Mastozoología Neotropical, 27(1):103-125 Mendoza, 2020
Versión on-line ISSN 1666-0536
https://doi.org/10.31687/saremMN.20.27.1.0.03

Copyright © SAREM, 2020
http://www.sarem.org.ar
http://www.sbmz.org

Artículo

FILOGEOGRAFÍA DEL MARGAY (*Leopardus wiedii*; FELIDAE, CARNIVORA): DETERMINACIÓN DE POSIBLES SUBESPECIES MEDIANTE MARCADORES MITOCONDRIALES

Myreya Pinedo-Castro[1] y Manuel Ruiz-García[1]

[1]Laboratorio de Genética de Poblaciones Molecular-Biología Evolutiva. Unidad de Genética. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá DC., Colombia.
[Correspondencia: Manuel Ruiz-García <mruiz@javeriana.edu.co>]

RESUMEN. El margay *Leopardus wiedii*, Felidae, Carnivora) es una de las ocho especies de felinos neotropicales del género *Leopardus* reconocidas hasta el momento. Con criterios morfológicos tradicionales, se han reconocido putativamente 10 subespecies de *L. wiedii*. Más recientemente, se han reconocido como válidas tres subespecies de margay en función de los resultados moleculares obtenidos por Eizirik et al. (1998). Sin embargo, el número de especímenes analizados en aquel estudio fue pequeño (24). Por ello, hemos procedido al análisis de 118 especímenes de margays para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, y mt*ND5*). Los especímenes fueron muestreados en México, Guatemala, Belice, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Guyana Francesa, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. Esos especímenes representaron siete de las 10 subespecies putativas descritas tradicionalmente. Nuestros resultados no coincidieron ni con la propuesta tradicional morfológica, ni con la propuesta molecular más reciente. Se detectaron, mediante un árbol bayesiano y un árbol de máxima verosimilitud 13 grupos diferentes. Algunos de ellos son: un grupo monofilético para *L. w. salvinia* (Guatemala y Belice), un pequeño grupo monofilético integrado por varios especímenes de *L. w. pirrensis* (Panamá y Costa Rica), otro pequeño grupo monofilético integrado por especímenes de *L. w. vigens* (Guyana Francesa), al igual que dos grupos monofiléticos (pero polifiléticos entre sí) de especímenes clasificados a priori como *L. w. boliviensis* (Bolivia) y de, al menos, cinco grupos monofiléticos al interior de *L. w. amazonica* (aunque polifiléticos entre sí) distribuidos por toda la cuenca del Amazonas. De este modo, se pone de manifiesto que no existe una correspondencia entre las posibles subespecies morfológicas y los resultados moleculares obtenidos. Tampoco se detectó estructura espacial significativa poniendo de manifiesto que, seguramente, la designación de subespecies geográficas tiene un sentido muy limitado en esta especie. Todos los métodos empleados para determinar posibles cambios demográficos detectaron una fuerte y significativa expansión poblacional. La misma fue datada hace 200 000-400 000 años para el procedimiento "mismatch distribution" y hace 300 000 años para el procedimiento "Bayesian Skyline Plot", lo cual se relacionó con cambios climatológicos en la última fase del Pleistoceno.

ABSTRACT. Philogeography of the margay (*Leopardus wiedii*; Felidae, Carnivora): determination of possible subspecies by mitocondrial markers. The margay (*Leopardus wiedii,* Felidae, Carnivora) is one of the eight recognized species from the *Leopardus* genus. With the traditional morphological criteria 10 *L. wiedii* subspecies have been recognized. Recently, only three subspecies of margay have been defined as valid throughout the molecular results of Eizirik et al. (1998). Nevertheless, the number of specimens analyzed in that study was small (24). Therefore, we analyzed 118 margay's specimens for three mitochondrial genes (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, and mt*ND5*). The specimens were sampled in Mexico, Guatemala, Belize, Nicaragua, Costa Rica, Panama, Colombia, French Guyana, Ecuador, Peru, Bolivia, and Brazil. These specimens

Recibido 26 enero 2019. Aceptado 18 agosto 2019. Editor asociado: P. Mirol.

included seven out of the 10 recognized subspecies of margay. Our results did not agree with the traditional morphological classification nor with the more recent molecular subspecies proposal. By means of Bayesian Inference and Maximum Likelihood, we detected 13 different groups. Some of them are a monophyletic clade for *L. w. salvinia* (Guatemala and Belize), a small monophyletic clade composed by some specimens of *L. w. pirrensis* (Panama and Costa Rica), another small monophyletic clade composed by specimens of *L. w. vigens* (French Guyana), two monophyletic clades with specimens a priori classified as *L. w. boliviensis* (Bolivia) (but polyphyletic between them), and, at least, five monophyletic clades within *L. w. amazonica* (although polyphyletic among them) distributed across all the Amazon Basin. Henceforth, there was not agreement between the morphological subspecies and the molecular data obtained. No significant spatial structure was detected. Thus, the concept of geographical subspecies has a very limited significance for this species. All the demographic analysis procedures showed a very strong and significant population expansion for this species. The mismatch distribution analysis dated this population expansion around 200 000-400 000 years ago, meanwhile the Bayesian Skyline Plot analysis estimated it around 300 000 years ago. This was related with the climatic changes in the last phase of the Pleistocene.

Palabras clave: filogeografía, genes mitocondriales, *Leopardus wiedii*, margay, Pleistoceno, subespecies.

Key words: *Leopardus wiedii*, margay, mitochondrial genes, Pleistocene, phylogeography, subspecies.

INTRODUCCION

El primer paso para la conservación de cualquier organismo es poder situarlo en un taxón discreto. Una vez un grupo de organismos es reconocido como una especie, otro paso fundamental es determinar en cuantas unidades genéticamente diferentes se divide, determinar la estructura en y entre esas unidades, y la reconstrucción de la historia evolutiva de las mismas. Eso es fundamental para la conservación de la biodiversidad y, también, para una correcta definición de las políticas de conservación de muchas especies (Haig 1998). Sin embargo, en muchas ocasiones, existen discrepancias entre los especialistas en la determinación de qué es una especie, o cual es el estatus de un taxón determinado, debido al concepto de especie que manejen, al igual que por el tipo de datos que se ha utilizado (genética, morfología, etología, ecología, paleontología, etc.) Ruiz-García et al. (2012; 2014; 2016a;b). Por ejemplo, (Wilting et al. 2015) mostraron que los planes diseñados para la conservación del tigre (*Panthera tigris*) han sido fallidos por la falta de consenso en el número propuesto de subespecies.

Los felinos de la América Neotropical no son una excepción. Actualmente, la comunidad científica identifica 11 especies de felinos en Latino América. Ocho de ellos, forman un grupo monofilético denominado el linaje del ocelote (Wurster-Hill & Centerwall 1982; Collier & O'Brien 1985; Pecon Slattery et al. 1994; Johnson et al. 1996; 2006; Johnson & O'Brien 1997; Slattery & O'Brien 1998). Esas ocho especies son el ocelote (*Leopardus pardalis*), el margay (*Leopardus wiedii*), el gato andino (*Leopardus jacobita*), el gato de las pampas, o colocolo, (*Leopardus colocolo*) (sin embargo, Garcia-Perea 1994 morfológicamente distinguió tres especies en el seno de este taxón), la güiña o huiña (*Leopardus guigna*), el gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), el tigrillo (*Leopardus tigrinus*), y el tigrillo del sur de Brasil (*Leopardus guttulus*). Esta última especie ha sido diferenciada recientemente del *L. tigrinus* por medio de análisis moleculares exhaustivos (Trigo et al. 2008; 2013; 2014). En los últimos dos años, otras dos especies del género *Leopardus* han sido propuestas. Nascimento & Feijó (2017) mostraron que la población de tigrillos del nor-este de Brasil podría ser considerada una nueva especie utilizando caracteres morfológicos, *Leopardus emiliae*. Igualmente, Ruiz-García et al. (2018b; 2019a), utilizando datos moleculares y morfológicos, detectaron la presencia de una presunta nueva especie de felino en el sur de Colombia que ha sido denominada *Leopardus narinensis*. Sin embargo, todavía no se ha dado una ratificación total por parte de los especialistas de esas dos últimas presuntas nuevas especies del género *Leopardus*.

Una de esas especies de este género es el margay (*L. wieddi*), cuya distribución se da desde México hasta el sur de Brasil, Uruguay y norte de Argentina (Figura 1). Es una especie fuertemente asociada a bosques primarios (Bisbal 1989) y parece ser poco tolerante a disturbios en esos bosques, aunque ha sido reportado fuera de áreas boscosas (Vaughan 1983; Tello 1986) e, incluso, ha sido encontrada en plantaciones de cocoa y de café en Venezuela

(Mondolfi 1986). Se encuentra en raras ocasiones por encima de los 1.500 metros sobre el nivel del mar (de Oliveira 1994). Esta especie está categorizada como casi amenazada por IUCN y en el apéndice I de CITES (de Oliveira et al. 2015).

Morfológicamente, se ha considerado la existencia de 10 subespecies de margay (Cabrera 1957; Hall 1981; de Oliveira 1998): (1) *L. w. amazonica* (Cabrera 1917) con localidad tipo en Tabatinga, Amazonas, Brasil; (2) *L. w. boliviae* (Pocock 1941) con localidad tipo en Buena Vista, Santa Cruz, Bolivia; (3) *L. w. glaucula* (Thomas 1903) con localidad tipo en Beltrán, Jalisco, México; (4) *L. w. nicaraguae* (Allen 1919) con localidad tipo en Chinandega, Nicaragua; (5) *L. w. oaxacensis* (Nelson & Goldman 1931) con localidad tipo en Cerro San Felipe, Oaxaca, México; (6) *L. w. pirrensis* (Goldman 1914) con localidad tipo en Cana, Darién, Panamá; (7) *L. w. salvinia* (Pocock 1941) con localidad tipo en Vera Paz, Guatemala; (8) *L. w. vigens* (Thomas 1904) con localidad tipo en Igarapé-Assu, Pará, Brasil; (9) *L. w. wiedii* (Schinz 1821) con localidad tipo en Morro de Azará, rio Mucurí, Bahía, Brasil; y (10) *L. w. yucatanica* (Nelson & Goldman 1931) con localidad tipo en Mérida, Yucatán, México.

Recientemente, Kitchener et al. (2017) reconocieron tres subespecies de margay, haciéndolas coincidir con los tres grupos moleculares encontrados por Eizirik et al. (1998). *L. w. wiedii* correspondiente al grupo del noreste de Sudamérica, *L. w. vigens* correspondiente al grupo del sur de Sudamérica, y *L. w. glauculus* correspondiente al grupo centro americano. Sin embargo, Nascimento (2010), basado en caracteres morfológicos, no encontró variaciones geográficas significativas en el margay.

Los estudios genéticos con esta especie son escasos y de alcance limitado. Eizirik et al. (1998) analizaron 24 especímenes de *L. wieddi* procedentes de cautiverio en diversas instituciones de México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Guyana Francesa, Brasil, Bolivia, y Paraguay. Se analizó un fragmento de la región control del ADN mitocondrial (HVS-I) estimándose niveles de diversidad genética elevadísimos (diversidad haplotípica, H_d=0.985; diversidad nucleotídica, π=0.183). De hecho, la última estimación ha sido una de las más elevadas encontradas para cualquier especie de vertebrado. También detectaron tres agrupaciones geográficas diferentes. Una en Centro América (con dos subgrupos: México-Guatemala; Nicaragua-Costa Rica), otra en el noreste de Sudamérica (norte del Amazonas brasileño y Guyana Francesa), y la tercera en el sur de Sudamérica (este y sur de Brasil, Bolivia, y Paraguay). Concluyeron que el Río Amazonas y el estrecho del Darién fueron los causantes de la fragmentación de esta especie en esas tres unidades genéticas. Ruiz-García (2001) analizó cinco marcadores microsatélites en 14 especímenes de esta especie. Doce de ellos procedieron de la Amazonía colombiana (presuntamente de la subespecie *L. w. amazonica*) y dos procedieron del Departamento de Santa Cruz en Bolivia (presuntamente de la subespecie *L. w. boliviae*). Los niveles de diversidad genética encontrados para esos marcadores nucleares fueron también muy elevados (H=0.846), al igual que se había determinado para el ADN mitocondrial. Grisolia et al. (2007) analizaron 25 especímenes de *L. wieddi* procedentes de diferentes zoológicos de Brasil mediante cuatro marcadores microsatélites. Estimaron un número promedio de alelos por microsatélite muy elevado (11), además de un Contenido de Información Polimórfica (PIC=0.85) y una heterocigosis esperada (0.85), también muy elevados coincidiendo con lo encontrado por Ruiz-García (2001).

Sin embargo, hasta la fecha, no se ha realizado un estudio filogeográfico profundo de esta especie con una muestra lo suficientemente amplia para determinar cuál es el número de unidades genéticas diferenciadas y, presuntamente, el número de subespecies que pudiera contener esta especie. Para ello, analizamos 118 especímenes de *L. wieddi* procedentes de 12 países diferentes de Latino América (México, Guatemala, Belice, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Guyana Francesa, Ecuador, Perú, Bolivia, y Brasil) mediante tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, y mt*ND5*; 859 pares de bases, pb). Los genes mitocondriales son una herramienta de gran utilidad para tareas filogenéticas y filogeográficas debido a la rápida acumulación de mutaciones, tiempos de coalescencia rápidos, inexistencia de intrones, un alto número de copias por célula (lo cual permite obtener ADN mitocondrial con mayor facilidad en muestras degradadas, o de poca calidad, que ADN nuclear), e inexistencia de recombinación genética debido a una herencia haploide materna (Avise 1994). A pesar de que todos los genes mitocondriales pueden considerarse un único locus ligado, las presiones selectivas y las tasas de evolución pueden ser muy heterogéneas a lo largo de todo el ADN mitocondrial (Galtier et al. 2006; Nabholz et al. 2008). Debido a todo ello, los genes mitocondriales son más precisos que la mayor parte de los genes nucleares para la reconstrucción de la historia evolutiva de especies muy relacionadas o de subespecies en el interior de especies dadas (Moore 1995).

En el presente estudio se utilizaron fragmentos de tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, and mt*ND5*). Estos genes han sido elegidos porque tienen elevada variabilidad genética en felinos debido a su rápida evolución, son de fácil alineación, y son los que han sido secuenciados más frecuentemente en felinos neotropicales, lo cual permite potenciales comparaciones entre diferentes poblaciones o especies de estos felinos (Johnson et al. 1996; 1998; 1996; Johnson & O'Brien 1997; Slattery & O'Brien 1998; Culver et al. 2000). Aunque es objeto de un estudio mostrado en otro sitio, donde se compara la estructura genética del ocelote y del margay (Ruiz-García et al. 2019b), una fracción de los 118 margays analizados fueron secuenciados para sus mitogenomas completos (55 ejemplares; aproximadamente 16.300 pb) y mostraron resultados perfectamente compatibles con los obtenidos con los tres genes mitocondriales citados. Preferimos no utilizar el fragmento de la región control (HVS-I) empleada por Eizirik et al. (1998) ya que está repleto de inserciones y deleciones que dificulta enormemente la alineación correcta de las respectivas secuencias, lo cual puede ser la causa de la diversidad genética excepcionalmente elevada para el margay encontrada por esos autores.

Los objetivos principales del presente trabajo son los siguientes: 1) Estimar los niveles de diversidad genética para marcadores mitocondriales en el margay; 2) Determinar cuántos grupos genéticamente diferenciados pueden detectarse en el margay y en qué áreas geográficas se encuentran estos; 3) Determinar la posible existencia de estructura espacial a lo largo de la distribución geográfica de esta especie, y 4) Determinar la historia demográfica de la misma a lo largo de su trayectoria evolutiva.

MATERIALES Y METODOS

Muestras colectadas

Se analizaron muestras de 118 margays (pelos, dientes, huesos, y trozos de pieles) procedentes de México (tres muestras representando putativamente *L. w. glaucula*), Guatemala (ocho muestras representando putativamente *L. w. salvinia*), Belice (una muestra representando putativamente *L. w. salvinia*), Nicaragua (una muestra representando putativamente *L. w. nicaraguae*), Costa Rica (una muestra representando la subespecie *L. w. pirrensis*), Panamá (dos muestras representando putativamente *L. w. pirrensis*), Colombia (32 muestras representando putativamente *L. w. pirrensis* y *L. w. amazonica*), Guyana Francesa (tres muestras representando putativamente *L. w. vigens*), Ecuador (dos muestras representando putativamente *L. w. amazonica*), Perú (32 muestras representando putativamente *L. w. amazonica*), Bolivia (26 muestras representando putativamente *L. w. boliviae*) y Brasil (siete muestras representando la subespecie *L. w. amazonica*) (**Fig**. 1 y **Tabla** 1). La totalidad de las muestras representa siete de las 10 subespecies reconocidas morfológicamente. Estas muestras proceden básicamente de animales cazados por comunidades indígenas o colonas a través del Neotrópico (trozos de piel, dientes, y huesos). Algunos ejemplares estaban vivos y se conservaban como mascotas en esas comunidades (pelos con bulbo). Para ello, se solicitó permiso a las autoridades de las comunidades para colectar ese material biológico que ya estaba presente en las comunidades. Las comunidades solo se visitaron una vez, siendo las donaciones voluntarias y no se indujo, en ningún instante, la donación de muestras mediante ninguna transacción económica, o de ningún tipo. Durante el proceso de muestreo (tanto de tejidos de animales previamente cazados, como de ejemplares vivos presentes en las comunidades), se entrevistó a los cazadores de esas comunidades que mencionaron que los especímenes procedían, como mucho, de áreas alejadas entre 5-15 km de las mismas. Las muestras se obtuvieron en un periodo de 10 años (2006-2016).

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La extracción de ADN total se llevó a cabo mediante la resina Cheelex 100 TM (Walsh et al. 1991), con la que se procesaron las muestras de pelo con bulbo y de diente (pulpa), y mediante el método de Fenol-Cloroformo (Sambrook et al. 1989) para las muestras de piel. Las muestras de hueso se procesaron con DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Para la amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizaron los cebadores descritos por Johnson et al. (1998) para fragmentos de los genes *ATP8* (ATP8.1F: GCATTAACCTTTTAAGTTAAAG y ATP8.2R: GGCGAATAGATTTTCGTTCA, longitud del amplicón: 180 pb) y *ND5* (ND5-1F: GTGCAACTCCAAATAAAAG Y ND5-2R: GGGTCTGAGTTTATATATC; longitud del amplicón: 315 pb) y los cebadores descritos por Hoelzel & Green (1992) (1992) para *16S rRNA* (16S.1F: GTGCAAAGGTAGCATAATCA y 16S.4R: TGTCCTGATCCAACATCGAG, longitud del amplicón: 364 pb).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μl, conteniendo $MgCl_2$ 1 mM (CorpoGen), dNTPs 0.2 mM (BioLabs), 0.1 μM de cada cebador y una unidad de Taq Polimerasa (CorpoGen) con 20-200 ng de ADN molde (dependiendo del método de extracción). Las temperaturas de la PCR se llevaron a cabo a 95°C por 10 minutos seguidos de 35 ciclos de 35 segundos a 95°C, 30 segundos a 52-59°C y 45 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y fueron visualizados con rayos ultravioleta en un transiluminador. Ambas hebras fueron secuenciadas usando BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Inc.), cuyos productos fueron analizados en un ABI 3730 (Applied Biosystems, Inc.). Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa Sequencher 4.7 (Gene Codes, Corp., Ann Arbor, MI).

Los números de acceso de GenBank de los 118 ejemplares de margay analizados son los siguientes: de MN005818 a MN005935.

Tabla 1

Localización geográfica y coordenadas de los 118 margays (*Leopardus wiedii*) secuenciados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, y mt*ND5*), clasificados por subespecies putativas y localidad geográfica.

Subespecie y localidad geográfica	Número de muestras	Coordenadas	
L. w. glaucula Zacahuateya, Jalisco - México	1	19.406	-104.180
L. w. glaucula Cerro Grande, Jalisco - México	1	20.150	-104.517
L. w. glaucula Las Joyas, Jalisco - México	1	22.033	-101.900
L. w. salvinia Cobán, Alta Verapaz - Guatemala	1	15.483	-90.366
L. w. salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala	4	15.831	-88.750
L. w. salvinia Carmelita, Petén - Guatemala	1	17.462	-90.056
L. w. salvinia Tikal, Petén - Guatemala	1	17.216	-89.616
L. w. salvinia Zacapa - Guatemala	1	14.972	-89.583
L. w. salvinia Bermudian landing - Belice	1	17.550	-88.516
L. w. nicaraguae Moriello – Nicaragua	1	11.245	-84.778
L. w. pirrensis Drake, Punta Arenas - Costa Rica	1	8.714	-83.648
L. w. pirrensis Las Lajas, Chiriquí - Panamá	1	8.250	-81.866
L. w. pirrensis Las Tablas, Los Santos - Panamá	1	7.766	-80.283
L. w. pirrensis o amazonica El Zulia, Norte de Santander - Colombia	1	7.935	-72.605
L. w. pirrensis Caucasia, Antioquia - Colombia	1	7.983	-75.200
L. w. pirrensis Caucheras, Antioquia - Colombia	1	7.243	-76.435
L. w. pirrensis Chigorodó, Antioquia - Colombia	1	7.669	-76.681
L. w. pirrensis Murindó, Antioquia - Colombia	1	6.990	-76.756
L. w. amazonica Amacayacu NP, Amazonas - Colombia	2	-3.483	-70.200
L. w. amazonica Leticia, Amazonas - Colombia	6	-4.215	-69.941
L. w. amazonica Santa Sofía, Amazonas - Colombia	1	-3.985	-70.216
L. w. amazonica Puerto Rico, Caquetá - Colombia	1	1.907	-75.158
L. w. amazonica Rio Cuemaní, Caquetá - Colombia	1	2.565	-72.638
L. w. pirrensis Las teresitas, Los Katíos NP, Chocó - Colombia	1	7.150	-77.200
L. w. pirrensis Río Sucio, Chocó - Colombia	3	7.439	-77.113
L. w. amazonica Miraflores, Guaviare - Colombia	2	1.336	-71.951
L. w. amazonica San José del Guaviare, Guaviare - Colombia	1	2.565	-72.639
L. w. pirrensis Gairaca, Tayrona NP, Magdalena - Colombia	1	11.283	-74.183
L. w. pirrensis San Lorenzo, Sierra Nevada, Magdalena - Colombia	1	10.867	-73.720
L. w. amazonica Cumaral, Meta - Colombia	1	4.269	-73.486
L. w. amazonica Puerto Concordia, Meta - Colombia	1	3.811	-77.175
L. w. pirrensis Tumaco, Rio Mira, Nariño - Colombia	1	1.641	-79.006
L. w. pirrensis Puerto Soldado, Valle del Cauca - Colombia	1	3.805	-77.200
L. w. amazonica El Tuparro, Vichada - Colombia	2	4.971	-68.300
L. w. vigens Camopi - Guyana Francesa	2	3.166	-52.331
L. w. vigens Maripasoula - Guyana Francesa	1	3.641	-54.067
L. w. amazonica Tena, Napo - Ecuador	2	-0.989	-77.816
L. w. amazonica Tingo María, Huánaco - Perú	1	-9.295	-75.997
L. w. amazonica Alto Nanay, Loreto -Perú	2	-3.886	-73.696
L. w. amazonica Bolívar, Río Curaray, Loreto - Perú	1	-2.129	-74.760
L. w. amazonica Contamaná, Loreto - Perú	1	-7.333	-75.016
L. w. amazonica Diamante azul, Loreto - Perú	1	-2.413	-73.985
L. w. amazonica Genaro Herrera, Loreto - Perú	1	-4.983	-73.766
L. w. amazonica Indiana, Loreto - Perú	1	-3.533	-73.166
L. w. amazonica Intuto, Rio Tigre, Loreto - Perú	1	-3.650	-74.750
L. w. amazonica Mazán, Rio Napo, Loreto - Perú	1	-2.884	-74.000
L. w. amazonica Parinarí, Loreto - Perú	1	-4.566	-74.433
L. w. amazonica Pebas, Loreto - Perú	1	-3.318	-71.859
L. w. amazonica Peña blanca, Loreto - Perú	1	-4.012	-73.366

(*Tabla 1 cont.*)

Subespecie y localidad geográfica	Número de muestras	Coordenadas	
L. w. amazonica Punchana, Loreto - Perú	1	-3.716	-73.233
L. w. amazonica Requena, Loreto - Perú	2	-5.057	-73.852
L. w. amazonica Río Atacuarí, Loreto -Perú	1	-3.493	-71.000
L. w. amazonica Santa Clotilde, Río Napo, Loreto - Perú	1	-2.514	-73.733
L. w. amazonica Santa María de Nanay, Loreto - Perú	1	-3.639	-73.228
L. w. amazonica Tamshiyacu, Loreto - Perú	1	-4.008	-73.152
L. w. amazonica Torpedo, Loreto - Perú	1	-3.264	-75.029
L. w. amazonica Vencedores, Río Napo, Loreto - Perú	1	-1.533	-75.250
L. w. amazonica Lamas, San Martín - Perú	1	-6.416	-76.533
L. w. amazonica Envidia, Ucayali - Perú	1	-9.462	-74.292
L. w. amazonica Floresta, Ucayali - Perú	1	-10.173	-74.076
L. w. amazonica Iparia, Ucayali - Perú	1	-9.300	-74.533
L. w. amazonica Platanal, Ucayali - Perú	1	-8.816	-73.666
L. w. amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú	4	-8.353	-74.576
L. w. amazonica Puerto Bermúdez, Pasco -Perú	1	-10.296	-74.936
L. w. amazónica Atalaia do Norte, Río Javarí, Amazonas - Brasil	3	-4.373	-70.192
L. w. amazonica Novo Aripuaná, Amazonas - Brasil	2	-5.120	-60.379
L. w. amazonica Rio Urubú, Amazonas - Brasil	1	-1.666	-60.233
L. w. amazonica Taracuá, Amazonas - Brasil	1	0.100	-68.466
L. w. boliviae Añimbo, Chuquisaca - Bolivia	1	-20.566	-64.100
L. w. boliviae Monteagudo, Chuquisaca - Bolivia	2	-19.817	-63.983
L. w. boliviae Alejandría, Rio Mamoré, El Beni - Bolivia	1	-12.066	-65.150
L. w. boliviae Cercado, El Beni - Bolivia	2	-14.500	-64.500
L. w. boliviae Chuchini - Rio Ibaré, El Beni - Bolivia	1	-14.833	-64.900
L. w. boliviae Puerto Siles, El Beni - Bolivia	1	-12.800	-65.083
L. w. boliviae Rivera alta, El Beni - Bolivia	1	-11.005	-66.066
L. w. boliviae San Borja, El Beni - Bolivia	1	-15.183	-67.066
L. w. boliviae San Javier, El Beni - Bolivia	1	-14.596	-64.876
L. w. boliviae Coroico, La Paz - Bolivia	1	-16.183	-67.733
L. w. boliviae Giani, La Paz - Bolivia	1	-14.244	-67.662
L. w. boliviae Ixiamas, La Paz - Bolivia	1	-13.750	-68.150
L. w. boliviae San Miguel de Huachi, La Paz - Bolivia	1	-15.666	-67.250
L. w. boliviae Quime, La Paz - Bolivia	1	-16.983	-67.216
L. w. boliviae San Pedro, Madidi, La Paz - Bolivia	1	-13.710	-67.779
L. w. boliviae Santa Ana, La Paz - Bolivia	1	-13.333	-68.600
L. w. boliviae Puerto Maldonado, Madre de Dios - Bolivia	1	-12.600	-69.183
L. w. boliviae Manuripí, Pando - Bolivia	1	-10.800	-68.066
L. w. boliviae Piedras Blancas, Santa Cruz - Bolivia	2	-16.600	-61.166
L. w. boliviae Pozama, Santa Cruz - Bolivia	1	-18.500	-58.516
L. w. boliviae San Rafael, Santa Cruz - Bolivia	1	-16.812	-60.682
L. w. boliviae Totumos Santa Cruz - Bolivia	1	-18.120	-63.647
L. w. boliviae Yufi, Santa Cruz - Bolivia	1	-19.016	-62.400
L. w. boliviae Zapaco, Santa Cruz - Bolivia	1	-16.566	-61.583
Número total de muestras	118		

Fig. 1. Mapa con la distribución geográfica del margay (*Leopardus wieddi*), países muestreados con las subespecies morfológicas putativas muestreadas y tamaños muestrales respectivos.

Diversidad genética

Diversos estadísticos se utilizaron para determinar la diversidad genética de la muestra total estudiada de margays: sitios polimóricos (S), número de haplotipos (NH), la diversidad haplotípica (H_d), y la diversidad nucleotídica (π). Esos estadísticos fueron calculados con el programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas 2009).

Análisis filogenéticos

Las secuencias para los genes mt*ATP-8*, mt*16S rRNA* y mt*ND5* fueron concatenadas, ya que mostraron tener la misma señal filogenética cada una de ellas. Para ello se utilizó la prueba ILD ("Incongruence-length difference test"; Farris et al. 1995) mediante el programa mILD (Planet & Sarkar 2005). Mediante los programas MrModeltest v2.3 (Nylander 2004) y MEGA 6.05 (Tamura et al. 2013) se determinó el mejor modelo de substitución nucleotídica. Para ello, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike 1974).

Se obtuvieron dos tipos de árboles filogenéticos diferentes. El primero fue un árbol Bayesiano (AB) para determinar las relaciones de los 118 especímenes de margay estudiados y poder detectar posibles grupos monofiléticos que pudieran corresponderse con las subespecies putativas de esta especie. Para ello, se utilizó el programa BEAST v. 1.8.1 (Drummond et al. 2012). Se corrieron cuatro iteraciones independientes usando tres particiones de datos (codón 1, codón 2, codón 3) con seis Cadenas Markov Monte Carlo (MCMC) muestreadas cada 10.000 generaciones por 40 millones de generaciones después de un periodo de "burn-in" de 4 millones de generaciones. La convergencia se verificó utilizando el programa Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2013). Se contrastó la verosimilitud para cada generación y se estimó el tamaño efectivo de la muestra (ESS>200) de todos los parámetros a través de cuatro análisis independientes para determinar la convergencia y resultados óptimos. Los resultados de las diferentes corridas se combinaron mediante el programa LogCombiner v1.8.0 (Rambaut & Drummond 2013) y mediante el programa TreeAnnotator v1.8.0 (Rambaut & Drummond 2013). Se utilizó un modelo de especiación de Yule y un reloj molecular relajado con una tasa de distribución log-normal no correlacionada (Drummond et al. 2006). Los valores de probabilidad posterior proporcionaron una evaluación del grado de apoyo de cada nodo en el árbol. Los árboles fueron visualizados

mediante el programa FigTree v. 1.4 (Rambaut 2012). A partir del AB se obtuvieron los Tiempos de Divergencia del Ancestro Común más Reciente (TMRCA) para los diferentes nodos con probabilidades posteriores elevadas. Debido a que la información sobre el registro fósil para el género *Leopardus* es escasa, el tiempo prior para la raíz del árbol que se utilizó fue de 3.05 $\pm$ 1.1 millones de años (MA) (intervalo de confidencia del 97,5%: 0.89 – 5.21 MA). Este valor se estimó obteniendo el promedio de las estimaciones propuestas para la diversificación del género *Leopardus* por Johnson et al. (2006) (valor medio=2.91 MA, valor mínimo= 2.02 MA, valor máximo= 4.25 MA) y Li et al. (2016) (valor medio=3.14 MA, valor mínimo= 1.64 MA, valor máximo= 5.03 MA).

Para intentar ratificar los posibles clados detectados en el AB, se obtuvo un árbol de Máxima Verosimilitud (AMV). Para ello se utilizó el programa RAxML v.7.2.6 (Stamatakis 2006). Para seleccionar el mejor modelo de ajuste se utilizaron 50 iteraciones independientes usando tres particiones de datos (codón 1, codón 2, codón 3). Para cada análisis se utilizó el modelo GTR + G + I (Tavaré 1986) para la obtención del AMV y el soporte topológico se estimó mediante 500 réplicas de bootstrap (Stamatakis 2006).

Adicionalmente, para determinar las relaciones entre los haplotipos analizados se utilizó el algoritmo Median Joining Network (MJN) (Bandelt et al. 1999) utilizando el programa Network 4.6.0.1 (Fluxus Technology Ltd). Una ventaja de MJN comparado con los árboles filogenéticos tradicionales es que permite explícitamente la coexistencia de haplotipos ancestrales y descendientes, mientras que los árboles tradicionales tratan todas las secuencias como taxones terminales (Posada & Crandall 2001). Esto permite observar cuáles haplotipos fueron los primeros en originarse y cuáles son los haplotipos derivados más recientes.

Análisis genético espacial

Se realizaron dos tipos de análisis espaciales. El primero de ellos fue una prueba de Mantel (Mantel 1967). Se comparó la matriz de distancias genéticas de 2 parámetros de Kimura (Kimura 1980) entre individuos con la matriz de distancias geográficas entre los mismos. Ambas distancias fueron logaritmizadas y la significación estadística se estimó con 10.000 permutaciones. Para este análisis se utilizó el programa Alleles In Space (AIS) (Miller 2005).

El segundo fue un análisis de autocorrelación espacial mediante el estadístico Ay (Miller 2005). Ay se puede interpretar como la distancia genética promedio entre pares de individuos que caen dentro de una clase de distancia (CD) especificada. Ay toma un valor de 0 cuando todos los individuos dentro de una CD son genéticamente idénticos y toma un valor de 1 cuando todos los individuos dentro de una CD son completamente diferentes. La probabilidad para cada CD se obtuvo utilizando 10.000 permutaciones. Para llevar a cabo este análisis, se definieron cinco CD: 1CD (0-968 km), 2 CD (968-1.937 km), 3 DC (1.937-2.905 km), 4 DC (2.905-3.874 km), y 5 CD (3.874-5.243 km). Los especímenes fueron conectados con la red de Gabriel & Sokal (1969) y con otras variedades de redes (Ruiz-García 1993; 1994; 1997; 1999; Ruiz-García & Alvarez 2000).

Cambios demográficos

Para detectar posibles cambios en la historia demográfica del margay se utilizaron tres procedimientos diferentes. El primero fue la distribución de las diferencias de nucleótidos entre haplotipos/individuos o "mismatch distribution" (Rogers & Harpending 1992; Rogers et al. 1996) mediante el programa DNAsp v5.1 (Librado & Rozas 2009). Para ello, se generó la curva esperada de acuerdo a un modelo demográfico de población constante. Se utilizó el estadístico *rg* (Harpending et al. 1993; Harpending 1994) para determinar la similitud entre las curvas teóricas y observadas generadas en este análisis. Para aceptar, o rechazar, el modelo de demográfico de población constante se utilizó 10,000 simulaciones de coalescencia. Este análisis permite estimar temporalmente cuando comenzó el cambio demográfico detectado a partir de la expresión $\tau = 2 \cdot \mu \cdot t$, dónde τ es la tasa de mutación por millón de años y t el número de generaciones desde que ocurrió el cambio demográfico. de Oliveira (1998) describió que la madurez sexual en el margay se alcanza entre los 1 y 2 años de vida. Por ello, se utilizó la estima de 1 o 2 años por generación.

El segundo procedimiento consistió con varios estadísticos, siendo éstos las pruebas F_S de Fu (1997), D de Tajima (1989) y R_2 de Ramos-Onsins & Rozas (2002). Se obtuvo un intervalo de confianza del 95% y las probabilidades se obtuvieron con 10.000 permutaciones de coalescencia. El programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas 2009) fue utilizado para estimar esos estadísticos.

El tercer procedimiento fue un "Bayesian Skyline Plot" (BSP) mediante los programas BEAST v. 1.8.1. y TRACER v1.6. La opción "Coalescence-Bayesian skyline" fue seleccionada con cuatro pasos con 40 000 000 de generaciones (los primeros cuatro millones se descartaron mediante "burn-in"), con una función kappa con log Normal (1, 1.25) y el tamaño poblacional "Skyline" siguiendo una distribución uniforme (0, infinito; valor inicial 80). Con Tracer v1.5 (Rambaut et al. 2013), se analizaron las densidades marginales de las divisiones temporales y se seleccionó la opción de reconstrucción "Bayesian Skyline". Se utilizó una variante constante (de un paso) en el "Bayesian Skyline" con el tiempo máximo en el gráfico como la densidad posterior del 95%. La calibración del AB se utilizó para darle un valor al rootHeight. Por ello se analizó el posible cambio demográfico del margay en los últimos dos millones de años.

RESULTADOS

Diversidad genética

Para la muestra de 118 especímenes analizados, se encontró S=240, NH=85, H_d=0.976$\pm$0.009, y π=0.035$\pm$0.0032. El margay mostró tener una elevada diversidad genética mitocondrial, tal como se había encontrado en los escasos trabajos publicados anteriormente con diferentes tipos de marcadores, tanto mitocondriales como nucleares (Eizirik et al. 1998; Ruiz-García 2001). Por lo tanto, no existe discrepancia con el uso de los tres marcadores mitocondriales empleados en este estudio con los otros marcadores utilizados por otros autores.

Análisis filogenético

El AB (**Fig**. 2) mostró que las secuencias encontrados para el margay se diferencian y son monofiléticas con

respecto a los de otra especie del género *Leopardus*, en este caso el gato andino (*L. jacobita*) (Probabilidad Posterior, PP=1). El inicio de la diversificación de los haplotipos del margay fue estimada en 2.73 MA, coincidiendo con la fase final del Plioceno. En el AB se detectaron 14 clados principales con PP superiores a 0.6.

El clado 1 (PP=1) se diversificó hace unos 0.85 MA y contuvo especímenes de cuatro subespecies putativas morfológicas [*L. w. boliviae* (1 espécimen de Bolivia), *L. w. amazonica* (3 especímenes de Colombia), *L. w. pirrensis* (4 especímenes de la costa norte y pacífica de Colombia), y *L. w. glaucula* (1 espécimen de México)]. El clado 2 (PP=0.99) comenzó su diversificación alrededor de 1.43 MA. Estuvo integrado tan solo por tres especímenes representando dos de las subespecies morfológicas [*L. w. amazonica* (2 especímenes de la Amazonía peruana y colombiana) y *L. w. nicaraguae* (1 espécimen de Nicaragua)]. El clado 3 (PP=0.97) empezó su diversificación alrededor de 0.55 MA y solo estuvo integrado por dos especímenes de *L. w. amazonica*, ambos de los Llanos Orientales colombianos. El clado 4 (PP=0.92) empezó su diversificación hace 1.21 MA e incluyó a *L. w. vigens* (1 espécimen de Guyana Francesa), *L. w. boliviae* (1 espécimen de Bolivia), y, especialmente, *L. w. amazonica* (12 especímenes procedentes de la Amazonía peruana, colombiana y brasileña, y también de los Llanos Orientales colombianos). El clado 5 (PP=1) es el que presentó una diversificación inicial más antigua estimada en torno a 1.9 MA incluyendo a *L. w. boliviae* (4 especímenes de Bolivia), *L. w. glaucula* (1 espécimen de México), *L. w. amazonica* (2 especímenes de la Amazonía peruana) y *L. w. pirrensis* (2 especímenes del Pacífico colombiano). El clado 6 (PP=0.71) empezó a diferenciarse alrededor de 0.34 MA conformado únicamente por cinco especímenes de *L. w. amazonica* procedentes de la Amazonía occidental (Perú, Colombia, y Brasil). El clado 7 (PP=0.86), que comenzó su diversificación alrededor de 0.34 MA, está constituida exclusivamente por cuatro especímenes bolivianos (*L. w. boliviae*). El clado 8 (PP=0.93), que se originó alrededor de 0.53 MA, también estuvo exclusivamente conformado por siete especímenes bolivianos (*L. w. boliviae*). El clado 9 (PP=0.99), siendo el segundo más antiguo en originarse hace 1.43 MA, junto con el segundo clado, estuvo compuesto por cinco especímenes de *L. w. amazonica* procedentes de la Amazonía peruana y brasileña. El clado 10 (PP=0.8) se empezó a diversificar hace 0.62 MA, y estuvo compuesto únicamente por tres especímenes de dos presuntas subespecies morfológicas, *L. w. pirrensis* (1 espécimen del noroeste de Colombia) y *L. w. amazonica* (2 especímenes del centro de Perú). El clado 11 (PP=0.92) se diversificó hace 0.27 MA, y estuvo compuesto únicamente por dos especímenes de *L. w. vigens* procedentes de Guyana Francesa. El clado 12 (PP=0.67) empezó su diferenciación hace 0.87 MA, y estuvo conformado por 12 especímenes de *L. w. amazonica*, procedentes de la Amazonía peruana, colombiana y ecuatoriana, además de los Llanos Orientales colombianos, y dos especímenes de *L. w. pirrensis* del Pacífico colombiano. El clado 13 (PP=0.96), con una diferenciación inicial hace 0.59 MA, es de origen centroamericano y está constituido por dos sub-clados también con elevado soporte estadístico. El primero de ellos (PP=0.78), con una diversificación a partir de 0.34 MA, estuvo conformado por los nueve especímenes estudiados de *L. w. salvinia* procedentes de Guatemala y Belice. El segundo de ellos (PP=0.77), que comenzó su conformación hace 0.47 MA, estuvo compuesto por los únicos tres especímenes centroamericanos muestreados de *L. w. pirrensis* (dos procedentes de Panamá y uno de Costa Rica). Entre esos dos sub-clados se encontró también un espécimen de *L. w. glaucula* procedente de México. Finalmente, el clado 14 (PP=0.88), el de más reciente conformación (0.12 MA), estuvo compuesto únicamente por dos especímenes, uno de *L. w. amazonica* (Brasil) y otro de *L. w. pirrensis* (norte de Colombia).

Los 14 clados significativos no coincidieron en general con las subespecies morfológicas putativas y todos los procesos de diferenciación se dieron durante el Pleistoceno. El AMV (**Fig**. 3) ratificó 13 de los 14 grupos de margays encontrados en el AB con porcentajes de bootstraps elevados. El único grupo que no se conservó fue el clado 14 encontrado en el análisis anterior. Sin embargo, las posibles relaciones entre los 13 clados encontrados en ambos árboles filogenéticos fueron diferentes en función de cada uno de los árboles, lo cual pone de manifiesto que la estructura genética del margay es débil.

El procedimiento MJN (**Fig**. 4) mostró que los haplotipos de las supuestas subespecies putativas de margay se encuentran básicamente entremezclados. Por lo tanto, las conclusiones filogenéticas obtenidas a partir de los análisis con especímenes o con haplotipos fueron similares. El haplotipo 7 es compartido por especímenes clasificados a priori en las subespecies *L. w. amazonica*, *L. w. pirrensis*, y *L. w. boliviae*. El haplotipo 23 es compartido por especímenes de *L. w. amazonica* y *L. w. pirrensis*. Desparramados por esta red de haplotipos se encuentra algunas congregaciones de haplotipos que se corresponden con

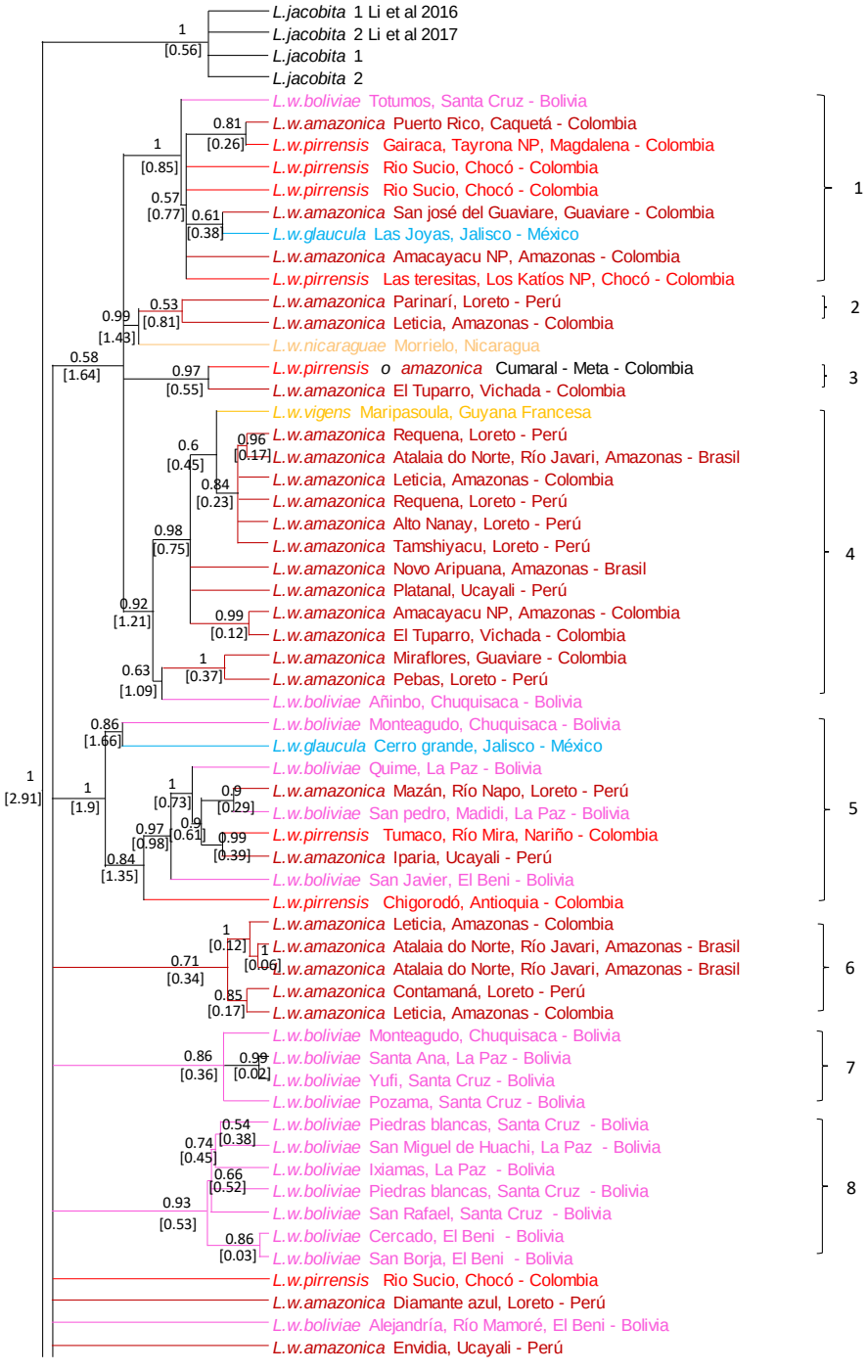

Fig. 2. Árbol Bayesiano (AB) con los 118 especímenes de margay (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*). En los nodos, probabilidades posteriores (PP) y en paréntesis el tiempo de divergencia de los clados respectivos en millones de años. Se señalan los 14 clados significativos encontrados en este análisis.

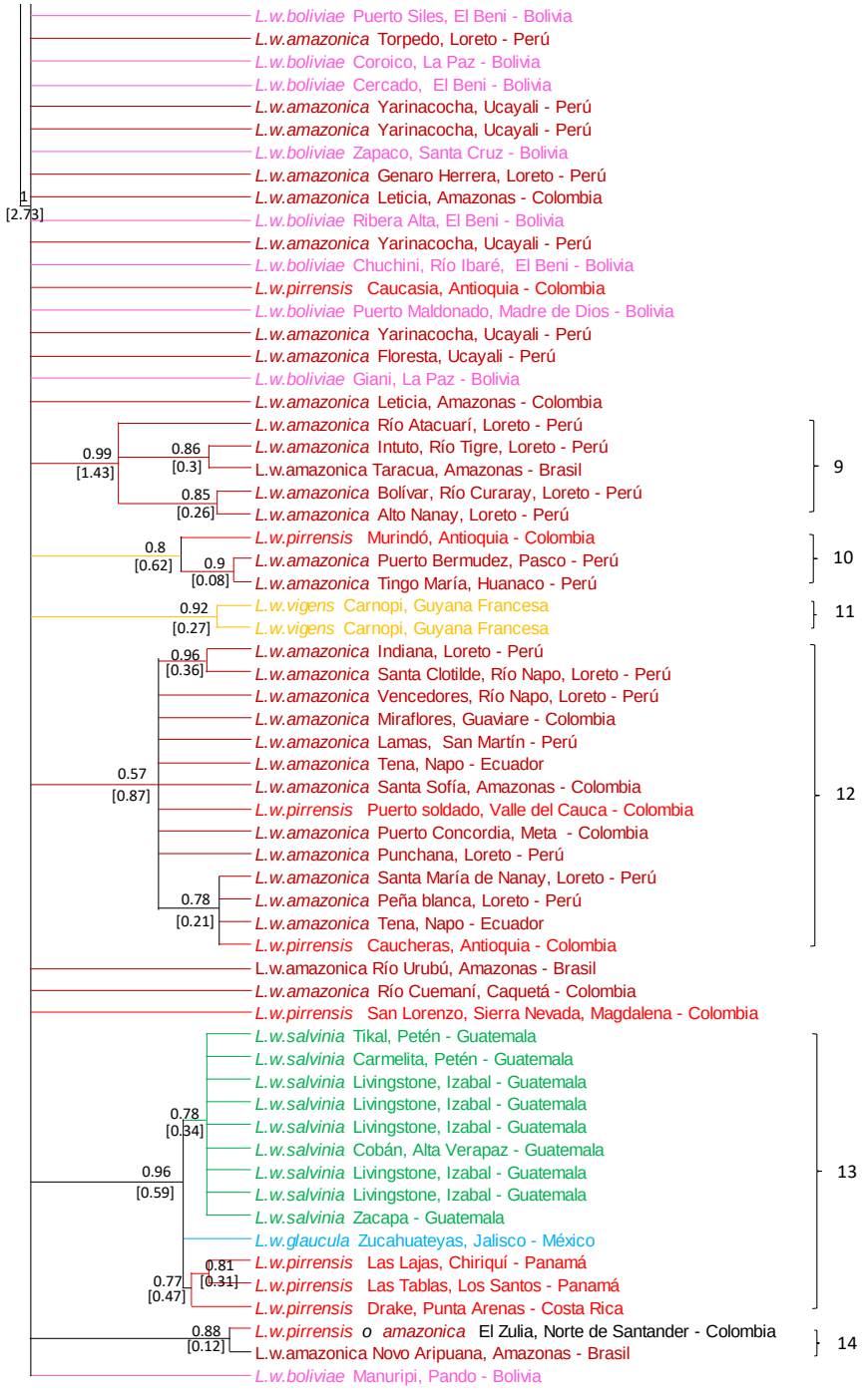
L.w.boliviae Puerto Siles, El Beni - Bolivia
L.w.amazonica Torpedo, Loreto - Perú
L.w.boliviae Coroico, La Paz - Bolivia
L.w.boliviae Cercado, El Beni - Bolivia
L.w.amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L.w.amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L.w.boliviae Zapaco, Santa Cruz - Bolivia
L.w.amazonica Genaro Herrera, Loreto - Perú
L.w.amazonica Leticia, Amazonas - Colombia
L.w.boliviae Ribera Alta, El Beni - Bolivia
L.w.amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L.w.boliviae Chuchini, Río Ibaré, El Beni - Bolivia
L.w.pirrensis Caucasia, Antioquia - Colombia
L.w.boliviae Puerto Maldonado, Madre de Dios - Bolivia
L.w.amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L.w.amazonica Floresta, Ucayali - Perú
L.w.boliviae Giani, La Paz - Bolivia
L.w.amazonica Leticia, Amazonas - Colombia
L.w.amazonica Río Atacuarí, Loreto - Perú
L.w.amazonica Intuto, Río Tigre, Loreto - Perú
L.w.amazonica Taracua, Amazonas - Brasil
L.w.amazonica Bolívar, Río Curaray, Loreto - Perú
L.w.amazonica Alto Nanay, Loreto - Perú
L.w.pirrensis Murindó, Antioquia - Colombia
L.w.amazonica Puerto Bermudez, Pasco - Perú
L.w.amazonica Tingo María, Huanaco - Perú
L.w.vigens Carnopi, Guyana Francesa
L.w.vigens Carnopi, Guyana Francesa
L.w.amazonica Indiana, Loreto - Perú
L.w.amazonica Santa Clotilde, Río Napo, Loreto - Perú
L.w.amazonica Vencedores, Río Napo, Loreto - Perú
L.w.amazonica Miraflores, Guaviare - Colombia
L.w.amazonica Lamas, San Martín - Perú
L.w.amazonica Tena, Napo - Ecuador
L.w.amazonica Santa Sofía, Amazonas - Colombia
L.w.pirrensis Puerto soldado, Valle del Cauca - Colombia
L.w.amazonica Puerto Concordia, Meta - Colombia
L.w.amazonica Punchana, Loreto - Perú
L.w.amazonica Santa María de Nanay, Loreto - Perú
L.w.amazonica Peña blanca, Loreto - Perú
L.w.amazonica Tena, Napo - Ecuador
L.w.pirrensis Caucheras, Antioquia - Colombia
L.w.amazonica Río Urubú, Amazonas - Brasil
L.w.amazonica Río Cuemaní, Caquetá - Colombia
L.w.pirrensis San Lorenzo, Sierra Nevada, Magdalena - Colombia
L.w.salvinia Tikal, Petén - Guatemala
L.w.salvinia Carmelita, Petén - Guatemala
L.w.salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala
L.w.salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala
L.w.salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala
L.w.salvinia Cobán, Alta Verapaz - Guatemala
L.w.salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala
L.w.salvinia Livingstone, Izabal - Guatemala
L.w.salvinia Zacapa - Guatemala
L.w.glaucula Zucahuateyas, Jalisco - México
L.w.pirrensis Las Lajas, Chiriquí - Panamá
L.w.pirrensis Las Tablas, Los Santos - Panamá
L.w.pirrensis Drake, Punta Arenas - Costa Rica
L.w.pirrensis o amazonica El Zulia, Norte de Santander - Colombia
L.w.amazonica Novo Aripuana, Amazonas - Brasil
L.w.boliviae Manuripi, Pando - Bolivia
1
[2.73]
0.99
[1.43]
0.86
[0.3]
0.85
[0.26]
0.8
[0.62]
0.9
[0.08]
0.92
[0.27]
0.96
[0.36]
0.57
[0.87]
0.78
[0.21]
0.78
[0.34]
0.96
[0.59]
0.81
[0.31]
0.77
[0.47]
0.88
[0.12]
9
10
11
12
13
14

Fig. 2. (cont.)

supuestas subespecies putativas. Este es el caso de varias agrupaciones polifiléticas de *L. w. amazonica* y de *L. w. boliviae*. La única agrupación monofilética de haplotipos que se correspondería a una supuesta subespecie morfológica es la que se estableció para *L. w. salvinia*.

Análisis genético espacial

La prueba de Mantel mostró una correlación no significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (r=0.073; *p*=0.06), ya que las distancias geográficas solo explicaron el 0.54 % de las distancias genéticas.

El análisis de autocorrelación espacial con 5 CD también mostró la inexistencia de estructura espacial tanto para el correlograma global (p=0.689) como para las CD individuales (**Fig**. 5). Así pues, en una distancia de más de 5.000 km, no se encontró evidencia de estructura espacial para el margay.

Cambios demográficos

El análisis de "Mismatch distribution" (**Fig**. 6) mostró una curva unimodal significativamente diferente a la distribución que se esperaría si la población hubiera tenido un tamaño constante (*rg*=0.0028, p=0.0074). Este resultado se ajusta bien a una expansión poblacional para la muestra global analizada para el margay. El valor de τ fue de 5.394. Aceptando que una generación en el margay fuera de un año, el inicio de esta expansión poblacional se habría dado hace 405 000 años. Si asumimos que una generación en el margay es de dos años, la misma se habría generado hace unos 202 000 años.

Los estadísticos utilizados para determinar presuntos cambios demográficos durante la historia evolutiva del margay también mostraron, todos ellos, una expansión poblacional significativa (Tajima D=-2.215, p=0.0013; Fu F_S=-48.485, p=0.000001; R_2=0.038, p=0.0051).

Por último, el análisis BSP detectó un inicio de expansión poblacional hace 350 000-300 000 años que se vio fuertemente incrementado en los últimos 150 000 años (**Fig**. 7). Por lo tanto, los tres métodos empleados detectaron una importante expansión poblacional para el margay y, tanto el primer método como el tercero, coinciden en estimar esa expansión poblacional en los últimos 400 000-150 000 años, durante la última fase del Pleistoceno.

DISCUSION

Diversidad genética

Como ya se ha mencionado, la muestra global de margay analizada para tres genes mitocondriales presentó una elevada diversidad genética (π=0.035). La misma es comparable a la de otros carnívoros neotropicales que también presentaron elevadas estimas de diversidad genética con los mismos, o similares, genes mitocondriales. Por ejemplo, estos son los casos de la taira (*Eira barbara*: π=0.042, Ruiz-García et al. 2017), del jaguar (*Panthera onca*: π=0.034, Ruiz-García et al. 2013c), y de la especie hermana del margay, el ocelote (*Leopardus pardalis*: π=0.031, Ruiz-García et al. 2019b). Sin embargo, la estima del margay es considerablemente superior a las encontradas en tres especies de zorros sudamericanos (*Cerdocyon thous*: π=0.019, Tchaicka et al. 2007; *Lycalopex culpaeus*: π=0.008, Ruiz-García et al. 2013b; *Lycalopex sechurae*: π=0.015, Ruiz-García et al. 2013b), en tres especies de nutrias (*Lontra felina*: π=0.005, Vianna et al. 2010; *Lontra longicaudis*: π=0.011, Ruiz-García et al. 2018a; *Pteronura brasiliensis*: π=0.008, Ruiz-García et al. 2018a), o en el puma (*Puma concolor*: π=0.003, Culver et al. 2000). Incluso, la diversidad genética estimada para el margay con los tres genes empleados (*ATP8, 16S rRNA*, y *ND5*) fue muy superior a la encontrada con la región control (*D-loop*) para especies de felinos neotropicales que tienen distribuciones geográficas más restringidas que el margay y que están en caso de mayor vulnerabilidad en términos de conservación. Estos son los casos de la guigna (*Leopardus guigna*: π=0.004, Napolitano et al. 2013) y del gato andino (*Leopardus jacobita*: π=0.004, Cossíos et al. 2009; Ruiz-García et al. 2013a).

Por lo tanto, la diversidad genética encontrada con los tres marcadores genéticos empleados es lo suficientemente elevada para encontrar estructura genética y espacial en el seno de esta especie en caso que existiera. La ausencia de la misma no es atribuible al tipo de marcadores mitocondriales utilizados.

Evolución temporal, espacial, y demográfica del margay

Hasta la fecha presente, solo se ha publicado un estudio relacionado con la filogeografía del margay (Eizirik et al. 1998). Sin embargo, ese estudio se realizó únicamente con 24 especímenes procedentes básicamente de animales en cautiverio y dejando sin muestrear grandes zonas geográficas donde habita el margay. El presente estudio intentó cubrir esas carencias ya que el tamaño muestral se incrementó

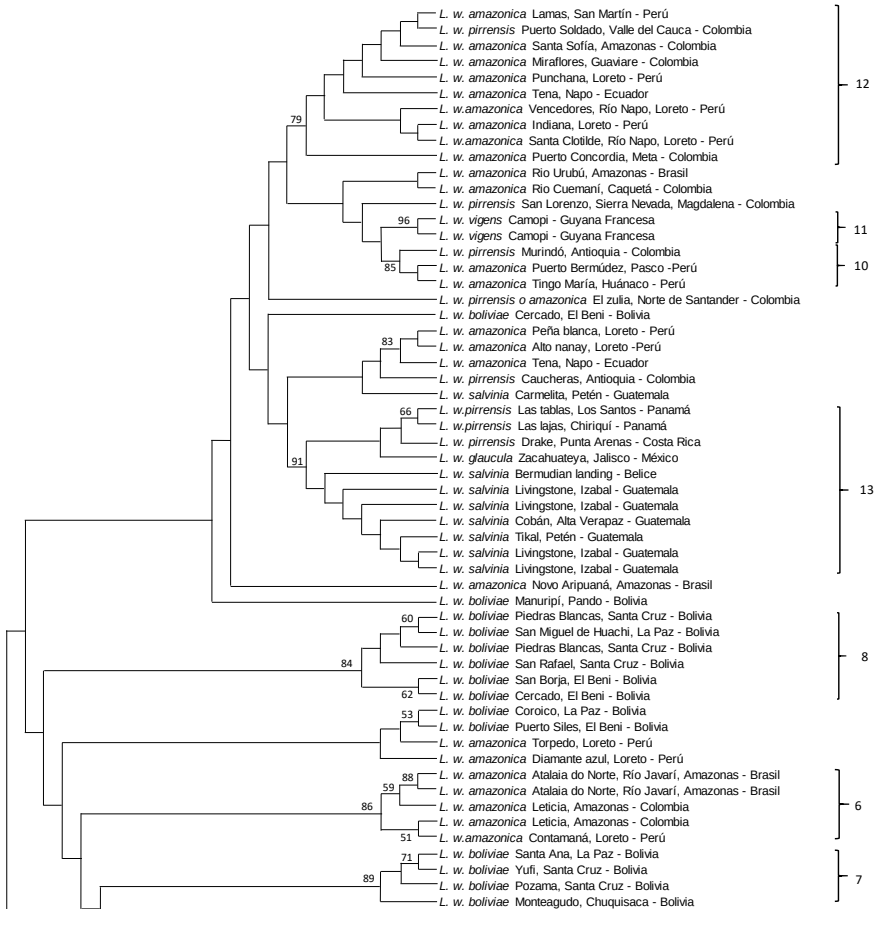

Fig. 3. Árbol de Máxima Verosimilitud (AMV) con los 118 especímenes de margay (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*). En los nodos, los porcentajes de bootstraps. Se señalan los 13 clados significativos encontrados en este análisis.

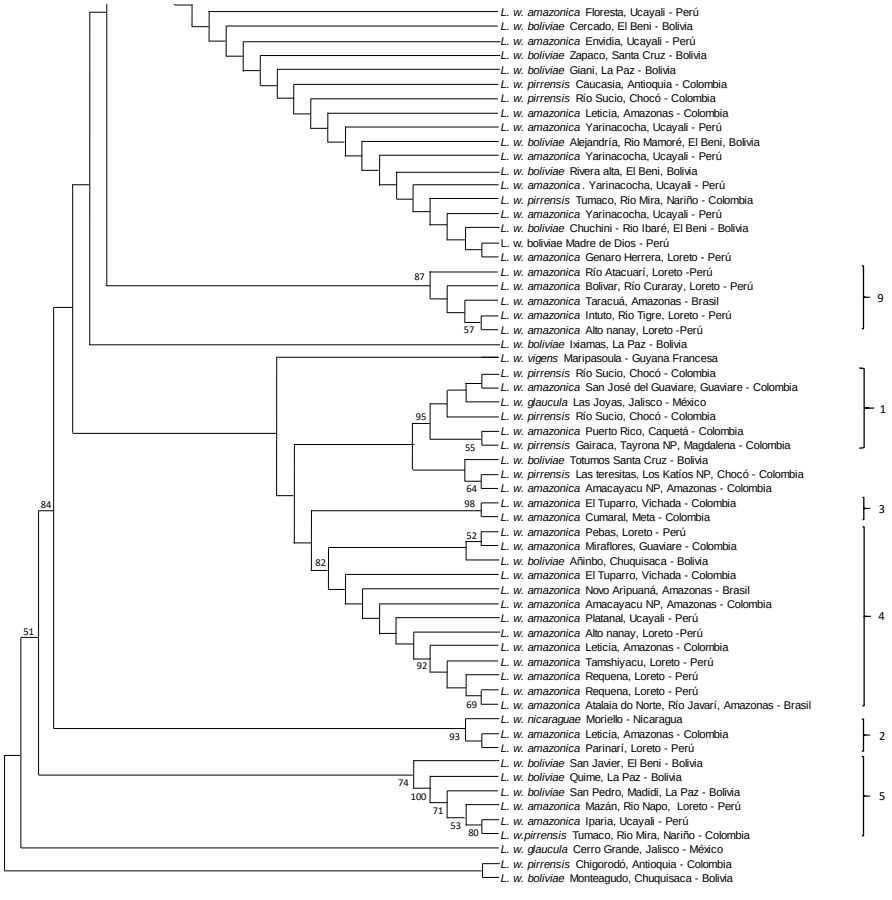
L. w. amazonica Floresta, Ucayali - Perú
L. w. boliviae Cercado, El Beni - Bolivia
L. w. amazonica Envidia, Ucayali - Perú
L. w. boliviae Zapaco, Santa Cruz - Bolivia
L. w. boliviae Giani, La Paz - Bolivia
L. w. pirrensis Caucasia, Antioquia - Colombia
L. w. pirrensis Río Sucio, Chocó - Colombia
L. w. amazonica Leticia, Amazonas - Colombia
L. w. amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L. w. boliviae Alejandría, Rio Mamoré, El Beni, Bolivia
L. w. amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L. w. boliviae Rivera alta, El Beni, Bolivia
L. w. amazonica . Yarinacocha, Ucayali - Perú
L. w. pirrensis Tumaco, Rio Mira, Nariño - Colombia
L. w. amazonica Yarinacocha, Ucayali - Perú
L. w. boliviae Chuchini - Rio Ibaré, El Beni - Bolivia
L. w. boliviae Madre de Dios - Perú
L. w. amazonica Genaro Herrera, Loreto - Perú
L. w. amazonica Río Atacuarí, Loreto -Perú
L. w. amazonica Bolivar, Rio Curaray, Loreto - Perú
L. w. amazonica Taracuá, Amazonas - Brasil
L. w. amazonica Intuto, Rio Tigre, Loreto - Perú
L. w. amazonica Alto nanay, Loreto -Perú
L. w. boliviae Ixiamas, La Paz - Bolivia
L. w. vigens Maripasoula - Guyana Francesa
L. w. pirrensis Río Sucio, Chocó - Colombia
L. w. amazonica San José del Guaviare, Guaviare - Colombia
L. w. glaucula Las Joyas, Jalisco - México
L. w. pirrensis Río Sucio, Chocó - Colombia
L. w. amazonica Puerto Rico, Caquetá - Colombia
L. w. pirrensis Gairaca, Tayrona NP, Magdalena - Colombia
L. w. boliviae Totumos Santa Cruz - Bolivia
L. w. pirrensis Las teresitas, Los Katíos NP, Chocó - Colombia
L. w. amazonica Amacayacu NP, Amazonas - Colombia
L. w. amazonica El Tuparro, Vichada - Colombia
L. w. amazonica Cumaral, Meta - Colombia
L. w. amazonica Pebas, Loreto - Perú
L. w. amazonica Miraflores, Guaviare - Colombia
L. w. boliviae Añinbo, Chuquisaca - Bolivia
L. w. amazonica El Tuparro, Vichada - Colombia
L. w. amazonica Novo Aripuaná, Amazonas - Brasil
L. w. amazonica Amacayacu NP, Amazonas - Colombia
L. w. amazonica Platanal, Ucayali - Perú
L. w. amazonica Alto nanay, Loreto -Perú
L. w. amazonica Leticia, Amazonas - Colombia
L. w. amazonica Tamshiyacu, Loreto - Perú
L. w. amazonica Requena, Loreto - Perú
L. w. amazonica Requena, Loreto - Perú
L. w. amazonica Atalaia do Norte, Río Javarí, Amazonas - Brasil
L. w. nicaraguae Moriello - Nicaragua
L. w. amazonica Leticia, Amazonas - Colombia
L. w. amazonica Parinarí, Loreto - Perú
L. w. boliviae San Javier, El Beni - Bolivia
L. w. boliviae Quime, La Paz - Bolivia
L. w. boliviae San Pedro, Madidi, La Paz - Bolivia
L. w. amazonica Mazán, Río Napo, Loreto - Perú
L. w. amazonica Iparia, Ucayali - Perú
L. w.pirrensis Tumaco, Rio Mira, Nariño - Colombia
L. w. glaucula Cerro Grande, Jalisco - México
L. w. pirrensis Chigorodó, Antioquia - Colombia
L. w. boliviae Monteagudo, Chuquisaca - Bolivia
87
57
95
55
64
98
52
82
92
69
84
51
93
74
100
71
53
80
9
1
3
4
2
5

Fig. 3. (cont.)

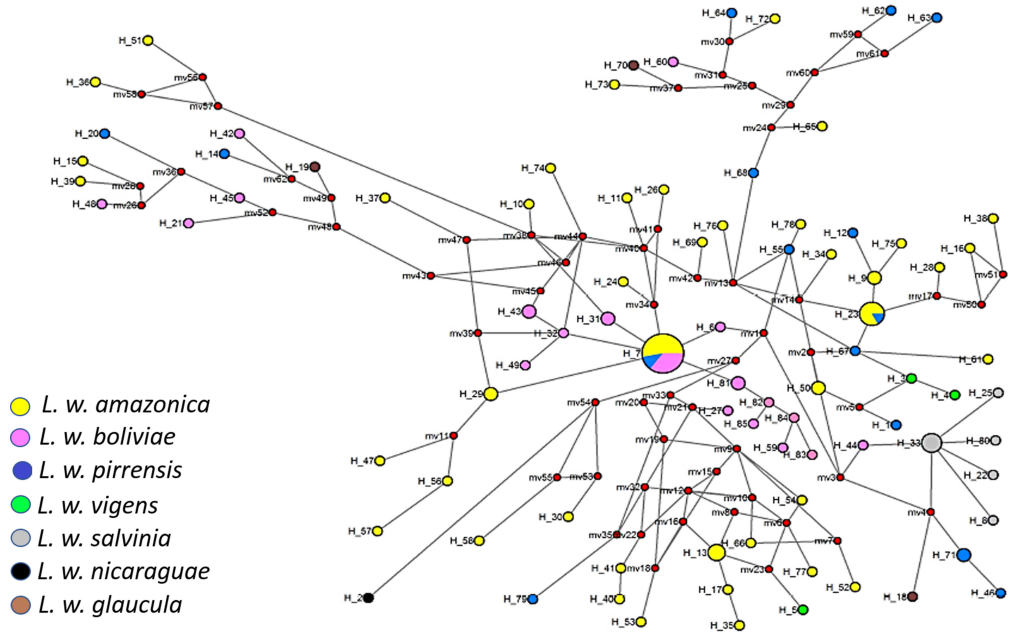

Fig. 4. Red de haplotipos ("Median Joining Network") con los haplotipos detectados en este análisis con 118 especímenes de margay (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*). Círculos rojos (mv) indican haplotipos no encontrados, o desaparecidos, que conectan los haplotipos detectados.

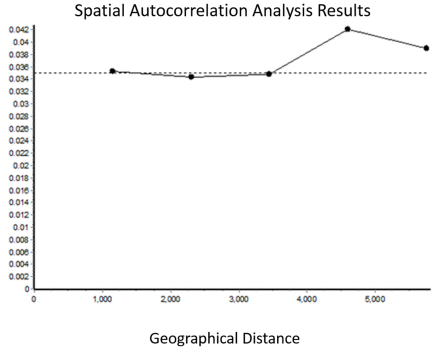

Fig. 5. Correlograma obtenido con el estadístico de autocorrelación espacial A_y con cinco clases de distancias para los 118 especímenes de margay (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*). El correlograma no fue significativo (p = 0.689) indicando ausencia de estructura espacial para esta especie.

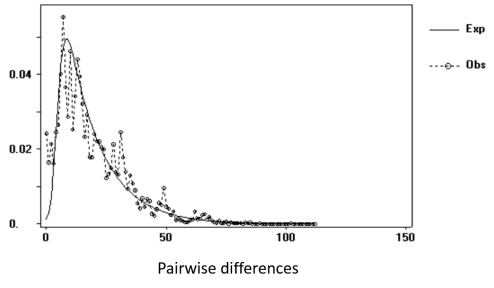

Fig. 6. Análisis de "Mismatch distribution" mostrando una expansión poblacional significativa para la muestra de 118 especímenes de margays (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*).

hasta 118 especímenes y se cubrieron muchas zonas geográficas que no fueron abarcadas por Eizirik et al. (1998).

El inicio de la diversificación mitocondrial del margay hace 2.7 MA se correlaciona bien con los cambios climáticos que se originaron por el cierre del Istmo de Panamá durante el final del Plioceno 3.1-2.8 MA; (Marshall et al. 1979; 1982; Marshall 1985; 1988; Webb 1985; Coates & Obando 1996; Webb 1997). Existe discusión entre diversos autores en determinar cuando apareció el Pleistoceno. La mayor parte de los trabajos parecen apuntar el inicio del Pleistoceno alrededor de 1.8 MA (extinción de los discoastéridos, 1.8-1.6 MA, Berggren 1987; paleomagnetimo, 2.0-1.8 MA, McDougall 1979; Potasio/Argón,

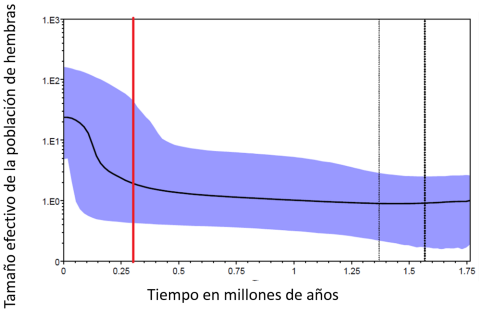

Fig. 7. Análisis "Bayesian Skyline Plot" mostrando una expansión poblacional significativa desde hace 300.000 años para la muestra de 118 especímenes de margays (*Leopardus wieddi*) analizados para tres genes mitocondriales (mt*ATP8*, mt*16S rRNA*, mt*ND5*).

1.86 MYA, Jordá 1995). Sin embargo, recientemente, otras fuentes reivindican el origen del Pleistoceno hace 2.59 MYA, incorporando el periodo Gelasiano del Plioceno al Pleistoceno (International Stratigraphic Chart 2008). Por lo tanto, el primer indicio de diversificación mitocondrial para el margay (2.7 MA) se habría dado en la última fase del Plioceno.

En el AB se observó que los clados 5, 2, 9 y 4 (solo se discuten los 13 clados que fueron comunes entre el AB y el AMV) fueron los que se diversificaron más antiguamente (1.9, 1.43, 1.43 y 1.21 MA, respectivamente) durante la primera fase del Pleistoceno. El primero incluyó un número limitado de especímenes (nueve) pero que ocuparon la mayor parte del rango geográfico analizado (desde México a Bolivia). Su diferenciación se dio dentro del periodo Gelasiano (transición Plio-Pleistocénica). El segundo es también un clado muy limitado (únicamente tres especímenes) pero que engloba especímenes amazónicos y centroamericanos (de Nicaragua). El tercero fue un clado exclusivamente conformado por ejemplares amazónicos (Perú y Brasil). El cuarto fue un clado que engloba un número mayor de ejemplares, básicamente cubriendo una buena parte de la Amazonía occidental y de los Llanos Orientales colombianos, pero, también con un ejemplar boliviano y otro de la Guyana Francesa, siendo exclusivamente un clado sudamericano.

Estos tres últimos clados (diferenciación 1.4-1.2 MA) parecen asociarse al periodo pre-Pastoniano (1.30-0.8 MA), el cual constituyó la etapa más fría y seca de la primera gran glaciación detectada en Norte América y en Europa Central (Nebraska-Günz). Fue un periodo extremadamente seco con importante fragmentación de bosques. En Sudamérica se relaciona con el Ensenadense tal como se comentará unas líneas más adelante. En este periodo se detectó también fragmentación genética en otras especies de Carnivora, tales como en el gato de pajonal (*Leopardus colocolo*; Cossíos et al. 2009), en ciertas formas de tigrillos (*Leopardus tigrinus*; Ruiz-García et al. 2018b), en el jaguarundí (Ruiz-García et al. 2018c), en zorros del género *Lycalopex* (Ruiz-García et al. 2013b) o en la taira (*Eira barbara*; Ruiz-García et al. 2017).

Otros clados significativos fueron, no obstante, de diversificación temporal mucho más reciente siendo el caso de los clados 13b, 7, 6, 13a, y 11 (0.47, 0.36, 0.34, 0.34, 0.27 MA, respectivamente). Este periodo coincide con el Bonaerense (Ameghino 1889) y se extendió desde hace 0.5 a 0.13 MA. Se caracterizó por la biozona del perezoso gigante (*Megatherium americanum*), por el incremento de mamíferos holárticos en Sudamérica (por ejemplo, roedores y cérvidos), y por la existencia de suelos con una flora muy diversa. Fue un periodo de una cierta estabilidad climática con un ambiente húmedo (extensión de bosques) y cálido lo cual se correlaciona perfectamente con la expansión poblacional detectada para el margay con los tres procedimientos empleados. La aparición de algunos clados, que se diferenciaron en esa franja temporal, pudo haberse dado en un periodo más frío y seco anterior al Bonaerense, el Ensenadense (2.0 a 0.5 MA). Al inicio del Ensenadense se caracterizó por la biozona de *Tolypeutes pampaeus* (un armadillo). Al comienzo de este periodo el clima fue substancialmente cálido y la fauna de la provincia de Buenos Aires era típicamente tropical o chaqueña (*Tapirus*, *Catagonus*, *Cyonasua*, *Clyomys*). Sin embargo, desde hace un millón de años hasta hace 0.5 MA, el clima se enfrió y se secó considerablemente. El registro fósil de mamíferos de la provincia de Buenos Aires se caracterizó entonces por taxones de zonas esteparias secas, como la fauna actual de la Patagonia (*Lama*, *Lestodelphys*, *Lyncodon*) (Forasiepi et al. 2007). Esto pudo producir una fragmentación de los bosques y de las antiguas poblaciones de margay en Latino América. Posteriormente algunas de esas poblaciones se expandieron de forma notable durante el Bonaerense y, a nivel genético, fueron detectadas sus expansiones durante ese periodo. No se puede descartar, no obstante, que la fragmentación de los grupos más modernos de margay se diera en algunos periodos, relativamente, breves de sequía y enfriamiento que se ocurrieron dentro del contexto de clima más cálido, húmedo y estable del Bonaerense. En Europa, la glaciación Riss (hace 0.2 MA) estaría intercalada temporalmente durante el Bonaerense

sudamericano. Por ejemplo, Hooghiemstra (1984) detectó, tan solo para el Pleistoceno de Colombia, hasta 27 posibles cambios climáticos importantes con una periodicidad de 100 000 A. Sin embargo, solo hay clara evidencia de la última gran glaciación que comenzó hace 116 000 A (van der Hammen & González 1963; van der Hammen et al. 1981; Helmens 1988; Flórez 1992). Sin embargo, hay una cierta evidencia de que se pudieron registrar glaciaciones en el noroeste de Sudamérica anteriores a los 128 000 años. Herd (1982) detectó una morrena de más de 100 000 años en el Departamento del Tolima (Colombia), lo cual significa que era anterior a la última gran glaciación que se inició hace 116 000 años. También, Van der Hammen et al. (1981) (Sierra del Cocuy, Departamento de Boyacá, Colombia), Helmens (1988) (Sumapaz, Departamento de Cundinamarca, Colombia), o Flórez (1992) (Departamento de Caldas, Colombia) encontraron evidencias de glaciaciones anteriores a unos 200 000 años. Esto significa que la fuerte expansión detectada para el margay durante el Bonaerense pudo darse en poblaciones que se fragmentaron anteriormente durante el Ensenadense o, también, que se fragmentaron durante el propio periodo Bonaerense, en ciertos momentos más secos y que, posteriormente, habrían generado múltiples contactos secundarios.

Todo lo comentado pone de manifiesto que han existido múltiples procesos de diversificación en el interior del margay, que esos procesos de diversificación han ocurrido en diferentes épocas, y muchos de ellos se han sobrepuesto geográficamente unos a otros debido a la considerable capacidad de expansión poblacional de esta especie. Especialmente, las zonas colonizadas originalmente (distribución de clados más antiguos) fueron posteriormente colonizadas, especialmente, en los últimos 400.000 A, por grupos de margays originados más modernamente. Por ello, encontramos, en unas mismas zonas geográficas, varios clados (AB y AMV) viviendo en simpatría. Algunos ejemplos son suficientes. Para el AB, en la Amazonía occidental (especialmente peruana y colombiana) detectamos hasta siete clados diferentes (clados 1, 2, 4, 5, 6, 9, y 12) coexistiendo en simpatría. En México, únicamente muestreamos tres ejemplares y cada uno de ellos pertenece a un clado diferente. Uno, en el clado 5 más antiguo y conjuntamente con especímenes sudamericanos (1.9 MA), otro en el clado 1, también con todos los otros especímenes sudamericanos (0.85 MA), y el tercero en el clado 13 (0.59 MA) que es exclusivamente centroamericano. En Bolivia (incluyendo las zonas amazónicas y centroandinas del país), convergen cinco clados diferentes. Tres de ellos (clados 1, 4 y 5) se encuentran ampliamente extendidos por la distribución geográfica del margay, mientras que otros dos son exclusivamente de origen boliviano. Los tres ejemplares muestreados en Guyana Francesa también ejemplarizan este concepto. Dos de los especímenes analizados conforman un clado (11) únicamente detectado en esa zona geográfica, pero el tercer espécimen pertenece al clado 4 ampliamente expandido por la cuenca del Amazonas. Estos resultados ponen de manifiesto que ni la Cordillera de los Andes, ni el tapón del Darién fueron obstáculos a múltiples conexiones entre las poblaciones de margay. Todo ello muestra una sobreimposición de grupos colonizadores que llegaron a las respectivas áreas geográficas en diferentes épocas temporales del Pleistoceno debido al elevado potencial de flujo génico para esta especie. Este fenómeno de sobreimposición de haplogrupos generados en diferentes épocas pero que actualmente viven en simpatría también ha sido detectado en otras especies de mamíferos neotropicales (*Cebus albifrons*, Ruiz-García et al. 2010); *Tapirus terrestris*, (Ruiz-García et al. 2016c); *Eira barbara*, (Ruiz-García et al. 2017); *Puma yagouaroundi*, (Ruiz-García et al. 2018c).

Esta sobreimposición geográfica de diferentes haplogrupos es el fenómeno que explica la no detección de estructura espacial significativa, tanto para el test de Mantel como para la autocorrelación espacial. Utilizando los mismos marcadores mitocondriales, otros estudios detectaron una muy significativa estructura espacial en el tigrillo (*Leopardus tigrina*; Ruiz-García et al. 2018b) y en el ocelote (Ruiz-García et al. 2019b). También, para el jaguar (Ruiz-García et al. 2019c) y el jaguarundí (*Puma yagouroundi*; Ruiz-García et al. 2016c), la estructura espacial a través del Neotrópico fue significativa aunque no tan marcadamente como en los dos taxones anteriormente comentados. Por lo tanto, la inexistencia de estructura espacial en el margay no es atribuible a las características de los genes mitocondriales empleados porque esos mismos marcadores sí detectaron una estructura espacial significativa en otros felinos neotropicales.

Un análisis mitogenómico, con una fracción de los 118 especímenes de margay estudiados aquí (55 especímenes), mostraron la existencia significativa de los clados 2, 4, 5, 7, 8, 12, y 13b (Ruiz-García et al. 2019b). Los otros clados detectados en el presente estudio no aparecieron porque no se pudo obtener el mitogenoma completo de especímenes representativos de esos clados.

Sistemática del margay

Todo lo comentado, conjuntamente con la poca estructura filogeográfica y la ausencia de estructura espacial significativa, entra en conflicto con las 10 subespecies morfológicas putativas y de localización geográfica específica establecida por Cabrera (1957), Hall (1981)y de Oliveira (1998), pero, también, entra en conflicto con las tres subespecies sugeridas por Kitchener et al. (2017) a partir del estudio molecular de Eizirik et al. (1998).

Los especímenes supuestamente pertenecientes a la subespecie *L. w. amazonica* se encontraron en 10 grupos significativamente diferentes. Cuatro de ellos incluyeron especímenes exclusivamente clasificados a priori como *L. w. amazonica*. Por lo tanto, esos cuatro grupos son monofiléticos pero polifiléticos entre sí. Por lo tanto, en el área geográfica considerada tradicionalmente para *L. w. amazonica*, encontramos 10 grupos diferentes, cuatro de ellos exclusivos de la Amazonía occidental. El estudio de Eizirik et al. (1998) no incluyó ningún espécimen de esta amplia zona de Sudamérica por lo que no pudo aportar nada al conocimiento filogeográfico de esta especie en dicha área.

La distribución geográfica tradicional de *L. w. pirrensis* estaba establecido en el sur de Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y costa norte de Colombia y zona este-andina (Pacífica) de Colombia y Ecuador. El presente estudio detectó ejemplares del norte de Colombia y de la zona este-andina (Pacífica) colombiana en cinco grupos diferentes y, en todos ellos, junto a especímenes de otras supuestas subespecies de origen oeste-andino. Si aceptamos que el origen del actual margay se dio en la Amazonía (Ruiz-García et al. 2019b), al menos, en cinco ocasiones esta especie ha pasado de la zona oeste-andina (Llanos y Amazonía) a la este-andina (Pacífica) por lo que la Cordillera de los Andes no pareciera haber sido una barrera geográfica consistente para el margay. Por lo tanto, esta supuesta subespecie (*L. w. pirrensis*) no parece ser una entidad real en el norte y pacífico colombiano. Eizirik et al. (1998) tampoco muestrearon especímenes de esa zona y ese estudio no pudo contribuir a resolver la situación sistemática de esa población de margay. Sin embargo, sí detectamos un grupo monofilético y significativo para los especímenes muestreados en Panamá y Costa Rica que se corresponden al área geográfica del holotipo de esta presunta subespecie. Este grupo exclusivamente del sur de Centroamérica sí se correspondería, entonces, con el tradicional *L. w. pirrensis*.

En territorio del Departamento de Santa Cruz (Bolivia), se definió el holotipo de *L. w. boliviae*. A priori los especímenes muestreados en Bolivia, los clasificamos en esa subespecie. Sin embargo, encontramos animales bolivianos en cinco grupos significativamente diferentes. Dos de ellos son monofiléticos (todos los especímenes de esos grupos son originariamente bolivianos) pero polifiléticos entre sí. Si el taxón *L. w. boliviae* fuera real, sin embargo, no podemos determinar a cuál de los dos grupos monofiléticos correspondería el mismo. Adicionalmente, dos de los otros tres grupos donde se encontraron especímenes bolivianos estuvieron integrados básicamente por ejemplares a priori clasificados como *L. w. amazonica*. Una posible interpretación es que en el territorio boliviano existen dos linajes endémicos de esa zona, pero también se pueden localizar ejemplares que se originaron en otras áreas de la cuenca amazónica (incluyendo al norte del Río Amazonas) y que se sobre-impusieron geográficamente a los dos linajes endémicos de ese país. Por lo tanto, la validez de *L. w. boliviae* es muy dudosa. Igualmente, este resultado pone en evidencia que el Río Amazonas no fue una barrera geográfica para la dispersión efectiva de esta especie a un lado, y al otro, del mencionado Río. Eizirik et al. (1998) analizó un solo ejemplar procedente de Bolivia que quedó asociado al grupo del sur de Sudamérica detectado por ellos. Kitchener et al. (2017) clasificaron ese ejemplar como *L. w. wiedii*. Nosotros no estudiamos ningún espécimen del rango de distribución de esa presunta subespecie por lo que no podemos hacer inferencias acerca de ella. Sin embargo, resulta evidente que al haber estudiado 26 especímenes bolivianos (versus el único ejemplar de Eizirik et al. 1998), podemos afirmar que la situación taxonómica de esta especie en Bolivia es mucho más compleja que lo que se determinó con el estudio de un único individuo.

Dos de los tres especímenes analizados procedentes de Guyana Francesa formaron un grupo monofilético que se correspondería bien a la zona geográfica donde se definió el holotipo de *L. w. vigens*. Eizirik et al. (1998) analizaron unos cuantos ejemplares de esa zona geográfica y también detectaron un grupo diferenciado en la misma. Kitchener et al. (2017) concluyó que, en esta zona al norte de la desembocadura del Río Amazonas en Brasil y de las Guyanas, está presente *L. w. vigens*. Nosotros concordamos con esa idea. Sin embargo, no hay que olvidar que en la misma área geográfica también detectamos un ejemplar que hizo parte de un grupo mayoritaria-

mente integrado por especímenes clasificados como *L. w. amazonica*. Por lo tanto, en esa área geográfica pueden estar viviendo en simpatría especímenes asignables a *L. w. vigens* con otros procedentes de otras áreas de la cuenca amazónica.

El caso de los taxones del margay en Centroamérica es muy interesante. Kitchener et al. (2017), a partir de Eizirik et al. (1998), concluyó que únicamente existía una subespecie, *L. w. glaucula*. Nuestros resultados no confirmaron esa afirmación. Ya comentamos más arriba que se pudo distinguir *L. w. pirrensis* en Panamá y sur de Costa Rica. Todos los especímenes muestreados en Guatemala y Belice también conformaron un grupo monofilético que se corresponde perfectamente con el origen del holotipo de *L. w. salvinia*. Sin embargo, el único ejemplar que analizamos de *L. w. nicaraguae* poseyó un haplotipo asociado a algunos haplotipos de origen sudamericano. El caso de los tres ejemplares mexicanos también es llamativo. Dos de ellos, se asociaron más intensamente a haplotipos sudamericanos que a los haplotipos de *pirrensis* o *salvinia*, mientras que el tercero se asoció de manera significativa a los de los dos taxones centroamericanos. Este último ejemplar podría potencialmente representar *L. w. glaucula*. Sin embargo, más especímenes de esa zona de México deberían estudiarse para poder determinar con exactitud esta aseveración. Al no haber muestreado, en México, especímenes correspondientes a las subespecies putativas *L. w. oaxacensis* y *L. w. yucatanica* no podemos hacer inferencias respecto a ellas. Por lo tanto, la situación en Centroamérica parece mucho más compleja que lo especificado por Eizirik et al. (1998) y Kitchener et al. (2017) con la existencia de un único grupo o una única subespecie (*L. w. glaucula*). Sin haber analizado ejemplares de dos presuntas subespecies de la zona, detectamos dos grupos bien diferenciados en Centroamérica (*pirrensis* y *salvinia*) y, al menos, cuatro penetraciones desde Sudamérica a Centroamérica. Las tres primeras, más antiguas, fuertemente relacionadas con actuales acervos sudamericanos, y una cuarta más moderna que dio lugar a los haplotipos exclusivamente encontrados en Centroamérica. Estos resultados ponen en evidencia que el tapón del Darién tampoco fue una barrera geográfica importante para la dispersión del margay.

Por lo tanto, el presente estudio molecular únicamente detectó tres grupos que pueden corresponderse a las subespecies morfológicas tradicionalmente consideradas: *L. w. salvinia* (Guatemala, Belice), *L. w. pirrensis* (pero restringida únicamente al sur de Costa Rica y Panamá), y *L. w. vigens* (noreste de Brasil al norte del Río Amazonas y Guyanas), aunque en ese territorio también pueden encontrase individuos y haplotipos característicos de otras zonas de la cuenca Amazónica. Igualmente, este estudio pone de manifiesto que el análisis de un número reducido de muestras y que no cubra ampliamente la distribución geográfica de la especie objeto de estudio puede mostrar una visión simplificada de la historia evolutiva y sistemática de la misma. Esto es lo que ocurre con el estudio de Eizirik et al. (1998). Esas circunstancias favorecen encontrar un número más reducido de grupos diferenciables y que estas agrupaciones parezcan monofiléticas cuando no lo son necesariamente. Eizirik et al. (1998) concluyeron que el Río Amazonas y el tapón del Darién eran barreras geográficas que separaban grupos genéticos diferenciables de margays. Nuestro estudio mostró que, al multiplicar por cinco el tamaño muestral, ambos procesos geográficos no fueron barreras impermeables a los eventos colonizadores del margay. Nuestro análisis también mostró que la Cordillera de los Andes tampoco imposibilitó la colonización de esta especie a un lado y al otro de la misma. En concordancia con nuestros hallazgos, Nascimento (2010), desde una perspectiva morfológica, tampoco encontró barreras geográficas que diferenciaran las poblaciones de margay.

Es necesario ampliar el número de especímenes a analizar, especialmente, en el rango geográfico de las tres presuntas subespecies no representadas en este análisis. También es necesario incrementar el análisis de muestras en ciertas áreas de la zona de distribución de *L. w. glaucula* (México) y de *L. w. nicaraguae* (norte de Costa Rica y Nicaragua). Igualmente, importante es el análisis de marcadores nucleares que permitan constatar el grado de mezcla entre los individuos que viven en simpatría pero que pertenecen a haplogrupos que han llegado en diferentes épocas a una misma zona geográfica. Si se hubiera dado introgresión genética podríamos encontrar que el ADN mitocondrial de un ejemplar se correspondiera con un agrupamiento diferente a la clasificación morfológica del mismo, mientras que el ADN nuclear podría coincidir con la clasificación morfológica preliminar. Igualmente, también podría ocurrir en el caso de que se diera hibridación que el ADN mitocondrial de ejemplares de una misma zona geográfica presente considerables diferencias por haber evolucionado en regiones geográficas diferentes, mientras que el ADN nuclear de los mismos ejem-

plares se haya homogeneizado por flujo genético efectivo entre los ancestros de esos especímenes.

Por último, no es descartable la posible hibridación entre el margay y otras especies del género *Leopardus*, especialmente con el ocelote. La importancia de la hibridación en la historia evolutiva de ciertas especies de ese género (por ejemplo, para *L. tigrinus*) ha sido constatado por Trigo et al. (2008; 2013; 2014) y Ruiz-García et al. (2018b). Por lo tanto, es importante analizar comparativamente los resultados obtenidos para el margay con los obtenidos para otras especies del mismo género.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la vicerrectoría de investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá (Colombia) mediante el proyecto titulado "Estructura genética y filogeografía de cinco especies de felinos neotropicales mediante microsatélites y secuencias de tres genes mitocondriales". ID: 4192. Los autores agradecen a múltiples colaboradores en Colombia, y en otros países Latinoamericanos, por la ayuda recibida durante más de 20 años en la consecución de muestras de especímenes conseguidos directamente en la naturaleza. Entre esas personas cabe destacar D. Álvarez, P. Escobar, N. Lichilín, L. F. Castellanos (Colombia), A. Castellanos (Ecuador), H. Gálvez (Perú), N. Mamani, V. Iñiguez (Bolivia), y a decenas de comunidades indígenas a través de toda Latino América, en especial a los Bora, Ocaina, Shipigo-Comibo, Capanahua, Angoteros, Orejón, Cocama, Kishuarana, Alamas, Sirionó, Canichana, Cayubaba, Chacobo, Jaguas, Ticunas, Huitoto, Cocama, Tucano, Nonuya, Yuri, Yucuna, Curripacos, Desano, Marubos, Matis, Mayoruna, Kichwa, Huaorani, Shuar, y Achuar. A todos ellos, muchas gracias.

LITERATURA CITADA

Akaike, H. 1974. A New Look at the Statistical Model Identification. IEEE Transactions on Automatic Control 19:716-723. https://doi.org/10.1109/tac.1974.1100705

Allen, J. A. 1919. Notes on the synonymy and nomenclature of the smaller spotted cats of tropical America. Bulletin of the American Museum of Natural History 41:341-419.

Ameghino, F. 1889. Contribución al conocimiento de los mamíferos fósiles de la República Argentina. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba 6:1-1027. https://doi.org/10.5962/bhl.title.121288

Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. P. en.: Chapman & Hall, New York, USA.

Bandelt, H. J., P. Forster, & A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Berggren, W. A. 1987. Neogene chronology and cronostratigraphy new data. Ann Inst Geol Publ Hungarica 70: 19-41.

Bisbal, F. J. 1989. Distribution and Habitat association of the carnivores in Venezuela. Pp. 339-362, en: Advances in Neotropical Mammalogy (KH Redford & JF Eisenberg, eds.). Sandhill Crane Press, Gainesville, Florida.

Cabrera, A. 1917. Mamíferos del Viaje al Pacífico. Verificado de 1862 a 1865 por una comisión de naturalistas enviada por el Gobierno Español. Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales. Serie zoológica 31:1-62. Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones científicas, España. https://doi.org/10.5962/bhl.title.5769

Cabrera, A. 1957. Catálogo de los mamíferos de América del sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"e Instituto Nacional de Investigacion de las Ciéncias Naturales, Ciéncias Zoológicas 4:1-307. https://doi.org/10.22179/revmacn.13.214

Coates, A. G., & J. A. Obando. 1996. The geologic evolution of the Central American isthmus. Evolution and environment in tropical America. (JBC Jackson, AF Budd & AG Coates, eds.). Chicago University, Chicago EEUU.

Collier, G., & S. O'Brien. 1985. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. Evolution 39:473-487. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00389.x

Cossíos, E. D., M. Ruiz-García, M. Lucherini, & A. Angers. 2009. Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). BMC Evol Biol 9:68. https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-68

Cossíos, E. D., S. Walker, M. Lucherini, M. Ruiz-García, & B. Angers. 2012. Between high-altitude islands and high-altitude corridors. The population structure of the Andean cat (*Leopardus jacobita*). Endangered Species Research 16: 283-294. https://doi.org/10.3354/esr00402

Culver, M., W. E. Johnson, J. Pecon-slattery, & S. J. O'brien. 2000. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). Journal of Heredity 91: 186-197. https://doi.org/10.1093/jhered/91.3.186

de Oliveira, T. G. 1994. Neotropical cats<U+202F>: ecology and conservation. P. en.: Sao Louis, Brasil.

de Oliveira, T. G. 1998. *Leopardus wiedii*. Mammalian Species 579:1-6. https://doi.org/10.2307/3504400

de Oliveira, T. G., A. Paviolo, J. Schipper, R. Bianchi, E. Payán, & S. Carvajal. 2015. *Leopardus wiedii*. The IUCN Red List of Threatened Species: . https://doi.org/10.2305/iucn.uk.2015-4.rlts.t11511a50654216.en

Drummond, A. J., H O Syw, M. J. Phillips, & A. Rambaut. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 4:699-710.

Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie, & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution 29:1969-1973. https://doi.org/10.1093/molbev/mss075

Eizirik, E. et al. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, felidae). Journal of Molecular Evolution 47:613-624. https://doi.org/10.1007/pl00006418

Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge, C, Bult. 1995. Testing significance of incongruence. Cladistics 10: 315-319. https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1994.tb00181.x

Flórez, A. 1986.Geomorfología del área de Manizales-Chinchiná, Cordillera Central, Colombia. Tesis Doctoral, Universidad de Amsterdam. 158p.

Flórez, A. 1992. Los nevados de Colombia: glaciales y glaciaciones. En: Análisis Geográficos IGAC. IGAC, Bogotá, Colombia.

Forasiepi, A. M., A. G. Martinelli, & F. J. Goin. 2007. Revisión taxonómica de *Parahyaenodon argentinus* Ameghino y sus implicancias en el conocimiento de los grandes mamíferos carnívoros del Mio-Plioceno de América de Sur. Ameghiniana 44:143-159.

Fu, Y. X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth. Genetics 147:915-25.

Gabriel, K. R., & R. R. Sokal. 1969. A new statistical approach to geographic variation analysis. Systematic Biology 18:259-278. https://doi.org/10.2307/2412323

Galtier, N., D. Enard, Y. Radondy, E. Bazin, & K. Belkhir. (2006). Mutation hotspots in mammalian mitochondrial DNA. Genome Research 16: 215-222. https://doi.org/10.1101/gr.4305906

Garcia-Perea, R. 1994. The pampas cat group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1958) (Carnivora, Felidae), a systematic and biogeographic review. American Museum Novitates. 3096: 1-35.

Goldman, E. A. 1914. Descriptions of five new mammals from Panama. Smithsonian Miscellaneous Collections 24:372-385.

Grisolia, A. B. et al. 2007. Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. Genetics and Molecular Research 6:382-389. https://doi.org/10.11606/t.10.2004.tde-08072005-103731

Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. Ecology 79:413-425.

Hall, R. 1981. The Mammals of North America. P. en.: The Blackburn Press, New York, USA.

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

Harpending, H. C., S. T. Sherry, A. R. Rogers, & M. Stoneking. 1993. Genetic structure of ancient human populations. Current Anthropology 34:483-496. https://doi.org/10.1086/204195

Helmens, K. 1988. Late Pleistocene glacial sequence in the area of the high plain of Bogota (Eastern Cordillera, Colombia). Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology 67: 263-283. https://doi.org/10.1016/0031-0182(88)90156-3

Herd, D. G. 1982. Glacial and volcanic geology of the Ruiz-Tolima volcanic complex, cordillera Central, Colombia. Publ. Geol. 8:1-48.

Hoelzel, A. R., & A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. Pp. 159-187, en: Molecular Genetic Analysis of Populations (AR Hoelzel, ed.). Oxford University Press.

Hooghiemstra, H. 1984. Vegetational and climatic history of the high plain of Bogotá, Colombia: A continous Record of the last 3.5 Millions Years. En: El Cuaternario de Colombia (T Van der Hammen, ed.), 10. Cramer. 368 p.

International Stratigraphic Chart. 2008. International Commission on Stratigraphy.

Johnson, W. E. et al. 2006. The late miocene radiation of modern felidae: A genetic assesstment. Science 311:73-77. https://doi.org/10.1126/science.1122277

Johnson, W. E., & S. J. O'Brien. 1997. Phylogenetic reconstruction of the felidae using *16S rRNA* and *NADH-5* mitochondrial genes. Journal of Molecular Evolution 44:S 98-116. https://doi.org/10.1007/pl00000060

Johnson, W. E., M. Culver, J. A. Iriarte, E. Eizirik, K. L. Seymour, & S J O'Brien. 1998. Tracking the evolution of the Elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita)* from mitochondrial DNA. Journal of Heredity 89:227-232. https://doi.org/10.1093/jhered/89.3.227

Johnson, W. E., P. A. Dratch, J. S. Martenson, & S. J. O'Brien. 1996. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. Journal of Mammalian Evolution 3:97-120. https://doi.org/10.1007/bf01454358

Jordá, J. F. 1995. El Cuaternario: Definición, límite inferior y divisiones. Zephyrus 58: 53-74.

Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120. https://doi.org/10.1007/bf01731581

Kitchener, A. C. et al. 2017. A revised taxonomy of the Felidae. The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN/ SSC Cat Specialist Group.Cat News Special Issue 11. Bern, Switzerland.

Li, G., B. W. Davis, E. Eizirik, & W. J. Murphy. 2016. Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae). Genome Research 26: 1-11. https://doi.org/10.1101/gr.186668.114

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

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.

Marshall, L. G. 1985. Geochronology and Land-Mammal Biochronology of the Transamerican Faunal Interchange. Pp. 49-85, en: The Great American Biotic Interchange, (FG Stehli & SD Webb, eds.). Plenum Press, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9181-4_3

Marshall, L. G. 1988. Land mammals and the great American interchange. American Scientist 76:380-388.

Marshall, L. G., R. Butler, R. E. Drake, G. H. Curtis, & R. H. Tedford. 1979. Calibration of the Great American Interchange. Science 204:272-279. https://doi.org/10.1126/science.204.4390.272

Marshall, L. G., S. D. Webb, J. J. Sepkoski, & D. M. Raup. 1982. Mammalian Evolution and the Great American Interchange. Science 215:1351-1357. https://doi.org/10.1126/science.215.4538.1351

McDougall, I. 1979. The present status of the geomanetic polarity time scale. En The Earth: its origin, structure and evolution. (MW McElhinny, ed.). (pp. 1-543). London: Academic Press.

Miller, M. P. 2005. Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Informatio. Journal of Heredity 96:722-724. https://doi.org/10.1093/jhered/esi119

Mondolfi, E. 1986. Notes on the biology and status of the small wild cats in Venezuela. Pp. 125-146, en: Cats of the world: biology, conservation, and management (S Miller & D Everett, eds.). National wildlife federation, Washington, District of Columbia.

Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. Evolution 49:718-726. https://doi.org/10.2307/2410325

Nabholz, B, S. Glémin, & N. Galtier. 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals - The longevity hypothesis. Molecular Biology and Evolution 25:120-130. https://doi.org/10.1093/molbev/msm248

Napolitano, C. et al. 2014. Population genetics of the felid *Leopardus guigna* in southern South America: Identifying intraspecific units for conservation. Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of Neotropical Carnivores. (M. Ruiz-García & J. M. Shostell, eds.). New York: Nova Science Publishers Inc.

Nascimento, F. 2010. Revisão taxonômica gênero do *Leopardus* Gray, 1842 (Carnivora, Felidae). University of Sao Paulo, Brazil. https://doi.org/10.11606/t.41.2010.tde-09122010-104050

Nascimento, F., & A. Feijó. 2017. Taxonomic revision of the tigrina *Leopardus tigrinus* (Scrheber, 1775) species group (Carnivora, Felidae). Papéis Avulsos de zoologia 57:231-264. https://doi.org/10.11606/0031-1049.2017.57.19

Nelson, E. W., & E. Goldman. 1931. New carnivores and rodents from Mexico. Journal of Mammalogy 12:302-306. https://doi.org/10.2307/1373882

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

Pecon Slattery, J., W. E. Johnson, D. Goldman, & S. J. O'Brien. 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. Journal of Molecular Evolution 39:296-305. https://doi.org/10.1007/bf00160153

Planet, P. J., & I. N. Sarkar. 2005. A tool for constructing and analyzing matrices of pairwise phylogenetic character incongruence tests. Bioinformatics 21: 4423-4424. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti744

Pocock, R. 1941. Some new geographical races of *Leopardus*, commonly known as ocelots and margays. Annals and Magazine of Natural History (11th series) 8:234-239. https://doi.org/10.1080/00222934108527204

Posada, D., & K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology and Evolution 16: 37-45.https://doi.org/10.1016/s0169-5347(00)02026-7

Rambaut, A. 2012. FigTree v1.4. .

Rambaut, A., & A. J. Drummond. 2013. Tree Annotator v1.8.0. http://beast.bio.ed.ac.uk/.

Rambaut, A., M. A. Sucard, W. Xie, & A. J. Drummond. 2013. Tracer v1.6 .

Ramos-Onsins, S. E., & J. Rozas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. Molecular Biology and Evolution 19:2100. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034

Rogers, A. R., & H. C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution 9:552-569. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727

Rogers, A. R., A. E. Fraley, M. J. Bamshad, W. S. Watkins, & L. B. Jorde. 1996. Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. Molecular Biology and Evolution 13:895-902. https://doi.org/10.1093/molbev/13.7.895

Ruiz-García, M. 1993. Analysis of the Evolution and Genetic Diversity Within and Between Balearic and Iberian Cat Populations. Journal of Heredity 84:173-180. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111312

Ruiz-García, M. 1994. Genetic profiles from coat genes of natural Balearic cat populations: An eastern Mediterranean and North-African origin. Genetics Selection Evolution 26:39-64. https://doi.org/10.1186/1297-9686-26-1-39

Ruiz-García, M. 1997. Genetic relationships among some new cat populations sampled in Europe: a spatial autocorrelation analysis. Journal of Genetics 76: 1-24. https://doi.org/10.1007/bf02931765

Ruiz-García, M. 1999. Genetic structure of different cat populations in Europe and South America at a microgeographic level: importance of the choice of an adequate sampling level in the accuracy population genetics interpretations. Genetics and Molecular Biology, 22:493-505. https://doi.org/10.1590/s1415-47571999000400006

Ruiz-García, M. 2001. Diversidad genética como herramienta de zonificación ambiental: estudios moleculares (microsatélites) en el caso de Primates y Félidos neotropicales comportan una nueva perspectiva. Zonificación Ambiental para el Ordenamiento Territorial en la Amazonía Colombiana (T. Defler & P. A. Palacios, eds.). Instituto Amazónico de Investigaciones, Imani and Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC. https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019005

Ruiz-García, M., & D. Alvarez. 2000. Genetic microstructure in two Spanish cat populations. I: Genic diversity, gene flow and selection. Genes & Genetic Systems 75:269-280. https://doi.org/10.1266/ggs.75.269

Ruiz-García, M. et al. 2010. Molecular Phylogenetics and Phylogeography of the Whitefronted capuchin (*Cebus albifrons*; Cebidae, Primates) by means of mt *COII* gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol 57:1049-1061. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.09.002

Ruiz-García, M. et al. 2012. Molecular Systematics and Phylogeography of *Cebus capucinus* (Cebidae, Primates) in Colombia and Costa Rica by means of mitochondrial *COII* gene. American Journal of Primatology 74: 366-380. https://doi.org/10.1002/ajp.20940

Ruiz-García, M., E. D. Cossíos, M. Lucherini, F. Yáñez, M. Pinedo-Castro, & B. Angers. 2013a. Population genetics and spatial structure in two Andean cats (the Pampas cat, *Leopardus pajeros* and the Andean mountain cat, *L. jacobita*) by means of nuclear and mitochondrial markers and some notes on skull biometrics. Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of Neotropical Carnivores. (M. Ruiz-García & J. M. Shostell, eds.). New York: Nova Science Publishers Inc. https://doi.org/10.3354/esr00402

Ruiz-García, M., D. Rivas-Sánchez, & N. Lichilín. 2013b. Phylogenetics relationships among four putative taxa of foxes of the *Pseudoalopex* genus (Canidae, Carnivora) and molecular population genetics of *Ps. culpaeus* and *Ps. sechurae*. Molecular population genetics, evolutionary Biology and Biological conservation of Neotropical Carnivores (M. Ruiz-García & J. M. Shostell, eds.). New York: Nova Science Publishers Inc.

Ruiz-García, M., C. Vásquez, A. Murillo, M. Pinedo-Castro, & D. Alvarez. 2013c. Population Genetics and Phylogeography of the largest wild cat in the Americas: An analysis of the jaguar by means of microsatellites and mitochondrial gene sequences. Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of Neotropical Carnivores (M Ruiz-García & J M Shostell, eds.). New York: Nova Science Publishers Inc.

Ruiz-García, M., M. I. Castillo, & K. Luengas. 2016a. It is misleading to use*Sapajus* (robust capuchins) as a genus? : A review of the evolution of the capuchins and suggestions on their systematics. Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of the Neotropical Primates (M. Ruiz-García & J. Shostell, eds.). New York: Nova Science Publishers Inc.

Ruiz-García, M., A. Castellanos, L. A. Bernal, M. Pinedo-Castro, F. Kaston, & J. M. Shostell. 2016b. Mitogenomics of the mountain tapir (*Tapirus pinchaque*, Tapiridae, Perissodactyla, Mammalia) in Colombia and Ecuador: Phylogeography and insights into the origin and systematics of the South American tapirs. Mammalian Biology 81: 163-175. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.11.001

Ruiz-García, M., C. Vásquez, S. Sandoval, F. Kaston, K. Luengas-Villamil, & J. M. Shostell. 2016c. Phylogeography and spatial structure of the lowland tapir (*Tapirus terrestris*, Perissodactyla: Tapiridae) in South America. Mitochondrial DNA 27:2334-2342. https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1022766

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, & J. M. Shostell. 2014. How many genera and species of woolly monkeys (Atelidae, Platyrrhine, Primates) are there? The first molecular analysis of *Lagothrix flavicauda*, an endemic Peruvian primate species. Molecular Phylogenetics and Evolution 79:179-198. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.034

Ruiz-García, M., P. Escobar-Armel, B. Thoisy, M. Martínez-Agüero, M. Pinedo-Castro, & Shostell, J. M. 2018a. Biodiversity in the Amazon: origin hypotheses, intrinsic capacity of species colonization, and comparative phylogeography of river otters (*Lontra longicaudis* and *Pteronura brasiliensis*, Mustelidae, Carnivora) and pink river dolphin (*Inia* sp, Iniidae, Cetacea). Journal of Mammalian Evolution 25: 213-240. https://doi.org/10.1007/s10914-016-9375-4

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, & J. M. Shostell. 2018b. Small spotted bodies with multiple specific mitochondrial DNAs: existence of diverse and differentiated tigrina lineages or species (*Leopardus* spp: Felidae, Mammalia) throughout Latin America. Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis 29:993-1014. https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1404041

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, & J. M. Shostell. 2018c. Mitogenomics of the jaguarundi (*Puma yagouaroundi*, Felidae, Carnivora): Disagreement between morphological subspecies and molecular data. Mammalian Biology 93:153-168. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.004

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, & J. M. Shostell. 2019a. *Leopardus narinensis*: Morphological and Genetic (Nuclear and Mitogenomics) support for a new spotted cat from southern Colombian Andes. Scientific Reports 9 (en prensa).

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, A. Aversa, & P. Orozco-Terwengel. 2019c. Mitogenome and DNA nuclear microsatellite analyses of the jaguar (*Panthera onca*; Felidae, Carnivora) with special emphasis in its evolutionary trajectory in north-western and central South America. Journal of Mammalogy (sometido).

Ruiz-García, M., M. Pinedo-Castro, A. J. Criado-Flórez, & J. M. Shostell. 2019b. Mitogenomics of the ocelot and the margay (*Leopardus pardalis* and *Leopardus wiedii*, Felidae, Carnivora) throughout Latin America: ocelot showed more phylogeographic structure than other Neotropical wild cats, and margay showed inexistence of spatial structure and low correspondence with morphological subspecies. Molecular Ecology (in press). https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.004

Ruiz-García, M., N. Lichilín-Ortíz, Y. Mejia, J. Ortega, & J. M. Shostell. 2017. Mitochondrial population genetics inferences about the phylogeography and systematics of the Tayra (*Eira barbara*, Mustelidae, Carnivora). Advances in Genetics Research 17: 63- 106.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://doi.org/10.1002/biuz.19900200607

Schinz, H. R. 1821. Das Thierreich Eingetheilt nach dem Bau der Thiere als Grundlage ihrer Naturgeschichte und der Vergleichenden Anatomie von dem Herrn Ritter von Cuvier. J. G. Cottaschen Buchhandlung, Stuttgart und Tübingen. Germany. https://doi.org/10.5962/bhl.title.120173

Slattery, J. P., & S. J. O'Brien. 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the felidae radiation. Genetics 148:1245-1255.

Stamatakis, A. 2006. Raxml-Vi-Hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22: 2688-1243. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585-595.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-9. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

Tavaré, S. 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17: 57-86.

Tchaicka, L., E. Eizirik, T. G. De Oliveira, J. F. Candido Jr, & T. R. Freitas. 2007. Phylgeography and population history of the crab-eating fox. Molecular Ecology 16: 819- 838. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2006.03185.x

Tello, L. 1986. The situation of the wild cats (Felidae) in Bolivia, including notes on other wildlife species and on general aspects of the conservation and utilization of natural resources. P. en.: IUCN publication.

Thomas, O. 1903. Notes on neotropical mammals of the genera *Felis*, *Hapale*, *Oryzomys*, *Akodon*, and *Ctenomys*, with descriptions of new species. Annals and Magazine of Natural History (7th series) 12:234-243. https://doi.org/10.1080/00222930308678847

Thomas, O. 1904. New *Callithrix*, *Midas*, *Felis*, *Rhipidomys* and *Proechimys* from Brazil and Ecuador. The Annals and Magazine of Natural History (7th series) 14:188-196. https://doi.org/10.1080/03745480409442992

Trigo, T. C. et al. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between L. geoffroyi and L. tigrinus in southern Brazil. Molecular Ecology 17:4317-4333. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.03919.x

Trigo, T. C. et al. 2013. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. Current Biology 23:2528-2533. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.046

Trigo, T. C., F. P. Tirelli, T. R. O. De Freitas, & E. Eizirik. 2014. Comparative assessment of genetic and morphological variation at an extensive hybrid zone between two wild cats in southern Brazil. PLoS ONE 9:e108469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108469

van der Hammen, T., & E. González. 1963. Historia de clima y vegetación del Pleistoceno superior y del Holoceno de la Sabana de Bogotá. Boletín Geológico 11:189-266.

van der Hammen, T., J. Barelds, H. De Jong, & A. A. De Veer. 1981. Glacial sequence and environmental history in the Sierra Nevada del Cocuy (Colombia). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 32:247-258. https://doi.org/10.1016/0031-0182(80)90043-7

van der Hammen, T., L. E. Urrego, N. Espejo, J. F. Duivenvoorden, & J. M. Lips. 1992. Late-glacial and Holocene sedimentation and fluctuations of river water level in the Caquetá River area (Colombian Amazonia). Journal of Quaternary Science 7:57-67. https://doi.org/10.1002/jqs.3390070106

Vaughan, C. 1983. A report on dense forest habitat for endangered wildlife species in Costa Rica. Environmental Sciences School National University, Heredia, Costa Rica.

Vianna, J. A. et al. 2010. Phylogeography of the marine otter (*Lontra felina*): Historical and contemporary factors determining its distribution. Journal of Heredity 101: 676-689. https://doi.org/10.1093/jhered/esq088

Walsh, P. S., D. A. Metzger, & R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10:506- 513. https://doi.org/10.2144/000114018

Webb, S. D. 1985. Late Cenozoic mammal dispersals between the Americas. Pp. 357-386, en: The great American biotic interchange (F Stehli & SD Webb, eds.). Plenum Press, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9181-4_14

Webb, S. D. 1997. The Great Faunal Interchange. Pp. 97-122, en: Central America: A Natural and Cultural History (AG Coates, ed.). Yale University Press, New Haven. https://doi.org/10.2307/j.ctt1xp3sdf.10

Wilting, A. et al. 2015. Planning tiger recovery: Understanding intraspecific variation for effective conservation. Science Advances 1:e1400175.

Wurster-Hill, D. H., & W. R. Centerwall. 1982. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. Cytogenetic and Genome Research 34:178-192. https://doi.org/10.1159/000131806