es la denominada Tefra Nahuel Huapi (NHT²¹, de ahora en más), constituida por lapilli pumíceo blanco (Auer 1960; Laya 1977; Crivelli Montero y Silveira 1983). La tefra ha sido identificada a partir de testigos sedimentológicos lacustres, perfiles estratigráficos de excavaciones arqueológicas -incluyendo CTI- y perfiles de caminos. Esta tefra alcanza los 2 m de espesor en la frontera entre Chile y Argentina y se adelgaza rápidamente hacia el este alcanzando ~ 0,2 m en el perfil estratigráfico de CTI (Crivelli Montero et al. 1993; Villarosa et al. 2006). El gráfico de isopacas²² de esta tefra sugiere que el foco eruptivo se encontraba en el CVPCC (Figura 3.1 B). La correlación de 9 dataciones radiocarbónicas obtenidas en diferentes localidades para la tefra NHT permitió acotar el momento de su depositación entre un rango de edad probable de 2070-2325 años cal AP (Villarosa et al. 2006; Villarosa 2008). La presencia de la tefra NHT en CTI, junto con la estimación de ocurrencia de un cuello de botella en *C. sociabilis* ~ 2600 años cal AP en este yacimiento y la subsecuente desaparición de esta especie en el registro fósil, llevaron a proponer a este episodio eruptivo como responsable de la pérdida de diversidad genética en *C. sociabilis* (Chan et al. 2005; Chan y Hadly 2011).

Considerando los resultados obtenidos a partir de los datos genéticos de esta tesis la hipótesis es reformulada para los tres depósitos, como sigue:

H1: La depositación de la tefra NHT fue la causa del cuello de botella y de la pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* observada en ACo, CdC y CTI.

²¹ Del inglés, Nahuel Huapi Tefra.

²² Gráfico de curvas trazadas uniendo puntos de igual espesor que muestran las potencias variables de una unidad estratigráfica.

P1: La pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* en los tres sitios ocurre de manera sincrónica y es temporalmente concordante o inmediatamente posterior a la fecha estimada de depositación de la tefra NHT.

Para poner a prueba esta hipótesis, los datos genéticos de *C. sociabilis* obtenidos en este estudio fueron analizados sobre una escala temporal calibrada, determinada a partir de las fechas radiocarbónicas y los modelos cronológicos de edad-profundidad elaborados para cada depósito. La Figura 3.2 muestra, sobre la escala cronológica, la distribución temporal de cada haplotipo del citocromo b de *C. sociabilis* en ACo, CdC y CTI, según la fecha radiocarbónica estimada para cada espécimen. A partir de estos análisis se determinó que las fechas estimadas entre los yacimientos para el evento de pérdida de diversidad genética en *C. sociabilis* no resultan sincrónicas. Además, en los tres sitios el rango de fechas más probable para la pérdida de diversidad genética fue previo a la fecha estimada de depositación de la tefra NHT (Figura 3.2).

Los datos genéticos de *C. sociabilis* para CTI indican que luego de los 3537 años cal AP (3293 ± 43 años ^{14}C AP) la especie desaparece del registro fósil (Chan et al. 2005; Figuras 2.2 y 3.2). En esta fecha se encontraron 3 haplotipos (sobre un n total de 4 especímenes de *Ctenomys* estudiados) co-ocurriendo, el haplotipo actual y 2 haplotipos extintos (Figura 3.2). Estos datos, en combinación con la ausencia de *C. sociabilis* en trampeos realizados en la región y en las egagrópilas frescas de individuos de *Tyto furcata* colectadas en el sitio (Pearson y Pearson 1993; esta tesis) sugieren una extinción durante el Holoceno tardío. La extinción, sin embargo, no se ve precedida por una pérdida de haplotipos como se observa en el sitio vecino CdC (véase más adelante). En ACo (~ 23 km al sur de CTI) ubicado dentro del rango geográfico actual de *C. sociabilis*, los datos genéticos sugieren que la pérdida de variabilidad ocurre entre los 4166-2546 años cal AP. La escala cronológica indica que hasta los 4166 años cal AP los especímenes fósiles secuenciados (n = 7) mostraron 4 variantes haplotípicas, mientras que a partir de los 2546 años cal AP y hasta los 966 años cal AP, los especímenes fósiles secuenciados (n = 5) mostraron el mismo haplotipo (i.e. haplotipo actual) que los especímenes actuales (n = 9) que fueron capturados alrededor del sitio. Esto sugiere que la pérdida de haplotipos de *C. sociabilis* en ACo es previa a los 2546 años cal AP. Por otro lado, en la Figura 3.1 B, se puede observar que la ubicación geográfica de ACo se emplaza por fuera de la estimación máxima de dispersión actual de la tefra NHT (Villarosa et al. 2006; Villarosa 2008), lo cual sugiere que las poblaciones de *C. sociabilis* cercanas a ACo se habrían visto menos afectadas que las poblaciones de CTI y CdC,

incluidas dentro del límite de dispersión de la tefra. Sin embargo, se observa pérdida de haplotipos en los tres sitios (Figura 3.2).

La escala cronológica para los especímenes de CdC indica que la pérdida de variantes haplotípicas sucede entre los 6223-4301 años cal AP (Figura 3.2). Las secuencias nucleotídicas de 10 especímenes ubicados temporalmente antes de los 6223 años cal AP mostraron 3 variantes haplotípicas, mientras que a partir de los 4301 y hasta los 2833 años cal AP, las secuencias de 4 especímenes señalan únicamente la ocurrencia del haplotipo actual. Luego de los 2833 años cal AP, *C. sociabilis* desaparece del registro fósil de CdC, indicando su extinción local, dado que tampoco se encuentra en las egagrópilas de individuos de *Tyto furcata* que actualmente habitan el sitio. Teniendo en cuenta el segmento temporal donde se ubica la pérdida de variantes haplotípicas (6223-4301 años cal AP) es posible determinar que dicho evento sucedió en CdC aproximadamente 1000 años antes (o más) que en CTI. El contraste temporal de este último resultado, considerando la proximidad geográfica de los sitios CTI y CdC (~ 5 km; Figura 3.1 A), sugiere que es poco probable que un cambio abrupto, como lo es una erupción volcánica, haya sido la causa del cuello de botella y subsecuente pérdida de diversidad genética observada en *C. sociabilis*.

Los datos genéticos de ACo, CdC y CTI, tomados en forma conjunta, sugieren que la pérdida de haplotipos de *C. sociabilis* ocurre en diferentes segmentos temporales entre los sitios, en todos los casos, antes de la fecha estimada de depositación de NHT, incluso las extinciones locales detectadas para esta especie en CdC y CTI se ubican temporalmente antes del evento téfrico. Estos resultados indican que los eventos volcánicos de 2070-2325 años cal AP, asociados con la tefra NHT no son concordantes con la pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis*, ni tampoco con las extinciones locales en CdC y CTI. Por lo tanto, estos resultados contradicen tanto la H1 como la P1.

La secuencia estratigráfica de los sitio ACo y CdC no sugieren otros eventos volcánicos, al menos con registros preservados en las fechas donde se observa la pérdida de haplotipos en estos sitios. Estas evidencias apoyan la idea de que la pérdida de variabilidad genética en *C. sociabilis* no fue la consecuencia de erupciones volcánicas y depositación de tefras.

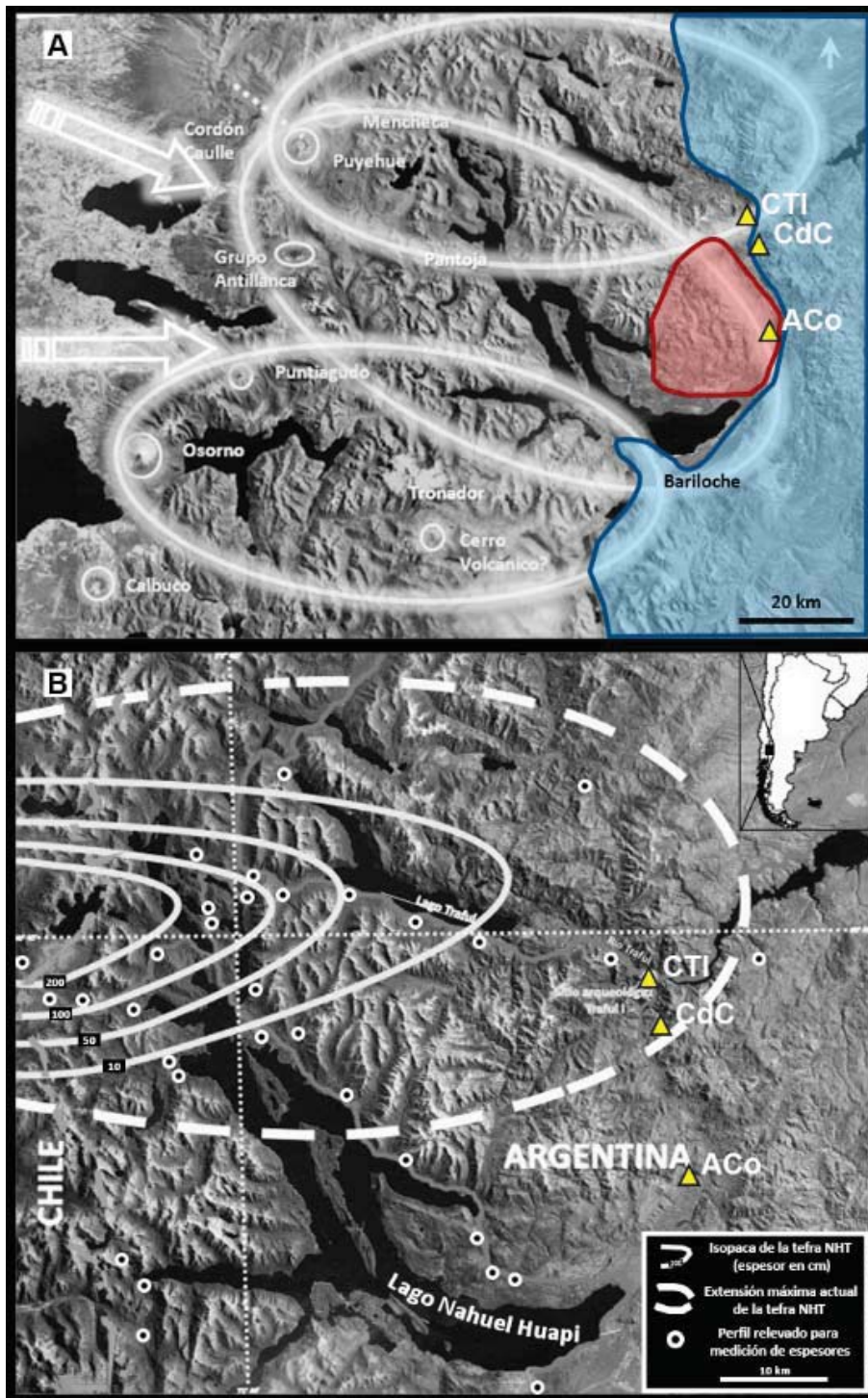


Figura 3.1. A) Área de influencia de los volcanes activos del Holoceno (Villarosa 2008). Las flechas señalan la dirección de los vientos dominantes. Las elipses señalan el área de dispersión probable de la caída de cenizas. B) Isopacas de la NHT (Villarosa 2008). Polígono rojo = área de distribución actual de *C. sociabilis*; polígono azul = área de distribución actual de *C. haigi*. Los triángulos indican la ubicación de los yacimientos estudiados. Figuras modificadas de Villarosa 2008.

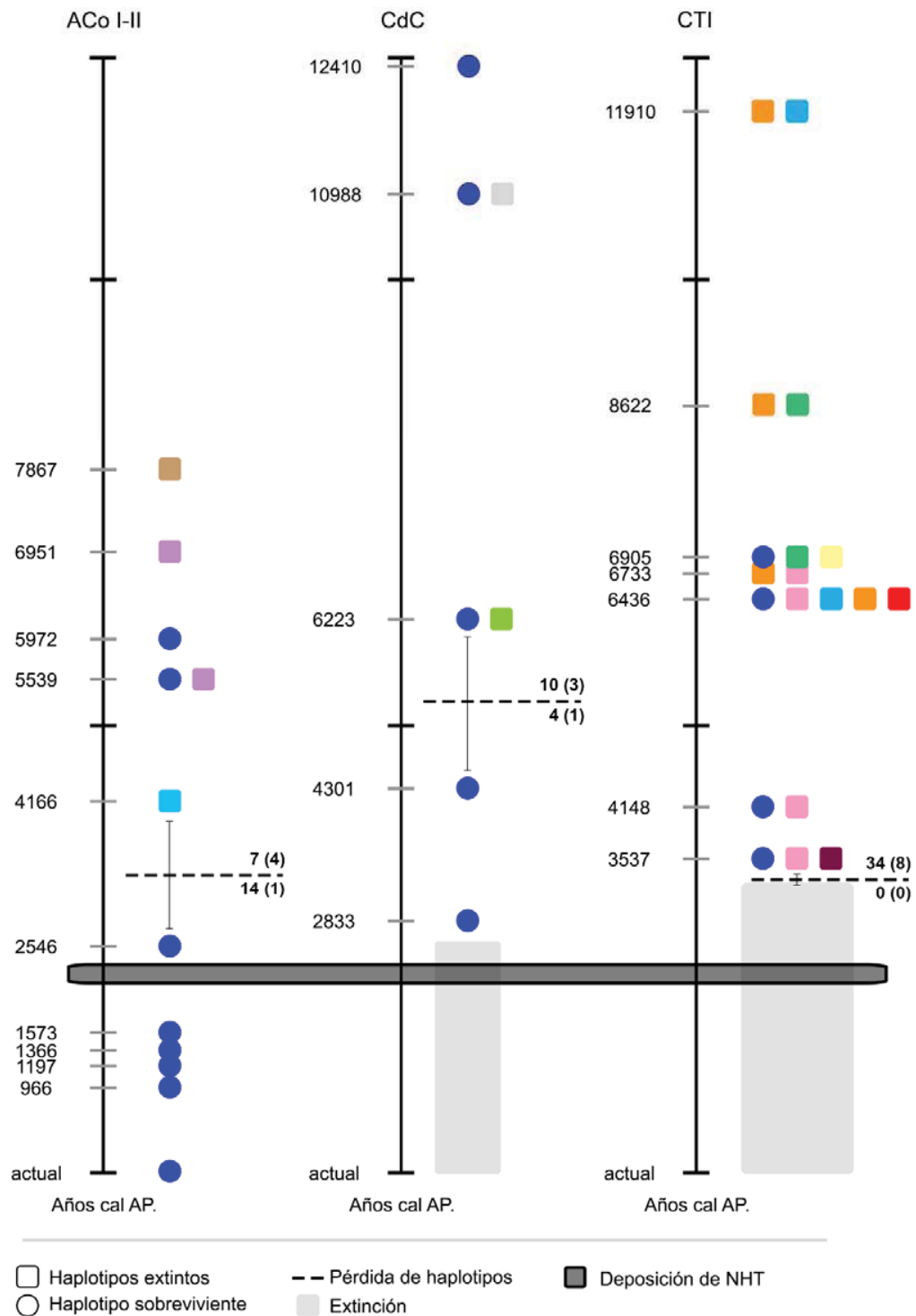


Figura 3.2. Escala cronológica de distribución de haplotipos de *C. sociabilis* en ACo, CdC y CTI y su relación con la depositación de la tefra NHT. Los números por arriba y por debajo de las líneas de puntos indican el número de especímenes secuenciados antes y después de la fecha estimada de pérdida de haplotipos; entre paréntesis se indica el número de haplotipos.

HIPÓTESIS 2: COMPETENCIA ENTRE *C. SOCIABILIS* Y *C. HAIGI*

Las poblaciones actuales de *Ctenomys sociabilis* presentan tamaño pequeño, las crías hembras mayormente son filopátricas, son microendémicas y están restringidas a hábitats húmedos y arbustivos en el ecotono bosque/estepa en la Sierra de Cuyín Manzano²³, provincia del Neuquén (Lacey y Wieczorek 2003, 2004; Tammone et al. 2012). Estas características hacen que las poblaciones de esta especie sean más vulnerables a sufrir extinciones locales y pérdida de rango geográfico, en comparación con el parapátrico *C. haigi*, cuyas poblaciones actuales son de mayor tamaño, todas las crías se dispersan, son de amplia distribución y más generalistas en las condiciones de hábitat (Lacey y Wieczorek 2003, 2004). Las diferencias de uso del hábitat y demográficas entre estas especies probablemente aumenten la capacidad de *C. haigi* de encontrar y potencialmente invadir nuevos hábitats, y por lo tanto favorecerla competitivamente si la abundancia relativa de *C. sociabilis* disminuye (e.g. Vassallo 1993). Consecuentemente, la disminución de la abundancia relativa (i.e. tamaño efectivo poblacional) de esta última tendría efectos importantes sobre su diversidad genética (Patton y Yang 1977; Lande 1999). Algunos estudios han demostrado en otras especies de *Ctenomys* (Vassallo 1993; Kubiak et al. 2015) y más generalmente de roedores subterráneos (Thaeler 1968), que la competencia en relación al uso del hábitat es un componente importante en la estructuración espacial de estos animales y por lo tanto en los patrones de variación genética (Steinberg y Patton 2000).

El incremento en la abundancia relativa de *C. haigi* y la disminución de la abundancia de *C. sociabilis* que se verifica en CTI durante el Holoceno, junto con su extinción local y la ocurrencia cercana de *C. haigi*, llevaron a Chan et al. (2005) a proponer que la competencia entre estas especies podría ser responsable del decrecimiento y pérdida de diversidad en *C. sociabilis*. Sin embargo, por si solos, los datos de CTI no permiten distinguir esta interacción, incluso aplicando modelos demográficos (Chan y Hadly 2011). En este sentido, los restos fósiles de *C. sociabilis* y *C. haigi* recuperados en ACo y CdC (ver Capítulo 2), en combinación con los datos para CTI, proporcionan un rango espacial más amplio y permiten poner a prueba la hipótesis de exclusión competitiva, cuya reformulación es como sigue:

²³ Muy recientemente se ha detectado una población –representada por algunos pocos ejemplares coleccionados y que aparentemente estaría extinta– en cercanías de El Maitén, Chubut (Tammone y Lacey 2014).

H2: La pérdida de diversidad genética y declinación poblacional de *C. sociabilis* está relacionada con la aparición en su rango geográfico del competidor *C. haigi*.

P2: La pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* se observa únicamente en los sitios con co-ocurrencia sincrónica de ambas especies de *Ctenomys*.

Para evaluar el papel potencial de la competencia interespecífica sobre la pérdida de diversidad genética y la disminución en la abundancia relativa de *C. sociabilis* se analizaron ambos aspectos para las dos especies de *Ctenomys* a lo largo del registro fósil de los sitios ACo y CdC. Para este propósito, se calculó la proporción de cada especie sobre la escala cronológica de cada depósito a partir de la identificación genética de los especímenes fósiles secuenciados (ver Capítulo 2). En dicha escala, se ubicó la fecha estimada para la ocurrencia de la pérdida de haplotipos de cada sitio. El patrón de cambio de abundancias en ACo y CdC fue comparado en el obtenido en CTI.

En CdC y CTI, la identificación de los restos fósiles de *Ctenomys* realizada a partir de las secuencias nucleotídicas muestra que durante el Holoceno *C. sociabilis* es reemplazada totalmente por *C. haigi* y que en ambos sitios la pérdida de variabilidad genética detectada en *C. sociabilis* podría asociarse a una disminución de la proporción de esta especie y a un aumento en la proporción de *C. haigi* (Figura 3.3). Por el contrario, en ACo, las secuencias nucleotídicas de los restos fósiles de *Ctenomys* indican que todos los especímenes (n = 12) corresponden a *C. sociabilis*. A partir de un relevamiento de campo se determinó que las poblaciones de *Ctenomys*, que se distribuyen actualmente en los alrededores de ACo también corresponden a esta especie. Esto sugiere que la proporción de *C. sociabilis* se mantuvo constante en la vecindad del sitio durante todo el periodo temporal abarcado por el depósito (Pleistoceno tardío–Holoceno). En este sitio, la presencia de *C. haigi* se detectó únicamente en las egagrópilas frescas de *Tyto furcata* (Figura 3.3). Estos especímenes son capturados por las lechuzas muy probablemente sobre la margen este del río Limay, 2 km al este del sitio (dentro del rango de caza de la lechuza) donde se verifican poblaciones de *C. haigi*. Esto indica que la pérdida de variabilidad genética de *C. sociabilis*, al menos en ACo, no puede vincularse ni con una disminución en la abundancia relativa de *C. sociabilis* ni con la presencia de *C. haigi*. Por lo tanto, estos resultados contradicen tanto la H2 como la P2. Al mismo tiempo, esto sugiere que en CdC y CTI el cambio de

proporciones de estas especies debe haber sucediendo por otro proceso que no es la competencia.

Es importante destacar que en todas estas apreciaciones se debe tener en cuenta que los registros fueron generados por la acción depredadora de lechuzas. Por lo tanto, cuando aquí se efectúan indicaciones sobre presencia o ausencia, están implicando círculos teóricos que corresponden al radio de forrajeo de estas aves (alrededor de 2,5 km; Taylor 1994).

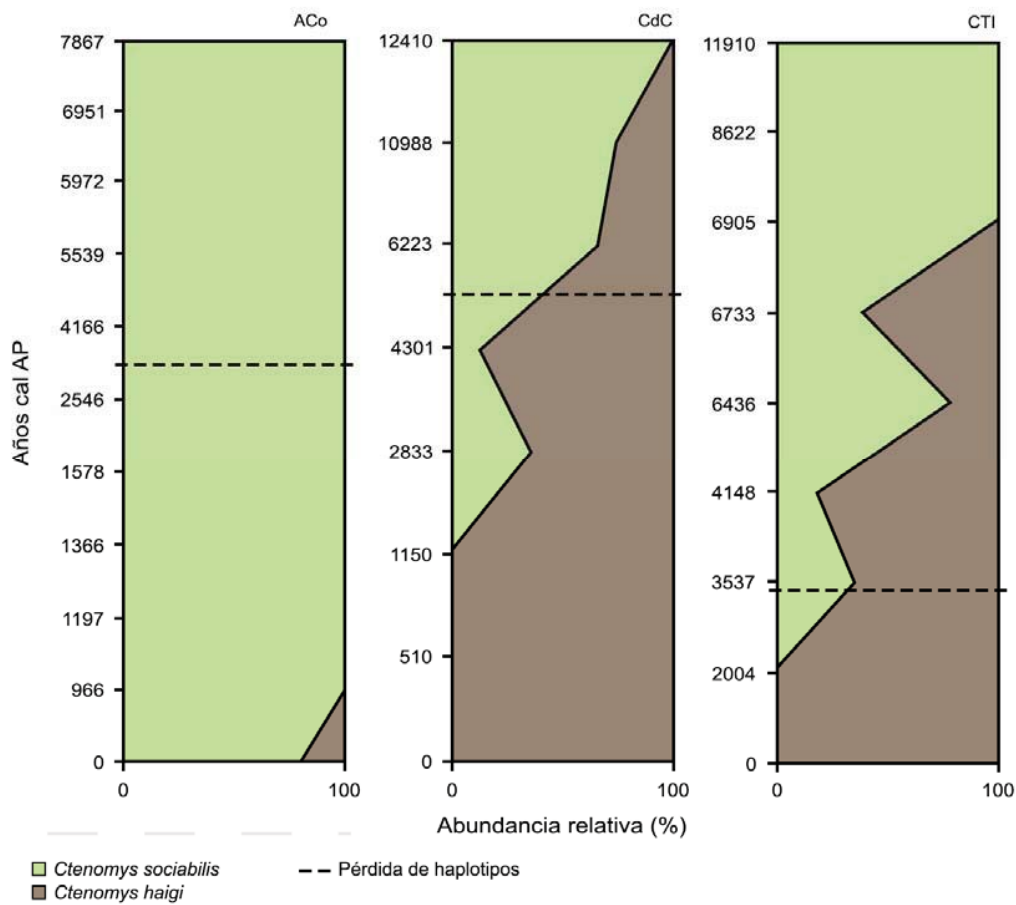


Figura 3.3. Abundancia relativa estimada para *C. sociabilis* y *C. haigi* según la proporción calculada a partir de las identificaciones genéticas de los especímenes fósiles secuenciados en cada yacimiento. La proporción de *C. haigi* en ACo se debe a su presencia en las egagrópilas actuales de *Tyto furcata* (ver pág. 85).

HIPÓTESIS 3: CAMBIOS AMBIENTALES

La historia ambiental de la región del Nahuel Huapi es, sin duda, un componente importante en la evolución de la flora y fauna del norte de Patagonia (Ruzzante y Rabassa 2011). Producto del fenómeno conocido como sombra pluvial de cordillera, la región está dominada por un gradiente extremo de precipitación de oeste a este (-35 mm/km) que actualmente produce un ecotono entre el bosque templado y la estepa patagónica (e.g. Markgraf 1983; Ezcurra y Brion 2005; Mermoz et al. 2009; Bianchi y Ariztegui 2012). En el ecotono, cambios sutiles de alguna condición limitante (e.g. precipitación) producen respuestas significativas en la distribución de especies dominantes y su comunidad asociada (Kitzberger 2012). Por esto, los ambientes de ecotono están probablemente entre las regiones más dinámicas del planeta y es en donde los cambios ambientales se hacen más evidentes (Kitzberger 2012).

El registro paleoecológico de la región del Nahuel Huapi indica que, a causa de las variaciones históricas en las precipitaciones y temperaturas, el ecotono ha sufrido cambios significativos en la flora, distribución de hábitats y ensambles de pequeños mamíferos (e.g. Markgraf 1983; Pearson 1987; Monjeau 1989; Bianchi et al. 1999; Pardiñas 1999b; Premoli et al. 2000; Heusser 2003; Iglesias et al. 2014; Tammone et al. 2014). De esta manera, los cambios climáticos ocurridos durante el Holoceno muy probablemente afectaron el ambiente donde vivieron las poblaciones de *C. sociabilis* y *C. haigi*. Sin embargo, la distribución de *C. sociabilis* exclusivamente en hábitats de ecotono, en comparación con los hábitos más lábiles de *C. haigi* (Lacey y Wiczorek 2003; Tammone et al. 2012) podrían haber contribuido a que esta especie fuera más afectada y, quizás, ser la causa de la pérdida de diversidad genética observada.

En comparación con las consecuencias inmediatas y más localizadas causadas por los cambios ambientales abruptos (i.e. catastróficos), como por ejemplo una erupción volcánica, los cambios ambientales de tipo climático (e.g. variaciones en temperatura y precipitación) resultan más graduales y generan gradientes ambientales extendidos en el tiempo. Esta diferencia espacial y temporal podría gatillar procesos microevolutivos aleatorios o adaptativos diferenciales dependientes de cual fuera el cambio ambiental. En consecuencia, se espera que las poblaciones naturales muestren distintos patrones de cambio en su rango geográfico y en su diversidad genética, tanto espacialmente como

temporalmente, según el tipo de cambio experimentado en su entorno (Channell y Lomolino 2000; Chevin y Lande 2010; Pauls et al. 2013). Por ejemplo, bajo un escenario de cambio ambiental gradual, se esperaría que la diversidad genética de una especie se vea afectada en diferentes momentos en el tiempo en distintos sitios.

Para evaluar si los cambios climáticos estuvieron relacionados con la pérdida de diversidad genética, las variaciones de abundancia relativa y las extinciones locales observadas en *C. sociabilis* se propone la siguiente hipótesis:

H3: La pérdida de diversidad genética y la declinación poblacional de *C. sociabilis* se deben a los cambios de hábitat asociados con la variación en las precipitaciones ocurridas durante el Holoceno en el noroeste de Patagonia.

P3: Tanto la pérdida de diversidad genética como la disminución poblacional de *C. sociabilis* no necesariamente deben ser sincrónicas entre sitios alejados espacialmente y son coincidente con el avance y establecimiento de los bosques densos.

Para contrastar esta hipótesis, los tiempos estimados en que ocurre la pérdida de haplotipos en cada sitio fueron analizados en relación a la reconstrucción de las precipitaciones medias de verano inferidas para el Holoceno (Markgraf et al. 2002). Por otro lado, esta curva de precipitaciones se relacionó con la curva de abundancia relativa de *C. sociabilis* y *C. haigi* para los sitios ACo y CdC. Para estos análisis, la proporción obtenida para las especies de *Ctenomys* a partir de los datos de ADN antiguo de cada sitio, se trasladó al total de MNI de *Ctenomys* respecto de todas las especies de pequeños mamíferos que se encontraron en cada sitio (Tammone et al. 2014).

Como se indicó anteriormente, la distribución temporal de los haplotipos de *C. sociabilis* en ACo, CdC y CTI muestra que la pérdida de haplotipos sucede en diferentes segmentos temporales (Figuras 3.2 y 3.4). La continuidad y superposición temporal de los eventos de pérdida de diversidad entre los sitios estudiados sugiere que, a nivel regional, estos habrían impactado –como máximo– en un segmento temporal de 4000 años (6000-2000 años cal AP; Figura 3.4). Si bien estos segmentos temporales individuales pueden estar sobreestimados, el solapamiento parcial entre ACo y CTI y la ausencia de superposición de CdC, sugiere que la pérdida de diversidad genética ocurre de manera gradual y sucesional. Este resultado ajusta con la predicción P3. Por otro lado, la dinámica geográfico-temporal de la declinación poblacional de *C. sociabilis* indica que las poblaciones del norte (CTI y

CdC) del rango de distribución de la especie fueron las más afectadas, mientras que en ACo, la localidad más próxima al centro de distribución geográfica, la especie persistió (Figura 3.1). Esto podría estar relacionado con las diferencias en el grado de aislamiento y el tamaño de las poblaciones de *C. sociabilis* en cada localidad. La aparición de *C. haigi* en el registro fósil de CdC y CTI (Figura 3.3) podría ser el resultado de dispersiones de poblaciones de esta especie desde el este y, en consecuencia, las lechuzas comienzan a detectar esta presa que así se incorpora al registro.

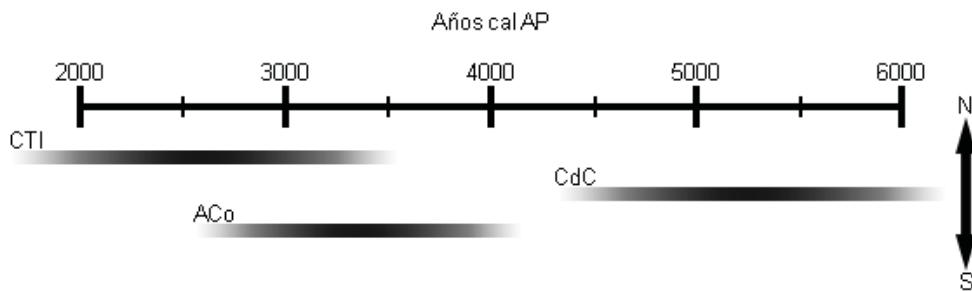


Figura 3.4. Segmento temporal estimado para la ocurrencia de la pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* durante el Holoceno entre los sitios dispuestos en un orden norte-sur. La estimación en CTI corresponde a Chan et al. (2006).

La abundancia relativa de *C. sociabilis* en ACo y CdC sugiere una disminución poblacional sustancial durante el Holoceno medio; mientras que en ACo se habría perdido un 60% de la población, en CdC habría alcanzado un 70% (Figura 3.5). Esta disminución, sin embargo, se observa en diferentes segmentos temporales. Mientras que en ACo ocurre entre los 7867 y los 5972 años cal AP, en CdC se verifica entre los 6223 y los 4301 años cal AP. Este resultado también ajusta con la predicción P3. De acuerdo con la reconstrucción de las precipitaciones medias de verano (Markgraf et al. 2002), la disminución poblacional y pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* coincide con un incremento sostenido de las precipitaciones a partir de los 8000 y hasta los 6000 años cal AP, que duplica las precipitaciones actuales (Figura 3.5). El registro polínico obtenido en múltiples sitios entre los 41° y 43° S indica que este incremento en las condiciones de humedad se relacionaría con una elevada tasa de cambio de la composición vegetal entre elementos boscosos y esteparios, favoreciendo el desarrollo de bosques de *Nothofagus dombeyi* y *Austrocedrus chilensis* en detrimento de áreas esteparias de Poaceas y Asteraceas (Markgraf 1984; Markgraf et al. 2002; Bianchi y Ariztegui 2012; Iglesias et al. 2014). El desarrollo de bosques

densos de *Nothofagus* y en particular de *Austrocedrus*, con el consecuente desplazamiento del ecotono hacia el este respecto a su posición durante el Holoceno temprano (cf. Iglesias et al. 2012b, 2014) habría generado una disminución generalizada de los hábitats abiertos ocupados por *C. sociabilis*. Este efecto climático sostenido en el tiempo hasta por lo menos los 2000 años cal AP habría provocado la declinación poblacional de *C. sociabilis* debido a la pérdida de hábitat y posiblemente su extinción en CdC y CTI, favorecida en estos casos por el aislamiento de estas localidades debido a sistemas orográficos y barreras fluviales.

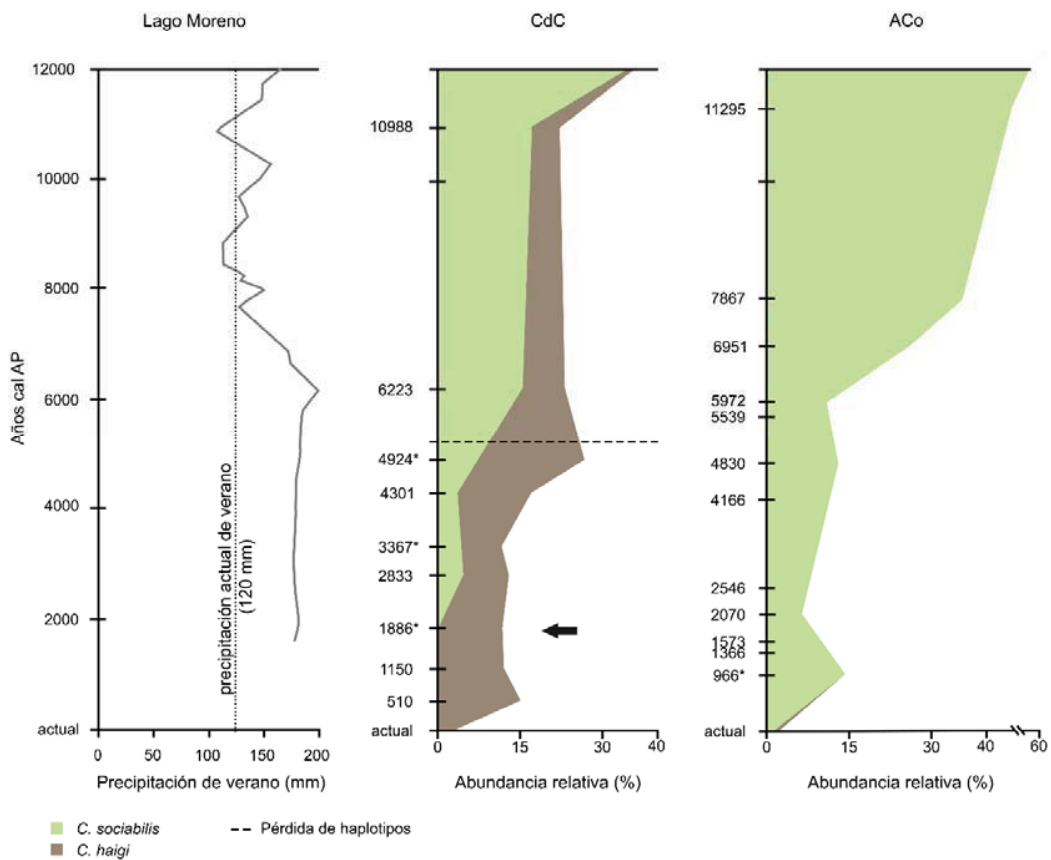


Figura 3.5. Reconstrucción de la precipitación histórica de verano según el registro polínico de Lago Moreno (Markgraf et al. 2002). Abundancia relativa estimada para cada especie de *Ctenomys* en los depósitos CdC y ACo según la proporción obtenida a partir de las secuencias nucleotídicas de ADN antiguo. La curva de abundancia representa el valor total de MNI estimado de *Ctenomys* respecto al resto de todas las especies de mamíferos pequeños que se encontraron en cada sitio. La flecha indica la fecha estimada de extinción de *C. sociabilis* en CdC.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados expuestos en este capítulo sugieren que los cambios climáticos que afectaron el noroeste de Patagonia durante el Holoceno tuvieron efectos significativos en la diversidad genética y la abundancia relativa de *C. sociabilis*. En contraste, indican que los eventos volcánicos que provocaron la caída de la tefra NHT y la potencial competencia interespecífica entre *C. sociabilis* y *C. haigi* no habrían estado relacionados con la declinación poblacional detectada en dicha especie.

Desde el Pleistoceno medio-tardío y hasta la actualidad, la región del Nahuel Huapi se ha visto afectada por la actividad volcánica recurrente de la SVZ de los Andes (Lara et al. 2006; Villarosa et al. 2006; Singer et al. 2008). Esto sugiere que la caída de tefra producida por esta actividad fue un elemento recurrente a lo largo de la historia evolutiva de las poblaciones estudiadas de *Ctenomys*, siempre y cuando se asuma que las mismas habitan la zona desde, al menos, el Plio-Pleistoceno. Sin embargo, los efectos de estos eventos –a nivel de potencial impacto sobre las poblaciones- no se reflejan en el registro fósil estudiado, incluso para el más conspicuo que ha quedado preservado, la tefra NHT (Villarosa et al. 2006; Lirio 2011). Estudios preliminares sobre la reciente erupción del CVPCC que afectó el área de distribución de *C. sociabilis* no sugieren efectos demográficos drásticos, mientras que si se verificaron cambios en la dieta (Lacey et al. 2014). Estos datos sugieren cierto grado de plasticidad fenotípica (e.g. cambios en los hábitos alimenticios) a corto plazo que podría favorecer la persistencia local de la especie. Por otro lado, los datos genéticos de *C. sociabilis* en ACo permitieron inferir que la pérdida de diversidad genética detectada en esta especie resulta independiente, al menos temporalmente, de la aparición de *C. haigi*. Además, teniendo en cuenta que la gran mayoría de las especies del género *Ctenomys* se distribuyen de manera alopatrica (Reig et al. 1999; Lacey 2000; Kubiak et al. 2015), es posible concluir que la competencia congénica no tendría un efecto significativo en las poblaciones de *Ctenomys*.

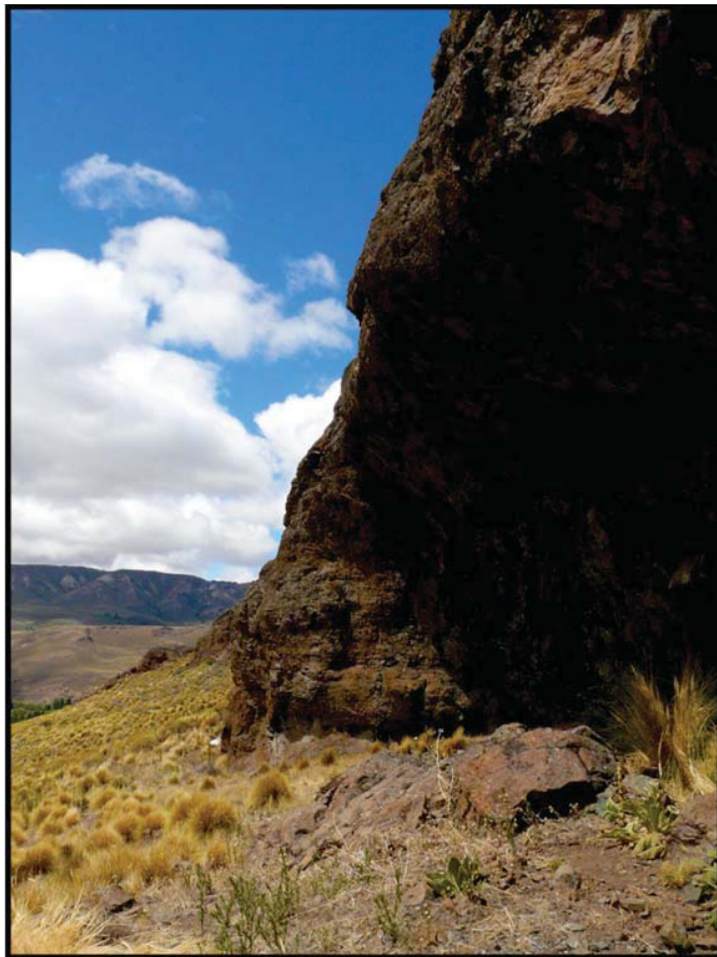
Los análisis realizados sugieren que la pérdida de diversidad genética de *C. sociabilis* estaría relacionada con los cambios ambientales inferidos para el periodo abarcado en este estudio. Durante los últimos 10000 años se registraron variaciones de temperatura y precipitación, cambios graduales en la posición de los vientos dominantes del oeste y el

establecimiento de la Oscilación climática del Sur “El Niño” (ENSO²⁴), en particular luego de los 5000 años cal AP (Moreno 1997; Lamy et al. 2001; Whitlock et al. 2007). Durante este periodo, una tendencia climática de aridez imperante durante la primera mitad del Holoceno cambió hacia condiciones más húmedas durante el Holoceno tardío, es inferida partir del registro polínico (e.g. Heusser y Streeter 1980). Al este de los Andes, a partir de los 5000 años cal AP se registran los valores más altos de recambio de la composición vegetal (taxones bosque/estepa), específicamente un incremento en el polen de tipo *Nothofagus* y Cupresaceas a expensas de Poaceas y otros taxones de estepa (Whitlock et al. 2006; Iglesias et al. 2012a, b, 2014). A largo plazo, este cambio climático favoreció el establecimiento y la expansión gradual de bosques densos de *Nothofagus* y particularmente de *Austrocedrus* hacia el este y su avance sobre la estepa (Iglesias et al. 2014; Iglesias y Whitlock 2014). A su vez, el avance del bosque habría proporcionado un incremento de biomasa y material combustible permitiendo un progresivo aumento de los regímenes de incendios favorecido por el comienzo del fenómeno ENSO durante el Holoceno tardío (Whitlock et al. 2006; Iglesias y Whitlock 2014). Durante este período, la inestabilidad ambiental junto con las condiciones microclimáticas y topográficas habrían provocado cambios a nivel de paisaje (Kitzberger y Veblen 1999; Kitzberger 2012) que combinado con el uso restringido del hábitat de *C. sociabilis* habrían provocado su declinación poblacional en CdC y CTI. Las condiciones de aislamiento determinadas por barreras topográficas y distancia geográficas habrían favorecido la extinción regional de esta especie. Para *C. haigi*, en contraste, el uso más generalizado del hábitat y la capacidad de desplazamiento continuo de individuos desde el este habrían permitido su supervivencia e incluso su expansión en el área. Esto se ve reflejado en un aumento de su proporción en la dieta de las lechuzas hacia la actualidad.

²⁴ Del inglés, El Niño-Southern Oscillation

CAPÍTULO 4

Conclusiones



Cambios de diversidad genética en *Ctenomys* durante el Holoceno

Como se ha demostrado en este estudio, los análisis comparativos de los datos genéticos y de abundancia relativa de *C. sociabilis* y *C. haigi* en los depósitos estudiados permitieron identificar diferencias sustanciales respecto a los cambios en la diversidad genética y la abundancia relativa de estas especies durante los últimos 12000 años. Específicamente, durante el Pleistoceno más tardío y Holoceno temprano (12000-6000 año cal AP) se detectaron altos valores de diversidad genética en *C. sociabilis* en comparación con los valores detectados en *C. haigi*. A partir del Holoceno medio (6000 años cal AP) en *C. sociabilis* se verificó una pérdida de diversidad genética y una disminución de la abundancia relativa que afectó a la especie en los tres yacimientos estudiados. Para *C. haigi* no se detectaron cambios significativos en los niveles de diversidad genética, mientras que sí se verifican cambios en su abundancia relativa. De acuerdo con las hipótesis evaluadas, se concluye que la declinación poblacional de *C. sociabilis* -pérdida de diversidad genética y disminución de rango geográfico- estaría vinculada con la expansión y establecimiento de los bosques de *Austrocedrus* y *Nothotofagus* en el noroeste de Patagonia durante la segunda mitad del Holoceno debido a un incremento en las precipitaciones (Markgraf et al. 2002; Whitlock et al. 2006; Iglesias et al. 2014). Los distintos patrones de diversidad genética y abundancia relativa observados entre estas especies de *Ctenomys* son atribuidos a diferencias interespecíficas en respuesta a factores externos (e.g. precipitación), como se ha propuesto para otras especies de *Ctenomys* (e.g. Mora et al. 2007). Particularmente, las diferencias en el uso del hábitat y la demografía serían la base de esta respuesta diferencial, que son discutidas a continuación.

Especificidad de hábitat y comportamiento social

La teoría de la genética de poblaciones predice que la diversidad genética está determinada por factores intrínsecos de las especies, principalmente las características demográficas (e.g. tamaño efectivo poblacional, dispersión) y la tasa de mutación (Gillespie 2004; Willi y Hoffmann 2009). Sin embargo, dado su efecto sobre la demografía y la dinámica poblacional, los factores extrínsecos -como por ejemplo la distribución de los hábitats- influyen significativamente sobre los patrones de diversidad genética de las especies, tanto espaciales y temporales (Garner et al. 2005; Doyle et al. 2015). En consecuencia, bajo un escenario de cambio climático es probable que aquellas especies que

expresan algún grado de especificidad de hábitat sean más perjudicadas que las especies más generalistas, debido a que se modifica la disponibilidad de hábitats adecuados (Vrba 1992; Gómez Cano et al. 2013). En *C. sociabilis*, la declinación poblacional y las extinciones locales detectadas en este trabajo estarían relacionadas con la especificidad de hábitat de esta especie, en contraste con *C. haigi*. Como se ha mencionado, *C. sociabilis* se distribuye exclusivamente en el ecotono, particularmente sobre borde de mallín y áreas arbustivas con cobertura de hierbas y gramíneas (Pearson y Christie 1985; Tammone et al. 2012). Por el contrario, *C. haigi* se distribuye tanto en la estepa como en el ecotono, ocupando diversos tipos de hábitats, excluyendo los bosques densos (Pearson 1984; Lacey y Wiczorek 2003). Al comparar la disponibilidad de los hábitats utilizados por estas especies se desprende que para *C. sociabilis*, los hábitats adecuados están distribuidos irregularmente (i.e. en parche). Esta característica disminuiría la persistencia de la especie en parches de hábitat distantes y aumentaría la probabilidad de que ocurran extinciones locales frente a cambios climáticos prolongados temporalmente debido al aislamiento poblacional y la dificultad de recolonizar parches distantes. Esto sugiere que la especificidad de hábitat de *C. sociabilis* lo hace más vulnerable a la pérdida de hábitat mientras que la distribución en parche de los mismos incrementa las probabilidades de extinción. La interacción de factores ambientales a escala de paisaje es reconocido como un elemento importante relacionado con la dinámica de ocupación de los parches y la estructura poblacional en especies de *Ctenomys* (Kittlein y Gaggiotti 2008; Mapelli et al. 2012b). Por otro lado, en el caso de *C. sociabilis*, estos factores estarían relacionados con la filopatría natal y el comportamiento gregario de esta especie (Lacey y Wiczorek 2003; Lacey y Ebensperger 2007).

Como ha sido demostrado en diversos grupos de mamíferos, la formación de grupos sociales afecta los parámetros demográficos y, por lo tanto, los niveles de diversidad genética (Dobson et al. 1998; Pope 1998; Storz 1999; Richardson et al. 2002; Spong et al. 2002). El comportamiento gregario, particularmente en roedores subterráneos, está asociado con bajos tamaños poblacionales, bajos niveles de flujo genético y una alta probabilidad de endogamia debido al cercano grado de parentesco entre grupos sociales (Lacey y Cutrera 2007). En consecuencia, se espera que los procesos evolutivos neutrales (e.g. deriva) tengan mayor influencia sobre la conformación de la variación genética en estas especies (Storz 1999). A su vez, estos procesos estarían reforzados en especies subterráneas debido a la restricción de movimiento de los individuos. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis indican que para *C. sociabilis* la pérdida de diversidad genética (tanto a nivel haplotípico como nucleotídico) dio como resultado la supervivencia del mismo haplotipo de citocromo b en

las poblaciones estudiadas. Por lo tanto, este patrón podría estar más relacionado con procesos microevolutivos selectivos (direccional) asociados con los cambios climáticos de finales del Holoceno y menos con deriva génica y flujo genético. Se ha demostrado empíricamente que los cambios ambientales provocados por variaciones climáticas prolongadas pueden disminuir sustancialmente la diversidad genética de una especie a medida que sus poblaciones se adaptan a los cambios (Jump et al. 2006; Hoffmann y Sgrò 2011; Pauls et al. 2013). De esta manera, cuando los procesos que generan variación genética son limitados como es el caso de *C. sociabilis* la probabilidad de supervivencia de las poblaciones se ve reducida debido a una disminución en la capacidad de respuesta a cambios futuros.

En conclusión, para *C. sociabilis* la combinación de factores intrínsecos (i.e. limitada capacidad de dispersión, comportamiento social complejo y uso del hábitat más restringido) y extrínsecos (i.e. cambios climáticos) habrían favorecido la declinación poblacional, incluyendo pérdida de diversidad genética y extinciones locales en bajo un escenario de variaciones climáticas y cambios de hábitat que se extendió durante la segunda mitad del Holoceno. Por otro lado, la aparición de *C. haigi* durante el Holoceno temprano en el registro fósil estudiado estaría relacionado con una mayor flexibilidad en el uso del hábitat y una estructura social simple (i.e. solitario). Estas características están asociadas con un mayor movimiento de individuos y por lo tanto habrían favorecido la expansión del rango geográfico de *C. haigi* durante una época desfavorable para *C. sociabilis*. Este trabajo podría brindar información relevante respecto a las extinciones del Pleistoceno-Holoceno, particularmente en Patagonia.

Extinciones cuaternarias en Patagonia

Hacia el Pleistoceno tardío, 90 géneros de grandes mamíferos (>44 kg) se extinguieron a lo largo del mundo, siendo el continente africano el menos afectado (Leakey y Lewin 1995; MacPhee 1999; Barnosky et al. 2004). Aunque los motivos de su desaparición son muy discutidos, se apuntan como factores claves de este proceso los cambios climáticos posteriores al Último Máximo Glacial y al impacto de la expansión del *Homo sapiens* durante la transición Pleistoceno-Holoceno (Markgraf 1985; Graham et al. 1996; Miotti y Salemme 1999; Lyons et al. 2004; Hajduk et al. 2006; Koch y Barnosky 2006; Nogués-Bravo et al. 2010). Este proceso de extinción continuó, a una escala significativamente menor, a lo largo de todo el Holoceno sobre un amplio rango de tamaños corporales de

mamíferos incluyendo pequeños mamíferos (MacPhee y Flemming 1999; Turvey 2009). Por otro lado, el estudio del registro paleontológico del Pleistoceno tardío y Holoceno, junto con sus características genéticas a nivel geográfico y poblacional, indica que además de las extinciones documentadas, las especies actuales que sobrevivieron a la extinción se vieron afectadas en varios aspectos, entre ellos la abundancia poblacional, el rango de distribución geográfica y la diversidad genética (Hofreiter 2007; Hofreiter y Stewart 2009). Al mismo tiempo, datos paleoecológicos de los últimos 20 mil años indican que las comunidades han sufrido cambios sustanciales en la composición y estructura de especies (Blois et al. 2010; Gómez Cano et al. 2013).

En Patagonia, el análisis de los ensambles de pequeños mamíferos ha demostrado que durante el Holoceno las comunidades han cambiado su estructura, particularmente durante el Holoceno más tardío (Pearson 1987; Pardiñas et al. 2000, 2011, 2012; Hajduk et al. 2004; Teta et al. 2005, 2014; Udrizar Sauthier et al. 2009; Pardiñas y Teta 2013). Estos trabajos, sumados a la información de las expediciones de finales de siglo XIX y principios del XX (e.g. Allen 1903; Hatcher 1903; Osgood 1943) y a una extensa base de datos de egagrópilas y trampeos a lo largo de Patagonia (Pardiñas et al. 2003, 2011; Formoso 2013), sugieren que la extinción regional de pequeños mamíferos es un fenómeno frecuente para esta región (e.g. Pardiñas et al. 2012; Teta et al. 2014). Este proceso se vio intensificado durante los últimos 500 años por la actividad antrópica reciente (Pardiñas et al. 2000, 2012; Teta et al. 2014).

Específicamente, la composición taxonómica a escala regional en Patagonia indica la declinación de poblaciones y pérdida de rango geográfico para numerosas especies de pequeños mamíferos (*Lestodelphys halli*, Formoso et al. 2015; *Tympanoctomys kirchnerorum*, *Loxodontomys micropus* y *Notiomys edwardsii*, Pardiñas et al. 2012; *Euneomys chinchilloides* y *E. mordax*, Pardiñas y Teta 2013; *Ctenomys sociabilis*, Tammone y Lacey 2014; esta tesis). En contraste, estos ensambles indican un aumento sustancial de especies más generalistas como por ejemplo *Calomys musculinus*, *Eligmodontia* sp., *Oligoryzomys longicaudatus* (Pardiñas et al. 2000; Pardiñas y Teta 2013; de Tommaso et al. 2014) que incluso llegan a dominar los ensambles actuales (Teta et al. 2014). Este patrón de recambio de taxones en las comunidades de pequeños mamíferos patagónicos podría estar relacionado con características específicas como el grado de especialización ecológica. Los resultados presentados en esta tesis proporcionan información relevante respecto a los cambios diferenciales de abundancia en dos especies de *Ctenomys* que habitan la misma región ambiental, pero que difieren en aspectos demográficos y de uso de hábitat. Este

trabajo, en combinación por ejemplo con los métodos de modelo de nicho y modelos demográficos (e.g. Hornsby y Matocq 2012; Prost et al. 2013; Formoso et al. 2015), podría ser utilizado como marco de estudio para comprender la evolución de la fauna de pequeños mamíferos de la Patagonia y la biodiversidad de la región, particularmente considerando el potencial análisis de los ensamblajes actuales y fósiles de pequeños mamíferos disponibles.

Implicancias para la conservación

Este estudio demuestra que *C. sociabilis* ha sufrido una declinación poblacional, en términos de abundancia relativa y diversidad genética, que es evidente en varios puntos de su distribución geográfica. Este proceso se vincularía principalmente con los cambios ambientales naturales ocurridos durante el Holoceno, previo al impacto antrópico actual. Sin embargo, las restricciones demográficas y ecológicas discutidas anteriormente, junto con el empobrecimiento genético (microsatélites, Lacey 2001; ADN mitocondrial, Chan et al. 2005; esta tesis) hacen suponer que la especie podría sufrir extinciones locales en la actualidad frente a perturbaciones del hábitat, particularmente ante el cambio climático global. Afortunadamente, *C. sociabilis* está protegida por el Parque Nacional Nahuel Huapi (de ahora en más, PNNH) del cual es especie endémica, por lo tanto el manejo del uso de las tierras donde se distribuye está regulado por normas de conservación; sin embargo, su vulnerabilidad frente al cambio climático global se mantendría incluso dentro de las áreas protegidas.

Recientemente se ha documentado una población de *C. sociabilis* aparentemente extinta, por fuera del PNNH, en las inmediaciones de la localidad de El Maitén, provincia del Chubut, >100 km al sur de su distribución actual (Tammone y Lacey 2014). Si bien las causas de su aparente desaparición no están determinadas, las evidencias recopiladas en esa región indican que se trata de una extinción ocurrida en las últimas 3 décadas y por lo tanto podrían vincularse tanto con el cambio climático global como por el impacto antrópico reciente, específicamente, uso de las tierras con fines agropecuarios. Este hallazgo sugiere la potencial ocurrencia de poblaciones de esta especie -en ambientes de ecotono- entre la Sierra de Cuyín Manzano (PNNH) y la localidad de El Maitén. La ejecución de trabajos de campo en esta región sería un paso fundamental para verificar la existencia de nuevas poblaciones de *C. sociabilis* tanto dentro como fuera del PNNH y avanzar en el conocimiento de su historia evolutiva.

Por otro lado, el desarrollo de planes de monitoreo a largo plazo en las poblaciones

del PNNH podría proporcionar información respecto a la dinámica actual de las poblaciones de *C. sociabilis* y permitiría alertar sobre futuras extinciones. Recientemente se han reportado desplazamientos altitudinales en mamíferos de montaña, acompañado con erosión genética y reducción de rango geográfico en respuesta al cambio climático actual (e.g. Rubidge et al. 2012; Ferro 2013; Rowe et al. 2014). Considerando el rango de altitud entre las poblaciones de *C. sociabilis* (750-1800 m snm; Tammone et al. 2012), los monitores podrían brindar información respecto al efecto del cambio climático actual sobre el gradiente altitudinal en el cual esta se distribuye. Es importante destacar que, dadas las elevaciones máximas de la Sierra de Cuyín Manzano y el dominio de los bosques húmedos y alto-andinos en la región montañosa al este de la sierra, *C. sociabilis* se encuentra en un “techo” natural que hace aún más crítico su futuro.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, J.A. 1903. Descriptions of new rodents from southern Patagonia, with a note on the genus *Euneomys* Coues, and an addendum to article IV, on Siberian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 19:185.
- ALLENDORF, F.W., G. LUIKART Y S.N. AITKEN. 2013. Conservation and the genetics of populations, 2nd edition.
- ALTSCHUL, S.F., W. GISH, W. MILLER, E.W. MYERS Y D.J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER Y D.J. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- ANDREWS, P. 1990. Owls, caves and fossils. University of Chicago Press, Natural History Museum, London.
- ARIAS CABAL, P., A. HAJDUK, E.A. CRIVELLI MONTERO, A. CHAUVIN, A. ALBORNOZ, A. ARMENDARIZ GUTIÉRREZ, M. CUETO RAPADO, M. FERNÁNDEZ, P. FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M.J. LEZCANO, E. PALACIO PÉREZ, J. TAPIA SAGARNA, M.N. TAMMONE, L.C. TEIRA MAYOLINI Y J. VALLEJO LLANO. 2013. El poblamiento temprano del noroeste de la Patagonia Argentina. Pp. 19-41 en *Informes y Trabajos: Excavaciones en el exterior 2011*. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España.
- ARNOLD, B.D. Y G.S. WILKINSON. 2015. Female natal philopatry and gene flow between divergent clades of pallid bats (*Antrozous pallidus*). *Journal of Mammalogy* 96:531-540.
- AUER, V. 1960. The Quaternary history of Fuego-Patagonia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 152:507-516.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
- AVISE, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36:3-15.
- AVISE, J.C., J. ARNOLD, R.M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J.E. NEIGEL, C.A. REEB Y N.C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: the Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- BARBUJANI, G. 2010. Inference of demographic processes from comparisons of ancient and modern DNAs. *Journal of Anthropological Sciences* 88:235-237.
- BARNOSKY, A.D., E.A. HADLY, B.A. MAURER Y M.I. CHRISTIE. 2001. Temperate terrestrial vertebrates faunas in North and South America: interplay of ecology, evolution, and geography with biodiversity. *Conservation Biology* 15:658-674.
- BARNOSKY, A.D., P.L. KOCH, R.S. FERANEC, S.L. WING Y A.B. SHABEL. 2004. Assessing the causes of late Pleistocene extinctions on the continents. *Science* 306:70-75.

- BARNOSKY, A.D., N. MATZKE, S. TOMIYA, G.O.U. WOGAN, B. SWARTZ, T.B. QUENTAL, C. MARSHALL, J.L. MCGUIRE, E.L. LINDSEY, K.C. MAGUIRE, B. MERSEY Y E. A FERRER. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471:51-57.
- BEADELL, J., Y.L. CHAN Y R. FLEISCHER. 2009. The role of ancient DNA in conservation biology. Pp. 202-224 en *Population Genetics for Animal Conservation* (G. Bertorelle, M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli y C. Vernesi, eds.). Cambridge University Press, United Kingdom.
- BENNETT, K.D. 1994. Confidence intervals for age estimates and deposition times in late-Quaternary sediment sequences. *The Holocene* 4:337-348.
- BIANCHI, M.M. Y D. ARIZTEGUI. 2012. Vegetation history of the Rio Manso Superior catchment area, Northern Patagonia (Argentina), since the last deglaciation. *The Holocene* 22:1283-1295.
- BIANCHI, M.M., J. MASSAFERRO, G. ROMAN ROSS, A.J. AMOS Y A. LAMI. 1999. Late Pleistocene and early Holocene ecological response of Lake El Trébol (Patagonia, Argentina) to environmental changes. *Journal of Paleolimnology* 22:137-148.
- BIDAU, C.J. 2015. Family Ctenomyidae Lesson, 1842. Pp. 818-877 en *Mammals of South America, Volume 2: Rodents* (J. L. Patton, U. F. J. Pardiñas y G. D'Elía, eds.). The University of Chicago Press, Chicago.
- BIDAU, C.J., E.P. LESSA Y R.A. OJEDA. 2008. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 08 June 2015.
- BLAAUW, M. 2010. Methods and code for 'classical' age-modelling of radiocarbon sequences. *Quaternary Geochronology* 5:512-518.
- BLAINVILLE, H.M.D. 1826. Sur une nouvelle espèce de rongeur fousseur du Brésil. *Nouv. Bull. Sci. Soc. Philom. Paris* 3:62-64.
- BLOIS, J.L., J.L. MCGUIRE Y E.A. HADLY. 2010. Small mammal diversity loss in response to late-Pleistocene climatic change. *Nature* 465:771-774.
- BRACE, S., E. PALKOPOULOU, L. DALÉN, A.M. LISTER, R. MILLER, M. OTTE, M. GERMONPRÉ, S.P.E. BLOCKLEY, J.R. STEWART Y I. BARNES. 2012. Serial population extinctions in a small mammal indicate Late Pleistocene ecosystem instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:20532-6.
- BRADLEY, R.D. Y R.J. BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82:960-973.
- BRADSHAW, W.E. Y C.M. HOLZAPFEL. 2006. Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312:1477-1478.
- BRAN, D. 2000. Las regiones ecológicas de la Patagonia y sus principales formaciones vegetales. Pp. 93-100 en *Principios de Ecología y Conservación de los Recursos Naturales de la Patagonia* (INTA, ed.). Buenos Aires, Argentina.
- BRONK RAMSEY, C. 2009. Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* 51:337-360.
- BUSCH, C., C.D. ANTINUCHI, C.J. DEL VALLE, M.J. KITTLEIN, A.I. MALIZIA, A.I. VASSALLO Y R.R. ZENUTO. 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. Pp. 183-226 en *Life Underground: the biology of subterranean rodents* (E. A. Lacey, J. L. Patton y G. N. Cameron, eds.). University of Chicago Press, Chicago.

- CABRERA, A.L. Y A. WILLINK. 1980. Biogeografía de América Latina. 2.^a edición. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.
- CAMPOS, P.F., T. KRISTENSEN, L. ORLANDO, A. SHER, M. V. KHOLODOVA, A. GÖTHERSTRÖM, M. HOFREITER, D.G. DRUCKER, P. KOSINTSEV, A. TIKHONOV, G.F. BARYSHNIKOV, E. WILLERSLEV Y M.T.P. GILBERT. 2010a. Ancient DNA sequences point to a large loss of mitochondrial genetic diversity in the saiga antelope (*Saiga tatarica*) since the Pleistocene. *Molecular Ecology* 19:4863-4875.
- CAMPOS, P.F., E. WILLERSLEV, A. SHER, L. ORLANDO, E. AXELSSON, A. TIKHONOV, K. AARIS-SØRENSEN, A.D. GREENWOOD, R.-D. KAHLKE, P. KOSINTSEV, T. KRAKHMALNAYA, T. KUZNETSOVA, P. LEMEY, R.D.E. MACPHEE, C. A NORRIS, K. SHEPHERD, M.A. SUCHARD, G.D. ZAZULA, B. SHAPIRO Y M.T.P. GILBERT. 2010b. Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5675-5680.
- CASTILLO, A H., M.N. CORTINAS Y E.P. LESSA. 2005. Rapid diversification of South American tucos-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyicad): Contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86:170-179.
- CHAN, Y.L., C.N.K. ANDERSON Y E.A. HADLY. 2006. Bayesian estimation of the timing and severity of a population bottleneck from ancient DNA. *PLoS Genetics* 2:451-460.
- CHAN, Y.L. Y E.A. HADLY. 2011. Genetic variation over 10000 years in *Ctenomys*: comparative phylochronology provides a temporal perspective on rarity, environmental change and demography. *Molecular Ecology* 20:4592-4605.
- CHAN, Y.L., E.A. LACEY, O.P. PEARSON Y E.A. HADLY. 2005. Ancient DNA reveals Holocene loss of genetic diversity in a South American rodent. *Biology letters* 1:423-426.
- CHANNELL, R. Y M. V. LOMOLINO. 2000. Trajectories to extinction: Spatial dynamics of the contraction of geographical ranges. *Journal of Biogeography* 27:169-179.
- CHEN, I.-C., J.K. HILL, R. OHLEMÜLLER, D.B. ROY Y C.D. THOMAS. 2011. Rapid range shift of species associated with high levels of climate warming. *Science* 333:1024-1026.
- CHEVIN, L.M. Y R. LANDE. 2010. When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? *Evolution* 64:1143-1150.
- CHEVIN, L.M., R. LANDE Y G.M. MACE. 2010. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. *PLoS Biology* 8.
- COLLINI, E., M.S. OSORES, A. FOLCH, J.G. VIRAMONTE, G. VILLAROSA Y G. SALMUNI. 2013. Volcanic ash forecast during the June 2011 Cordón Caulle eruption. *Natural Hazards* 66:389-412.
- COLLINS, C.J., N.J. RAWLENCE, S. PROST, C.N.K. ANDERSON, M. KNAPP, R.P. SCOFIELD, B.C. ROBERTSON, I. SMITH, E. A MATISOO-SMITH, B.L. CHILVERS Y J.M. WATERS. 2014. Extinction and recolonization of coastal megafauna following human arrival in New Zealand. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281:20140097.
- COLLINS, C.J., N.J. RAWLENCE, T.H. WORTHY, R.P. SCOFIELD, A.J.D. TENNYSON, I. SMITH, M. KNAPP Y J.M. WATERS. 2013. Pre-human New Zealand sea lion (*Phocarcos*

- hookeri*) rookeries on mainland New Zealand. Journal of the Royal Society of New Zealand 44:1-16 DOI: 10.1080/03036758.2013.828761.
- COOPER, A. Y H.N. POINAR. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. Science 289:1139.
- CORBELLA, H. Y L.E. LARA. 2008. Late Cenozoic Quaternary volcanism in Patagonia and Tierra del Fuego. Pp. 95-119 en The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego (J. Rabassa, ed.). Elsevier, Amsterdam.
- COSACOV, A., A.N. SÉRSIC, V. SOSA, L.A. JOHNSON Y A.A. COCUCCI. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. Journal of Biogeography 37:1463-1477.
- CRIVELLI MONTERO, E. Y M.J. SILVEIRA. 1983. Radiocarbon chronology of a tephra layer in the Trafal river valley, Province of Neuquén, Argentina. Quaternary of South America and Antarctic Peninsula 1:135-150.
- CRIVELLI MONTERO, E.A., D.E. CURZIO Y M.J. SILVEIRA. 1993. La estratigrafía de la Cueva Trafal I (Provincia del Neuquén). Praehistoria 1:9-160.
- CURRIER, L.A. 2004. The remarkable metrological history of radiocarbon dating [II]. Journal of Research-national Institute of Standards and Technology 109:185-218.
- CUTRERA, A.P., M.S. MORA, C.D. ANTENUCCI Y A.I. VASSALLO. 2010. Intra- and interspecific variation in home-range size in sympatric tuco-tucos, *Ctenomys australis* and *C. talarum*. Journal of Mammalogy 91:1425-1434.
- CUTRERA, A.P., E.A. LACEY Y C. BUSCH. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): Implications for kinship and dispersal. Molecular Ecology 14:2511-2523.
- D'ELÍA, G., E.P. LESSA Y J.A. COOK. 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): evolution of the mendocinus species group and evolution of asymmetric sperm. Journal of Mammalian Evolution 6:19-38.
- DAGA, R., S.R. GUEVARA, M.L. SÁNCHEZ Y M. ARRIBÉRE. 2010. Tephrochronology of recent events in the Andean Range (northern Patagonia): Spatial distribution and provenance of lacustrine ash layers in the Nahuel Huapi National Park. Journal of Quaternary Science 25:1113-1123.
- DALÉN, L. 2005. Distribution and abundance of genetic variation in the arctic fox. Stockholm University.
- DALÉN, L., V. NYSTRÖM, C. VALDIOSERA, M. GERMONPRÉ, M. SABLIN, E. TURNER, A. ANGERBJÖRN, J.L. ARSUAGA Y A. GÖTHERSTRÖM. 2007. Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:6726-6729.
- DEPAULIS, F., L. ORLANDO Y C. HÄNNI. 2009. Using classical population genetics tools with heterochroneous data: time matters! PloS ONE 4:e5541. DOI: 10.1371/journal.pone.0005541.
- DOBSON, F.S. 1998. Social structure and gene dynamics in mammals. Journal of Mammalogy 79:667-670.

- DOBSON, F.S. 2007. Gene dynamics and social behavior. Pp. 163-172 en *Rodent Societies: an ecological y evolutionary perspective* (J. O. Wolff y P. W. Sherman, eds.). The University of Chicago Press, Chicago.
- DOBSON, F.S., R.K. CHESSER, J.L. HOOGLAND, D.W. SUGG Y D.W. FOLTZ. 1998. Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79:671-680.
- DOYLE, J.M., C.C. HACKING, J.R. WILLOUGHBY, M. SUNDARAM Y J. A. DEWOODY. 2015. Mammalian genetic diversity as a function of habitat, body size, trophic class, and conservation status. *Journal of Mammalogy* 96:564-572.
- DRUMMOND, A.J., O.G. PYBUS, A. RAMBAUT, R. FORSBERG Y A.G. RODRIGO. 2003. Measurably evolving populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18:481-488.
- EZCURRA, C. Y C. BRION. 2005. Plantas del Nahuel Huapi: catálogo de la flora vascular del Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. Universidad Nacional del Comahue-Red Latinoamericana de Botánica, San Carlos de Bariloche.
- FASANELLA, M., C. BRUNO, Y. CARDOSO Y M. LIZARRALDE. 2013. Historical demography and spatial genetic structure of the subterranean rodent *Ctenomys magellanicus* in Tierra del Fuego (Argentina). *Zoological Journal of the Linnean Society* 169:697-710.
- FELSENSTEIN, J. 1976. The theoretical population genetics of variable selection and migration. *Annual Review of Genetics* 10: 253-280
- FELSENSTEIN, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics* 22:521-565.
- FERNÁNDEZ, F.J., F. BALLEJO, G. MOREIRA, E.P. TONNI Y L.J. DE SANTIS. 2011. Roedores cricétidos de la Provincia de Mendoza:115.
- FERNÁNDEZ, F.J., P. TETA, R. BARBERENA Y U.F.J. PARDIÑAS. 2012. Small mammal remains from Cueva Huenul 1, northern Patagonia, Argentina: Taphonomy and paleoenvironments since the Late Pleistocene. *Quaternary International* 278:22-31.
- FERNANDEZ-JALVO, Y., P. ANDREWS, P. SEVILLA Y V. REQUEJO. 2014. Digestion versus abrasion features in rodent bones. *Lethaia*:DOI: 10.1111/let.12061.
- FERRO, I. 2013. Rodent endemism, turnover and biogeographical transitions on elevation gradients in the northwestern Argentinian Andes. *Mammalian Biology* 78:322-331.
- FORMOSO, A. 2013. Ensamblés de micromamíferos y variables ambientales en Patagonia continental extra-andina Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- FORMOSO, A., G.M. MARTIN, P. TETA, A.E. CARBAJO, D.E.U. SAUTHIER Y U.F.J. PARDIÑAS. 2015. Regional extinctions and Quaternary shifts in the geographic range of *Lestodelphys halli*, the southernmost living marsupial: clues for its conservation. *Plos One* 10:e0132130.
- FRANKHAM, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126:131-140.
- FRANKHAM, R., J.D. BALLOU Y D.A. BRISCOE. 2010. *Introduction to conservation genetics*. 2nd edición. Cambridge University Press, New York.

- FRANKHAM, R. Y J.G. KINGSLOVER. 2004. Response to environmental change: Adaptation or extinction. Pp. 85-100 en *Evolutionary Conservation Biology* (U. Dieckman y D. Couvet, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- GALLARDO, M.H. Y N. KOHLER. 1994. Demographic changes and genetic losses in populations of a subterranean rodent (*Ctenomys maulinus brunneus*) affected by a natural catastrophe. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 59:358-365.
- GALLARDO, M.H., N. KÜHLER Y C. ARANEDA. 1996. Loss of genetic variation in *Ctenomys coyhaiquensis* (Rodentia, Ctenomyidae) affected by vulcanism. *Mastozoología Neotropical* 3:7-13.
- GARNER, A., J.L. RACHLOW Y J.F. HICKS. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology* 19:1215-1221.
- GERLACH, D.C., F. A FREY, H. MORENO-ROA Y L. LOPEZ-ESCOBAR. 1988. Recent volcanism in the Puyehue-Cordón Caulle region, Southern Andes, Chile (40.5°S): petrogenesis of evolved lavas. *Journal of Petrology* 29:333-382.
- GILBERT, M.T.P., H.J. BANDELT, M. HOFREITER Y I. BARNES. 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology y Evolution* 20:541-544.
- GILLESPIE, J.H. 2004. *Population Genetics: a concise guide*. 2nd edición. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- GÓMEZ CANO, A.R., J.L. CANTALAPIEDRA, A. MESA, A. MORENO BOFARULL Y M. HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ. 2013. Global climate changes drive ecological specialization of mammal faunas: trends in rodent assemblages from the Iberian Plio-Pleistocene. *BMC evolutionary biology* 13:94.
- GONÇALVES, G.L. Y T.R.O. DE FREITAS. 2009. Intraspecific variation and genetic differentiation of the Collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90:1020-1031.
- GOODALL-COPESTAKE, W.P., G. A. TARLING Y E.J. MURPHY. 2012. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity* 109:50-56.
- GRAHAM, R.W., E.L. LUNDELIUS, M. A. GRAHAM, E.K. SCHROEDER, R.S. TOOMEY, E. ANDERSON, A. D. BARNOSKY, J. A. BURNS, C.S. CHURCHER, D.K. GRAYSON, R.D. GUTHRIE, C.R. HARRINGTON, G.T. JEFFERSON, L.D. MARTIN, H.G. McDONALD, R.E. MORLAN, H. A. SEMKEN, S.D. WEBB, L. WERDELIN Y M.C. WILSON. 1996. Spatial response of mammals to Late Quaternary environmental fluctuations. *Science* 272:1601-1606.
- GRAYSON, D.K. 1981. A critical view of the use of archaeological vertebrates in paleoenvironmental reconstruction. *Journal of Ethnobiology* 1:28-38.
- GRAYSON, D.K. 1984. *Quantitative zooarchaeology: topics in the analysis of archaeological faunas*. Studies in Archaeological Science. Academic Press, Inc, New York.
- GRAYSON, D.K. Y D.J. MELTZER. 2003. A requiem for North American overkill. *Journal of Archaeological Science* 30:585-593.
- HADLY, E.A., U. RAMAKRISHNAN, Y.L. CHAN, M. VAN TUINEN, K. O'KEEFE, P.A. SPAETH Y C.J. CONROY. 2004. Genetic response to climatic change: insights from ancient DNA and phylochronology. *Public Library of Science, Biology* 2:1600-1609.

- HADLY, E.A., M. VAN TUINEN, Y.L. CHAN Y K. HEIMAN. 2003. Ancient DNA evidence of prolonged population persistence with negligible genetic diversity in an endemic tuco-tuco (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy* 84:403-417.
- HAJDUK, A., A. ALBORNOZ Y M.J. LEZCANO. 2004. El «Mylodon» en el patio de atrás. *Contra Viento y Marea, V Jornadas de Arqueología de la Patagonia*:715-732.
- HAJDUK, A., A. ALBORNOZ Y M.J. LEZCANO. 2006. Levels with extinct fauna in the forest rockshelter El Trébol (Northwest Patagonia, Argentina). *Current Research in the Pleistocene* 23:55-57.
- HAJDUK, A., P. ARIAS CABAL, A. CHAUVIN, E. CRIVELLI, A. ALBORNOZ, A. ARMENDARIZ GUTIÉRREZ, M. CUETO RAPADO, M. FERNANDEZ, M. FERNANDEZ SÁNCHEZ, V. FERNANDEZ, S. GOYE, M.J. LEZCANO, J. TAPIA SAGARNA Y L.C. TEIRA MAYOLINI. 2007. Poblamiento temprano y arte rupestre en el área del lago Nahuel Huapi y cuenca del río Limay (Pcias. de Río Negro y Neuquén, Argentina). Edición especial de la Revista Pacarina:393-399.
- HARRIS, E. 1989. *Principles of archaeological stratigraphy* 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego.
- HATCHER, J.B. 1903. Volume I. Narrative of the expedition and geography of Southern Patagonia. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- HEUSSER, C.J. 2003. Ice age southern Andes: a chronicle of palaeoecological events, *Developments in Quaternary Science*. Elsevier, Amsterdam.
- HEUSSER, C.J. Y S.S. STREETER. 1980. A temperature and precipitation record of the past 16000 years in southern Chile. *Science* 210:1345-1347.
- HIMES, C.M.T., M.H. GALLARDO Y G.J. KENAGY. 2008. Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography* 35:1415-1424.
- HOFFMANN, A. A Y C.M. SGRÒ. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470:479-485.
- HOFREITER, M. 2007. Pleistocene extinctions: haunting the survivors. *Current Biology* 17:609-611.
- HOFREITER, M., D. SERRE, H.N. POINAR, M. KUCH Y S. PÄÄBO. 2001. Ancient DNA. *Nature reviews. Genetics* 2:353-359.
- HOFREITER, M. Y J. STEWART. 2009. Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Current Biology* 19:584-594.
- HOGG, A.G., Q. HUA, P.J. BLACKWELL, M. NIU, C.E. BUCK, T.P. GUILDERTON, T.J. HEATON, J.G. PALMER, P.J. REIMER, R.W. REIMER, C.S.M. TURNEY Y S.R.H. ZIMMERMAN. 2013. SHCal13 southern hemisphere calibration, 0–50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 55:1-15.
- HORNSBY, A.D. Y M.D. MATOCQ. 2012. Differential regional response of the bushy-tailed woodrat (*Neotoma cinerea*) to late Quaternary climate change. *Journal of Biogeography* 39:289-305.

- IGLESIAS, V. Y C. WHITLOCK. 2014. Fire responses to postglacial climate change and human impact in northern Patagonia (41–43°S). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E5545-E5554.
- IGLESIAS, V., C. WHITLOCK, M.M. BIANCHI, G. VILLAROSA Y V. OUTES. 2012a. Climate and local controls of long-term vegetation dynamics in northern Patagonia (Lat 41°S). *Quaternary Research* 78:502-512.
- IGLESIAS, V., C. WHITLOCK, M.M. BIANCHI, G. VILLAROSA Y V. OUTES. 2012b. Holocene climate variability and environmental history at the Patagonian forest/steppe ecotone: Lago Mosquito (42°29'37.89"S, 71°24'14.57"W) and Laguna del Cóndor (42°20'47.22"S, 71°17'07.62"W). *The Holocene* 22:1297-1307.
- IGLESIAS, V., C. WHITLOCK, V. MARKGRAF Y M.M. BIANCHI. 2014. Postglacial history of the Patagonian forest/steppe ecotone (41-43°S). *Quaternary Science Reviews* 94:120-135.
- IRWIN, D.M., T.D. KOCHER Y A.C. WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32:128-144.
- JOHNS, G.C. Y J.C. AVISE. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* 15:1481-1490.
- JOHNSON, M., I. ZARETSKAYA, Y. RAYTSELIS, Y. MEREZHUK, S. MCGINNIS Y T.L. MADDEN. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36:W5-W9.
- JUMP, A.S., J.M. HUNT, J. A. MARTÍNEZ-IZQUIERDO Y J. PEÑUELAS. 2006. Natural selection and climate change: Temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology* 15:3469-3480.
- KITTLEIN, M.J. Y O.E. GAGGIOTTI. 2008. Interactions between environmental factors can hide isolation by distance patterns: a case study of *Ctenomys rionegrensis* in Uruguay. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275:2633-2638.
- KITZBERGER, T. 2012. Ecotones as complex arenas of disturbance, climate, and human impacts: the trans-Andean forest-steppe ecotone of northern Patagonia. Pp. 59-88 en *Ecotones Between Forest and Grassland* (R. W. Myster, ed.). Springer, New York.
- KITZBERGER, T. Y T.T. VELEN. 1999. Fire-induced changes in northern Patagonian landscapes. *Landscape Ecology* 14:1-15.
- KOCH, P.L. Y A.D. BARNOSKY. 2006. Late Quaternary extinctions: state of the debate. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37:215-250.
- KUBIAK, B.B., D. GALIANO Y T.R.O. DE FREITAS. 2015. Sharing the space: distribution, habitat segregation and delimitation of a new sympatric area of subterranean rodents. *PloS ONE* 10:DOI: 10.1371/journal.pone.0123220.
- KUHN, T.S., K. A. MCFARLANE, P. GROVES, A. O. MOOERS Y B. SHAPIRO. 2010. Modern and ancient DNA reveal recent partial replacement of caribou in the southwest Yukon. *Molecular Ecology* 19:1312-1323.
- LACEY, E.A. 2000. Spatial and social systems of subterranean rodents. Pp. 257-293 en *Life Underground: the biology of subterranean rodents* (E. A. Lacey, J. L. Patton y G. N. Cameron, eds.). University of Chicago Press, Chicago.

- LACEY, E.A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86:628-637.
- LACEY, E.A., S.H. BRAUDE Y J.R. WIECZOREK. 1997. Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy* 78:556-562.
- LACEY, E.A., S.H. BRAUDE Y J.R. WIECZOREK. 1998. Solitary burrow use by adult Patagonian tuco-tucos (*Ctenomys haigi*). *Journal of Mammalogy* 79:986-991.
- LACEY, E.A. Y A.P. CUTRERA. 2007. Behavior, demography, and immunogenetic variation: new insights from subterranean rodents. Pp. 341-355 en *Subterranean Rodents: news from underground* (S. Begall, H. Burda y C. E. Schleich, eds.). Springer, Heidelberg.
- LACEY, E.A. Y L.A. EBENSPERGER. 2007. Social Structure in Octodontid and Ctenomyid Rodents. Pp. 403-415 en *Rodent Societies: an ecological y evolutionary perspective* (J. O. Wolff y P. W. Sherman, eds.). University of Chicago Press, Chicago.
- LACEY, E.A., J.L. PATTON Y G.N. CAMERON. 2000. *Life Underground: the biology of subterranean rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- LACEY, E.A., R. TAKENAKA Y M.N. TAMMONE. 2014. Arena en mis dientes: cambios demográficos y ecológicos del tuco-tuco colonial luego de la erupción del volcán Puyehue. P. 114 en *Libro de resúmenes: XXVII Jornadas Argentinas de Mastozoología*. Esquel, Argentina.
- LACEY, E.A. Y J.R. WIECZOREK. 2003. Ecology of sociality in rodents: a ctenomyid perspective. *Journal of Mammalogy* 84:1198-1211.
- LACEY, E.A. Y J.R. WIECZOREK. 2004. Kinship in colonial tuco-tucos: evidence from group composition and population structure. *Behavioral Ecology* 15:988-996.
- LACY, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy* 78:320-335.
- LAMBERT, D.M., P.A. RITCHIE, C.D. MILLAR, B. HOLLAND, A.J. DRUMMOND Y C. BARONI. 2002. Rates of evolution in ancient DNA from Adélie penguins. *Science* 295:2270-2273.
- LAMY, F., D. HEBBELN, U. RÖHL Y G. WEFER. 2001. Holocene rainfall variability in Southern Chile: A marine record of latitudinal shifts of the Southern Westerlies. *Earth and Planetary Science Letters* 185:369-382.
- LANDE, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460.
- LANDE, R. 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological, and genetic factors. Pp. 1-22 en *Genetics and the extinction of species* (L. F. Landweber y A. P. Dobson, eds.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- LANDWEBER, L.F. Y A.P. DOBSON. 1999. *Genetics and the extinction of species*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- LARA, L.E., H. MORENO, J. A. NARANJO, S. MATTHEWS Y C. PÉREZ DE ARCE. 2006. Magmatic evolution of the Puyehue-Cordón Caulle Volcanic Complex (40° S), Southern Andean Volcanic Zone: From shield to unusual rhyolitic fissure volcanism. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 157:343-366.

- LAYA, H. 1977. Edafogénesis y paleosuelos de la Formación téfrica Río Pireco (Holoceno). Suroeste de la provincia del Neuquén, Argentina. *Asociación Geológica Argentina* 32:2-23.
- LEAKEY, R. Y R. LEWIN. 1995. *The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind*. Doubleday, New York.
- LEÓN, R.J.C., D. BRAN, M. COLLANTES, J.M. PARUELO Y A. SORIANO. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8:125-144.
- LEONARD, J.A. 2008. Ancient DNA applications for wildlife conservation. *Molecular Ecology* 17:4186-4196.
- LESSA, E.P. Y J.A. COOK. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9:88-99.
- LESSA, E.P., G. D'ELÍA Y U.F.J. PARDIÑAS. 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19:3031-3037.
- LIBARDO, P. Y J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- LIBBY, W.F., E.C. ANDERSON Y J.R. ARNOLD. 1949. Age determination by radiocarbon content: worldwide assay of natural radiocarbon. *Science* 109:227-228.
- LIRIO, J.M. 2011. Eventos paleoambientales en la cuenca del Lago Nahuel Huapi registrados en testigos sedimentarios lacustres durante los últimos 19000 años. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- LYMAN, R.L. 2008. *Quantitative paleozoology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- LYNCH, M. Y R. LANDE. 1993. Evolution and extinction in response to environmental change. Pp. 234-250 en *Biotic Interactions and Global Change* (P. M. Kareiva, J. G. Kingsolver y R. B. Huey, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- LYONS, S.K., F.A. SMITH Y J.H. BROWN. 2004. Of mice, mastodons and men: human-mediated extinctions on four continents. *Evolutionary Ecology Research* 6:339-358.
- MACPHEE, R.D.E. 1999. *Extinctions in near time: causes, contexts, and consequences*. Springer, New York.
- MACPHEE, R.D.E. 2013. Extinction. Pp. 307-310 en *Encyclopedia of Natural Hazards* (P. T. Bobrowsky, ed.). Springer, Dordrecht.
- MACPHEE, R.D.E. Y C. FLEMMING. 1999. Requiem aeternam: the last five hundred years of mammalian species extinctions. Pp. 333-371 en *Extinctions in near time: causes, contexts, and consequences* (R. D. E. MacPhee, ed.). Springer, New York.
- MAPELLI, F.J., M.S. MORA, P.M. MIROL Y M.J. KITTLEIN. 2012a. Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *Journal of Zoology* 286:48-57.
- MAPELLI, F.J., M.S. MORA, P.M. MIROL Y M.J. KITTLEIN. 2012b. Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *Conservation Genetics* 13:165-181.

- MARKGRAF, V. 1983. Late and postglacial vegetational and paleoclimatic changes in subantarctic, temperate, and arid environments in Argentina. *Palynology* 7:43-70.
- MARKGRAF, V. 1984. Late Pleistocene and Holocene vegetation history of temperate Argentina: Lago Morenito, Bariloche. *Dissertationes Botanicae* 72:235-254.
- MARKGRAF, V. 1985. Late Pleistocene faunal extinctions in southern Patagonia. *Science* 228:1110-1112.
- MARKGRAF, V., R.S. WEBB, K.H. ANDERSON Y L. ANDERSON. 2002. Modern pollen / climate calibration for southern South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 181:375-397.
- MASCHERETTI, S., P.M. MIROL, M.D. GIMÉNEZ, C.J. BIDAU, J.R. CONTRERAS Y J.B. SEARLE. 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 70:361-376.
- MATOCQ, M.D. Y F.X. VILLABLANCA. 2001. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation* 98:61-68.
- MCCORMAC, F.G., A.G. HOGG, P.J. BLACKWELL, C.E. BUCK, T.E.G. HIGHMAN Y P.J. REIMER. 2004. SHCal04 southern hemisphere calibration, 0-11.0 cal kyr BP. *Radiocarbon* 46:1087-1092.
- MERMOZ, M., C. ÚBEDA, D. GRIGERA, C. BRION, C. MARTÍN, E. BIANCHI Y H. PLANAS. 2009. El Parque Nacional Nahuel Huapi. Sus características ecológicas y estado de conservación. APN, Parque Nacional Nahuel Huapi, San Carlos de Bariloche.
- MILLER, C.R. y L.P. WAITS. 2003. The History of Effective Population Size and Genetic Diversity in the Yellowstone Grizzly (*Ursus arctos*): Implications for Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4334-4339.
- MIOTTI, L. Y M. SALEMME. 1999. Biodiversity, taxonomic richness and specialists-generalists during Late Pleistocene/Early Holocene times in Pampa and Patagonia (Argentina, Southern South America). *Quaternary International* 53-54:53-68.
- MIROL, P., M.D. GIMÉNEZ, J.B. SEARLE, C.J. BIDAU Y C.G. FAULKES. 2010. Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. *Biological Journal of the Linnean Society* 100:368-383.
- MONDOL, S., M.W. BRUFORD Y U. RAMAKRISHNAN. 2013. Demographic loss , genetic structure and the conservation implications for Indian tigers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280:20130496.
- MONJEAU, J.A. 1989. Ecología y distribución geográfica de los pequeños mamíferos del Parque Nacional Nahuel Huapi y áreas adyacentes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- MORA, M.S., A.P. CUTRERA, E.P. LESSA, A.I. VASSALLO, A. D'ANATRO Y F.J. MAPELLI. 2013. Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): Integrating demographic and habitat histories. *Journal of Mammalogy* 94:459-476.
- MORA, M.S., E.P. LESSA, A.P. CUTRERA, M.J. KITTLEIN Y A.I. VASSALLO. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum*

- (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology* 16:3453-3465.
- MORENO, P. 1997. Vegetation and climate bear Lago Llanquihue in the Chilean Lake District Between 20,200 and 9500 14C yr BP. *Journal of Quaternary Science* 12:485-500.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEVO, E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10:269-308.
- NEWHALL, C.G. Y S. SELF. 1982. The volcanic explosivity index (VEI): an estimate of explosive magnitude for historical volcanism. *Journal of Geophysical Research* 87:1231-1238.
- NIJMAN, V. Y M. ALIABADIAN. 2013. DNA Barcoding as a Tool for Elucidating Species Delineation in Wide-ranging Species as Illustrated by Owls (Tytonidae and Strigidae). *Zoological Science* 30:1005-1009.
- NOGUÉS-BRAVO, D., R. OHLEMÜLLER, P. BATRA Y M.B. ARAÚJO. 2010. Climate predictors of late Quaternary extinctions. *Evolution* 64:2442-2449.
- OSGOOD, W.H. 1943. *The mammals of Chile*. Field Museum of Natural History, Chicago.
- PÄÄBO, S., R.G. HIGUCHI Y A.C. WILSON. 1989. Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction 264:9709-9712.
- PALMA, R.E., D. BORIC-BARGETTO, F. TORRES-PÉREZ, C.E. HERNANDEZ Y T.L. YATES. 2012. Glaciation effects on the phylogeographic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Southern Andes. *PloS ONE* 7:DOI: 10.1371/journal.pone.0032206.
- PAMILO, P. 1988. Genetic variation in heterogeneous environments. *Annales Zoologici Fennici* 25:99-106.
- PARADA, A. 2007. *Sistemática molecular de Ctenomys (Rodentia, Ctenomyidae): límites y grupos de especies abordados con un muestreo taxonómico y geográfico denso*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- PARADA, A., G. D'ELÍA, C.J. BIDAÚ Y E.P. LESSA. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92:671-682.
- PARDIÑAS, U.F.J. 1999a. Tafonomía de microvertebrados en yacimientos arqueológicos de Patagonia (Argentina). *Arqueología* 9:265-308.
- PARDIÑAS, U.F.J. 1999b. Los roedores muroideos del Pleistoceno Tardío-Holoceno en la región pampeana (sector este) y Patagonia (República Argentina): aspectos taxonómicos, importancia bioestratigráfica y significación paleoambiental. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- PARDIÑAS, U.F.J., G.J. MOREIRA, C.M. GARCIA-ESPONDA Y L.M. DE SANTIS. 2000. Deterioro ambiental y micromamíferos durante el Holoceno en el nordeste de la estepa patagónica (Argentina). *Revista Chilena de Historia Natural* 73:9-21.

- PARDIÑAS, U.F.J. Y P. TETA. 2013. Holocene stability and recent dramatic change in micromammalian communities of northwestern Patagonia. *Quaternary International* 305:127-140.
- PARDIÑAS, U.F.J., P. TETA, S.S. CIRIGNOLI Y D.H.D.H. PODESTÁ. 2003. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) de norpatagonia extra andina, Argentina: taxonomía alfa y biogeografía. *Mastozoología Neotropical* 10:69-113.
- PARDIÑAS, U.F.J., P. TETA, A. FORMOSO Y R. BARBERENA. 2011. Roedores de extremo austral: tafonomía, diversidad y evolución ambiental durante el Holoceno tardío. Pp. 61-84 en *Bosques, montañas y cazadores* (L. A. Borrero y K. Borrazzo, eds.). CONICET-IMHICIHU, Buenos Aires, Argentina.
- PARDIÑAS, U.F.J., D.E. UDRIZAR SAUTHIER Y P. TETA. 2012. Micromammal diversity loss in central-eastern Patagonia over the last 400 years. *Journal of Arid Environments* 85:71-75.
- PARNELL, A.C., C.E. BUCK Y T.K. DOAN. 2011. A review of statistical chronology models for high-resolution, proxy-based Holocene palaeoenvironmental reconstruction. *Quaternary Science Reviews* 30:2948-2960.
- PATTON, J.L., U.F.J. PARDIÑAS Y G. D'ELÍA. 2015. *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*. The University of Chicago Press, Chicago.
- PATTON, J.L. Y M.F. SMITH. 1990. Population structure and genetics of speciation in pocket gophers, genus *Thomomys*. *Acta Zoologica Fennica* 170.
- PATTON J.L., S. YANG. 1977. Genetic variation in *Thomomys bottae* pocket gophers: macrogeographic patterns. *Evolution* 31:697-720
- PAULS, S.U., C. NOWAK, M. BÁLINT Y M. PFENNINGER. 2013. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology* 22:925-946.
- PEARSON, O.P. 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *Journal of Zoology* 202:225-237.
- PEARSON, O.P. 1987. Mice and the postglacial history of the Trafal Valley of Argentina. *Journal of Mammalogy* 68:469-478.
- PEARSON, O.P. 1994. The impact of an eruption of Volcán Hudson on small mammals in argentine Patagonia. *Mastozoología Neotropical* 1:103-112.
- PEARSON, O.P. 1995. Annotated key for identifying small mammals living in or near Nahuel Huapi National Park or Lanin National Park, southern Argentina. *Mastozoología Neotropical* 2:99-148.
- PEARSON, O.P. Y M.I. CHRISTIE. 1985. Los tuco-tucos (Genero *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lanin y Nahuel Huapi, Argentina. *Historia Natural* 37:337-343.
- PEARSON, O.P. Y A.K. PEARSON. 1993. La fauna de mamíferos pequeños de Cueva Trafal I, Argentina: pasado y presente. *Præhistoria* 1:211-224.
- POPE, T.R. 1998. Effects of demographic change on group kin structure and gene dynamics of populations of red howling monkeys. *Journal of Mammalogy* 79:692-712.

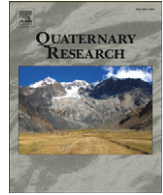
- PREMOLI, A.C., T. KITZBERGER Y T.T. VEBLEN. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27:251-260.
- PROENÇA, V. Y H.M. PEREIRA. 2013. Comparing Extinction Rates: Past, Present, and Future. *Encyclopedia of Biodiversity* 2:167-176.
- PROST, S. 2009. DNA analysis of Late Glacial mammal remains. Tesis de Maestría. Universität Wien, Austria.
- PROST, S. Y C.N.K. ANDERSON. 2011. TempNet: a method to display statistical parsimony networks for heterochronous DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 2:663-667.
- PROST, S., R.P. GURALNICK, E. WALTARI, V.B. FEDOROV, E. KUZMINA, N. SMIRNOV, T. VAN KOLFSCHOTEN, M. HOFREITER Y K. VRIELING. 2013. Losing ground: past history and future fate of Arctic small mammals in a changing climate. *Global Change Biology* 19:1854-1864.
- PRUETT, C.L. Y K. WINKER. 2008. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *Ecography* 39:252-256.
- R CORE TEAM. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna. R Foundation for Statistical Computing. <<http://www.r-project.org/>>.
- RAMAKRISHNAN, U. Y E. A. HADLY. 2009. Using phylochronology to reveal cryptic population histories: Review and synthesis of 29 ancient DNA studies. *Molecular Ecology* 18:1310-1330.
- RAMAKRISHNAN, U., E.A. HADLY Y J.L. MOUNTAIN. 2005. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Molecular Ecology* 14:2915-2922.
- RAWLENCE, N.J., J.L. METCALF, J.R. WOOD, T.H. WORTHY, J.J. AUSTIN Y A. COOPER. 2012. The effect of climate and environmental change on the megafaunal moa of New Zealand in the absence of humans. *Quaternary Science Reviews* 50:141-153.
- REIG, O.A. 1989. Karyotypic repatterning as a triggering factor in cases of explosive speciation. Pp. 246–289 en *Evolutionary biology of unstable populations* (A. Fontdevila, ed.). Springer Verlag, Berlin.
- REIG, O.A., C. BUSCH, M.O. ORTELLS Y C. J.R. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pp. 71-90 en *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels* (E. Nevo y O. A. Reig, eds.). Alan R. Liss, New York.
- REIMER, P.J., M.G.L. BAILLIE, E. BARD, A. BAYLISS, J.W. BECK, P.J. BLACKWELL, C.E. BUCK, G.S. BURR, R.L. EDWARDS, M. FRIEDRICH, P.M. GROOTES, T.P. GUILDERSON, I. HAJDAS, T.J. HEATON, A.G. HOGG, K.A. HUGHEN, K.F. KAISER, B. KROMER, F.G. MCCORMAC, S.W. MANNING, R.W. REIMER, D.A. RICHARDS, J.R. SOUTHON, S. TALAMO, C.S.M. TURNEY, J. VAN DER PLICHT Y C.E. WEYHENMEYE. 2009. IntCal09 and Marine09 radiocarbon age calibration curves, 0-50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 51:1111-1150.
- RICHARDSON, B.J., R. A. HAYES, S.H. WHEELER Y M.R. YARDIN. 2002. Social structures, genetic structures and dispersal strategies in Australian rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51:113-121.

- RIZZI, E., M. LARI, E. GIGLI, G. DE BELLIS Y D. CARAMELLI. 2012. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution* 44:DOI: 10.1186/1297-9686-44-21.
- ROWE, K.C., K.M.C. ROWE, M.W. TINGLEY, M.S. KOO, J.L. PATTON, C.J. CONROY, J.D. PERRINE, S.R. BEISSINGER Y C. MORITZ. 2014. Spatially heterogeneous impact of climate change on small mammals of montane California. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:20141857.
- RUBIDGE, E.M., J.L. PATTON, M. LIM, A. C. BURTON, J.S. BRASHARES Y C. MORITZ. 2012. Climate-induced range contraction drives genetic erosion in an alpine mammal. *Nature Climate Change* 2:285-288.
- RUZZANTE, D.E. Y J. RABASSA. 2011. Palaeogeography and palaeoclimatology of Patagonia: Effects on biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society* 103:221-228.
- SABA, S. Y D. A DE LAMO. 1994. Dynamic responses of mammals to the eruption of Volcán Hudson. *Mastozoología Neotropical* 1:113-122.
- SAGE, R.D., J.R. CONTRERAS, V.G. ROIG Y J.L. PATTON. 1986. Genetic variation in the South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 51:158-172.
- SAITOU, N. Y M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- SEUTIN, G., B.N. WHITE Y P.T. BOAG. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69:82-90.
- SHAPIRO, B., A.J. DRUMMOND, A. RAMBAUT, M.C. WILSON, P.E. MATHEUS, A. V SHER, O.G. PYBUS, M.T.P. GILBERT, I. BARNES, J. BINLADEN, E. WILLERSLEV, A.J. HANSEN, G.F. BARYSHNIKOV, J. A BURNS, S. DAVYDOV, J.C. DRIVER, D.G. FROESE, C.R. HARRINGTON, G. KEDDIE, P. KOSINTSEV, M.L. KUNZ, L.D. MARTIN, R.O. STEPHENSON, J. STORER, R. TEDFORD, S. ZIMOV Y A. COOPER. 2004. Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science* 306:1561-1565.
- SIKES, R.S., W.L. GANNON Y AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92:235-253.
- SIMKIN, T. Y L. SIEBERT. 1994. *Volcanoes of the world*. 2nd edición. Geoscience Press, Tucson, Arizona.
- SINGER, B.S., B.R. JICHA, M. A. HARPER, J.A. NARANJO, L.E. LARA Y H. MORENO-ROA. 2008. Eruptive history, geochronology, and magmatic evolution of the Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex, Chile. *Bulletin of the Geological Society of America* 120:599-618.
- SMITH, M.F. 1998. Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9:1-14.
- SPIELMAN, D., B.W. BROOK Y R. FRANKHAM. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15261-15264.

- SPONG, G., J. STONE, S. CREEL Y M. BJORKLUND. 2002. Genetic structure of lions (*Panthera leo* L.) in the Selous Game Reserve: implications for the evolution of sociality. *Journal of Evolutionary Biology* 15:945-953.
- STEINBERG, E.K. Y J.L. PATTON. 2000. Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. Pp. 301-331 en *Life Underground: the biology of subterranean rodents* (E. A. Lacey, J. L. Patton y G. N. Cameron, eds.). University of Chicago Press, Chicago.
- STERN, C.R. 2004. Active Andean volcanism: its geologic and tectonic setting. *Revista geológica de Chile*.
- STORZ, J.F. 1999. Genetic consequences of mammalian social structure. *Journal of Mammalogy* 80:553-569.
- STRANDBERG, A. K.K. Y L. A. SALTER. 2004. A comparison of methods for estimating the transition:transversion ratio from DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:495-503.
- SUNYAEV, S., F. A. KONDRASHOV, P. BORK Y V. RAMENSKY. 2003. Impact of selection, mutation rate and genetic drift on human genetic variation. *Human Molecular Genetics* 12:3325-3330.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMMONE, M.N., A. HAJDUK, P. ARIAS, P. TETA, E.A. LACEY Y U.F.J. PARDIÑAS. 2014. Last glacial maximum environments in northwestern Patagonia revealed by fossil small mammals. *Quaternary Research* 82:198-208.
- TAMMONE, M.N. Y E.A. LACEY. 2014. Material de museo revela una población aparentemente extinta del endémico tuco-tuco colonial (*Ctenomys sociabilis*) en el noroeste del Chubut, Argentina. P. 165 en *Libro de resúmenes: XXVII Jornadas Argentinas de Mastozoología*. Esquel, Argentina.
- TAMMONE, M.N., E.A. LACEY Y M.A. RELVA. 2012. Habitat use by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*): specialization, variation, and sociality. *Journal of Mammalogy* 93:1409-1419.
- TAYLOR, I. 1994. *Barn Owls*. Cambridge University Press, Cambridge.
- TELFORD, R.J., E. HEEGAARD Y H.J.B. BIRKS. 2004. The intercept is a poor estimate of a calibrated radiocarbon age. *The Holocene* 14:296-298.
- TEMPLETON, A.R., K.A. CRANDALL Y C.F. SING. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633.
- TERRY, R.C. 2007. Inferring predator identity from skeletal damage of small-mammal prey remains. *Evolutionary Ecology Research* 9:199-219.
- TERRY, R.C. 2008. Modeling the effects of predation, prey cycling, and time averaging on relative abundance in raptor-generated small mammals death assemblages. *Palaios* 23:402-410.

- TETA, P., A. ANDRADE Y U.F.J. PARDIÑAS. 2005. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) y paleoambientes del Holoceno tardío en la Patagonia noroccidental extrandina (Argentina). *Archeofauna* 14:183-197.
- TETA, P., A. FORMOSO, M. TAMMONE, D.C. DE TOMMASO, F.J. FERNÁNDEZ, J. TORRES Y U.F.J. PARDIÑAS. 2014. Micromamíferos, cambio climático e impacto antrópico: ¿Cuánto han cambiado las comunidades del sur de América del Sur en los últimos 500 años? *Therya* 5:7-38.
- THAELER, C.S. 1968. An analysis of the distribution of pocket gopher species in north-eastern California (genus *Thomomys*). University of California Publications in Zoology 86: 1-46.
- THOMAS, O. 1919. On mammals collected by Sr. E. Budin in North-western Patagonia. *Annals and Magazine of Natural History* 9:199-212.
- TILLING, R.I. 2009. Volcanism and associated hazards: the Andean perspective. *Advances in Geosciences* 22:125-137.
- DE TOMMASO, D.C., A. FORMOSO, P. TETA, D.E. UDRIZAR Y U.F.J. PARDIÑAS. 2014. Distribución geográfica de *Calomys musculinus* (Rodentia, Sigmodontinae) en Patagonia. *Mastozoología Neotropical* 21:121-127.
- VAN TUINEN, M., U. RAMAKRISHNAN Y E.A. HADLY. 2004. Studying the effect of environmental change on biotic evolution: past genetic contributions, current work and future directions. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 362:2795-2820.
- TURVEY, S.T. 2009. *Holocene Extinctions*. Oxford University Press Inc., New York.
- UDRIZAR SAUTHIER, D.E., U.F.J. PARDIÑAS Y E.P. TONNI. 2009. *Tympanoctomys* (Mammalia: Rodentia) en el Holoceno de Patagonia, Argentina. *Ameghiniana* 46:203-208.
- UICN. 2015. IUCN 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.1. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 01 June 2015.
- VASSALLO, A.I. 1993. Habitat shift after experimental removal of the bigger in sympatric *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Rodentia: Octodontidae). *Behaviour* 127: 247-263.
- VILLAROSA, G. 2008. Tefrocronología Postglacial de la región de Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- VILLAROSA, G., V. OUTES, A. HAJDUK, E. CRIVELLI MONTERO, D. SELLÉS, M. FERNÁNDEZ Y E. CRIVELLI. 2006. Explosive volcanism during the Holocene in the Upper Limay River Basin: The effects of ashfalls on human societies, Northern Patagonia, Argentina. *Quaternary International* 158:44-57.
- VRBA, E.S. 1992. Mammals as a key to evolutionary theory. *Journal of Mammalogy* 73:1-28.
- DE VRIES, H.L. 1958. Variation in concentration of radiocarbon with time and location on Earth. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie Wetenschappen B* 61:94-102.

- WHITLOCK, C., M.M. BIANCHI, P.J. BARTLEIN, V. MARKGRAF, J. MARLON, M. WALSH Y N. MCCOY. 2006. Postglacial vegetation, climate, and fire history along the east side of the Andes (lat 41-42.5°S), Argentina. *Quaternary Research* 66:187-201.
- WHITLOCK, C., P.I. MORENO Y P. BARTLEIN. 2007. Climatic controls of Holocene fire patterns in southern South America. *Quaternary Research* 68:28-36.
- WILLERSLEV, E. Y A. COOPER. 2005. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:3-16.
- WILLI, Y. Y A. A. HOFFMANN. 2009. Demographic factors and genetic variation influence population persistence under environmental change. *Journal of Evolutionary Biology* 22:124-133.
- WILLIS, K.J., R.M. BAILEY, S.A. BHAGWAT Y H.J.B. BIRKS. 2010. Biodiversity baselines, thresholds and resilience: testing predictions and assumptions using palaeoecological data. *Trends in Ecology and Evolution* 25:583-591.
- WILSON, T., J. COLE, S. CRONIN, C. STEWART Y D. JOHNSTON. 2011. Impacts on agriculture following the 1991 eruption of Vulcan Hudson, Patagonia: Lessons for recovery. *Natural Hazards* 57:185-212.
- WLASIUK, G., J.C. GARZA Y E.P. LESSA. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57:913-926.
- WOODS, C.A. Y C.W. KILPATRICK. 2005. Infraorden Hystricognathi. Pp. 1538-1600 en *Mammal species of the world*, 3rd ed. (D. E. Wilson y D. M. Reeder, eds.). Johns Hopkins Press, Baltimore.
- YANG, D.Y., B. ENG, J.S. WAYE, H.C. DUDAR Y S.R. SAUNDERS. 1998. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silicabased spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* 105:539-543.
- ZENUTO, R.R., A.I. VASSALLO Y C. BUSCH. 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:165-177.



Last glacial maximum environments in northwestern Patagonia revealed by fossil small mammals



Mauro N. Tammone^{a,b,*}, Adan Hajduk^c, Pablo Arias^d, Pablo Teta^a, Eileen A. Lacey^e, Ulyses F.J. Pardiñas^a

^a Unidad de Investigación Diversidad, Sistemática y Evolución, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET), Casilla de Correo 128, 9120 Puerto Madryn, Chubut, Argentina

^b Programa de Estudios Aplicados a la Conservación (CENAC-PNNH, CONICET), Bariloche, Río Negro, Argentina

^c Museo de la Patagonia "F. P. Moreno" (APN-CONICET), Bariloche, Río Negro, Argentina

^d Instituto Internacional de Investigaciones Prehistóricas de Cantabria (IIIPC), Universidad de Cantabria, Av. de los Castros s/n, 39005 Santander, Spain

^e Museum of Vertebrate Zoology, 3101 VLSB, University of California, Berkeley, CA 94720-3140, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2013

Available online 26 May 2014

Keywords:

Paleoenvironments
Last glacial maximum
Rodent assemblages
Taxonomic diversity
Argentina

ABSTRACT

Comparisons of historical and modern assemblages of mammals can yield important insights into patterns and processes of environmental change. Here, we present the first analyses of small mammal assemblages present in northern Patagonia during the last glacial maximum (LGM). Using remains obtained from owl pellets excavated from an archeological cave site (Arroyo Corral I, levels VII–V, carbon dates of 22,400–21,530 cal yr BP), we generate estimates of the minimum number of individuals for all species detected; these estimates, in turn are used to determine relative species abundances. Comparisons of these data with similar analyses of small mammal remains obtained from a second archeological site (AColl, levels IV–V, carbon dates of 10,010–9220 cal yr BP) as well as from modern owl pellets reveal pronounced changes in relative species abundance since the LGM. In particular, *Euneomys chinchilloides* and *Ctenomys sociabilis* – the predominant species during the LGM – declined markedly, suggesting a change from open, bare habitat punctuated by patches of wet meadows and shrubs to the more densely vegetated mosaic of ecotone habitats found in this region today. These data provide important new insights into the environmental changes that have occurred in northern Patagonia over the last 20,000 years.

© 2014 University of Washington. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Reconstructing historical faunas can generate important insights into patterns and processes of evolutionary change. In addition to revealing temporal changes in the compositions of specific biotas, such reconstructions can be used to draw inferences regarding associated patterns of habitat and climate change. For small bodied mammals, analyses of bones and teeth deposited around owl or raptor roosts represent a particularly direct means of characterizing historical assemblages (Andrews, 1990; Stahl, 1996). Information obtained from such deposits can be used to document temporal changes in multiple aspects of a species' biology, including relative abundance (Grayson, 1983; Terry, 2010a, 2010b), body size (Barnosky, 1994; Hadly et al., 1998), and genetic variability (Hadly et al., 1998; Chan et al., 2005). In conjunction with data regarding a species' current ecology, such analyses can be used to draw inferences regarding associated environmental changes (Barnosky et al., 1996; Hadly, 1996) and, potentially, the causes of biotic change over time.

In South America, glacial cycles are thought to have been critical in shaping habitats and associated biotas (Lessa et al., 2003, 2010), with multiple advances and retreats of ice sheets causing pronounced changes

over relatively short periods of time (Heusser et al., 2006). The last glacial maximum (LGM) at the end of the Pleistocene (~23,000–19,000 yr) was the most recent significant expansion of ice on a global scale. In northern Patagonia, the geological nature of this event has been well characterized based on current landforms and other evidence of glacial activity (Porter, 1981; Hulton et al., 2002; Rabassa, 2008; Rabassa et al., 2011). In contrast, the impact of the LGM on the flora and fauna of this region is less well understood, with inferences about paleoenvironments drawn primarily from phylogeographic studies of extant taxa (Turchetto-Zolet et al., 2013). More direct characterizations of biotic assemblages based on fossil data are almost non-existent, with available information limited primarily to analyses of insects and pollen from south-central Chile (e.g., Hoganson and Ashworth, 1992; Moreno, 1997; Heusser, 2003).

With regard to small mammals, a number of Patagonian fossil assemblages have been collected, primarily in archeological contexts (Pearson and Pearson, 1993; Teta et al., 2005; Fernández et al., 2012; Pardiñas and Teta, 2013). Most of these collections, however, are restricted to the Holocene; although a few cover the Pleistocene–Holocene transition, none extend to the LGM. Indeed, the oldest known small mammal assemblage recovered from northern Patagonia (El Trébol archeological site, Neuquén Province, Argentina) dates to only 10,570 ± 130 ¹⁴C yr BP (AA-65707) (Hajduk et al., 2004, 2006) and thus does not encompass the last major glacial advance. As a result, the small mammal faunas of this region during the LGM are unknown

* Corresponding author at: Programa de Estudios Aplicados a la Conservación (CENAC-PNNH, CONICET), Bariloche, Río Negro, Argentina.

E-mail address: mtammone@gmail.com (M.N. Tammone).

(Tonni and Carlini, 2008; Pardiñas et al., 2011), precluding comparisons of historic and modern assemblages to assess biotic changes over the last ~20,000 years.

Here, we studied a fossil assemblage of Patagonian small mammals from the LGM. The materials examined are from the Río Limay Valley in the Nahuel Huapi region of northwestern Argentine Patagonia, an area that has been the subject of considerable research regarding modern small mammals (Pearson and Pearson, 1982; Pearson, 1984; Monjeau et al., 1997; Pardiñas et al., 2003). Using materials collected from three cave sites in southern Neuquén and Río Negro Provinces, we characterize the taxonomic composition and relative species abundances of the small mammal faunas present at these locations during the LGM. Through comparisons of these data with information regarding the modern mammals of this region, we quantify changes in the vertebrates of this region since the LGM and, based on the ecologies of extant taxa, use these analyses to explore apparent habitat changes over the same time period. In addition to providing the first characterization of a Patagonian small mammal assemblage from the LGM, our data provide new insights into patterns of environmental change in this region over the past ~20,000 years.

Methods

Fossil samples

Small mammal remains were retrieved from the archeological site Arroyo Corral I (ACol) (Arias et al., 2013; 40°55'52"S, 71°03'19"W [WGS84], 844 m.a.s.l.), located on Estancia La Lonja in Parque Nacional Nahuel Huapi (PNNH), Neuquén Province, Argentina (Fig. 1). The site, which overlooks the Río Limay, consists of a rocky cave composed of two well-developed caverns, each measuring ca. 20 m by 14 m, with a ceiling height of ca. 3 m (Fig. 2). The surrounding habitat consists

primarily of precordilleran steppe representing the ecotone between semiarid Patagonian steppe and Andean *Nothofagus* forests. Vegetation in the area is dominated by small shrubs (*Mulinum spinosum*, *Acaena splendens*) and bunch grasses (*Festuca pallescens*, *Stipa speciosa*) and is punctuated by isolated groves of the evergreen cypress *Austrocedrus chilensis* (León et al., 1998; Bran, 2000).

During the austral summer of 2006, a 2-m by 2-m pit was excavated at ACol (Fig. 2). Digging was completed using hand-held trowels following natural stratigraphic boundaries. Excavation extended to a depth of 280 cm before reaching bedrock. Seven sedimentary levels (labeled I to VII) were identified. All soil removed was sieved in the field using a screen with a 2-mm mesh size. Material collected from each stratigraphic level was placed in a plastic bag and transported to the archeological laboratory in the Museo de la Patagonia in San Carlos de Bariloche (Río Negro Province, Argentina) for final separation and sorting of mammal remains.

Chronology and taphonomy

The small mammal assemblages examined were collected from the three basal levels (V to VII) of the ACol stratigraphic sequence. Radiocarbon dating performed by accelerator mass spectrometry (AMS) on bone collagen from specimens of Mylodontinae and *Lama guanicoe* contained in these levels generated the following estimates of stratigraphic ages: (1 = AMS Laboratory, University of Arizona; 2 = Oxford Radiocarbon Accelerator Unit, University of Oxford; 2-sigma calibration interval)

Level V: 21,267–19,998 cal yr BP [18,700 ± 260 ¹⁴C age BP (AA-75674)¹]

Level VII: 21,886–21,203 cal yr BP [19,520 ± 100 ¹⁴C yr BP (OxA-19478)²]

22,108–20,754 cal yr BP [19,410 ± 280 ¹⁴C age BP (AA-75675)¹]

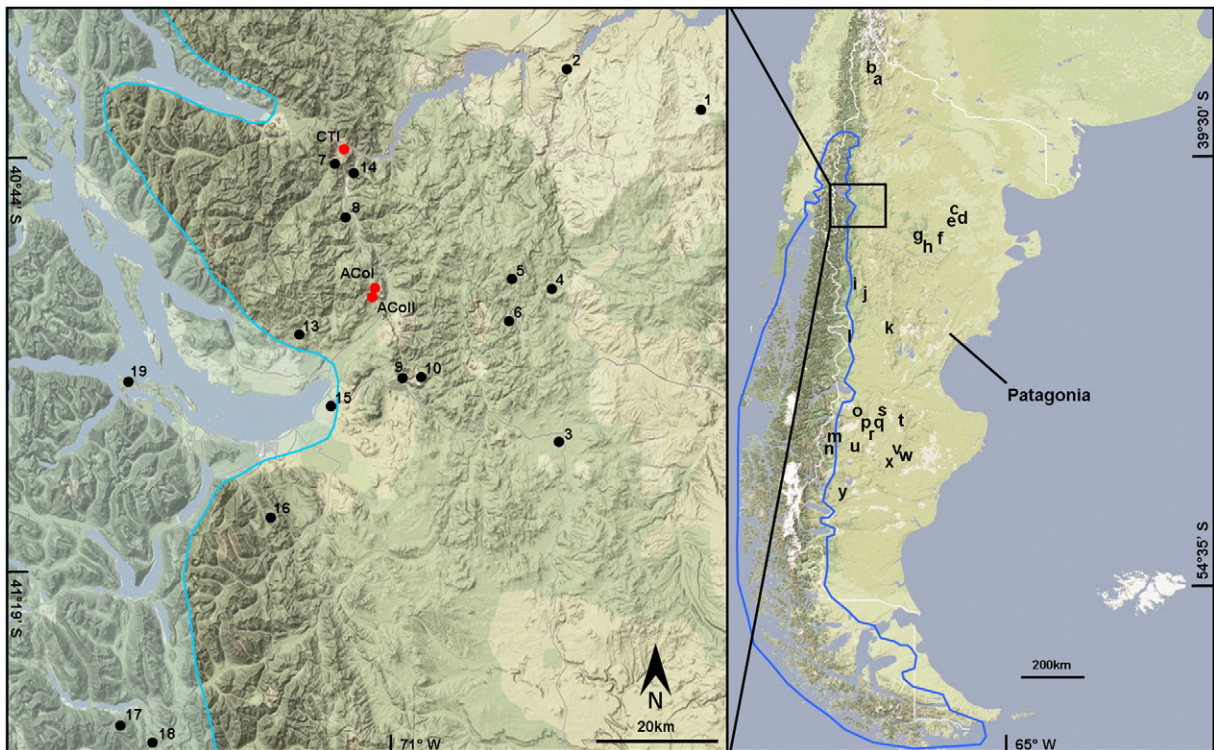


Figure 1. Map of the study area in northern Patagonia. In (A), a detailed map of the Limay Valley region is shown; this area includes the ACol, AColI, and CTI sites at which fossil material was collected (red dots) as well as the 19 locations at which modern owl pellets were collected (black dots). In (B), a larger portion of Patagonia is shown, with the 25 locations at which modern owl pellets were collected noted. The blue line indicates the estimated limit of ice sheets during the LGM.

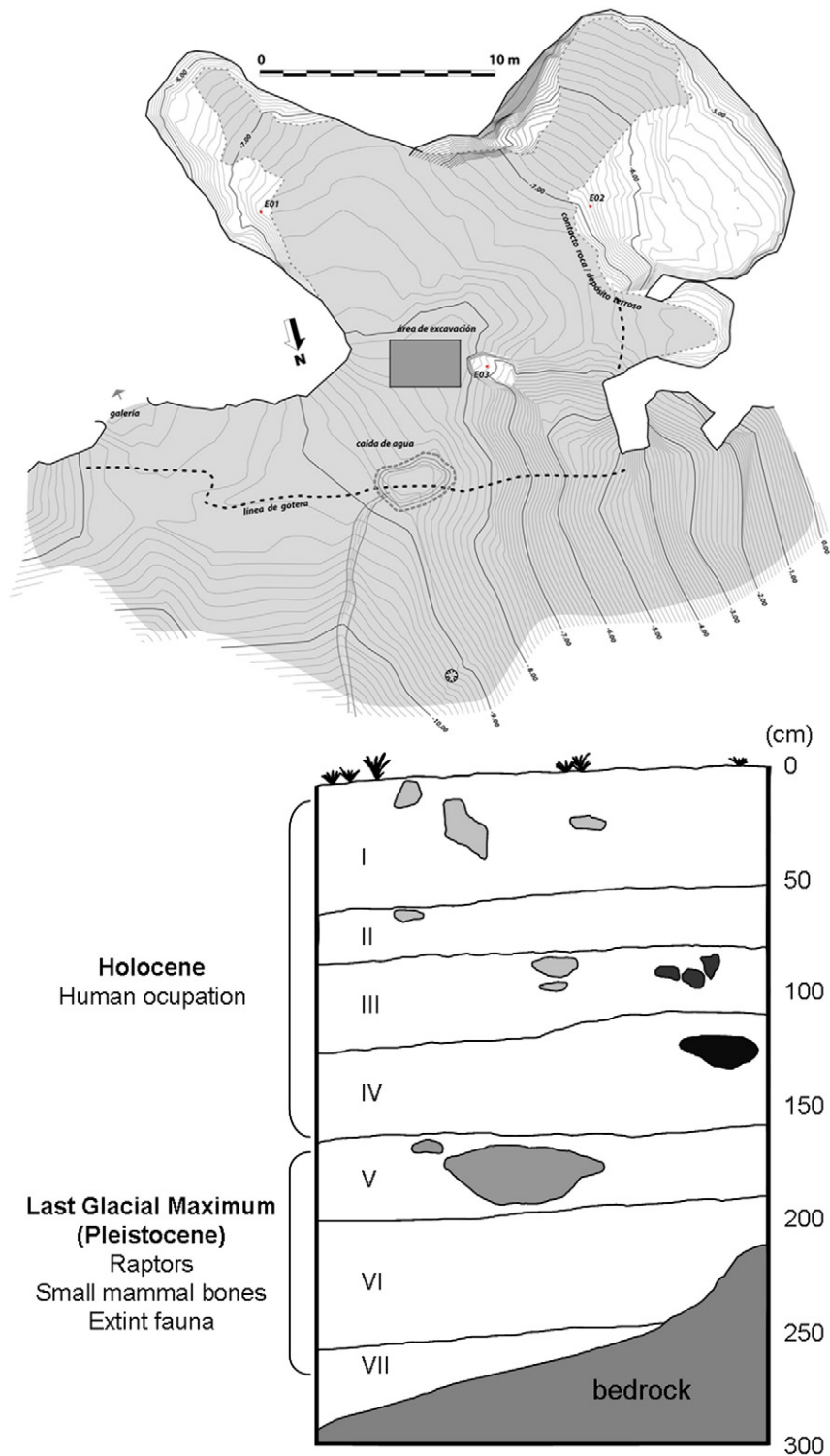


Figure 2. Map of the Arroyo Corral I collection site. In the upper panel, the location of the excavation site (gray rectangle) within the cave is indicated. Topography and imaging: Luis C. Teira Mayolini. In the lower panel, the stratigraphic sequence of the excavation pit is depicted.

Date calibration was accomplished using the IntCal13 calibration curve (Hogg et al., 2013) with the OxCal4.2 calibration software package (Bronk Ramsey, 2009). These estimates of stratigraphic age are concordant with the timing of the last glacial maximum in southern South America (Porter, 1981). No evidence of human occupation was detected at these levels of the cave. Given both the relatively short time span encompassed by these samples (~1000 years) and the absence of pronounced differences in the matrix recovered, and in the source of

sample deposition (see below) from these strata, we pooled material recovered from levels V–VII for subsequent analyses.

Small mammal remains from ACoI consisted of cranial, dental, and postcranial material. The taphonomy at the site was characterized using two approaches. First, bones and teeth were inspected using a hand-held magnifying glass to detect evidence of digestion and to determine the degree of fragmentation of each specimen. The breakage pattern of the bones examined, the low percentage of broken post-

cranial material, and the limited corrosion (<1%) of long bones (e.g., humerus, femur) and teeth were all consistent with an avian predator as the main agent responsible for small mammal sample deposition (Andrews, 1990; Stahl, 1996); this interpretation was supported by the discovery of numerous in-situ owl pellets during our excavations. Second, the relative abundances of nine skeletal elements (mandible, maxilla, scapula, humerus, radius, pelvis, femur, tibia, and calcaneus) were quantified for each stratigraphic level using the following formula: $N_i / (E_i \times MNI) \times 100$, where N_i is the number of each element in the sample, E_i is the expected number of each element per individual, and MNI is the minimum number of individuals (Andrews, 1990). Relative abundances of these skeletal elements (Fig. 3) indicate that the taphonomic agent was the same for all three stratigraphic levels, with the high abundances of cranial elements, humeri and femora being consistent with deposition by owls (Terry, 2007).

Given these lines of evidence, we conclude that the small mammal remains recovered from ACoI were deposited primarily – if not exclusively – by owls. In Patagonia, only two owl species use caves and are capable of producing such bone deposits – the Barn Owl (*Tyto alba*) and the Magellanic Horned Owl (*Bubo magellanicus*). The Barn Owl is the most common and most widely distributed owl in Patagonia, where it roosts primarily in caves (Travaini et al., 1997; Pardiñas and Cirignoli, 2002) and has been shown to be responsible for the deposition of small mammal bones at numerous archeological sites (Pearson and Pearson, 1993; Pardiñas, 1999a, 1999b; Teta et al., 2005). In contrast, the Magellanic Horned Owl nests mainly in open areas and uses caves only occasionally as resting sites (Trejo et al., 2005a). Thus, although we expect that *T. alba* was the primary agent of bone accumulation at ACoI, we cannot rule out potential contributions by *B. magellanicus*. However, even if both species had occupied the cave at different points in time, we do not expect this variation to have impacted our paleoenvironmental reconstructions samples due to the marked similarity in hunting behavior and associated large overlap in diet between Barn and Horned Owls (Trejo et al., 2005b; Trejo, 2006).

Additional fossil samples

Although our study focused on material deposited at ACoI, we also examined small mammal remains obtained from two other archeological sites in the vicinity of the Limay Valley. The first of these, Arroyo Corral II (ACoII), is a distinct cave located ~100 m uphill from ACoI. Excavation of ACoII is ongoing, but small mammal remains obtained from levels IV and V of this site (the oldest levels available) were examined using the methods described above. AMS dating of a bone from an unidentified large mammal placed level IV at 10,007–9294 cal yr BP [10,020 ± 96 ¹⁴C age BP (AA-75677)] and dating of a rodent (*Ctenomys*) mandible placed level V at 9802–9216 cal yr BP [9890 ± 97 ¹⁴C age BP (AA-100200)]. Thus, samples from this site were deposited during the early Holocene, most likely due to a combination of human activity and owl

predation. The second site, Cueva Trafal I (CTI) is a well-characterized archeological dig located about 25 km north of ACoI (Crivelli Montero et al., 1993; Pearson and Pearson, 1993). We examined the data set for small mammals from CTI provided in Pardiñas and Teta (2013). Based on dates published by Crivelli Montero et al. (1993), this material ranged from the early (9285 ± 105 ¹⁴C yr BP, LP-62) to the late (2230 ± 40 ¹⁴C yr BP, LJ-5130) Holocene. Thus, collectively, the three cave sites examined span the last ~20,000 years.

Modern samples

To provide an appropriate temporal comparison, we collected fresh owl pellets from 19 sites in the Limay region. Samples were collected within a ~50-km radius of ACoI to allow characterization of the small mammal fauna in the vicinity of our historical cave sites (Fig. 1). We assigned a habitat type to each modern locality following the scheme of León et al. (1998), with habitat types assessed visually at the time of sample collection (Table 2). Owl pellets were recovered from beneath nests and roost sites; based on feathers found in nests as well as direct observations of nest and roost sites, pellets were attributed to *T. alba*. To provide a larger, regional-scale perspective on the small mammal fauna potentially represented in LGM assemblages, we also analyzed remains contained in 25 modern owl pellet samples drawn from a large (>300 samples; Formoso, 2013) unpublished database covering most of Argentine Patagonian (Fig. 1).

Taxonomy and quantification

To determine the number of taxa present in a sample (i.e., species richness), cranial and dental remains were identified using dichotomous keys (Pearson, 1995; Fernández et al., 2011) as well as comparisons with reference specimens housed in the Colección de Mamíferos del Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET; Puerto Madryn, Argentina). The taxonomy employed here follows Musser and Carleton (2005) and Pardiñas et al. (2011). To estimate a species' relative abundance, the minimum number of individuals (MNI) present in a sample was calculated using cranial (mandibles, maxillae) and dental remains (Grayson, 1984), a second abundance estimator (NISF) was calculated but not used in the analysis; estimates were based on the most abundant of these anatomical elements, with bilateral symmetry (i.e., two elements per individual) taken into account. MNI was calculated for each of the 3 (V–VII) stratigraphic levels from ACoI and for each modern pellet-derived assemblage. To standardize MNI values calculated for each taxon, MNI was divided by the total number of individuals (all taxa combined) in the sample, generating estimates of the relative abundance of each taxon considered. Due to the marked variation in samples sizes for the different fossil levels, rarefaction curves (Colwell et al., 2004) were calculated for each level in order to assess reliability of our estimates of richness and relative abundance.

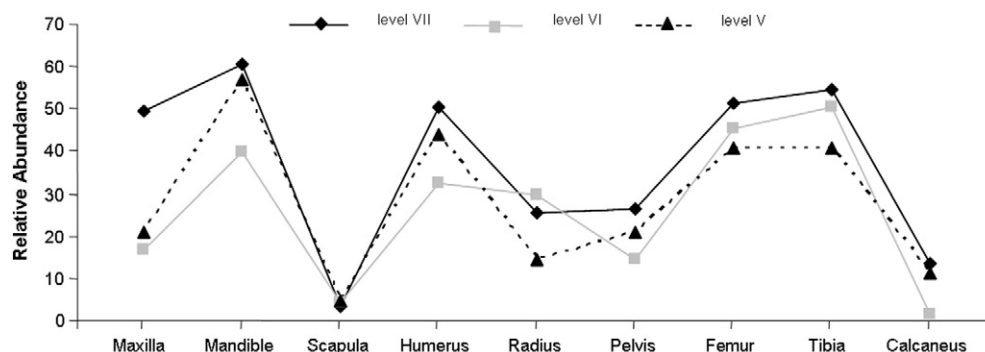


Figure 3. Relative abundance of the nine skeletal elements at the three LGM levels.

Table 1
Estimates of the minimum number of individuals (MNI) by taxon for three stratigraphic levels excavated at Arroyo Corral I (ACol) in southern Neuquén Province, Argentina. Carbon dates for these levels are shown and correspond to the last glacial maximum (LGM). The same information is presented for early Holocene samples collected from the nearby Arroyo Corral II (ACoII) as well as modern samples collected at ACoI. In brackets is the number of identified specimens (NISF).

Site	Level	¹⁴ C age BP	Abrothrix longipilis	Abrothrix olivaceus	Chelemys macronyx	Ctenomys sociabilis	Eligmodontia morganii	Euneomys chinchilloides	Irenomys tarsalis	Loxodontomys micropus	Microcavia australis	Oligoryzomys longicaudatus	Phyllotis xanthopygus	Reithrodontomys auritus	Total MNI	Total NISF	# species
ACoI	#VII	19,410 ± 280	0	2 (2)	7 (13)	6 (6)	0	36 (107)	0	0	0	0	6 (7)	0	57	135	5
		19,520 ± 100															
ACoI	#VI	No date	1 (1)	1 (1)	1 (1)	5 (7)	0	10 (16)	0	0	0	0	1 (1)	0	19	29	6
ACoI	#V	18,700 ± 260	0	0	0	4 (5)	1 (1)	8 (12)	0	1 (1)	0	0	1 (1)	0	15	20	5
ACoII	#IV	9890 ± 97	2 (2)	1 (1)	1 (1)	64 (134)	0	7 (11)	0	9 (15)	7 (10)	0	1 (2)	10 (20)	102	196	9
		10,020 ± 96															
ACoII	Modern		33 (73)	23 (57)	8 (22)	7 (13)	10 (28)	3 (7)	18 (45)	33 (70)	0	22 (61)	8 (19)	36 (122)	201	518	11

Community structure analyses

To explore relationships between relative abundance estimates for fossil and modern taxa, Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) analyses were performed (Taguchi and Oono, 2005). These analyses generated a Bray–Curtis statistic calculated from matrices of per-species abundances (%MNI) arranged (1) per-stratigraphic level for fossil assemblages and (2) per-locality for modern assemblages. To determine if species composition differed between time periods or between sampling localities within time periods, an Analysis of Similarities (ANOSIM; Clarke, 1993) was conducted using the Bray–Curtis statistics derived from our NMDS analyses. ANOSIM produces a statistic *R*, large values of which (i.e., *R* ~1) signify dissimilarity between groups. Pairwise ANOSIMs completed for all temporal and spatial combinations of data points were used as a post-hoc test of significance for individual *R* values, with a sequential Bonferroni test (Rice, 1989) conducted to determine appropriate alpha values. Finally, Similarities Percentage Analysis (SIMPER; Clarke, 1993) was used to identify the taxa contributing to significant differences between time periods or sampling localities. All analyses were conducted using the computer package PAST 1.81 (Hammer et al., 2001).

Paleoenvironmental analyses

Analyses of small mammal remains recovered from owl pellets are a relatively standard method for comparing faunal assemblages across time periods (Pearson and Pearson, 1993; Andrade and Teta, 2003; Fernández et al., 2012). Two attributes of owl biology make such samples particularly appropriate. First, the remains found in owl pellets are better preserved than those left by other predators and, second, the high roost fidelity displayed by many owl species leads to accumulation (with eventual fossilization) of extensive collections of material over time (Andrews, 1990). *T. alba* – the species most likely to have produced the deposits analyzed here – has been shown to prey primarily on small mammals; the specific prey items taken are determined by the habitats present with the ~5 km hunting radius of these animals, with no selection for specific prey species known to occur (Taylor, 1994; Pardiñas et al., 2003; Trejo and Lambertucci, 2007). As a result, assemblages of small mammal remains collected by owls are thought to provide useful indicators of the habitat types and thus the environments present at the time that predation occurred (e.g., Pearson and Pearson, 1993; Pardiñas, 1999a; Andrade and Teta, 2003; Teta et al., 2005; Trejo and Lambertucci, 2007; Pardiñas and Teta, 2008; Fernández et al., 2012). Thus, based on information regarding the current habitat preferences of the small mammals of northern Patagonia (Pearson and Pearson, 1982; Pearson, 1983, 1984, 1987, 1995; Pardiñas and Teta, 2013), we used comparisons of relative abundances in historical and modern assemblages (Overpeck et al., 1985) to draw inferences regarding the paleoenvironments of the study region.

Results

Temporal comparisons of assemblages at ACoI

A total of 181 cranial and dental remains from LGM small mammals were recovered from levels VII to V at ACoI. All remains were identified to species and consisted of either caviomorph or cricetid rodents. The total minimum number of individuals (MNI) was 91 and represented 8 species; 7 sigmodontines and 1 ctenomyd (Fig. 4 and Table 1). Rarefaction analyses revealed that although the species accumulation curve for level VII reached an asymptote, the curves for levels V and VI did not (Fig. 5). This suggests that while data from level VII provide a good representation of species richness, data from levels V and VI may have been biased in their estimates of species richness, most likely due to small sample sizes for these strata. When data from all 3 levels were pooled for analysis, the resulting rarefaction curve reached an

Table 2

Estimated MNIs for small mammal taxa found in modern owl pellets collected from 19 localities in Patagonia. NISP numbers on Supplementary Table 4.

#	Locality	Habitat	<i>Dromiciops gliroides</i>	<i>Abrothrix longipilis</i>	<i>Abrothrix olivaceus</i>	<i>Akodon iniscatus</i>	<i>Akodon neocenus</i>	<i>Chelemys macronyx</i>	<i>Ctenomys</i> spp.	<i>Eligmodontia</i> spp.	<i>Euneomys chinchilloides</i>	<i>Galea leucoblephara</i>
1	Cañadón A° Fuquelen	Arid steppe	0	0	15	0	0	0	29	28	0	0
2	Cerro Castillo	Arid steppe	0	1	6	0	7	0	38	104	0	1
3	Estancia Pilcañeu	Arid steppe	0	11	74	0	0	0	44	61	18	0
4	Paso de Los Molles	Arid steppe	0	1	36	4	0	0	15	10	0	0
5	Pipilcura	Arid steppe	0	19	15	0	0	7	27	1	4	0
6	Cooperativa Escuela	Arid steppe	0	19	51	0	0	3	14	25	12	0
7	Valle Encantado	Grassy steppe	0	56	5	0	0	7	17	23	0	0
8	La Lipela	Grassy steppe	0	119	11	0	0	0	13	14	3	0
9	San Ramón	Grassy steppe	0	36	15	0	0	3	15	21	0	0
10	Laguna Los Juncos	Grassy steppe	0	25	12	0	0	1	10	8	0	0
11	Corral II (modern)	Grassy steppe	0	33	23	0	0	8	7	10	3	0
12	Cueva Trafal I (modern)	Ecotone	0	28	7	0	0	8	7	8	0	0
13	Cliff Jones	Ecotone	0	143	24	0	0	12	9	6	11	0
14	Cueva del Caballo	Ecotone	0	170	59	0	0	6	44	62	5	0
15	Cerro Leones	Ecotone	0	566	393	0	0	27	50	169	23	0
16	Chalhuaco	Ecotone	3	59	1	0	0	44	20	6	3	0
17	Lago Steffen	Forest	0	7	36	0	0	1	0	0	0	0
18	Cabaña Cacique Foyel	Forest	0	6	11	0	0	0	0	0	0	0
19	Llao-Llao	Forest	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0

asymptote (Fig. 5) and thus this pooled data set was used for further analyses of faunal composition. In all 3 levels examined as well as in the pooled data set, assemblages were dominated by the rock-dwelling sigmodontine *Euneomys chinchilloides* (59% of MNI), followed by the subterranean *Ctenomys sociabilis* (16.4%; Fig. 6).

Comparisons of the small mammal assemblages from ACOI and ACOII revealed that all taxa detected during the LGM were also present in modern samples but that relative species abundance has changed markedly over time. Total species richness ($N = 8$ species) was lowest during the LGM and highest ($N = 11$ species) in the modern sample (Figs. 4 and 5); this change was due primarily to the addition of *Reithrodon auritus* during the early Holocene and the addition of *Irenomys tarsalis* and *Oligoryzomys longicaudatus* in modern samples. With regard to relative abundances, the most conspicuous changes were the decrease in frequency of *E. chinchilloides* and *C. sociabilis* from the LGM to today. More generally, modern samples were dominated by taxa (*Abrothrix longipilis*, *Loxodontomys micropus*, *R. auritus*) that had low abundances or that were absent during the LGM. Samples from the early Holocene contained the only occurrences of *Microcavia australis* and were distinguished by the extreme prevalence of *C. sociabilis*, both of which may reflect taphonomic biases related to human consumption of these rodents.

Spatial comparisons across the Limay region

Expanding the spatial scale of our comparisons to include samples from CTI revealed that *E. chinchilloides* was also the dominant species at this location. Thus, collectively, data from ACOI, ACOII, and CTI suggest that this animal was common (23–63% of total MNI) in the Limay region during much of the Pleistocene–Holocene (Table 1, Fig. 6). Samples from CTI and ACOI were also similar in that two species specializing on forest habitat, *I. tarsalis* and *Geoxus valdivianus* were absent before ~9 ka, as was *O. longicaudatus*, which occurs in moist, brushy habitats (Table 1, Fig. 6). The same 3 species were also absent in the early Holocene material from ACOII (Table 1, Fig. 6). The absence of these species from the fossil assemblages examined suggests that dry, open habitats characterized this region during the late Pleistocene.

Comparison of these fossil assemblages with data from modern owl pellets collected in the Limay region revealed that the small mammal fauna of this area has changed markedly since the LGM. NMDS ordination analyses revealed no relationship between the fossil and modern samples examined, with the fossil LGM assemblage from ACOI being clearly distinct from CTI, ACOII and the modern assemblage (Fig. 7). Based on these results, analyses of similarity (ANOSIM) were conducted

by dividing our data into 4 temporal categories – LGM, ACOI 10 ka, CTI, and modern – with the modern samples further subdivided by habitat type (Fig. 7). ANOSIM results indicated significant differences in species composition and abundance among these categories ($R = 0.880$, $P < 0.001$). Post-hoc pairwise comparisons confirmed significant differences among all of these assemblages as well as among the different modern habitat types (Supplementary Table 2). SIMPER analyses identified *E. chinchilloides* as the primary taxon underlying these differences, followed by *O. longicaudatus* (Supplementary Table 3). As noted above, *E. chinchilloides* was abundant in fossil assemblages while *O. longicaudatus* is an abundant component of modern assemblages.

Comparisons across Patagonia

Given the prevalence of *E. chinchilloides* in the LGM assemblage from ACOI, we searched an unpublished database of small mammal remains obtained from owl pellets collected in Patagonia (Colección de egagrópilas del Centro Nacional Patagónico; Formoso, 2013) to identify modern assemblages containing >30% *E. chinchilloides* (total MNI >100). This search resulted in 25 samples for analysis (Supplementary Table 1). NMDS ordination revealed no conspicuous association between ACOI and any of the 25 modern samples considered (Fig. 7). Similarity was greatest (Bray–Curtis index = 0.7856) between ACOI and a sample from Cajón Grande Curi Leuvu in Neuquén Province. This site is located ~500 km north of ACOI at an elevation of 1885 m.a.s.l., which is above the current treeline for that portion of the Andes Mountains.

Paleoenvironmental interpretations

Assuming that the habitat requirements of small mammals in Patagonia have not changed substantially over the last ~20,000 years, the above data allow us to draw several inferences regarding the habitats present at ACOI during the LGM. First, the predominance of *E. chinchilloides* in the ACOI assemblage coupled with the presence of *P. xanthophygyus* in these samples suggests an open, relatively barren rocky habitat. This hypothesis is also consistent with the similarity between the ACOI assemblage and the composition of owl pellets collected at Cajón Grande Curi Leuvu. Second, the occurrence of *C. sociabilis* and *Chelemys macronyx* are suggestive of the presence of patches of mesic habitat, perhaps associated with glacial runoff or other small waterways. Third, the absence of forest-dwelling taxa (e.g., *I. tarsalis* and *G. valdivianus*) from ACOI suggests an absence of extensive tree cover. Collectively, these inferences

<i>Geoxus valdivianus</i>	<i>Irenomys tarsalis</i>	<i>Lestodelphys halli</i>	<i>Loxodontomys micropus</i>	<i>Microcavia australis</i>	<i>Octodon bridgesii</i>	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	<i>Reithrodon auritus</i>	<i>Thylamys pallidior</i>	TOTAL	# species	LS	LW	Reference
0	0	8	0	0	0	2	7	26	2	117	8	40° 40'	70° 25'	(1)
0	0	5	2	0	0	5	29	58	0	256	11	40° 35'	70° 40'	(2)
0	0	11	5	0	0	0	4	111	0	339	9	41° 08'	70° 41'	(1)
0	0	2	0	0	0	0	1	20	0	89	7	40° 55'	70° 43'	(1)
1	0	0	27	0	0	1	2	31	0	135	11	40° 54'	70° 48'	(3)
0	0	0	19	0	0	0	8	18	0	169	9	40° 58'	70° 48'	(3)
5	19	0	69	0	0	74	11	2	0	288	11	40° 45'	71° 08'	(3)
0	6	0	96	0	0	64	2	31	0	359	10	40° 49'	71° 06'	(3)
2	2	0	22	0	0	36	16	72	0	240	11	41° 03'	70° 59'	(3)
0	0	0	51	0	0	6	1	54	0	168	9	41° 03'	71° 00'	(4)
0	18	0	33	0	0	22	8	36	0	201	11	40° 56'	71° 03'	This paper
7	0	0	18	0	0	115	3	2	0	203	10	40° 43'	71° 07'	This paper
19	31	0	271	0	7	187	4	53	0	777	13	40° 59'	71° 13'	This paper
4	25	0	95	1	2	242	19	2	0	736	14	40° 45'	71° 05'	This paper
18	20	0	621	0	0	508	19	361	0	2775	12	41° 04'	71° 08'	(4)
18	0	0	84	0	0	42	2	6	0	288	12	41° 15'	71° 16'	(3)
2	7	0	19	0	0	29	0	0	0	101	7	41° 32'	71° 35'	(5)
1	6	0	21	0	0	38	0	0	0	83	6	41° 35'	71° 31'	(5)
1	9	0	35	0	0	82	0	0	0	132	5	41° 03'	71° 34'	This paper

suggest that during the LGM, the area around ACoI contained (1) more barren, rocky habitat and open grasslands punctuated by mesic areas of glacial runoff; but (2) less shrubland and fewer stands of trees than occur at this site today.

Discussion and conclusions

Comparisons of historical and modern faunas can generate important insights into patterns of environmental change (e.g., Pearson, 1987; Avery, 1992; Blois et al., 2010; Ortiz et al., 2011; Terry et al., 2011; Fernández et al., 2012; Schmitt and Lupo, 2012). Assemblages of small mammal are particularly useful for this purpose because, in contrast to larger-bodied species, these animals are often of local derivation and have relatively narrow microhabitat requirements (e.g., Stahl, 1996; Terry, 2010a, 2010b). As a result, small mammal remains can provide detailed information regarding environmental conditions at specific localities. Our analyses of cranial and dental remains recovered from owl pellets revealed significant changes in the composition of the small mammal fauna in the Limay Valley region of Patagonia over the past ~20,000 years. In general, both species richness and evenness have increased since the LGM; accordingly, the relative abundances of some species have changed markedly during this period. Analyses of modern owl pellets collected throughout northern Patagonia revealed no pronounced geographic variation among the small mammal faunas contained in these samples, suggesting that the differences evident in the Limay Valley region are due primarily to temporal, rather than spatial, variation in small mammal assemblages. Extrapolating from these findings (in particular, changes in the relative abundance of several species), our data suggest that the habitats surrounding the ACoI study site have changed markedly since the LGM.

Reconstructing LGM environments

The composition of the LGM fauna at ACoI suggests a largely open, rocky environment punctuated by moister patches of grasses and shrubs. This interpretation is consistent with the few other data sets available regarding historic environments in northern Patagonia. Both pollen records and beetle assemblages from this region suggest that the LGM was characterized by persistent low temperatures, strong winds, and prolonged snow cover. For areas east of the Andes, the only evidence of habitat conditions during this period comes from palynological data collected at Mallín Aguado (~25 km SW of ACoI; Markgraf and Bianchi, 1999). This record, which dates to ca. 17,000 yr, suggests that the predominant habitat was steppe-like, consisting of largely

treeless expanses of grasses and shrubs (Markgraf et al., 2002). West of the Andes, pollen records from Fundo Llanquihue and Alerce (~150 km W of ACoI) suggest that ca. 20,000 yr, the Chilean Lake District was characterized by high Andean steppe consisting of a mix of grasses and shrubs punctuated by bog-like areas and small patches of Subantarctic forest (Heusser, 2003; Heusser et al., 2006); consistent with this, the average summer temperature at the time is estimated to have been 6–7°C cooler than today (Moreno, 1997). A similar landscape is suggested by the fossil fauna of cold-adapted beetles documented from this region (Hoganson and Ashworth, 1992; Ashworth, 2006). Thus, in general, LGM habitats from northern Patagonia appear to have been more open, barren, and colder than the habitats in the region today.

The LGM fauna from ACoI also yields insights into local patterns of glaciation. Several lines of evidence suggest that glaciers continued to cover large portions of the eastern slope of the Patagonian Andes at ca. 15–14 ka (McCulloch et al., 2000; Glasser et al., 2004). After the LGM, as the glaciers retreated, the landscape in northern Patagonia is thought to have been dominated by large lakes (Tatur et al., 2002). Along the Andean precordillera, extensive bodies of water formed when terminal moraines dammed existing drainages. This is thought to have coincided with a pluvial phase that peaked about 16.5 ka, as estimated from dates obtained from carbonates collected near Maquinchao (cf. Tatur et al., 2002), ca. 200 km east of the Limay Valley. As a result, lakes rose to the highest levels known for both the Patagonian steppe (e.g., Galloway et al., 1988; Cartwright et al., 2011) and central, semiarid Argentina (Bebadero basin; Gonzales et al., 1981). The changes in composition of the small mammal assemblages examined here – in particular, the increased mammalian diversity evident beginning in the early Holocene – are consistent with this general climatic change.

Finally, the faunal record revealed by owl pellets from ACoI can be used to infer the location of forest habitat during the LGM. Rodent species that today typically occur in forest or shrub–forest habitats (e.g., *Geoxus*, *Irenomys*, *Loxodontomys*, *Oligoryzomys*) are rare or missing from the earliest levels examined at ACoI, suggesting that the surrounding area was not forested during this period. Although this could be attributed to the tendency of Barn Owls to hunt in open habitats, analyses of pellets deposited by *T. alba* nesting in or near forested areas revealed that those animals preyed heavily on forest-dwelling rodents (Trejo and Ojeda, 2004; Udrizar Sauthier et al., 2005). This suggests that if a patch of forest habitat had been located near ACoI during the LGM, we would have detected the presence of forest-dwelling rodents in the samples excavated from the cave.

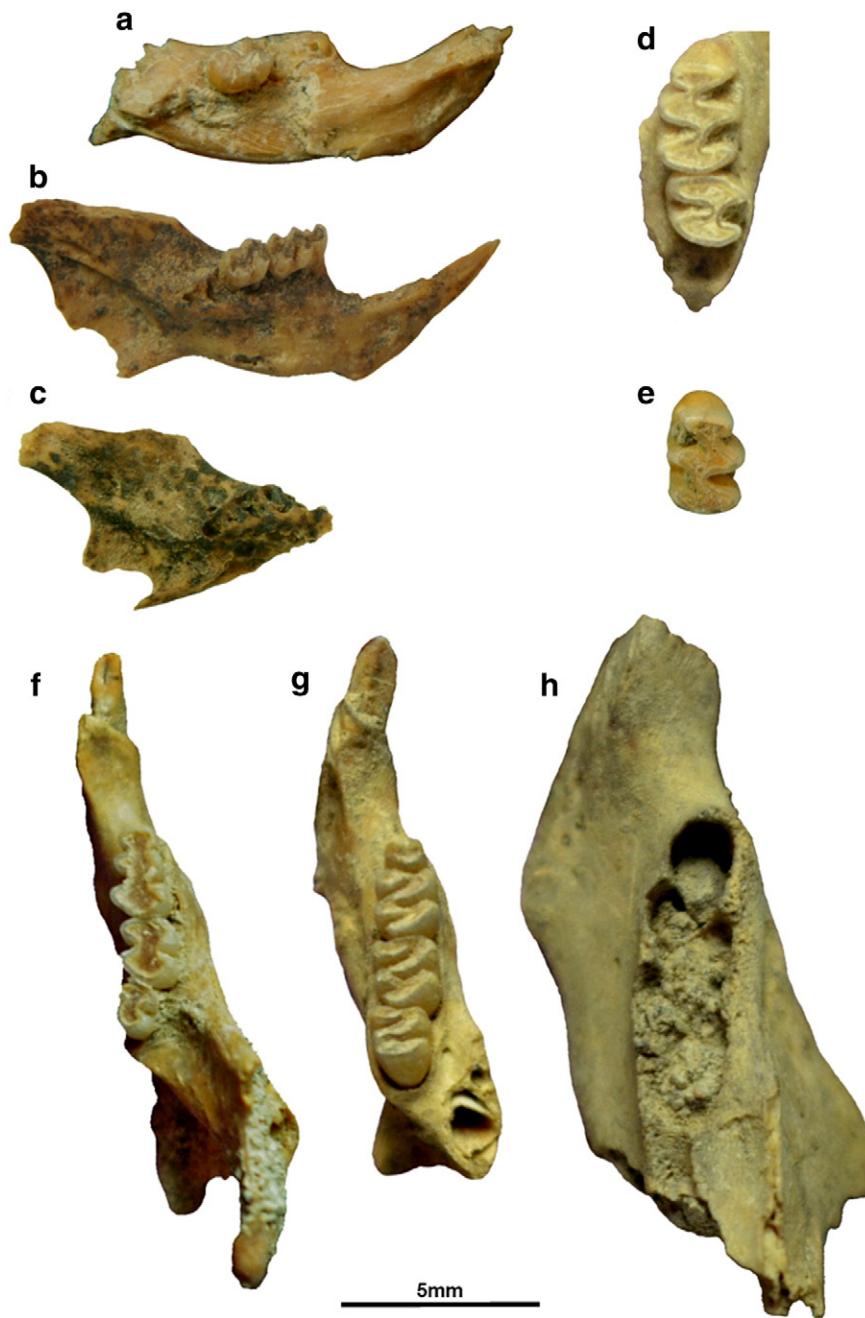


Figure 4. Representative examples of small mammal specimens obtained from ACol levels V–VII, which correspond to the LGM. Shown are the left mandibles (labial views) of (a) *Abrothrix longipilis* [with m3], (b) *A. olivaceus* [with m2–3] and (c) *Eligmodontia morgani* [with alveoli]. Also shown are the left maxillae of (d) *Phyllotis xanthopygus* [with M1–3] and an isolated right M1 molar of (e) *Loxodontomys micropus*. Finally, right mandibles (occlusal views) are shown for (f) *Chelemys macronix* [with m1–3], (g) *Euneomys chinilloides* [with m1–3] and (h) *Ctenomys sociabilis* [with alveoli].

The location of the LGM terminal moraine indicates that the edge of the ice shield was about 10 km SW of ACol, near the mouth of the Limay River. The hilly terrain (elevation >1500 m) immediately to the west of the cave, suggests that ACol was not covered by ice but was characterized by cold and dry conditions, making the presence of a forest refugium in this area unlikely. This interpretation is supported by pollen records from Mallín Aguado; prior to 17,000 cal yr BP, this location was dominated by treeless steppe vegetation (Markgraf et al., 2002). Additionally, phylogeographic studies of several forest-dwelling small mammal taxa (e.g., *Dromiciops gliroides*: Amico and Aizen, 2000; Himes et al., 2008) as well as several plant taxa associated with Patagonian forests (e.g., *Nothofagus pumillo*; Mathiasen and Premoli, 2010) suggest that forested refuge areas were located in north-central Chile

and southern Mendoza Province in Argentina (Smith et al., 2001; Palma et al., 2012) as well as in the eastern Andes well to the south of ACol (latitudes >43°S; Premoli et al., 2000; Pastorino et al., 2009). Thus, the area surrounding ACol does not appear to have been forested during the LGM, adding further support to the hypothesis that the predominant habitat at this location was open grassland or shrub-land.

Changes in the mammalian fauna

Given the apparent similarity between the inferred LGM habitat at ACol and current high Andean habitats, it is perhaps not surprising that the small mammal assemblages recovered from ACol are somewhat depauperate. Modern small mammal communities from presumably

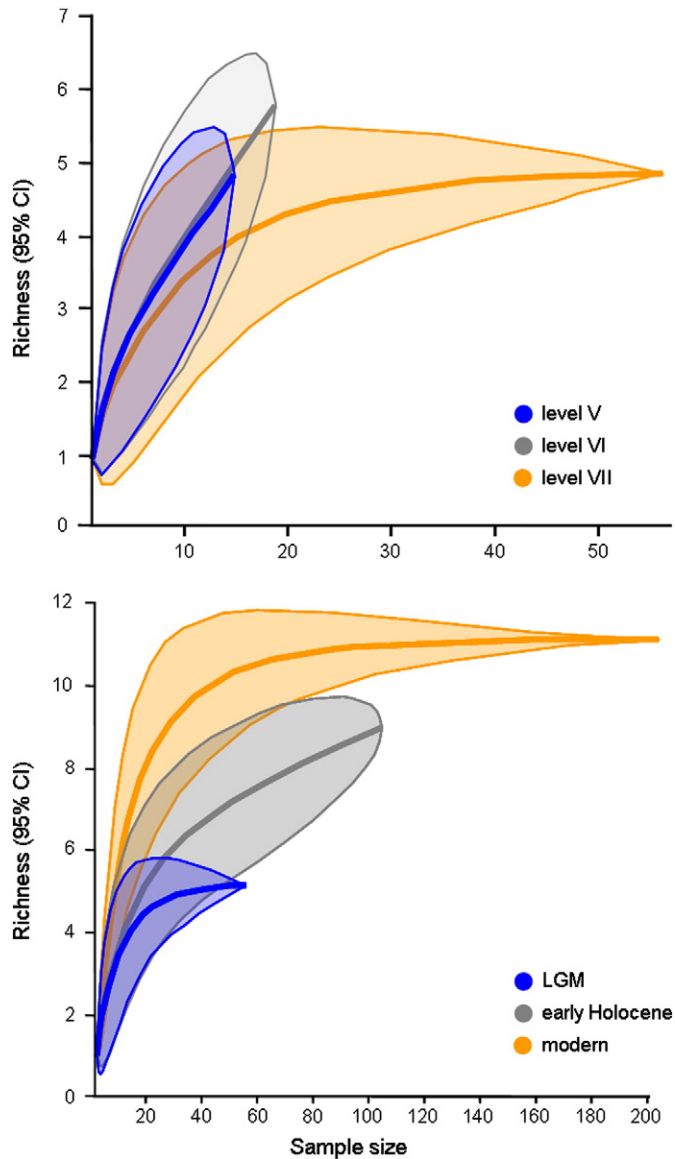


Figure 5. Rarefaction analyses for fossil LGM assemblages from ACol (upper panel), and for across time periods (bottom panel) include early Holocene (10 ka) and modern samples from AColI, and LGM samples from ACol (all levels pooled). For all samples, 95% confidence intervals are shown.

similar high elevation Andean habitats contain relatively limited taxonomic diversity, typically consisting of a few members of the Abrotrichini and Phyllotini as well as *Euneomys* (Reise and Venegas, 1987; Pearson, 1995; Pardiñas et al., 2003). In contrast, the ecotone habitat present at ACol today – a mosaic of grassland, open shrubland, and small patches of forest – is typically associated with greater species diversity (Pearson and Pearson, 1982). Thus, the increase in species richness and diversity over time evident in our samples is consistent with changes from the inferred LGM environment to the modern habitats in the Limay region. Overall, this suggests that most responses to changing climatic conditions occurred in situ (see Terry et al., 2011), with a major faunal shift resulting from the immigration of new taxa associated with forested habitats ca. 9–10 ka.

Temporal changes in the prevalence of two species are particularly noteworthy. First, our data revealed a pronounced decline in the relative abundance of *E. chinchilloides* since the LGM. In montane areas near Aconcagua (elevation 2850 m) in northwestern Argentina, this species represents >50% of the prey consumed by owls (Pardiñas et al., 2010), suggesting that these animals represent an important food resource for

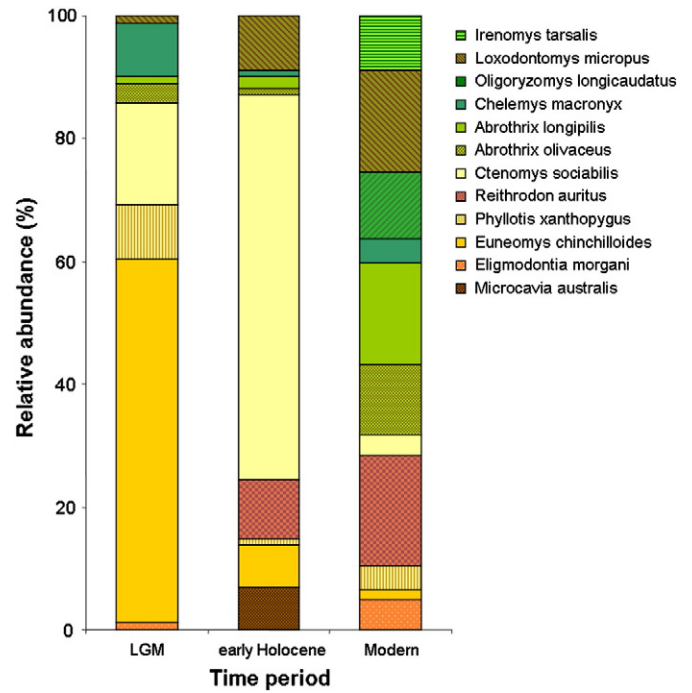


Figure 6. Temporal changes in the relative abundance of small mammal species in the Limay Valley region. Data shown are from the LGM (ACol), the early Holocene (AColI), and modern owl pellets (AColI). Estimates of relative abundance were calculated from analyses of MNI values for each species.

at least one avian predator in this ecosystem. At ACol, *E. chinchilloides* went from being the most abundant small mammal species (~60% of material identified) during the LGM to being one of the least common (<5% of material identified) in modern samples from this locality (see also Pearson, 1987; Rebane, 2002; Pardiñas and Teta, 2013). In addition to the implications of this finding for inferences regarding historic and modern environments (see above), this dramatic shift in the composition of the small mammal fauna of ACol seems likely to have had important consequences for other elements of the local biota, such as the predators in this region that relied on *E. chinchilloides* as a food resource.

A marked decrease in the abundance of *C. sociabilis* since the LGM was also detected. This species is endemic to the Limay region (Pearson, 1995), where it is associated with mesic patches of grass and shrub land (Tammone et al., 2012). Comparisons of historic samples from Cueva Traful and modern populations of this species suggest that it has undergone a significant loss of genetic variability over the last 3000–5000 years (Chan et al., 2005). One proposed explanation for this reduction in genetic variability is loss of suitable habitat due to changes in environmental conditions. The open grassland and shrubland habitat thought to have occurred in this region immediately after the last major glacial retreat (Markgraf et al., 2002) would have favored *C. sociabilis*. As *Nothofagus* forest and cypress began to increase in prevalence in the early Holocene, however, much of this open habitat may have disappeared, leading to the decrease in relative abundance and genetic diversity reported for *C. sociabilis* (Chan et al., 2005).

In sum, our analyses of fossil mammal assemblages obtained from owl pellets collected at ACol have generated important new insights into the environment present at this locality during the LGM. Our analyses suggest that during this period, the Limay Valley region of Patagonia was characterized by open, barren, cold habitats of the type found today at high elevation locations in the Andes mountains. Associated with habitat changes at this locality over the past ca. 20,000 years are pronounced changes in the small mammal community, notably marked decreases in two previously predominant species, *E. chinchilloides* and *C. sociabilis*. In addition generating insights into the ecological histories of these two taxa, these analyses suggest important changes in the

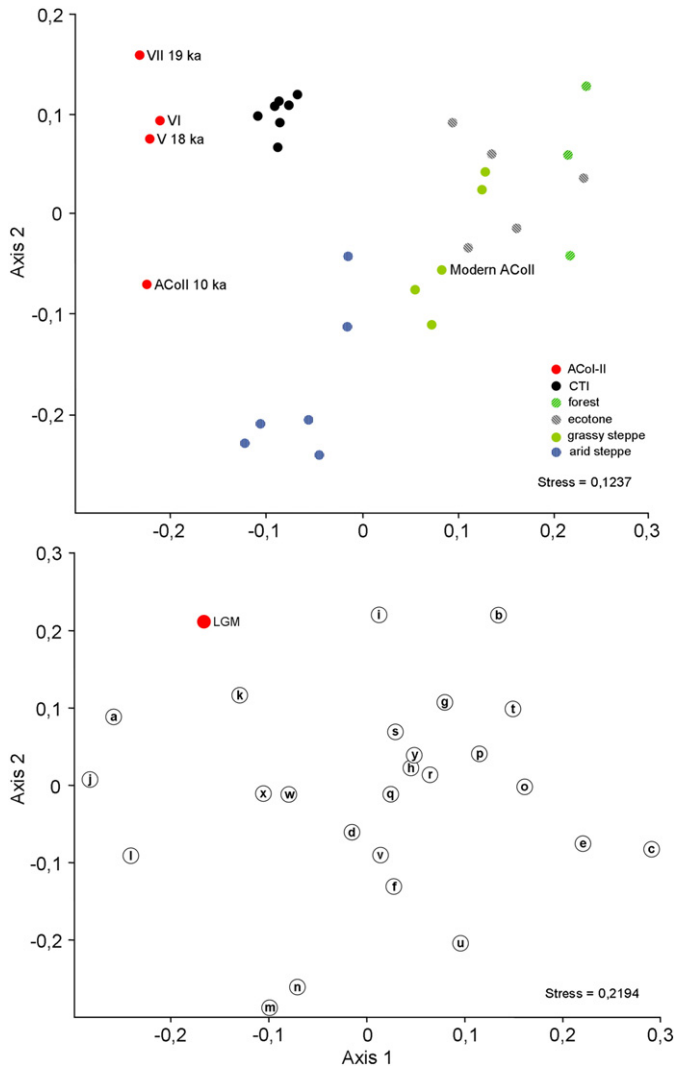


Figure 7. NMDS ordination plots for modern and fossil small mammal assemblages from Patagonia. Upper panel: analyses of samples from the Limay Valley region, including fossil assemblages from Corral's caves and CTI, and modern samples by habitat type from the 19 localities listed in Table 2. Bottom panel: analyses of samples from a larger area of Patagonia. Letters refer to the 25 modern sampling localities listed in Table 1. For both panels, the stress value indicates the concordance between the data matrix and the 2-dimensional plane; high stress values = 1 indicate a poor fit between these parameters.

larger communities in which these animals occurred. Future studies will focus on integrating these data with more detailed analyses of the historical demography and genetics of *E. chinchilloides* and *C. sociabilis* in order to better understand the ecological and evolutionary consequences of temporal changes in environmental conditions in Patagonia.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yqres.2014.04.015>.

Acknowledgments

We are especially grateful to Susan Jones Frey and Juan Carlos Perez, who generously allowed us to work at Estancia La Lonja. We thank the Administración de Parques Nacionales and Parque Nacional Nahuel Huapi for permission to work within the park. Fernando Fernández provided helpful advice regarding taphonomy and Luis Cesar Teira Mayolini assisted with digital topography. We also wish to thank Maximiliano Lezcano, Ana Albornoz, Jesus Tapia Sagarna, Ángel Armendariz Gutiérrez, Patricia Fernández Sánchez and Marián Cueto Rapado for assistance with the excavation of ACol. Anahí Formoso, Daniela de Tommaso, and Adela Bernardis provided valuable help during laboratory analyses of small

mammal remains. Fieldwork at Arroyo Corral I and II has been funded by two projects of the Spanish Ministries of Culture (Ayudas en régimen de concurrencia competitiva para proyectos arqueológicos en el exterior) Education and Science (Programa de Incentivación de la Incorporación e Intensificación de la Actividad Investigadora-Programa I3) granted to Pablo Arias. Financial assistance was provided by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2008-0547 to Ulyses F.J. Pardiñas).

References

- Amico, G., Aizen, M.A., 2000. Mistletoe seed dispersal by a marsupial. *Nature* 408, 929–930.
- Andrade, A., Teta, P., 2003. Micromamíferos (Rodentia y Didelphimorphia) del Holoceno Tardío del sitio arqueológico alero Santo Rosario (provincia de Río Negro, Argentina). *Atek Na* 1, 273–287.
- Andrews, P., 1990. *Owls, Caves and Fossils*. Natural History Museum, University of Chicago Press, London.
- Arias, P., Hajduk, A., Crivelli, E., Chauvin, A.M., Albornoz, A.M., Armendariz, Á., Caracotche, S., Cueto, M., Fernández, M.M., Fernández Sánchez, P., Lezcano, M.J., Palacio, E., Tapia, J., Tamzone, M.N., Teira, L.C., Vallejo, J., 2013. El poblamiento temprano del noroeste de la Patagonia argentina. *Trabajos desarrollados durante 2011. Informes y trabajos*, 9, pp. 19–41.
- Ashworth, A., 2006. *Quaternary Fossil Beetle Assemblages from South America*. Encyclopedia of Quaternary Science. Elsevier, Amsterdam.
- Avery, D.M., 1992. The environment of early modern human at Border Cave, South Africa: micromammalian evidence. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 91, 71–87.
- Barnosky, A.D., 1994. Defining climate's role in ecosystem evolution: clues from Late Quaternary mammals. *Historical Biology* 8, 173–190.
- Barnosky, A.D., Rouse, T.I., Hadly, E.A., Wood, D.L., Keesing, F.L., Schmidt, V.A., 1996. Comparison of mammalian response to glacial–interglacial transitions in the middle and late Pleistocene. In: Stewart, K.M., Seymour, K.L. (Eds.), *Palaeoecology and Palaeoenvironments of Late Cenozoic Mammals*. University of Toronto, pp. 16–33.
- Blois, J.L., McGuire, J.L., Hadly, E.A., 2010. Small mammal diversity loss in response to late-Pleistocene climatic change. *Nature* 465, 771–775.
- Bran, D., 2000. Las regiones ecológicas de la Patagonia y sus principales formaciones vegetales. In: INTA (Ed.), *Principios de Ecología y Conservación de los Recursos Naturales de la Patagonia*. INTA, Buenos Aires, pp. 93–100.
- Bronk Ramsey, C., 2009. Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* 51, 337–360.
- Cartwright, A., Quade, J., Stine, S., Adams, K.D., Broecker, W., Cheng, H., 2011. Chronostratigraphy and lake-level changes of Laguna Cari-Laufquén, Río Negro, Argentina. *Quaternary Research* 76, 430–440.
- Chan, Y.L., Lacey, E.A., Pearson, O.P., Hadly, E.A., 2005. Ancient DNA reveals Holocene loss of genetic diversity in a South American rodent. *Biology Letters* 1, 423–426.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117–143.
- Colwell, R.K., Mao, C.X., Chang, J., 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85, 2717–2727.
- Crivelli Montero, E.A., Curzio, D.E., Silveira, M.J., 1993. La estratigrafía de la Cueva Trafal I (Provincia del Neuquén). *Praehistoria* 1, 9–160.
- Fernández, F.J., Ballejos, F., Moreira, G.J., Tonni, E.P., De Santis, L.J., 2011. *Roedores cricétidos de la Provincia de Mendoza: guía cráneo-dentaria orientada para su aplicación en estudios zooarqueológicos*. Universitat, Córdoba.
- Fernández, F.J., Teta, P., Barberena, R., Pardiñas, U.F.J., 2012. Small mammal remains from Cueva Huenul 1, northern Patagonia, Argentina: Taphonomy and paleoenvironments since the Late Pleistocene. *Quaternary International* 278, 22–31.
- Formoso, A.E., 2013. *Ensamblajes de micromamíferos y variables ambientales en Patagonia continental extra-andina Argentina*. (Ph.D. thesis) Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Galloway, R.W., Markgraf, V., Bradbury, J.P., 1988. Dating shorelines of lakes in Patagonia, Argentina. *Journal of South American Earth Sciences* 1, 195–198.
- Glasser, N.F., Harrison, S., Winchester, V., Aniya, M., 2004. Late Pleistocene and Holocene palaeoclimate and glacier fluctuations in Patagonia. *Global and Planetary Change* 43, 79–101.
- Gonzales, M.N., Musacchio, E.A., Garcia, A., Pascual, R., Coret, A.E., 1981. Las líneas de costa Holoceno de la salina del Bebedero (San Luis, Argentina). Implicaciones paleoambiente les de sus microfósiles. *Actas VIII Congreso Geológico Argentino*, San Luis, 3, pp. 617–628.
- Grayson, D.K., 1983. The paleontology of Gatecliff Shelter: small mammals. In: Thomas, D. H. (Ed.), *The Archaeology of Monitor Valley: 2. Gatecliff Shelter*. Anthropological Papers of the American Museum of Natural History, 59, pp. 99–126.
- Grayson, D.K., 1984. *Quantitative Zooarchaeology: Topics in the Analysis of Archaeological Faunas*. Academic Press, Inc., New York.
- Hadly, E.A., 1996. Influence of Late-Holocene climate on Northern Rocky Mountain mammals. *Quaternary Research* 46, 298–310.
- Hadly, E.A., Kohn, M.H., Leonard, J.A., Wayne, R.K., 1998. A genetic record of population isolation in pocket gophers during Holocene climatic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6893–6896.
- Hajduk, A., Albornoz, A., Lezcano, M.J., 2004. El "Myloodon" en el patio de atrás. *Contra Viento y Marea, V Jornadas de Arqueología de la Patagonia*, pp. 715–732.
- Hajduk, A., Albornoz, A., Lezcano, M.J., 2006. Levels with extinct fauna in the forest rockshelter El Trébol (Northwest Patagonia, Argentina). *Current Research in Pleistocene* 23, 55–57.

- Hammer, O., Harper, D.A.P., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 1–9.
- Heusser, C.J., 2003. Ice age southern Andes: a chronicle of palaeoecological events. *Developments in Quaternary Science*, vol. 3. Elsevier, Amsterdam.
- Heusser, L., Heusser, C., Mix, A., McManus, J., 2006. Chilean and Southeast Pacific paleoclimate variations during the last glacial cycle: directly correlated pollen and $\delta^{18}\text{O}$ records from ODP Site 1234. *Quaternary Science Reviews* 25, 3404–3415.
- Himes, C.M.T., Gallardo, M.H., Kenagy, G.K., 2008. Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography* 35, 1415–1424.
- Hoganson, J., Ashworth, A., 1992. Fossil beetle evidence for climatic change 18,000–10,000 years BP in south-central Chile. *Quaternary Research* 37, 101–116.
- Hogg, A., Hua, Q., Blackwell, P., Niu, M., Buck, C., Guilderson, T., Heaton, T., Palmer, J., Reimer, P., Reimer, R., Turney, C., Zimmerman, S., 2013. SHCal13 southern hemisphere calibration, 0–50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 55, 1889–1903.
- Hulton, N., Purves, R., McCulloch, R., Sugden, D., Bentley, M., 2002. The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews* 21, 233–241.
- León, R.J.C., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J.M., Soriano, A., 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8, 125–144.
- Lessa, E.P., Cook, J.A., Patton, J.L., 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10331–10334.
- Lessa, E.P., D'Elia, G., Pardiñas, U.F.J., 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian–Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19, 3031–3037.
- Markgraf, V., Bianchi, M.M., 1999. Paleoenvironmental changes during the last 17,000 years in western Patagonia: Mallín Aguado, province of Neuquén, Argentina. *Bamberg Geographische Schriften* 19, 175–193.
- Markgraf, V., Webb, R.S., Anderson, K.H., Anderson, L., 2002. Modern pollen/climate calibration for southern South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 181, 375–397.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C., 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology* 19, 371–385.
- McCulloch, R.D., Bentley, M.J., Purves, R.S., Hulton, N.R.J., Sugden, D.E., Clapperton, C.M., 2000. Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidences at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science* 15, 409–417.
- Monjeau, J., Sikes, R., Birney, E., Guthmann, N., Phillips, C., 1997. Small mammal community composition within the major landscape divisions of Patagonia, southern Argentina. *Mastozoología Neotropical* 4, 113–127.
- Moreno, P., 1997. Vegetation and climate bear Lago Llanquihue in the Chilean Lake District between 20,200 and 9500 ^{14}C yr BP. *Journal of Quaternary Science* 12, 485–500.
- Musser, G.G., Carleton, M.D., 2005. Superfamily Muroidea. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Maryland, pp. 894–1531.
- Ortiz, P.E., Madozzo Jaén, M.C., Jayat, J.P., 2011. Micromamíferos and paleoenvironments: climatic oscillations in the Monte desert of Catamarca (Argentina) during the last two millennia. *Journal of Arid Environments* 77, 103–109.
- Overpeck, J.T., Webb, T., Prentice, I.C., 1985. Quantitative interpretation of fossil pollen spectra: dissimilarity coefficients and the method of modern analogs. *Quaternary Research* 23, 87–108.
- Palma, R.E., Boric-Bargetto, D., Torres-Pérez, F., Hernández, C.E., Yates, T.L., 2012. Glaciation effects on the phylogeographic structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Southern Andes. *PLoS ONE* 7, e32206.
- Pardiñas, U.F.J., 1999a. Los roedores muroideos del Pleistoceno Tardío-Holoceno en la región pampeana (sector este) y Patagonia (República Argentina): aspectos taxonómicos, importancia bioestratigráfica y significación paleoambiental. (Ph.D. thesis) Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Pardiñas, U.F.J., 1999b. Tafonomía de microvertebrado en yacimientos arqueológicos de Patagonia (Argentina). *Arqueología* 9, 265–308.
- Pardiñas, U.F.J., Cirignoli, S., 2002. Bibliografía comentada sobre los análisis de egagrópilas de aves rapaces en Argentina. *Ornitología Neotropical* 13, 31–59.
- Pardiñas, U.F.J., Massoia, E., 1989. Roedores y marsupiales de Cerro Castillo, Paso Flores, Departamento Pilcaniyeu, provincia de Río Negro. *Boletín Científico, Asociación para la Protección de la Naturaleza* 13, 9–13.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., 2008. Small mammals and paleoenvironments around the Pleistocene–Holocene boundary in Patagonia. *Current Research in the Pleistocene* 25, 30–32.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., 2013. Holocene stability and recent dramatic change in micromammalian communities of northwestern Patagonia. *Quaternary International* 305, 127–140.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., Cirignoli, S., Podestá, D.H., 2003. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) de norpatagonia extra andina, Argentina: taxonomía alfa y biogeografía. *Mastozoología Neotropical* 10, 69–113.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., Chebez, J.C., Martínez, F., Ocampo, S., Navas, D., 2010. Mammalia, Rodentia, Sigmodontinae, Euneomys chinchilloides (Waterhouse, 1837): range extension. *Check List, Journal of Species List and Distribution* 6, 167–169.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., D'Elia, G., Lessa, E.P., 2011. The evolutionary history of sigmodontine rodents in Patagonia and Tierra del Fuego. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 495–513.
- Pastorino, M.J., Marchelli, P., Milleron, M., Soliani, C., Gallo, L.A., 2009. The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antarctica*. *Genetica* 136, 79–88.
- Pearson, O.P., 1983. Characteristics of a mammalian fauna from forests in Patagonia, southern Argentina. *Journal of Mammalogy* 64, 476–492.
- Pearson, O.P., 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *Journal of Zoology* 202, 225–237.
- Pearson, O.P., 1987. Mice and the postglacial history of the Trafal Valley of Argentina. *Journal of Mammalogy* 68, 469–478.
- Pearson, O.P., 1995. Annotated key for identifying small mammals living in or near Nahuel Huapi National Park or Lanin National Park, southern Argentina. *Mastozoología Neotropical* 2, 99–148.
- Pearson, O.P., Pearson, A.K., 1982. Ecology and biogeography of the southeastern rainforests of Argentina. In: Mares, M.A., Genoways, H.H. (Eds.), *Mammalian Biology in South America*. Pennsylvania, Pymatuning Lab. Ecol., Special Publ. No. 6, pp. 129–142.
- Pearson, O.P., Pearson, A.K., 1993. La fauna de mamíferos pequeños de Cueva Trafal I, Argentina: pasado y presente. *Præhistoria* 1, 211–224.
- Porter, S., 1981. Pleistocene glaciation in the southern Lake District of Chile. *Quaternary Research* 16, 263–292.
- Premoli, A.C., Kitzberger, T., Veblen, T., 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27, 251–260.
- Rabassa, J., 2008. Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Sciences*, vol. 11. Elsevier, Amsterdam.
- Rabassa, J., Coronato, A., Martínez, O., 2011. Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 316–335.
- Rebane, K., 2002. The effects of historic climatic change and anthropogenic disturbance on rodent communities in Patagonia, Argentina. (Honors thesis) Stanford University, Menlo Park, CA.
- Reise, D., Venegas, W., 1987. Catalogue of records, localities and biotopes from research work on small mammals in Chile and Argentina. *Gayana: Zoología* 51, 103–130.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Schmitt, D.N., Lupo, K.D., 2012. The Bonneville Estates Rockshelter rodent fauna and changes in Late Pleistocene–Middle Holocene climates and biogeography in the Northern Bonneville Basin, USA. *Quaternary Research* 78, 95–102.
- Smith, M.F., Kelt, D.A., Patton, J.L., 2001. Testing models of diversification in mice in the *Abrothrix olivaceus/xanthorhinus* complex in Chile and Argentina. *Molecular Ecology* 10, 397–405.
- Stahl, P.W., 1996. The recovery and interpretation of microvertebrate bone assemblages from archaeological contexts. *Journal of Archaeological Method and Theory* 3, 31–75.
- Taguchi, Y., Oono, Y., 2005. Relational patterns of gene expression via non-metric multidimensional scaling analysis. *Bioinformatics* 21, 730–740.
- Tammone, M.N., Lacey, E.A., Relva, M.A., 2012. Habitat use by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*): specialization, variation, and sociality. *Journal of Mammalogy* 93, 1409–1419.
- Tatur, A., del Valle, R., Bianchi, M.M., Outes, V., Villarosa, G., Niegodzisz, J., Debaen, G., 2002. Late Pleistocene palaeolakes in the Andean and Extra-Andean Patagonia at mid-latitudes of South America. *Quaternary International* 89, 135–150.
- Taylor, I., 1994. *Barn Owls*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Terry, R.C., 2007. Inferring predator identity from skeletal damage of small-mammal prey remains. *Evolutionary Ecology Research* 9, 199–219.
- Terry, R.C., 2010a. On raptors and rodents: testing the ecological fidelity and spatiotemporal resolution of cave death assemblages. *Paleobiology* 36, 137–160.
- Terry, R.C., 2010b. The dead do not lie: using skeletal remains for rapid assessment of historical small-mammal community baselines. *Proceedings of the Royal Society B* 277, 1193–1201.
- Terry, R.C., Cheng, L., Hadly, E.A., 2011. Predicting small-mammal responses to climatic warming: autoecology, geographic range, and the Holocene fossil record. *Global Change Biology* 17, 3019–3034.
- Teta, P., Andrade, A., Pardiñas, U.F.J., 2005. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) y paleoambientes del Holoceno tardío en la Patagonia noroccidental extra-andina (Argentina). *Archeofauna* 14, 183–197.
- Tonni, E., Carlini, A., 2008. Neogene vertebrates from Argentine Patagonia: their relationship with the most significant climatic changes. In: Rabassa, J. (Ed.), *Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego*. Developments in Quaternary Science, vol. 11. Elsevier, Amsterdam, pp. 269–283.
- Travaini, A., Donázar, J.A., Ceballos, O., Rodríguez, A., Hiraldo, F., Delibes, M., 1997. Food habits of common Barn Owls along an elevational gradient in Andean Argentine Patagonia. *Journal of Raptor Research* 31, 59–64.
- Trejo, A., 2006. Segregation by size at the individual prey level between Barn and Magellanic Horned Owls in Argentina. *Journal of Raptor Research* 40, 168–172.
- Trejo, A., Lambertucci, S., 2007. Feeding habits of Barn Owls along vegetative gradient in northern Patagonia. *Journal of Raptor Research* 41, 277–287.
- Trejo, A., Ojeda, V., 2004. Diet of Barn Owls (*Tyto alba*) in forested habitats of northwestern Argentine Patagonia. *Ornitología Neotropical* 15, 307–311.
- Trejo, A., Guthmann, N., Lozada, M., 2005a. Seasonal selectivity of Magellanic Horned Owl (*Bubo magellanicus*) on rodents. *European Journal of Wildlife Research* 51, 185–190.
- Trejo, A., Kun, M., Sabores, M., Seijas, S., 2005b. Diet overlap and prey size of two owls in the forest-steppe ecotone of southern Argentina. *Ornitología Neotropical* 16, 539–546.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C., 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22, 1193–1213.
- Udrizsar Sauthier, D.E., Andrade, A., Pardiñas, U.F.J., 2005. Predation of small mammals by Rufous-Legged Owl, Barn Owl, and Magellanic Horned Owl in Argentinean Patagonia forests. *Journal of Raptor Research* 39, 163–166.