

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Phylogéographie et conservation de deux espèces de petits  
félidés des Andes : le chat des pampas et le chat des Andes**

Par

E. Daniel Cossíos Meza

Département des Sciences Biologiques  
Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
En Sciences Biologiques

Avril 2009

© E. Daniel Cossíos



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Phylogéographie et conservation de deux espèces de petits  
félidés des Andes : le chat des pampas et le chat des Andes

présentée par

E. Daniel Cossíos Meza

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Pflieger, président-rapporteur

Bernard Angers, directeur de recherche

Marco Festa-Bianchet, membre du jury

Julie Turgeon, examinatrice externe

Thora Martina Herrmann, représentant du doyen de la FES

## Sommaire

---

Le chat des Andes (*Leopardus jacobita*) et le chat des pampas (*Leopardus colocolo*) sont deux espèces de petits félidés sauvages habitant l'espace géographique des hautes Andes du Pérou, de la Bolivie, du Chili et de l'Argentine. Le chat des Andes est considéré comme l'une des plus rares espèces de félidés du monde et la plus menacée des Amériques. Le chat des pampas présente une grande variabilité phénotypique tout au long de son ample répartition. Malgré les recherches effectuées sur le chat des Andes à partir des années 1990 et l'apparente abondance du chat des pampas, les structures des populations et la variabilité génétique de ces deux espèces ont été très peu étudiées, ce qui a freiné le développement de programmes effectifs pour leur conservation. Face à cette problématique, l'objectif principal de cette thèse a été la détermination d'unités de conservation pour ces espèces, grâce à l'utilisation de différentes méthodes d'analyse génétique. Rencontrant de grandes difficultés pour obtenir des tissus des espèces étudiées, une méthode d'identification des déjections fécales, basée sur la PCR, a été développée. Cette méthode, présentée au chapitre I de la thèse, permet de différencier des échantillons provenant des félidés des Andes, incluant le chat des Andes, le chat des pampas, le puma (*Puma concolor*) et le chat de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), et en les différenciant aussi d'autres carnivores comme le renard des Andes (*Pseudalopex culpaeus*), le chat domestique (*Felis catus*), et le chien domestique (*Canis familiaris*).

L'utilisation de la méthode développée au chapitre I, ainsi comme l'observation directe d'animaux sur le terrain et l'identification de peaux maintenues chez des bergers, ont permis d'évaluer la répartition des deux espèces étudiées au Pérou. Les résultats de cette évaluation, présentée au chapitre II, incluent 30 nouveaux enregistrements pour le chat des Andes et 268 pour le chat des pampas, pris entre les années 2001 et 2006. Ces nouveaux enregistrements étendent la répartition connue du chat des Andes de 892 km vers le nord-ouest et montrent que le chat des pampas occupe une grande diversité d'habitats tout au long de la côte et des Andes péruviennes.

La structure génétique du chat des pampas a été déterminée et liée aux fluctuations climatiques anciennes de la région andine (chapitre III). En utilisant des marqueurs d'ADN nucléaire et mitochondrial et 329 échantillons (290 déjections fécales et 39 peaux) récoltés au Pérou, en Bolivie et en Argentine, nous en avons déduit l'existence d'au moins quatre groupes de populations dans les Andes centrales, qui doivent être considérées comme des unités de gestion différentes, et trois autres localités proposées ici comme des unités de gestion provisoires. La répartition de ces groupes est liée à la latitude, avec une zone centrale caractérisée par un mélange de plusieurs clades mitochondriaux. La similarité entre les temps de coalescence des haplotypes mitochondriaux indique que les principaux clades se sont séparés il y a environ un million d'années, probablement au cours de la période glaciaire pré-Pastonienne (0,80 – 1,30 MYA), événement suivi par une expansion démographique dans chaque clade au cours de la période interglaciaire Aftonienne (0,45 - 0,62 MYA).

Pour le cas du chat des Andes, un total de 95 échantillons (65 déjections fécales et 30 peaux) ont été analysés pour déterminer son structure génétique de populations (chapitre IV). Les résultats confirment que cette espèce possède une diversité nucléaire et mitochondriale extrêmement faible, vraisemblablement causée par un goulot d'étranglement historique et une faible population effective. La structure géographique de la diversité génétique est très forte, mais contraste avec celles d'autres espèces des Andes. Ces différences peuvent être expliquées par des populations isolées dans des "îles d'altitude" et par l'utilisation de corridors d'altitude inatteignables pour les autres espèces. La structure des populations de ce félinidé permet de reconnaître deux unités évolutives significatives (ESUs), séparées entre 26°S et 35°S. Additionnellement, dans l'ESU du Nord, deux groupes génétiquement distincts devraient être considérés comme des unités de gestion différentes.

**Mots clés :** microsatellites, ADNmt, unités évolutives significatives, unités d'aménagement, échantillonnage non-invasif, phylogéographie, Amérique du Sud, Pérou, Bolivie, Argentine

## Summary

---

The Andean cat (*Leopardus jacobita*) and the pampas cat (*Leopardus colocolo*) are two small wild cats inhabiting the high-Andes geographic province in Peru, Bolivia, Chile and Argentina. The Andean cat is considered as one of the rarest felid species of the world, and as the most threatened of the Americas. The pampas cat has a great phenotypic variability throughout its wide distribution. Despite recent research on the Andean cat and the apparent abundance of pampas cat, the population structures and the genetic variability of these species have been little studied, which hinders the development of effective programs for their conservation. Faced with this problem, the main objective of this thesis was the determination of conservation units for these species, by using diverse genetic analyses methods. Due to big difficulties to obtain tissues samples from the studied species, a PCR based method to identify faecal samples was developed. This non-invasive approach (chapter I) permitted us to distinguish between scats of Andean felids, including Andean cat, pampas cat, puma (*Puma concolor*) and Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*), as well as other sympatric carnivores such as culpeo fox (*Pseudalopex culpaeus*), domestic cat (*Felis catus*), and domestic dog (*Canis familiaris*).

Using a combination of faecal DNA analysis, direct observation of animals in the wild and identification of skins owned by local villagers, we evaluated the distribution of the studied species in Peru (chapter II). Results included 30 Andean cat and 268 pampas cat new records, obtained between 2001 and 2006. These new records extend the known Andean cat distribution an extra 892 km northwest and show that pampas cats occupy a great diversity of habitats throughout the Peruvian coast and Andes.

The genetic structure of the pampas cat was determined and linked to ancient climate fluctuations on the Andean region (chapter III). Using both mitochondrial sequences and nuclear microsatellites, and 329 samples (290 faecal and 39 skin samples) collected in Peru, Bolivia and Argentina, we inferred the existence of at least four groups

of populations in the central Andes, that must be considered different management units, and three other localities proposed here as provisional management units. The distribution of these groups is correlated to latitude, with a central area characterized by admixture of numerous mitochondrial clades. The similar coalescence times of the mitochondrial haplotypes indicated that the major clades split approximately one million years ago, likely during the Pre-Pastonian glacial period (0.80 – 1.30 MYA), followed by a demographic expansion in every clade during the Aftonian interglacial period (0.45 – 0.62 MYA).

For the Andean cat, a total of 95 samples (65 faecal and 30 skin samples) were analysed to determine its population genetic structure (chapter IV). Results confirmed that Andean cat populations harbour extremely low mitochondrial and nuclear genetic diversity. Comparison with pampas cat indicates historical bottleneck and low effective population size as responsible of the low diversity of Andean cat. The geographic structure of the genetic diversity is very strong, but contrast with that of other Andean species. Discrepancies may be explained by populations isolated in high-altitude islands, as well as the use of high-altitude corridors unavailable to other species. The particular population structure leads the recognition of two evolutionarily significant units (ESUs), with a latitudinal separation between 26°S and 35°S. In addition, two genetically distinct groups within the northern ESU could be considered separated management units (MUs).

**Keywords :** microsatellites, mtDNA, Evolutionary Significant Units, Management units, non-invasive samplig, phylogeography, South America, Peru, Bolivia, Argentina

## Table des matières

---

Sommaire .....	ii
Summary .....	iv
Table des matières .....	vi
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des sigles, abréviations et symboles .....	xii
Avant propos .....	xvii
Remerciements .....	xviii
Introduction .....	1
Les espèces étudiées : Chat des Andes et chat des pampas .....	1
Phylogénie et systématique des petits félidés des hautes Andes .....	1
Description, biologie et répartition .....	5
Chat des Andes .....	5
Chat des pampas .....	6
Taxonomie sous-espécifique du chat des pampas .....	6
État de conservation et menaces .....	11
Le cadre de la recherche .....	13
Biologie de la conservation, génétique de la conservation et phylogéographie ...	13
Unités de conservation .....	15
Échantillonnage d'espèces difficiles à observer .....	17
Les outils : Marqueurs moléculaires .....	18
ADNmt .....	18
Microsatellites .....	19
Objectifs de la thèse .....	22
Objectif principal .....	22
Objectifs secondaires et structure de la thèse .....	22
Chapitre I : Identification of Andean felid feces using PCR-RFLP .....	24
Résumé .....	25
Abstract .....	26



Chapitre II : Update on the distribution of the Andean cat <i>Leopardus jacobita</i> and the pampas cat <i>Leopardus colocolo</i> in Peru .....	34
Résumé.....	35
Abstract .....	36
Introduction.....	37
Materials and methods .....	38
Results.....	39
Discussion and conclusions .....	45
 Chapitre III : Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat ( <i>Leopardus colocolo</i> ) .....	49
Résumé.....	50
Abstract .....	51
Methods.....	53
Study localities and sampling .....	53
DNA extraction.....	56
Species identification .....	56
MtDNA.....	56
Microsatellites.....	59
Data analysis .....	59
Results.....	61
Species identification and mtDNA variability .....	61
Individual identification and population diversity .....	65
mtDNA ( <i>HVS-I</i> ).....	66
Microsatellites.....	66
Population structure .....	67
Evolutionary and demographic history .....	71
Discussion .....	71
Genetic diversity .....	71
Genetic structure and geographic distribution .....	73
Influence of Pleistocene .....	74
Implications for conservation .....	76
Conclusion .....	77

Chapitre IV : Between high-altitude islands and high-altitude corridors. The population genetic structure of the Andean cat ( <i>Leopardus jacobita</i> ).....	78
Résumé.....	79
Abstract.....	80
Introduction.....	81
Materials and methods .....	82
Sample collection.....	82
Laboratory procedures .....	83
Microsatellite Data analysis.....	84
Mitochondrial Data analysis .....	85
Results.....	86
Species and individual identification .....	86
Population structure and genetic diversity.....	87
Demographic and evolutionary history.....	95
Discussion and conclusions .....	97
Genetic diversity .....	97
Population structure .....	98
Conservation implications .....	100
Identification génétique de restes fécaux .....	103
Répartition des petits félidés des Andes .....	104
La région de contrôle comme marqueur génétique.....	104
Structure des populations et phylogéographie des espèces étudiées .....	105
Conservation .....	108
Pour le futur .....	111
Sur le chat des pampas.....	111
Sur le chat des Andes.....	114
Sur la biogéographie des Andes.....	115
Références.....	116
Annexes.....	132
Annexe 1 : Enregistrements pour le chat des pampas au Pérou, utilisés au Chapitre II .....	132
Annexe 2 : Fréquences alléliques des microsatellites.....	136

## Liste des tableaux

---

### Chapitre I

Table 1. Expected fragments size in bp of the 16S gene-amplified segment following digestion with diagnostic restriction enzymes.....	33
---	----

### Chapitre II

Table 1. Andean cat records in Peru between 2002 and 2006.....	41
Table 2. Results of interviews relating to the presence of Andean cats by region.....	42

### Chapitre III

Table 1. Sampled localities, geographical coordinates and sample sizes .....	55
Table 2. Haplotype and microsatellite diversity in pampas cat .....	66
Table 3. AMOVA results for groupings of populations .....	68

### Chapitre IV

Table 1. Localities and size of the Andean cat samples analysed in this study as well as the number of individuals <i>a posteriori</i> inferred according to the number of different multiloci genotypes.....	82
Table 2. Reduced CLUSTAL W alignment of part of the Andean cat HVS-I, 16S, ATP-8 and NADH-5 mitochondrial sequences, showing only variable sites.....	91
Table 3. Microsatellite diversity in Andean cat .....	92
Table 4. Mitochondrial DNA diversity in Andean cat, for the combined HVS-I, NADH-5, ATP8 and 16S sequences.....	93

### Discussion

Tableau 1. Aires protégées où les différentes unités d'aménagement (MUs) du chat des Andes ont été enregistrées, surface et population estimée.....	110
---	-----

## Liste des figures

---

### Introduction

Figure 1. Les espèces étudiées .....	4
Figure 2. Différents patrons du manteau chez le chat des pampas.....	9
Figure 3. Répartition approximative des 11 sous-espèces reconnues pour le chat des pampas, en Amérique du sud.....	10
Figure 4. Structure de la région de contrôle de l'ADNmt.....	20

### Chapitre I

Figure 1. Aligned sequences of the 16S rRNA gene segment from Andean carnivores.....	29
Figure 2. Fragment profiles following digestion of the 16S rRNA gene segment.....	30

### Chapitre II

Figure 1. Andean cat distribution in Peru.....	40
Figure 2. Pampas cat distribution in Peru.....	44
Figure 3. Relative abundance of Andean cats in Peru, estimated from interviews with local inhabitants .....	47

### Chapitre III

Figure 1. Pampas cat sampled localities .....	54
Figure 2. Pampas cat hypervariable sequence I (HVS-I).....	58
Figure 3. Neighbour-joining tree of the observed HVS-I sequences .....	63
Figure 4. Neighbour-joining tree of the combined observed NADH-5 – ATP-8 sequences .....	64
Figure 5. Population structure inferred from microsatellite data .....	69
Figure 6. HVS-I haplotypes distribution and frequencies .....	70
Figure 7. Divergence times between pampas cat clades and their correspondence with glacial and interglacial periods .....	72
Figure 8. Distribution of the seven Management Units (MUs) proposed for the pampas cat in the Andean and Argentinean pampas regions, as defined by mtDNA and microsatellite analysis .....	75

## Chapitre IV

Figure 1. Population structure inferred from microsatellite data.....	89
Figure 2. Maximum parsimony network and corresponding nested design used in nested clade analysis for Andean cat HVS-I, NADH-5, ATP-8 and 16S combined sequences. ....	90
Figure 3. Geographical structure of the Andean cat populations.....	94
Figure 4. Results of the nested clade analysis of geographic distances.....	96

## Discussion

Figure 1. Temps estimés pour les divergences entre les différents clades et pour les expansions démographiques inférées pour le chat des pampas, le guanaco et la vigogne. ....	107
---	-----

## **Liste des sigles, abréviations et symboles**

---

- $\pi$  : diversité de nucléotides
- AIC : Akaike information criterion (critère d'information d'Akaike)
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AMOVA : analysis of molecular variance (analyse de variance moléculaire)
- $A_r$  : allelic richness (richesse allélique)
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ARNr : acide ribonucléique ribosomique
- ARNt : acide ribonucléique de transfert
- bp : base pairs (paires de bases)
- BSA : bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)
- C : cytosine
- CITES : Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora  
(Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction)
- DAS : shared allele distance
- $D_c$  : diamètre de la distribution géographique d'un clade (voir NCA)
- $D_{ce}$  : distance de Chord
- $D_n$  : distance géographique entre un clade et le centre du clade supérieur (voir NCA)
- DNA : deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique)
- dNTP : désoxyribonucléotide tri-phosphate
- EN : endangered (en danger; catégorie de statut de conservation de l'UICN)
- ESU : evolutionarily significant unit (unité évolutive significative)
- F : statistique de Fu et Li
- $F_{st}$  : indice de différenciation inter-population
- H : nombre d'haplotypes
- hd : diversité d'haplotypes
- $H_e$  : diversité génétique ou hétérozygotie attendue
- HPLC : high performance liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)
- HVS-I : hyper variable sequence I (séquence hypervariable I)

HW : équilibre de Hardy-Weinberg

i.e. : id est (c'est à dire)

I-Tc : distance entre un clade intérieur et un clade externe (voir NCA)

I-Tn : distance entre un clade intérieur et un clade externe supérieur (voir NCA)

IUCN : International Union for the Conservation of Nature (UICN)

$k$  : nombre d'allèles

$K$  : nombre de populations

MA : millions d'années

MCMC : Monte Carlo Markov Chains (simulations Monte-Carlo de chaînes de Markov)

ML : maximum likelihood (maximum de vraisemblance)

mtDNA : mitochondrial DNA (ADN mitochondrial)

MU : management unit (unité d'aménagement)

MY / MYA : million years ago (millions d'années avant)

NCA : nested clade analysis (analyse de clade nichée)

ncDNA : nuclear DNA (ADN nucléaire)

NJ : neighbour joining (méthode du plus proche voisin)

NT : near threatened (quasi menacé; catégorie de statut de conservation de l'UICN)

Numt : nuclear mitochondrial DNA (ADN mitochondrial transféré au génome nucléaire)

P : pourcentage de sites polymorphes

pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaîne de la polymérase)

pH : potentiel hydrogène

pM : picomolaire

Pr : probabilité

$r$  : coefficient de corrélation de Pearson

RFLP : restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RS1 - RS5 : repeated sequence 1-5 (séquence répétée 1-5)

$S$  : nombre de sites polymorphes

SSCP : single-strand conformation polymorphism (polymorphisme de conformation par simple brin)

T : thymine

Taq : *Thermus aquaticus*

TAS : termination associated sequence (séquence associée à la terminaison)

U : unités

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature



À Sayri, Chaska et Rumi ;

le prince, l'étoile et la force.

Chaysawam pumawan tinkurqan.  
Chaymi payca "qayllaktaraqmi rin; qaylla ñam sichpaykunki"  
ñiptinmi paytaqa "qamqa ancha kuyaşqam kanki;  
llamactapaş huchayuqpa llamantaraqmi mikupunki;  
qamta wañuchişpapaş hatun *fiestapiraqmi* umansawa çuraşpa takichişunki;  
chaymanta watanpi qamta lluqşichişpari huk  
llamanta nakaşparaqmi takichişunki" ñispa ñirqan.

Manuscrit anonyme du début du 17<sup>e</sup> siècle, considéré comme la bible du peuple quechua  
Extrait du texte normalisé au quechua contemporain  
par G. Taylor (2001)

## Avant propos

---

En 1996, dans le cadre d'une stratégie globale pour la conservation des félidés, le groupe de spécialistes en félidés de la UICN a considéré le chat des Andes comme une des espèces les plus rares et les moins connues au monde, signalant l'urgence d'obtenir de l'information permettant la création de stratégies pour sa conservation. C'est certainement cette publication qui a le plus influencé la réalisation de nombreux projets de recherche sur la répartition, l'écologie et le statut de l'espèce mentionnée, projets qui ont commencé à se dérouler à la fin des années 1990 en Bolivie, au Chili et en Argentine. J'ai eu la chance de prendre contact avec la plupart des biologistes qui menaient ces projets, de fonder avec eux un groupe voué à la conservation du chat des Andes et de diriger le premier projet de ce genre au Pérou à partir du 2002.

Comme pour tous les biologistes travaillant avec le chat des Andes, mon intérêt pour les autres animaux habitant la même région a augmenté, spécialement pour le chat des pampas, un autre félidé très peu connu. Néanmoins, le travail sur le terrain présentait d'énormes limitations pour résoudre des questions cruciales pour la conservation des espèces nous intéressant, comme la description de leur structure de populations et de leurs histoires démographiques. De plus, les difficultés pour capturer nos chats, insaisissables, ne faisaient qu'empirer le problème – spécialement dans le cas du chat des Andes, dont on a réussi à capturer qu'un seul individu en six ans. Ces besoins et ces défis ont été une des principales raisons pour lesquelles je me suis décidé à m'engager dans un doctorat en génétique des populations. Une autre raison fut mon désir de mieux connaître la théorie et la pratique d'une discipline qui révolutionne la biologie de la conservation. Enfin, une troisième raison fut l'espoir de contribuer à une meilleure compréhension de la biogéographie de l'Amérique du Sud.

C'est ainsi qu'a commencé cette histoire.

## Remerciements

---

Beaucoup de personnages ont participé à cette histoire. Certains d'entre eux ont joué un rôle indispensable pour son déroulement, d'autres ont rendu mon parcours de doctorant plus agréable, ce que j'ai beaucoup apprécié.

Je veux d'abord remercier mon directeur de recherche, Bernard Angers, qui a si bien su me montrer le chemin à suivre. J'ai beaucoup estimé ses conseils et ses leçons, qui m'ont fait découvrir l'énorme potentiel de la génétique des populations comme outil pour la conservation. Mes vifs remerciements vont aussi vers les institutions qui ont supporté mes études : Cat Action Treasury, Wildlife Conservation Network et Panthera-Wildlife Conservation Society-Kaplan Graduate Awards Program. Elles m'ont fourni des bourses pour les recherches que j'ai effectuées en laboratoire et sur le terrain, tandis que le CRSNG m'a fourni une bourse d'études.

Merci aux membres de l'Alianza Gato Andino (AGA). Leur support moral et leurs commentaires ont été inestimables.

Je suis très reconnaissant envers tous ceux qui m'ont envoyé les échantillons indispensables pour cette recherche. L'échantillonnage de populations de carnivores peut être assez difficile et l'est encore plus dans le cas des espèces rares comme le chat des Andes. Le nombre d'individus obtenus de cette espèce (56) pendant les cinq années de mes études le démontre. Je remercie donc énormément Susan Walker, Fernando Alfaro, Giovanna Gallardo, Rocío Palacios, Claudia Manfredi, Mauro Lucherini, Claudio Sillero, Manuel Ruiz-García, Pablo Perovic, Lilian Villalba, Never Bonino, Victor Pacheco, Ursula Fajardo, Analí Madrid, Dina Farfán et José Luis Condori.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé sur le terrain : Marco Arenas, Melecio Arias, Daniel Ascencios, Pilar Ayala, Auri Cangalaya, Susy Castillo, Iris Deustua, Víctor

Gamarra, Elizabeth Gonzales, Antenor Huamán, Deyvis Huamán, Alexander Jiménez, Roberto Ledesma, Juan Nugent, Sergio Ramirez-Carrascal, William Ramos, Carlos Sánchez, Walter Santacruz et Gonzalo Quiroz, et à ceux qui m'ont donné un coup de main au laboratoire, pour les manipulations ou par des conseils : Mathieu Alday, Mathieu Chouteau, Michelle Pelletier, Philippe Girard, Rachel Massicotte, Frédéric Cyr, Claude-Olivier Silva-Beaudry, Émilie Castonguay, Joelle Boizard, Marie-Claire Binet et Marie-Claude Gagnon. Votre aide a été immense. Mes remerciements vont aussi pour Julie Turgeon, Marco Festa-Bianchet et Jean-François Plieger; ses commentaires ont beaucoup amélioré le contenu de cette thèse.

Je veux remercier spécialement Luca Fumagalli de l'Université de Lausanne, Víctor Pacheco du Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos et Susan Walker, de WCS, qui m'ont donné de précieux conseils, et Isabelle et Pascal Veillon, pour ses observations pendant la rédaction.

Finalement, mes plus grands remerciements vont à Mical, qui m'a beaucoup aidé à améliorer mon français, et sans laquelle mon séjour dans un tout nouvel environnement n'aurait sûrement pas été si plein de joie.

# Introduction

---

## **Les espèces étudiées : Chat des Andes et chat des pampas**

Le chat des Andes (*Leopardus jacobita*; Figure 1A) et le chat des pampas (*Leopardus colocolo*; Figure 1B) sont les deux seules espèces de petits félidés sauvages qui habitent la province géographique des hautes Andes du Pérou, de la Bolivie, du Chili et de l'Argentine. Les importantes lacunes de connaissances au point de vue écologique et phylogéographique concernant ces deux espèces créent des problèmes pour la prise de décisions en matière de conservation.

## **Phylogénie et systématique des petits félidés des hautes Andes**

La famille Felidae serait apparue il y a 10-15 millions d'années (Collier, O'Brien, 1985; Hunt, 1996) et comprend actuellement huit lignées reconnues: celles du genre *Panthera*, du chat bai, du caracal, de l'ocelot, du lynx, du puma, du chat léopard et du chat domestique (Johnson *et al.*, 2006). La lignée de l'ocelot aurait divergé il y a 2,91 - 5,3 millions d'années et comprend l'ocelot (*Leopardus pardalis*), le margay (*Leopardus wiedii*), le chat-tigre (*Leopardus tigrina*), le chat de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), le kodkod (*Leopardus guigna*), le chat des pampas et le chat des Andes (Johnson *et al.*, 1998), espèces présentes uniquement en Amérique. Dans cette lignée, l'ocelot et le margay forment un groupe monophylétique séparé d'un autre groupe qui contient le kodkod, le chat de Geoffroy et le chat-tigre. Par contre, les positions respectives du chat des pampas et du chat des Andes dans la lignée de l'ocelot n'ont pas encore été résolues : La position du chat des pampas varie selon les méthodes et les gènes qu'on a utilisés dans plusieurs recherches, pouvant se trouver à la base de la lignée de l'ocelot, à la base d'un groupe formé par le kodkod, le chat de Geoffroy, le chat-tigre et le chat des pampas, ou formant un groupe monophylétique avec le chat-tigre (Masuda *et al.*, 1996 ; Johnson, O'Brien, 1997; Johnson *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2006). Le chat

des Andes, sur la base de l'étude de quelques gènes mitochondriaux, a généralement été placé dans le même groupe monophylétique que l'ocelot et le margay (Johnson *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999). Mais une recherche récente sur 22 789 pb de gènes nucléaires et mitochondriaux, n'a pas obtenu un support suffisant pour confirmer cette position (Johnson *et al.*, 2006). Les difficultés pour déterminer la phylogénie de ces espèces peuvent provenir de la radiation relativement récente des félidés modernes (Masuda *et al.*, 1996) ou de la rétention de polymorphismes ancestraux (Wu, 1991).

Pendant les derniers cent ans, la classification des félidés a connu plusieurs révisions et les différences d'opinions entre les derniers travaux sur cette matière suggèrent qu'un effort considérable est encore nécessaire pour arriver à un consensus (Werdelin, 1985). En particulier le chat des Andes et le chat des pampas ont passé d'un genre à un autre. Ainsi, le premier a été classifié dans les genres *Felis*, *Oreailurus* et *Leopardus* tandis que le chat des pampas a figuré dans les genres *Felis*, *Dendrailurus*, *Oncifelis*, *Lynchailurus*, *Pajeros* et *Leopardus*, entre autres (Pocock, 1917; Collier, O'Brien, 1985; Hemmer, 1978; Herrington, 1986; Scrocchi, Halloy, 1986; Salles, 1992; Wozencraft, 2005, entre autres). García-Perea (1994) a aussi proposé la division du chat des pampas en trois espèces appartenant au genre *Lynchailurus*.

De tous les changements proposés sur la position taxonomique du chat des Andes et du chat des pampas, ceux qui ont été acceptés de façon plus ou moins générale par la communauté scientifique ces dernières années sont :

- a) la création du genre monospécifique *Oreailurus* pour le chat des Andes, basé principalement sur une plus grande chambre antérieure de la bulla tympanique en relation à la chambre postérieure chez cette espèce (Cabrera, 1940) ;
- b) l'inclusion du chat des pampas dans le genre *Oncifelis*, avec le chat-tigre, le chat de Geoffroy et le kodkod (Wozencraft, 1993). Même si Wozencraft (1993) n'a pas spécifié quel auteur il a suivi pour considérer ce groupe d'espèces comme monophylétique, on peut reconnaître comme antécédent les observations de Wurster-

Hill et Gray (1973) sur le caryotype des membres de la lignée : tous les chromosomes sont métacentriques chez le chat des pampas, le chat de Geoffroy et le chat-tigre, tandis que l'ocelot et le margay présentent un chromosome acrocentrique ;

- c) la proposition de García-Perea (1994) de placer le chat des pampas dans le genre *Lynchailurus*, basée sur la possession de trois autapomorphies (la présence d'une « crinière » de poils longs sur le dos, une hypertrophie de l'os ectotympanique et la présence de « rides » sur les carnassiers supérieurs) et
- d) l'inclusion de tous les membres de la lignée de l'ocelot dans le genre *Leopardus* par Wozencraft (2005). Ce changement taxonomique avait été originalement proposé par Herrington (1983, 1986) basé sur le fait que toutes ces espèces ont 36 chromosomes au lieu de 38 comme le reste de félidés (mais notez que le chat des Andes n'a jamais été caryotypé). Wozencraft a accepté ce changement de façon provisionnelle, considérant que les relations phylogénétiques entre les membres de la lignée de l'ocelot n'étaient pas résolues.

Au moment de publier les articles correspondant aux chapitres I et II de cette thèse, c'était encore commun d'accepter les genres *Oreailurus* et *Lynchailurus*, et les journaux où ils ont été publiés l'ont préféré ainsi. Pour les articles correspondant aux chapitres III et IV, par contre, les journaux ont exigé le genre *Leopardus*. Dans cette thèse, pour uniformiser la nomenclature, j'utiliserai seulement le genre *Leopardus* pour les deux espèces étudiées, selon la classification suivante :

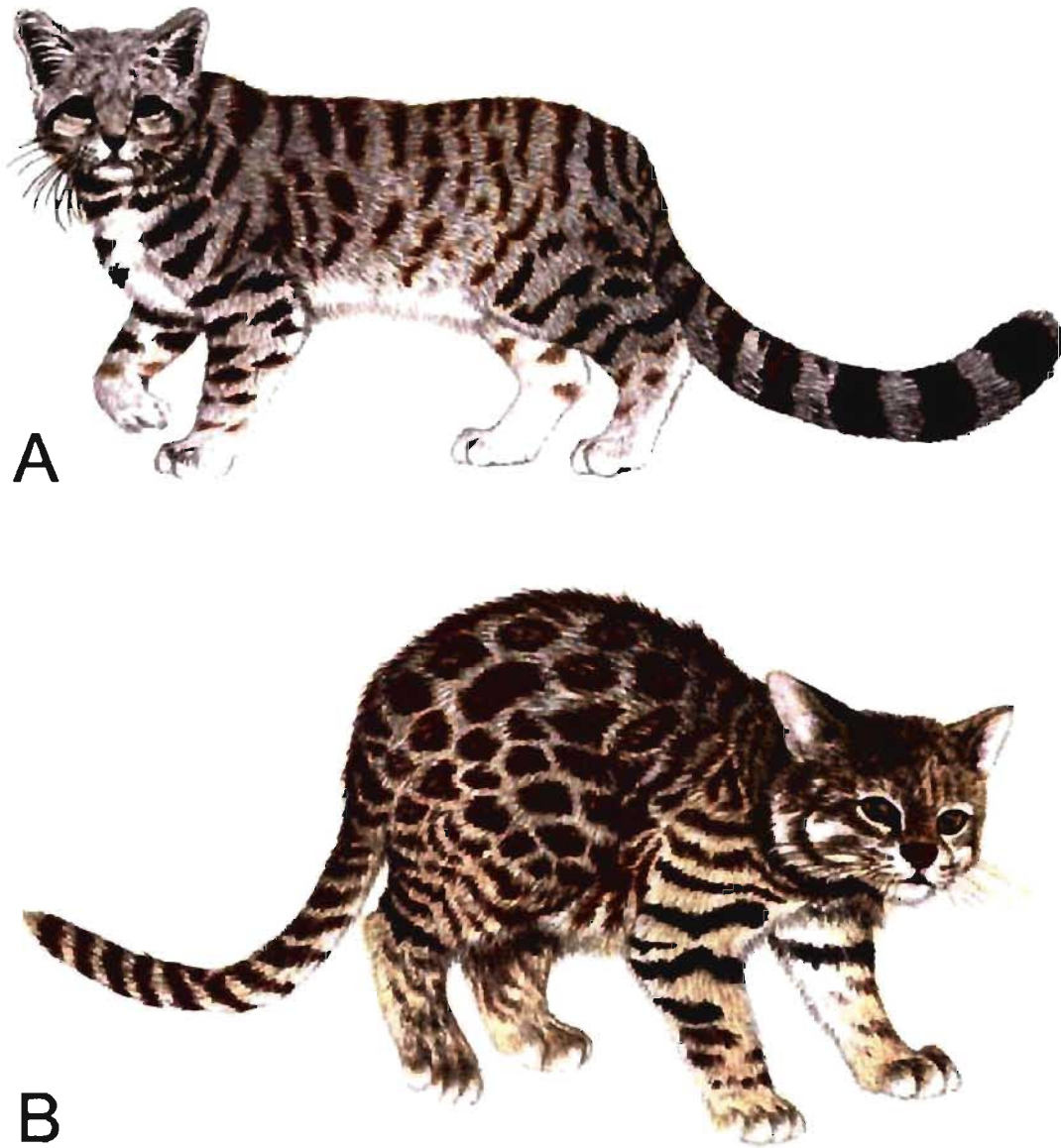
Famille : Felidae

Sous-Famille : Felinae

Genre *Leopardus*, Gray 1842

<i>L. jacobita</i> (Cornalia, 1865)	Chat des Andes
<i>L. colocolo</i> (Molina, 1782)	Chat des pampas





**Figure 1.** Les espèces étudiées. **A :** Chat des Andes, *Leopardus jacobita*. **B :** Chat des pampas, *Leopardus colocolo* (sous-espèce *L. c. garleppi*). Illustrations : ED Cossíos.

## **Description, biologie et répartition**

### Chat des Andes

La longueur du corps du chat des Andes va de 74 à 85 cm et celle de la queue de 41 à 50 cm. Pour la masse, on compte seulement deux enregistrements : le premier provenant d'un exemplaire jeune du Pérou qui avait un poids de 4,0 kg (Pearson, 1957) et le deuxième d'une femelle adulte capturée en Bolivie, qui pesait 4,5 kg (Delgado *et al.*, 2004). La queue du chat des Andes, grosse et longue (2/3 de la longueur du corps) et ornée de bandes larges et obscures (entre six et huit), est caractéristique et est souvent utilisée pour le différencier du chat des pampas, espèce sympatrique avec laquelle il est souvent confondu (Chapron, 1999). D'autres caractéristiques de diagnose pour le chat des Andes, bien que moins évidentes que sa queue sont : fourrure épaisse (plus que chez le chat de pampas), lignes obscures sur les pattes, ne formant pas des anneaux; nez noir, lignes noires à côté des yeux, iris brun (García-Perea, 2002; Cossíos *et al.*, 2007a) (Figure 1A).

On connaît peu l'histoire naturelle du chat des Andes. On le considère comme une espèce principalement crépusculaire et nocturne (Scrocchi, Halloy, 1986; Villalba *et al.*, 2004). On a observé des femelles avec leurs petits entre octobre et août (Villalba *et al.*, 2004). Sa diète est composée principalement de viscaches (*Lagidium* spp.) et, en moindre importance, de petits rongeurs, oiseaux et reptiles (Walker *et al.*, 2007 ; Napolitano *et al.*, 2008). Un suivi radio-téléométrique, sur le seul exemplaire capturé vivant jusqu'à présent (Delgado *et al.* 2004), a permis d'estimer un domaine vital de 47,12 km<sup>2</sup> (Villalba, non publié).

La répartition connue jusqu'en 2005 de ce félinidé s'étendait du sud du Pérou aux régions hautes de la Bolivie, du nord du Chili et du nord-ouest de l'Argentine (Yensen, Seymour, 2000) où la température moyenne annuelle varie entre 0 et 4°C, les variations de température sont amples et les précipitations réduites (Villalba *et al.*, 2004). Récemment, des nouveaux enregistrements ont étendu cette répartition au centre de la région Argentine de Mendoza, 630 km plus au sud (Sorli *et al.*, 2006).

### Chat des pampas

La longueur du corps du chat des pampas oscille entre 55 et 70 cm et la longueur de sa queue entre 29 et 32 cm. La masse enregistrée pour cette espèce à l'état sauvage varie entre 3 et 3,7 kg (Redford, Eisenberg, 1992), tandis qu'en captivité il peut atteindre 7 kg (Green, 1991). Une grande variation phénotypique a été enregistrée pour cette espèce, principalement pour la longueur des poils et la coloration de la fourrure (Redford, Eisenberg, 1992; García-Perea, 1994). Une caractéristique du chat des pampas est la présence de poils plus longs sur le dos, formant une crinière. Les pattes antérieures, et parfois les postérieures, présentent des anneaux obscurs; la queue possède très souvent des lignes brunes ou noires, le nez est généralement rose ou d'une couleur claire, l'iris est jaune (García-Perea, 2002; Cossíos *et al.*, 2007a) (Figure 1B).

Même s'il s'agit d'une espèce commune, il existe peu d'information sur l'écologie du chat des pampas (Nowell *et al.*, 1996). Carnivore généraliste, sa diète inclut principalement des petits mammifères, des oiseaux et des reptiles, mais aussi des invertébrés et de la charogne (Cabrera, Yepes, 1960; Guggisberg, 1975; Ferrari *et al.*, 1984; Walker *et al.*, 2007; Napolitano *et al.*, 2008). Il a des habitudes principalement crépusculaires et nocturnes, même s'il est possible de l'observer aussi en plein jour (Nowell *et al.*, 1996).

La répartition de cette espèce va du nord de l'Équateur à l'extrême sud de la Patagonie (Argentine et Chili). On le trouve généralement associé à des paysages avec prédominance d'herbes et arbustes mais aussi à d'autres écosystèmes comme le *cerrado* brésilien et plusieurs types de forêts (Nowell *et al.*, 1996), comme les forêts d'altitude de l'est des Andes et la forêt sèche du nord du Pérou et du sud de l'Équateur.

### Taxonomie sous-espécifique du chat des pampas

Onze sous-espèces ont été décrites pour le chat des pampas. García-Perea (1994) considère que ces sous-espèces devraient former trois espèces différentes, appartenant toutes au genre *Lynchailurus* : *L. colocolo* comprendrait les sous-espèces distribuées au

Chili, à l'ouest des Andes; *L. pajeros* inclurait celles se trouvant le long des Andes et *L. braccatus* comprendrait celles des plaines situées à l'est des Andes (Figure 2). Pourtant, la plupart des auteurs continuent à considérer le chat des pampas comme une seule espèce (*L. colocolo*) divisée en sept à onze sous-espèces.

Les sous-espèces décrites diffèrent principalement par certaines mesures crâniennes et par le patron du manteau. Ensuite, je présente une courte description des sous-espèces, indiquant aussi leur répartition géographique. Pour les noms scientifiques, je considère ici tous ces taxons comme appartenant à l'espèce *Leopardus colocolo*.

Sous-espèces décrites à l'ouest des Andes :

-*L. c. colocolo* (Molina, 1782). Manteau avec des lignes obliques peu visibles; queue avec seulement deux anneaux en position distale (Figure 2A). Répartition: provinces centrales du Chili, entre Coquimbo et, probablement, Concepción (Wolffsohn, 1908).

-*L. c. wolffsohni* (García-Perea, 1994). Manteau avec des taches circulaires brunes disposées en lignes obliques (Figure 2B), queue avec huit anneaux, crinière dorsale et anneaux de la queue de la même couleur que les tâches du manteau. Mesures crâniennes similaires à celles de *L. c. colocolo*. Décrite à partir de deux seuls spécimens, dont un seul adulte. Répartition : hautes Andes de la province de Tarapacá, au nord du Chili. La validité de cette sous-espèce a été mise en cause par Johnson *et al.* (1998).

Sous-espèces décrites le long des Andes :

-*L. c. budini* (Pocock, 1941). Manteau avec un patron variable de tâches (Figures 2B, 2C et 2D). Les principales différences entre cette sous-espèce et les autres seraient des mesures crâniennes (García-Perea, 1994). Répartition : Montagnes du nord-ouest de l'Argentine.

-*L. c. crespoi* (Cabrera, 1957). Manteau avec des taches circulaires brunes disposées en lignes obliques (Figure 2B); queue avec des lignes peu visibles. Un seul spécimen (une peau sans éléments osseux), le holotype, est connu pour cette sous-espèce. Répartition : connue seulement de sa localité type – Aguaray, dans la province argentine

de Salta. García-Perea (1994) considère qu'il s'agit d'une sous-espèce morphologiquement très similaire à *L. c. budini* et qu'il pourrait n'être qu'un synonyme de celle-la.

-*L. c. pajeros* (Desmarest, 1816). Manteau de couleur orangé uniforme ou avec des tâches peu visibles (Figures 2C et 2D). Mesures crâniennes plus grandes que chez *L. c. budini*. Répartition : Argentine centrale.

-*L. c. crucinus* (Thomas, 1901). Manteau de couleur gris uniforme (Figure 2D). Répartition : Patagonie argentine et chilienne.

-*L. c. garleppi* (Matschie, 1912). Manteau avec des taches circulaires brunes disposées en lignes obliques (Figure 2B). Répartition : côté est des Andes péruviennes.

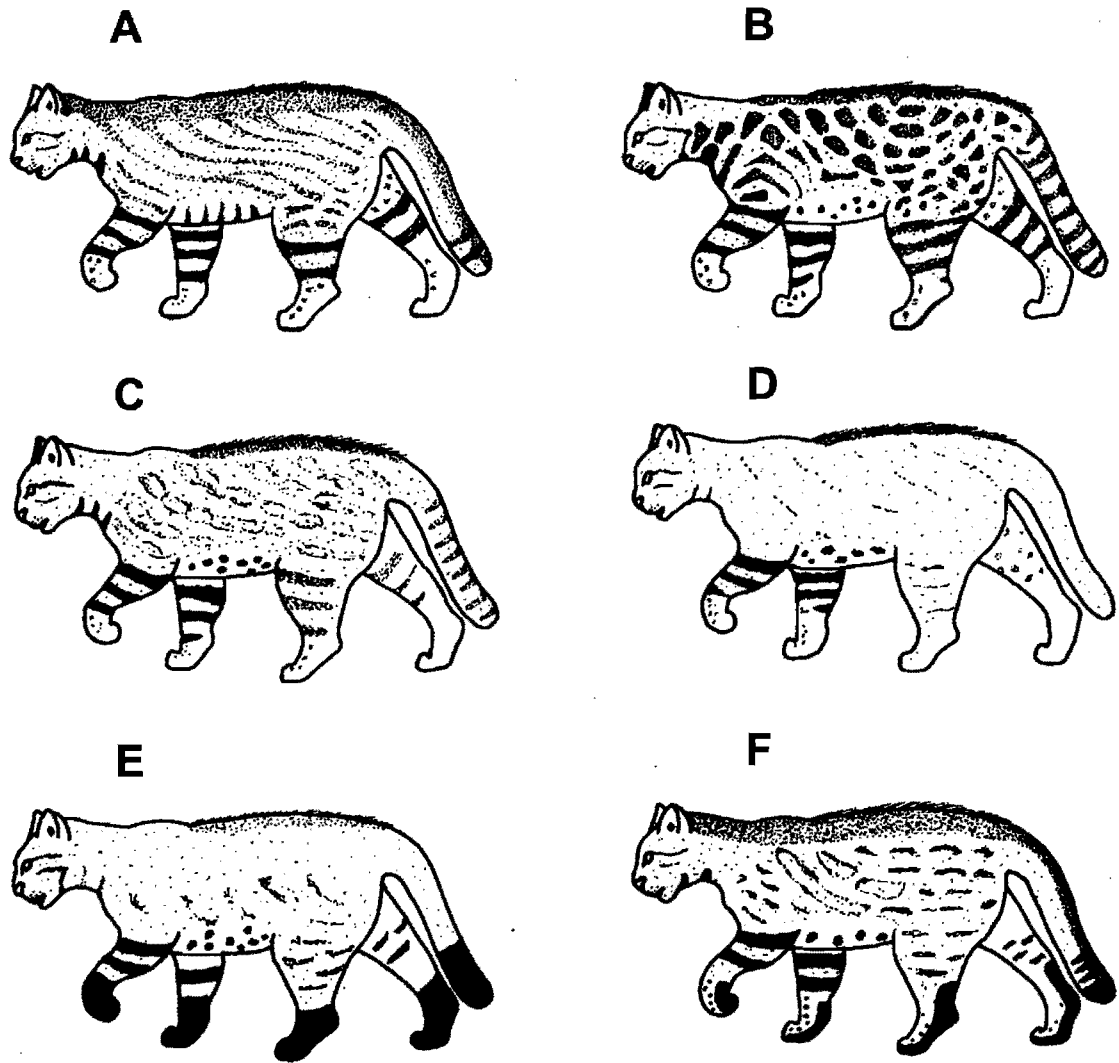
-*L. c. steinbachi* (Pocock, 1941). Manteau avec des taches circulaires brunes disposées en lignes obliques (Figure 2B). Taches plus pâles et mesures crâniennes plus grandes que chez *L. c. garleppi*. Répartition : province de Cochabamba, côté est des Andes boliviennes. García-Perea (1994) considère qu'il s'agit d'un taxon controversé et que plus d'individus devraient être examinés pour s'assurer de sa validité.

-*L. c. thomasi* (Lönnerberg, 1913). Manteau avec des taches circulaires brunes disposées en lignes obliques (Figure 2B). Sous-espèce avec un aspect extérieur et une morphologie crânienne similaires à ceux de *L. c. garleppi*, mais significativement plus petite. Répartition: côté est des Andes équatoriennes.

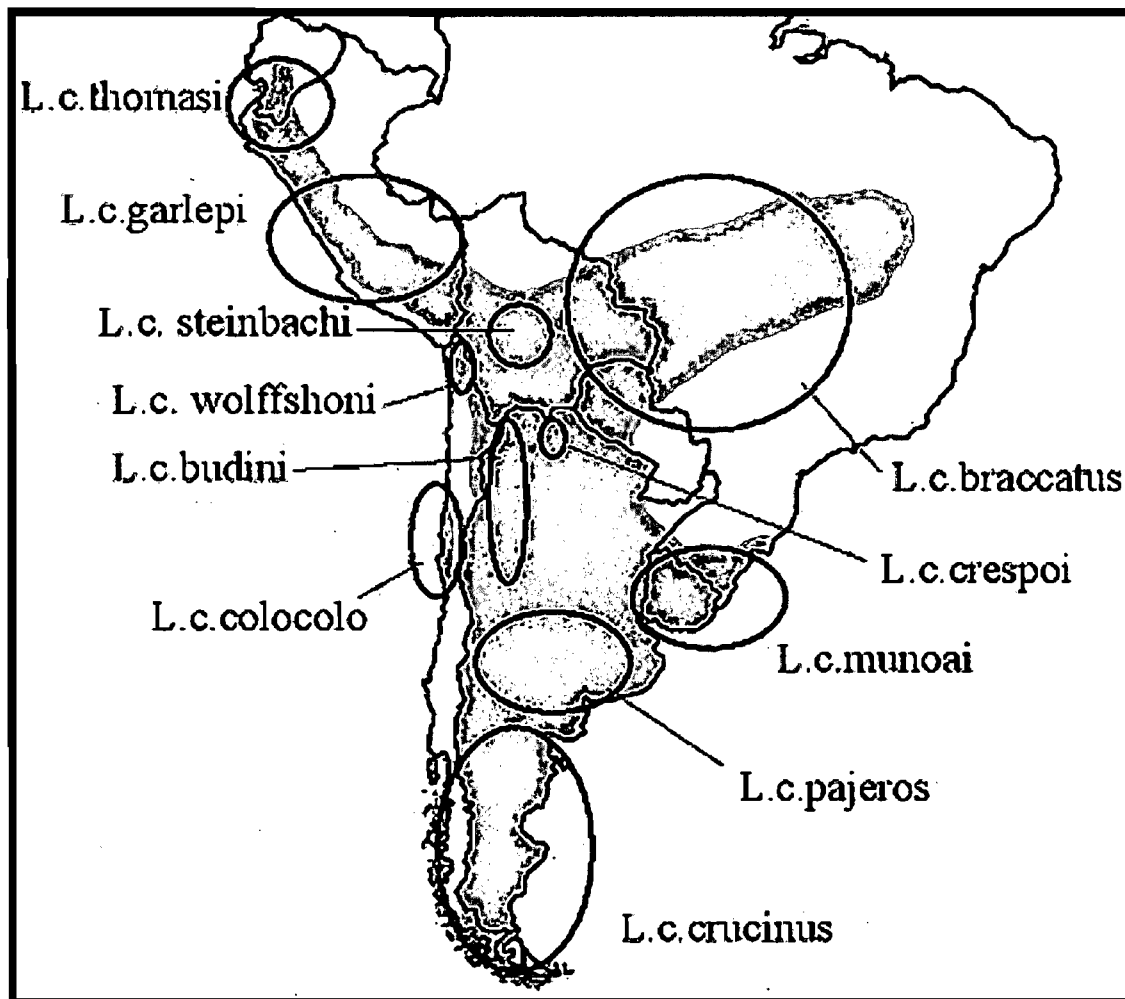
Sous-espèces décrites sur les plaines à l'est des Andes :

-*L. c. braccatus* (Cope, 1889). Manteau brun; moitié distale des pattes et extrême tiers de la queue noirs (Figure 2E). Répartition : sud-ouest du Brésil et Paraguay.

-*L. c. munoai* (Ximenez, 1961). Manteau brun; zone ventrale des pattes noire. Queue avec la pointe noire et trois ou quatre lignes noires qui n'arrivent pas à compléter des anneaux (Figure 2F). Répartition : Uruguay.



**Figure 2.** Différents patrons du manteau chez le chat des pampas Illustrations tirées de García-Perea (1994).



**Figure 3.** Répartition approximative des 11 sous-espèces reconnues pour le chat des pampas, en Amérique du sud. À partir de García-Perea (1994). L'aire grise correspond à la répartition approximative de l'espèce.

## État de conservation et menaces

Le chat des Andes est l'une des espèces de félinés les moins connues de la planète et la plus menacée du continent américain (Villalba *et al.*, 2004). Il fait partie de la catégorie EN C2a(i) de la UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) (Acosta *et al.*, 2008), ce qui signifie qu'on lui attribue un très grand risque d'extinction *in situ*, avec une population estimée plus petite que 2500 individus, qui continue à diminuer et qui présente des sous-populations de 250 individus ou moins (Acosta *et al.*, 2008). Il est considéré aussi sur l'Annexe I de la Convention CITES (Convention sur le commerce international des espèces de la faune et de la flore sauvages menacées d'extinction) -réservé aux espèces menacées d'extinction et pour lesquelles le trafic international est permis seulement pour des raisons scientifiques- et il est protégé dans les quatre pays de sa répartition. Au contraire du chat des Andes, le chat des pampas est une espèce commune et de répartition ample en Amérique du Sud. Il figure à la catégorie « Near Threatened » (NT) de l'UICN et à l'Annexe II de la CITES, créé pour les espèces qui, n'étant pas considérées comme menacées d'extinction, pourraient l'être si leur commerce n'était pas contrôlé (de Oliveira *et al.*, 2008).

La menace la plus importante pour ces deux espèces de félinés est la chasse. À l'exception de quelques régions, les habitants des hautes Andes ne reconnaissent pas le chat des Andes et le chat des pampas comme deux espèces et ils pensent souvent que leurs différences physiques correspondent à différents sexes ou âges de la même espèce (Cossíos, Madrid, 2003). Ces deux espèces sont alors traitées de la même façon dans la plupart des hautes Andes.

Dans certaines zones, les petits félinés des Andes sont tués et leurs peaux sont gardées par les paysans pour les utiliser lors de rituels et de danses diverses. Ces traditions existent au Pérou (Cossíos, Madrid, 2003), en Bolivie (Yapu, 2001 ; Núñez, Gallardo, 2002), au Chili (Iriarte, 1999) et en Argentine (Lucherini, Luengos, 2003; Perovic *et al.*, 2003). Parfois, les félinés sont tués car ils sont considérés potentiellement



dangereux pour les animaux domestiques ou à cause de diverses superstitions (Iriarte, 1999; Cossíos, Madrid, 2003; Lucherini, Luengos, 2003).

Parmi les menaces qui pèsent sur les populations du chat des Andes, en plus de la chasse, on trouve la fragmentation et la perte d'habitat (principalement des forêts d'arbres du genre *Polylepis*), la compétition avec d'autres carnivores, la petite taille de leurs populations et la diminution des populations de leurs principales proies (Villalba *et al.*, 2004). Il existe des évidences de la réduction récente de la répartition du chat des Andes: l'une des premières observations faites au Pérou a eu lieu à Azangaro, Puno (Grimwood, 1969), zone où actuellement on mène des activités agricoles intensives et les paysans disent n'y avoir pas vu le chat depuis plusieurs décennies (Cossíos, Madrid, 2003). Dans le cas du Chili, le chat des Andes a été enregistré dans la région centrale au XIX<sup>ième</sup> siècle (Scrocchi, Halloy, 1986), tandis qu'actuellement on le trouve, dans ce pays, uniquement dans la région nord de sa répartition historique (Iriarte, 1999; Villalba *et al.*, 2004). Même si la connaissance de sa répartition historique est faible, certains auteurs pensent que la population du chat des Andes s'est réduite dramatiquement à cause de la disparition presque totale des espèces de chinchillas (*Chinchilla brevicaudata* et *C. lanigera*) (e.g. Nowell *et al.*, 1996) survenue pendant la première moitié du XX<sup>ième</sup> siècle. Les populations du chat des pampas de l'Uruguay ont presque disparu et celles du sud de l'Argentine ont supporté une grande diminution à cause du commerce des peaux (Nowell *et al.*, 1996). Étant donné que l'on connaît peu la phylogéographie du chat des pampas, d'autres populations de cette espèce pourraient être menacées, actuellement ou dans le futur.

## Le cadre de la recherche

### Biologie de la conservation, génétique de la conservation et phylogéographie

La biologie de la conservation est une science multidisciplinaire née en réponse aux problèmes d'extinction affrontés par un grand nombre d'espèces et à la destruction d'habitats (Primack, 2006; Van Dyke, 2008). Cette science a trois objectifs (Groom *et al.*, 2006 ; Primack, 2006): a) documenter la diversité biologique; b) investiguer les impacts provoqués par les êtres humains sur les espèces, les communautés et les écosystèmes et c) développer des approches pratiques pour prévenir l'extinction des espèces, maintenir la variation génétique dans les espèces et protéger et restaurer des communautés biologiques et leurs fonctions dans les écosystèmes.

Depuis quelques décennies, la génétique a pris une grande importance pour la biologie de la conservation. L'objectif de la génétique de la conservation est de décrire la variation génétique chez les êtres vivants et de minimiser l'influence des facteurs génétiques sur leur risque d'extinction.

Les antécédents de l'utilisation des méthodes de génétique moléculaire en biologie de la conservation ont eu lieu durant les années 1960, avec l'usage de l'électrophorèse enzymatique pour identifier des patrons de diversité génétique, ainsi que des niveaux de polymorphisme et d'hétérozygotie (O'Brien, 1994; Avise, 2004). Plusieurs études ont mis en évidence que les espèces en danger montrent souvent une variabilité génétique réduite en relation à des espèces proches plus communes (Frankham *et al.*, 2002; Spielman *et al.*, 2004). Un nombre important d'études ont suggéré un lien direct entre la diversité génétique et la résistance aux maladies (Arkush *et al.*, 2002 ; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003), l'efficacité métabolique (Milton, 1993), la croissance (Aparicio *et al.*, 2001), la survie (Coltman *et al.*, 1998; Iimonen *et al.*, 2008) et la valeur adaptative (Amos *et al.*, 2001; Sauermann *et al.*, 2001; Keller, Walker, 2002; Foerster *et*

*al.*, 2003; Seddon *et al.*, 2004), tandis que d'autres ont montré une relation négative ou inexistante entre ces variables pour des cas particuliers (e.g. Petteri *et al.*, 2007; Jacquemyn *et al.*, 2007). Au niveau des espèces, le potentiel évolutif dépendrait du niveau de variation génétique qu'elles possèdent (Allendorf, Leary, 1986).

Si un grand nombre des premières recherches incluant génétique et conservation se sont centrées à trouver un lien entre la diversité génétique et des diverses variables liées à la viabilité des populations, le champ d'action de la génétique de la conservation s'est rapidement diversifié à partir des années 1980. Actuellement, la génétique de la conservation a comme rôles principaux (DeSalle, Amato, 2004): l'évaluation du degré de consanguinité et de la perte de variabilité génétique, la résolution de la structure génétique des populations, la résolution de doutes taxonomiques, la détermination des unités de conservation chez les espèces, l'assignation d'individus à leur population d'origine, la détection de l'hybridation, l'identification de sites et de génotypes pour les réintroductions, l'identification d'individus au niveau d'espèce, l'estimation de la taille efficace et du ratio mâles/femelles, l'analyse des liens de paternité, la compréhension de la connectivité entre populations.

Le mot phylogéographie a été introduit par Avise *et al* (1987). Cette discipline a comme objet la description des principes et des processus qui déterminent la distribution des populations et des espèces (Avise, 2000) et utilise des marqueurs moléculaires comme principaux outils. De ces marqueurs moléculaires, ceux qui sont situés sur l'ADNmt ont joué un rôle prépondérant dans le développement de la phylogéographie des animaux, étant donnée leur hérédité maternelle et leur nature non recombinante, ce qui permet le classement des haplotypes d'une façon phylogénétique (Bermingham, Moritz, 1998). D'un autre côté, les marqueurs nucléaires plus variables, comme les microsatellites, permettent la quantification des patrons plus fins au niveau des populations (Hedrick, 2004).

De façon générale, la phylogéographie s'est principalement concentrée sur l'analyse de la diversité génétique des populations d'une espèce, soit sur une petite partie

ou sur l'ensemble de leur aire de répartition (Bernatchez, Dodson, 1991; Taberlet, Bouvet, 1994; Angers, Bernatchez, 1998, entre autres). Plusieurs de ces études ont permis de mettre en évidence l'existence de différentes lignées évolutives à l'intérieur d'une même espèce. De plus, dans la majorité de ces études, les temps de séparation et de dispersion de ces lignées se sont avérés correspondre étroitement avec l'avènement d'importants événements historiques, révélant ainsi le rôle prépondérant qu'ont joué ces processus lors du façonnement de la diversité génétique de ces espèces.

### **Unités de conservation**

Une question fondamentale en biologie de la conservation est d'identifier les unités de conservation, ou groupes d'individus dont la protection assurerait celle de la diversité génétique d'une espèce. La notion de sous-espèce a été traditionnellement utilisée comme unité de conservation. Néanmoins, l'utilisation des sous-espèces, habituellement décrites à partir uniquement de caractères morphologiques, a souvent généré des partitions inadéquates ou incorrectes (Zink, 2004), surtout pour les espèces et sous-espèces en danger, décrites à partir d'un nombre limité d'individus (Avice, 1989). Plusieurs études ont montré une incongruence entre les sous-espèces définies phénotypiquement et des clades phylogénétiques identifiés avec des méthodes moléculaires (e.g. Zink, 1996; Burbrink *et al.*, 2000; Zink, 2004; Gottelli *et al.* 2004).

Pour solutionner ce problème, les concepts d'unité évolutive significative (ESU) et d'unité de gestion (MU), incluant une approche génétique, ont été créés. Les critères utilisés pour définir les ESUs varient entre les auteurs: entre autres, Ryder (1986) les a définies comme "des sous-groupes d'une espèce, possédant des attributs génétiques significatifs pour les générations présentes et futures de l'espèce en question". Pour Moritz (1994) les ESUs doivent être réciproquement monophylétiques pour l'ADNmt et montrer une divergence significative au niveau des fréquences alléliques des loci nucléaires. Fraser et Bernatchez (2001) les définissent comme "des lignées montrant un

flux génique très limité avec d'autres lignées dans le plus haut niveau organisationnel (lignée) de l'espèce". Avise (2004) considère qu'elles sont les sources principales de diversité génétique d'une espèce et que, à cause de cela, elles doivent être prises en considération pour des efforts en matière de conservation. Plusieurs auteurs ont critiqué le concept d'ESU. Entre autres, Crandall *et al.* (2000) argumente que les ESUs définies génétiquement ignorent les différences adaptatives entre populations. Certains auteurs considèrent l'adaptation comme un sujet crucial pour la reconnaissance des ESUs (e.g. Dizon *et al.*, 1992), tandis que d'autres pensent que les ESUs peuvent se différencier par des adaptations à leur habitat, mais que ceci ne serait pas obligatoire (e.g. Young, 2001). Même s'il y a des différences entre les définitions, on peut reconnaître comme caractéristiques des ESUs d'avoir des histoires évolutives distinctes et de montrer des différences significatives entre elles. L'interprétation des ESUs dépend des outils dont on se sert pour les définir (Angers, Bernatchez, 1998). Aucune approche ne fonctionne dans toutes les situations, raison pour laquelle les différentes approches peuvent être utilisées de façon complémentaire (Fraser, Bernatchez, 2001).

Contrairement aux ESUs, les MUs sont reconnues comme des populations qui montrent des différences significatives de leurs fréquences alléliques, soit à l'ADNmt ou à l'ADNnc (Moritz, 1994), sans que la monophylie réciproque soit nécessaire. De cette façon, une ESU pourrait être formée de plusieurs MUs.

Des définitions de sous-espèce intégrant des concepts génétiques existent aussi. Ainsi, Avise et Ball (1990) considèrent les sous-espèces comme « des groupes de populations d'une même espèce partageant un seul espace géographique ou habitat, et qui peuvent être différenciées d'autres groupes par plusieurs caractéristiques indépendantes et génétiquement hérités ». Ce concept diffère très peu de certaines définitions de ESU.

## **Échantillonnage d'espèces difficiles à observer**

Les techniques de laboratoire ont énormément évolué pendant les dernières années, permettant, entre autres, l'utilisation de méthodes d'échantillonnage non-invasif (i.e. qui évitent la capture et l'échantillonnage à partir d'individus vivants) pour la recherche en génétique de populations. Ainsi, le développement des nouvelles techniques a rendu possible l'extraction et l'analyse d'ADN provenant de poils, d'excréments et de tissus anciens, ce qui facilite le travail avec des espèces difficiles à observer et menacées.

Il faut remarquer que la qualité et la quantité de l'ADN contenu dans les échantillons (et donc les chances d'obtenir l'information recherchée) peuvent varier énormément d'après le type et la qualité des échantillons. Les excréments et les poils sont devenus une bonne source d'ADN mitochondriale mais, la quantité d'ADN nucléaire étant beaucoup moins élevée, le pourcentage d'échantillons ayant de l'ADN utile sera moins important dans ce cas, et la «fraîcheur» des échantillons pourrait être cruciale. Les tissus, en général, peuvent donner des meilleurs résultats, mais leur traitement avec des produits divers pour leur conservation en musée peut nuire la qualité de leur ADN. Parmi les tissus qu'on peut obtenir dans un musée, les peaux présentent un avantage: certaines parties des peaux, et en particulier les oreilles pour le cas des mammifères, sont pliées et les tissus contenus entre les plis sont mieux protégés des agents de conservation.

Pour cette thèse, étant donné les difficultés d'obtenir des exemplaires vivants des espèces étudiées, l'échantillonnage d'excréments a pris une place importante. Ces échantillons ont été récoltés sur le terrain, par plusieurs équipes de travail au Pérou, en Argentine et en Bolivie, pendant des évaluations de la présence de carnivores des Andes, souvent centrées sur le chat des Andes. Des morceaux de peaux ont aussi été récoltés (des morceaux d'oreille, quand ça a été possible), surtout dans le sud du Pérou, où les peaux sont utilisées par des bergers pour des cérémonies traditionnelles. Étant habituellement traitées seulement avec du sel pour leur conservation, ces peaux s'avèrent idéales comme source d'ADN.

## Les outils : Marqueurs moléculaires

Les analyses phylogéographiques utilisent principalement des marqueurs moléculaires, qui peuvent être situés sur l'ADN mitochondrial, nucléaire ou chloroplastique (Avisé, 2000). Ces marqueurs doivent être des marqueurs neutres, non affectés par la sélection naturelle et pour lesquels seulement la dérive génétique influence le niveau de polymorphisme dans une population (Parker *et al.*, 1998).

### ADNmt

L'ADNmt possède les caractéristiques d'un marqueur moléculaire idéal pour des analyses phylogénétiques (Avisé *et al.*, 1987). Il est devenu populaire principalement à cause de son haut taux de mutation, par rapport à l'ADN nucléaire. Le taux de mutation moyen des gènes mitochondriaux, chez les vertébrés, est de l'ordre de  $10^{-8}$ /site/année, tandis que celui des gènes nucléaires est de  $10^{-9}$ /site/année (Vawter, Brown, 1986). A cause de sa transmission généralement uniparentale et du fait qu'il est haploïde, la taille efficace de l'ADNmt est 4 fois plus petite que celle des gènes nucléaires autosomiques (Hartl, Clark, 2007), ce qui le rend plus sensible à la dérive génétique. À l'opposé des plantes, champignons, protistes et phytonématodes (Gray, 1989; Lunt, Hyman, 1997), la recombinaison de l'ADNmt n'a pas été reportée chez la plupart des animaux et ses gènes se transmettent comme un groupe entièrement lié (Hoech *et al.*, 1991). L'ADNmt des animaux contient des gènes codant pour 13 ARNm, 2 ARNr et 22 ARNt, ainsi qu'une région qui intervient dans l'initiation et la régulation de la réplication et de la transcription de l'ADNmt, appelée région de contrôle.

La région de contrôle est la seule grande région non-codante de l'ADNmt chez les animaux et son taux de mutation est beaucoup plus élevé que pour le reste de l'ADNmt (Aquadro, Greenberg, 1983; Cann *et al.*, 1984; Saccone *et al.*, 1991; Hoelzel *et al.*, 1994). Ces caractéristiques la rendent particulièrement utile pour étudier les relations phylogénétiques au niveau intra-spécifique ou entre espèces proches (Groves, 1997;

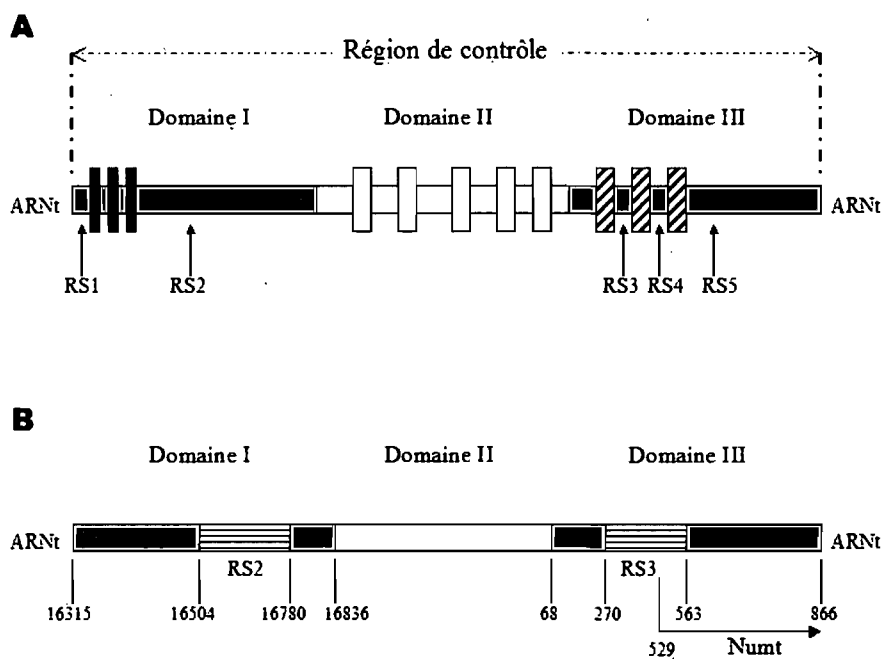
Parker *et al.*, 1998 ; Avise, 2000). La région de contrôle est divisée en trois parties ou domaines qui se différencient par la fréquence des différents nucléotides et la position des nucléotides variables (Fig. 3A ; Brown *et al.*, 1986). Les domaines I (5') et III (3'), appelés aussi séquence hypervariable I (HVS-I) et séquence hypervariable II (HVS-II), respectivement, contiennent la plupart des substitutions, délétions et insertions de la région de contrôle et sont particulièrement riches en adénine-thymine. Le domaine II est plus conservé et contient une proportion plus élevée de cytosine-guanine. Dans les trois domaines plusieurs blocs conservés ont été décrits (Sbisa *et al.*, 1997; Randi, Lucchini, 1998). En plus, des séquences répétées situées dans les domaines I et III ont été décrites pour plusieurs espèces de vertébrés et leur nom (de RS1 à RS5) varie selon la position qu'elles ont, relative aux blocs conservés (Hoelzel *et al.*, 1994; Fumagalli *et al.*, 1996). La figure 3-A présente un schéma de la structure de la région de contrôle des vertébrés.

Le domaine I de la région de contrôle de l'ADNmt des félinés contient une série de répétitions RS2 (environ 80pb par répétition) qui peuvent varier en nombre selon les individus et, dans certains cas, dans un même individu, créant de l'hétéroplasmie (Lopez *et al.*, 1996; Eizirik *et al.*, 1998). Le domaine III inclut trois blocs conservés (Saccone *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1994) et une séquence répétée RS3, équivalente à un microsatellite et qui est formée par la répétition imparfaite d'une séquence de 8pb (ACACACGT) (Hoelzel *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1996). Chez le chat domestique, on a aussi identifié une séquence du domaine III qui a été copiée dans le génome nucléaire (Numt; Lopez *et al.*, 1996). Le schéma de la Figure 3B montre la région de contrôle du chat domestique.

### **Microsatellites**

Si le taux de mutation de l'ADN mitochondrial est généralement plus élevé que celui des gènes nucléaires, il peut être encore trop bas pour identifier des divergences à des échelles temporelles récentes, ce qui impose l'utilisation de marqueurs moléculaires d'évolution plus rapide, comme les microsatellites, pour l'analyse des taxons d'origine récente ou des populations (Estoup, Angers, 1998).





**Figure 3.** Structure de la région de contrôle de l'ADNm. **A :** Schéma de la région de contrôle des vertébrés montrant la position des séquences répétées qui ont été décrites (RS1-5). Les blocs noirs représentent des séquences associées à la terminaison (TAS) sur le domaine I. Les blancs et les rayés représentent d'autres blocs conservés, sur les domaines II et III. **B :** Schéma de la région de contrôle chez le chat domestique montrant la position d'une séquence répétée RS2, d'une RS3 et d'un Numt (d'après Lopez *et al* 1996).

Les marqueurs microsatellites sont très polymorphes et abondants dans les génomes eucaryotes (Tautz, Renz, 1984; Tautz, 1989) et leur taux de mutation est élevé, entre  $10^{-2}$  et  $10^{-5}$ /locus/génération (Estoup, Angers, 1998; Scribner, Pearce, 2000; Avise, 2004), augmente la probabilité que les populations divergent rapidement à ces locus (Angers, Bernatchez, 1998).

Chez les félinés, plus de 550 microsatellites ont été décrits pour le chat domestique (Menotti-Raymond, O'Brien, 1995; Menotti-Raymond *et al.*, 1999; Menotti-Raymond *et al.*, 2003) et plusieurs d'entre eux ont été utilisés pour l'étude de la phylogéographie et la diversité d'autres espèces de félinés (Eizirik *et al.*, 1998; Eizirik *et al.*, 2001; Ernest *et al.*, 2003, entre autres). Des microsatellites ont été décrits aussi pour le lynx canadien *Lynx canadensis* (Carmichael *et al.*, 2000), le lynx américain *Lynx rufus* (Faircloth *et al.*, 2005), le tigre *Panthera tigris* (Williamson *et al.*, 2002) et le lion asiatique *Panthera leo persica* (Singh *et al.*, 2002).

## Objectifs de la thèse

### Objectif principal

L'objectif principal de ce projet est la détermination d'unités de conservation pour le chat des Andes et pour le chat des pampas aux Andes du Pérou, de la Bolivie, du Chili et de l'Argentine.

### Objectifs secondaires et structure de la thèse

Chacun des quatre premiers chapitres de cette thèse représente des objectifs secondaires de celle-ci. C'est pour cette raison que je me permets de présenter les objectifs et la structure ensemble. À la fin, la discussion générale donne un résumé des principales conclusions des chapitres précédents, offrant ainsi une perspective globale de l'ensemble des chapitres et mes impressions sur les recherches qui devraient être menées dans le futur.

Objectif du chapitre I : Développement d'une méthode pour différencier les espèces de carnivores des Andes à partir de l'ADN extrait de leurs excréments.

Justification de cet objectif : L'obtention d'un nombre important d'échantillons de tissus pour étudier la génétique des populations des félidés andins présente beaucoup de difficultés. Devant cette problématique, l'étude indirecte au travers de l'analyse d'excréments s'avère la meilleure solution. Malheureusement, à première vue, les excréments du chat des Andes ne peuvent pas être différenciés de ceux du chat des pampas ou du chat domestique et il est aussi possible de les confondre avec ceux d'autres carnivores, tels que le puma (*Puma concolor*), le renard des Andes (*Pseudalopex culpaeus*), le renard gris (*Pseudalopex griseus*) et le chien domestique. Pour cette raison, l'identification des excréments à partir de l'ADN qu'ils contiennent est crucial pour ce projet.

Objectif du chapitre II : Détermination de la répartition du chat des Andes et du chat des pampas au Pérou.

Justification de cet objectif : Avant 2006, même si on supposait sa présence plus au nord, on plaçait la limite nordique de la répartition connue du chat des Andes au Pérou, à 15°S. De même, on doutait de l'occurrence du chat des pampas à l'ouest des Andes péruviennes. Connaître la répartition d'une espèce est évidemment un pré-requis pour l'étude de sa phylogéographie. L'objectif de ce chapitre a été donc d'évaluer la répartition du chat des Andes et du chat des pampas au Pérou, en utilisant principalement la méthode développée au chapitre I.

Objectifs du chapitre III : Description de la structure génétique des populations du chat des pampas et détermination d'unités de conservation pour cette espèce.

Justification de ces objectifs : Le chat des pampas possède une variabilité morphologique importante, comportant plusieurs sous-espèces décrites dont la validité a été mise en cause. D'un autre côté, l'influence des glaciations du Pléistocène sur la biodiversité des Andes n'a pas été bien étudiée. La description de la structure génétique d'une espèce commune et amplement distribuée comme le chat des pampas doit être utile pour développer des inférences sur l'influence des changements climatiques anciens sur la faune des Andes, ainsi que pour identifier des unités de conservation pour cette espèce.

Objectifs du chapitre IV : Description de la structure génétique des populations du chat des Andes et détermination d'unités de conservation pour cette espèce.

Justification de ces objectifs : Le chat des Andes est considéré comme le félin le plus rare et le plus menacé des Amériques. Le travail décrit dans ce chapitre cherche à identifier ses populations, de mesurer son degré d'isolement et d'inférer son histoire démographique récente, ce que devrait aider au développement d'un programme de conservation effectif.

# Chapitre I

---

## **Identification of Andean felid feces using PCR-RFLP**

Cossíos, E. D., Angers, B.

Journal of Neotropical Mammalogy, 13(2): 239-244

2006

## Résumé

L'analyse de déjections fécales est une méthode utile pour la détermination de la répartition, de l'abondance et de la diète des animaux ; elle est spécialement importante dans le cas des espèces difficiles à capturer et à observer directement. Nous avons développé une méthode basée sur la PCR pour différencier les restes fécaux des félidés des Andes, incluant le rare et menacé chat des Andes (*Leopardus jacobita*), le chat des pampas (*Leopardus colocolo*), le puma (*Puma concolor*) et le chat de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), et en les différenciant aussi d'autres carnivores comme le renard des Andes (*Pseudalopex culpaeus*), le chat domestique (*Felis catus*), et le chien domestique (*Canis familiaris*). Cette méthode a été conçue pour être menée avec un équipement de laboratoire minimal et d'une manière rationnelle en termes d'économie et de temps.

## Abstract

Scat analysis is a useful method to determine distribution, abundance and diet of animals, and it is specially relevant in the case of elusive species. We developed a PCR-based method for distinguishing between scats of Andean felids, including the rare and endangered Andean cat (*Leopardus jacobita*), pampas cat (*Leopardus colocolo*), puma (*Puma concolor*) and Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*), as well as other sympatric carnivores such as culpeo fox (*Pseudalopex culpaeus*), domestic cat (*Felis catus*), and domestic dog (*Canis familiaris*). The method was designed to be performed with minimal laboratory equipment, to be cost and time efficient.

## Identification of Andean felid feces using PCR-RFLP

Scat analysis is a useful method to determine distribution, abundance and diet of animals (Putman, 1984; Kohn, Wayne, 1997; Wasser *et al.*, 2004). These methods are particularly relevant for monitoring elusive and secretive carnivores for which feces are often the only available materials (Foran *et al.*, 1997; Riddle *et al.*, 2003). As feces of similar-sized carnivore species can resemble each other in morphology and composition, distinguishing among them can be problematic (Davidson *et al.*, 2002; Prugh, Ritland, 2005). Development of methods for identification of the species from which feces originated is crucial for scat collection-based monitoring programs.

DNA methods on scat use intestinal cells of the animal that are incorporated into feces. Molecular scatology has been demonstrated to be an efficient method to identify carnivore species in a large number of publications, including felids (e.g. Ernest *et al.*, 2000; Farrel *et al.*, 2000; Palomares *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2003; Zuercher *et al.*, 2003). However, no protocol specific to Andean felids has been published. Several projects focussing on Andean cat (*Leopardus jacobita*), one of the rarest felids of the world and the most threatened of South America, are in progress (Villalba *et al.*, 2004). Therefore the development of such a method is highly relevant.

The aim of this work was to develop a PCRbased method for distinguishing between scats of Andean felids, namely Andean cat (*Leopardus jacobita*), pampas cat (*Leopardus colocolo*) – the most common felid in the Andes–, Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*), puma (*Puma concolor*), as well as other sympatric carnivores such as culpeo fox (*Pseudalopex culpaeus*), domestic cat (*Felis catus*), and domestic dog (*Canis familiaris*). A portion of the mitochondrial genome was PCR-amplified and RFLP patterns were used to distinguish felid species from one another and from other carnivore species.



The sequences of mitochondrial 16S ribosomal DNA from Andean felids and other carnivores (domestic cat and dog, canids, ursids, herpestids) were aligned using the CLUSTALW program. Restriction sites were identified as those providing a diagnostic pattern for felid species (Figure 1). Because fecal DNA is often of low quality, we selected a segment as short as possible that included restriction sites. Two primers (5'-AATTGACCTTCCCGTGAAGAGG-3' and 5'-CCTAGGGTAACTTGTTCCGTTG-3') were designed to amplify an expected segment of 257bp for Andean cat and Geoffroy's cat, 258bp for other felids and 257-263bp for other carnivores.

Samples for Andean cat, pampas cat, puma, and culpeo fox from Peru and Argentina; Geoffroy's cat from Argentina; and domestic cat, and domestic dog from various sources were obtained (skin, feces, tissues, see Figure 2). DNA from feces was isolated with Dneasy Tissue Kits (QIAGEN, Valencia, USA) according to Pires and Fernandes (2003). DNA from other samples was isolated by standard method of Proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction and precipitation with ethanol (Sambrook *et al.*, 1989).

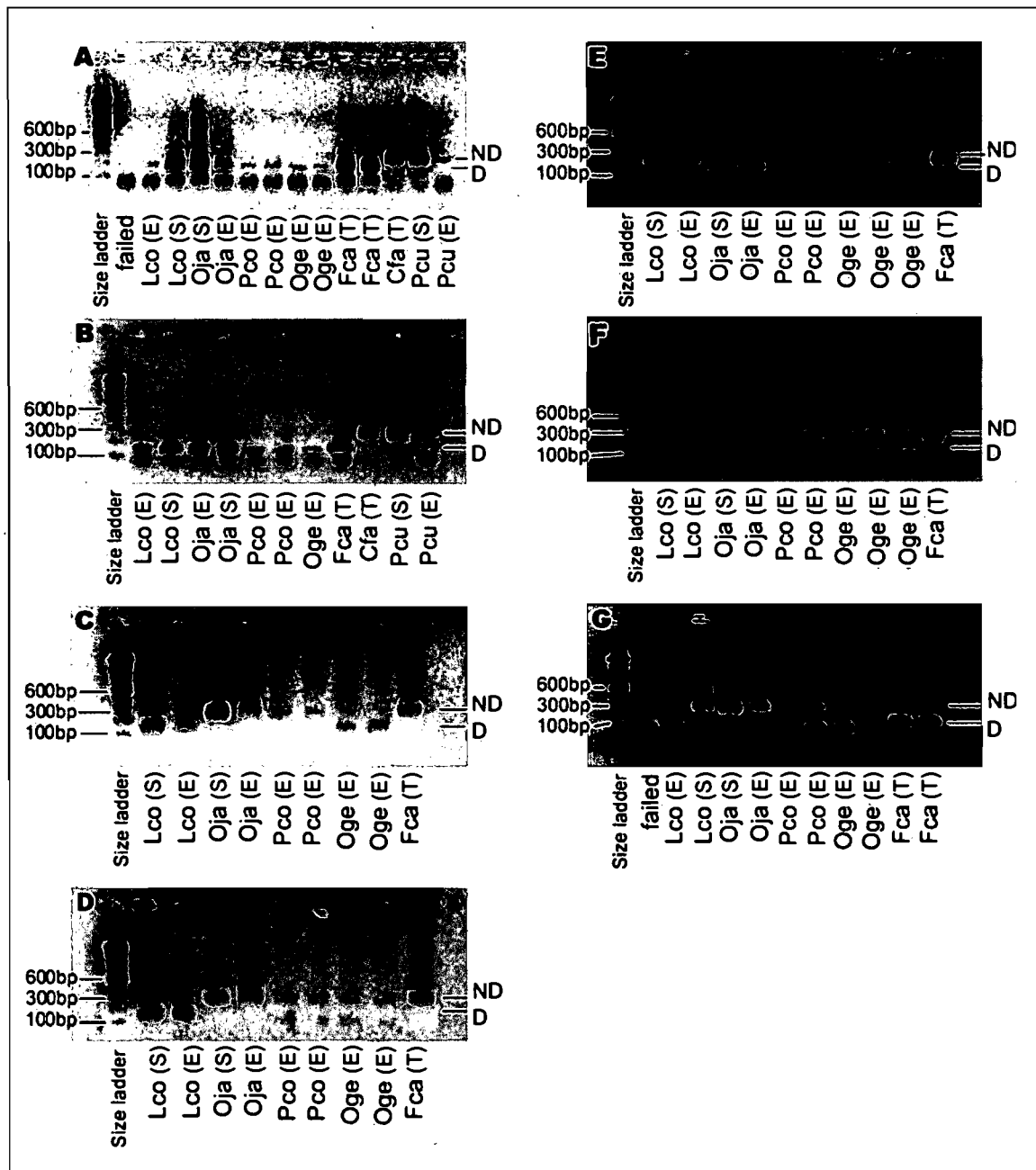
Fifty- $\mu$ l PCR reactions contained a final concentration of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP and 0.8 pM of each primer, 0.8 mg/ml of BSA, 0.8 unit of Taq DNA polymerase and approximately 50 ng of template DNA. The following program was performed: an initial denaturing step at 92°C for 2 min, 45 cycles of 92°C for 15 sec, 52°C for 15 sec, and 68°C for 30 sec, and a final extension step at 68°C for 5 min. Negative controls were used in the amplification reactions to monitor contamination.

Following amplification, PCR products were digested in seven reactions with *Dra*I, *Hae*III, *Nla*III, *Nco*I, *Ase*I, *Hpa*II and *Mbo*I. Restriction enzyme incubations were run in 7  $\mu$ l volume consisting of 0.7  $\mu$ l of the appropriate 10x buffer, 2-4 U of restriction enzyme and 5  $\mu$ l of the PCR product. Incubations were performed for at least 4h at 37°C and fragments were visualized in a 1.5% agarose gel.

	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	2	3	4	5	6
	1	1	1	1	1	1	1
Fca	AATTGACCTT	CCCGTGAAGA	GGCGGGAATA	TAATAATAAG	ACGAGAAGAC	CCTATGGAGC	TTTAATTAAC
Oge	.....	.....	.....	.....C..C.....	.....	.....	.....
Lco	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....
Pco	.....	.....	.....	.....C..C.....	.....	.....	.....
Oja	.....	.....	.....	.....C..C.....	.....	.....	.....T
Cfa	.....	.....	.....	.....CC.C.....	.....	.....	.....
Pcu	.....	.....	.....	.....C.C.....	.....	.....	.....
	0	0	0	1	1	1	1
	7	8	9	0	1	2	3
	1	1	1	1	1	1	1
Fca	CGACCCAAAG	AGACCATATG	AA--CCA---	ACCGACAGGA	-ACAACAAAC	CTCTAT----	ATGGGCCGGC
Oge	.....	.....CC.CT.....	.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....A.....
Lco	.....	.....CC.CT.....	.....T.....	.....	.....T.....	.....CC.....	.....A.....
Pco	.....	.....-CC..T.....	.....TTT.....	.....	.....	.....	.....A.....
Oja	.....	.....T.CC.CC.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....A.....
Cfa	TA.....	----T....	G.TA.T.GAT	...T...A.G	C.T...T.A	A.C..TATT	...A.TTA..
Pcu	CA.....	----TC...G.TATT.TTC	...T...A.G	C.T...TGT	A..C..TATT	...TTA..	.....
	1	1	1	1	1	1	2
	4	5	6	7	8	9	0
	1	1	1	1	1	1	1
Fca	AATTAGGTT	GGGGTGACCT	CGGAGAATAA	AACAACCTCC	GAGTGATTTA	AATCTAGACT	AACCAGTCGA
Oge	.....	.....	.....	.....T.....	.....A.....	.....	.....A.....
Lco	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....A.....
Pco	.....	.....	.....	.....C.G.....	.....	.....A.....	.....
Oja	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....
Cfa	.....	.....	.....AT.....	.....A..TC.....	.....A.....	.....T.....	.....C..A...A.....
Pcu	.....	.....	.....AT.C.....	.....A..TC.....	.....A.....	.....T.....	.....C..T...A.....
	2	2	2	2	2	2	
	1	2	3	4	5	6	
	1	1	1	1	1	1	
Fca	AAGTACTACA	TCACTTATTG	ATCCAAAAAC	CTT-GATCAA	CGGAACAAGT	TACCCTAGG	
Oge	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Lco	.....T.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....
Pco	.....T.....	.....	.....	.....GT.....	.....	.....	.....
Oja	.....T.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....
Cfa	.....A.....	.....	.....	.....T..T..T..T.....	.....	.....	.....
Pcu	.....TAGT.....	.....	.....	.....T.GT T.....	.....	.....	.....

**Figure 1.** Aligned sequences of the 16S rRNA gene segment from Andean carnivores.

The first position of the diagnostic restriction sites is indicated : *Dra*I (TTTAAA) 187; *Hae*III (GGCC) 134; *Nla*III (CATG) 126; *Nco*I (CCATGG) 125; *Ase*I (ATTAAT) 65, 88; *Mbo*I (GATC) 82 and *Hpa*II (CCGG) 136. Lco: pampas cat, Oja: Andean cat, Pco: puma, Oge: Geoffroy's cat, Fca: domestic cat, Cfa: domestic dog, Pcu: culpeo fox



**Figure 2.** Fragment profiles following digestion of the 16S rRNA gene segment. The origin of the extracted DNA (skin, tissue or scat samples) is indicated for each sample. S: skin, E: excrement, T: tissue. A: *DraI*, B: *HaeIII*, C: *NlaIII*, D: *NcoI*, E: *AseI*, F: *MboI*, G: *HpaII*. Lco: pampas cat, Oja: Andean cat, Pco: puma, Oge: Geoffroy's cat, Fca: domestic cat, Cfa: domestic dog, Pcu: culpeo fox. ND: undigested fragment, D: digested fragment.

The expected fragment profile (Table 1) was observed for all combinations of species and enzymes (Fig. 2). The enzymes *DraI* and *HaeIII* discriminate felids from other carnivores, digesting only felid species (Fig. 2A and B). *DraI* may digest herpestids but these species are not expected to be found in South America. The other restriction enzymes discriminate felid species from one another. The enzyme *NlaIII* provides restriction fragments only for pampas cat and Geoffroy's cat (Fig. 2C). Both species can then be discriminated with *NcoI* that digests only pampas cat (Fig. 2D). The *AseI* digestion pattern discriminates Andean cat and puma from other felids and both species can be differentiated according to the fragment sizes that differ by 20 bp (Fig. 2E). *MboI* can be used to identify unambiguously Andean cat (Fig. 2F). Finally, digestion with *HpaII* provided fragments only for domestic cat (Fig. 2G). The combination of enzymes allowed identification of each felid species on the basis of positive results (digested segment) making identification unambiguous in agarose gel.

PCR-RFLP on this segment of the mitochondrial 16S ribosomal DNA appears to be a suitable technique for differentiation between Andean felids. The method was designed to be performed with minimal laboratory equipment, to be cost and time efficient. It allows the identification of species from low quality DNA from scat samples, and should also be useful to identify hair, museum skins and carcasses. Hairs and other undigested rests from preys present on fecal samples may however interfere, producing a 'hybrid' pattern (Paxinos *et al.*, 1997). Special attention must be dedicated to sample preparation and extraction in order to reduce the risk of identifying the DNA of the prey (Wasser *et al.*, 1997). One limitation of this technique is the identification of putative hybrids among species such as pampas cat and Geoffroy's cat (Johnson *et al.*, 1999). Because of the strictly maternal inheritance of the mtDNA, nuclear markers must be developed to identify such hybrids.

Unambiguous identification of the Andean felids using feces and other non-invasive sampling provides a useful tool for estimation of felids diversity and for conservation purposes. In addition, identified samples can be further analyzed, opening up the possibility of studying other ecological and evolutionary aspects of these species.

**Table 1.** Expected fragments size in bp of the 16S gene-amplified segment following digestion with diagnostic restriction enzymes. Fragments less than 25bp are not shown. ND indicates undigested fragments. For carnivore species different than felids, only *DraI* and *HaeIII* fragment patterns are shown

	Identification of felids		Identification of Andean felid species					References and Genebank accession numbers
	<i>DraI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NlaIII</i>	<i>NcoI</i>	<i>AseI</i>	<i>MboI</i>	<i>HpaIII</i>	
Felidae								
Geoffoy's cat*	179, 78	132, 125	134, 123	ND	ND	ND	ND	AF006427; AF241818
Pampas cat*	179, 79	133, 125	135, 123	139, 119	ND	ND	ND	AF006411; Johnson et al. (1998)
Puma*	180, 78	132, 126	ND	ND	170, 88	ND	ND	AF288630-4; AF241851-3
Andean cat*	179, 78	132, 125	ND	ND	191, 66	151, 81	ND	Johnson et al. (1998)
Domestic cat*	179, 79	133, 125	ND	ND	ND	ND	136, 126	AF288633; AF288629
Canidae								
Culpeo fox*	ND	ND	-	-	-	-	-	DQ402045 (This study)
Domestic dog*	ND	ND	-	-	-	-	-	AF064567-8; AF006453
Dhole	ND	ND	-	-	-	-	-	AY289971-2
Wolf	ND	ND	-	-	-	-	-	AY289946; AY289960
Golden Jackal	ND	ND	-	-	-	-	-	AY289970
Herpestidae								
Indian mongoose	178, 79	ND	-	-	-	-	-	AY873843
Ursidae								
Asiatic black bear	ND	ND	-	-	-	-	-	AY504956-7
Brown bear	ND	ND	-	-	-	-	-	NC 003427; AF303110
American black bear	ND	ND	-	-	-	-	-	NC 003426; AF303109

\* species that can be found in Andean environments

## Chapitre II

---

### **Update on the distribution of the Andean cat *Leopardus jacobita* and the pampas cat *Leopardus colocolo* in Peru**

Cossíos, E. D., Madrid, A., Condori, J. and Fajardo, U.

Endangered Species Research, 3: 313-320

2007

## Résumé

Nous passons en revue la répartition actuelle du chat des Andes (*Leopardus jacobita*) et du chat des pampas (*Leopardus colocolo*) au Pérou et nous présentons 30 nouveaux enregistrements pour le chat des Andes et 268 pour le chat des pampas, pris entre les années 2001 et 2006. En outre, nous évaluons la présence du chat des Andes à partir d'entrevues avec des habitants locaux. Ces nouveaux enregistrements étendent la répartition connue du chat des Andes de 892 km vers le nord-ouest et montrent que le chat des pampas occupe une grande diversité d'habitats tout au long de la côte et des Andes péruviennes.

## Abstract

We review the current distribution of the Andean cat *Leopardus jacobita* and the pampas cat *Leopardus colocolo* in Peru and present 30 new records of the Andean cat and 268 of the pampas cat between the years 2001 and 2006. In addition, we evaluate the presence of the Andean cat from interviews with local inhabitants. These new records extend the known Andean cat distribution an extra 892 km northwest and show that pampas cats occupy a great diversity of habitats throughout the Peruvian coast and Andes.



## Introduction

The Andean cat, *Leopardus jacobita* Cornalia, 1865, and the pampas cat, *Leopardus colocolo* Molina, 1782, are 2 small cat species from South America. There is a lack of knowledge about the ecology and biology of both species and their distribution in Peru remains obscure.

The Andean cat is one of the rarest felid species in the world (Nowell *et al.*, 1996; Chapron, 1999). It is found only in the highlands of Peru, Bolivia, Chile and Argentina (Villalba *et al.*, 2004). Only 2 records of this species have been reported in Peru: Pearson (1957) reported an Andean cat in the Arequipa department, and Grimwood (1969) observed this species near Azangaro, in the department of Puno (Figure 1). Due to the extremely scarce observations in the field, its low population sizes, and the many threats that it faces, the Andean cat is listed as 'Endangered' by the IUCN the World Conservation Union (IUCN, 2006) as well as by the Peruvian government (Decreto Supremo No. 034-2004-AG).

The pampas cat is more common than the Andean cat with a distribution encompassing central Ecuador to Patagonia (Nowell *et al.*, 1996). It can be found in a great variety of habitats, including grasslands, the Brazilian Cerrado and many types of forests (Nowell *et al.*, 1996). Its large morphological variability led García-Perea (1994) to propose that it be split into 3 different species, whereas analyses of mitochondrial DNA diversity suggest it should be considered a single species (Johnson *et al.*, 1999). Although the pampas cat is relatively common, its distribution in Peru is not well known. Furthermore, publications of its global distribution usually fail to include local reports and grey literature.

Both felid species are hunted for their skins, to obtain stuffed cats or body parts for use in magic/religious ceremonies and folk dances, to decrease potential predation on domestic animals, for superstitious reasons or for sport (Villalba *et al.*, 2004). In addition, the pampas cat could be an important competitor of the Andean cat because of the

similarity of their diets (Lucherini, Luengos, 2003; Perovic *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 2004).

For the effective planning of conservation strategies for these cat species, better knowledge about their status across Peru is needed. In the present paper, the distributions of the Andean and pampas cats in Peru are updated based on new records.

## **Materials and methods**

We describe the distributions of Andean and pampas cats based on observations we made in the field and on records published by other authors. Our observations were made between 2001 and 2006, principally above an altitude of 3000 m in central and southern Peru, but they also include anecdotal observations from the northern regions as well as below this altitudinal limit.

Survey areas were chosen according to their altitude (3000 m or more) and previous information about the possible presence of Andean cats (historical records and data given by rangers in protected areas, mountain guides or field biologists). Our observations include sightings of live or dead animals, skins and stuffed specimens owned by rural inhabitants, skulls, and faeces collected by various researchers and identified in the laboratory.

Sightings, skins and skulls were identified with the criteria presented by García-Perea (2002) and Cossíos *et al.* (2007a). People who owned skins or stuffed cats were interviewed to determine the approximate site where the animals were hunted. Faecal samples were collected in paper bags and preserved with silica gel (Cossíos *et al.*, 2007a) and identified by DNA analysis according to the protocol presented by Cossíos and Angers (2006) or by mitochondrial DNA control region sequencing. Some skins and dead animals were sent to the San Marcos Natural History Museum (Lima, Peru) or to the San Agustín national University Museum (Arequipa, Peru). A total of 378 man-days were used for field survey, including 212 man-days spent on the search for faecal samples.

Because of the rarity of the Andean cat, in addition to the search for direct evidence of its presence, interviews with local inhabitants were conducted to assess its distribution. Local inhabitants were asked to give the location and date of sightings and to describe the observed felid species, special attention being given to the description of the tail, which is characteristic in the Andean cat (Chapron, 1999). When the interviewer did not have confidence in the answers given, interviews were discarded. The ratio  $n/N$ , where  $N$  is the number of interviews done in a region and  $n$  is the number of positive answers about Andean cat presence, was used as an indicator of the relative abundance of the Andean cat in each of the regions visited (Chapron, 1999). Although interviews have limitations (e.g. credibility of the interviewees and probable differences in detection probability throughout the evaluated area), this method is considered to be effective in assessing the presence of elusive or rare species (González, González, 1996; Schaller *et al.*, 1996; Chapron, 1999).

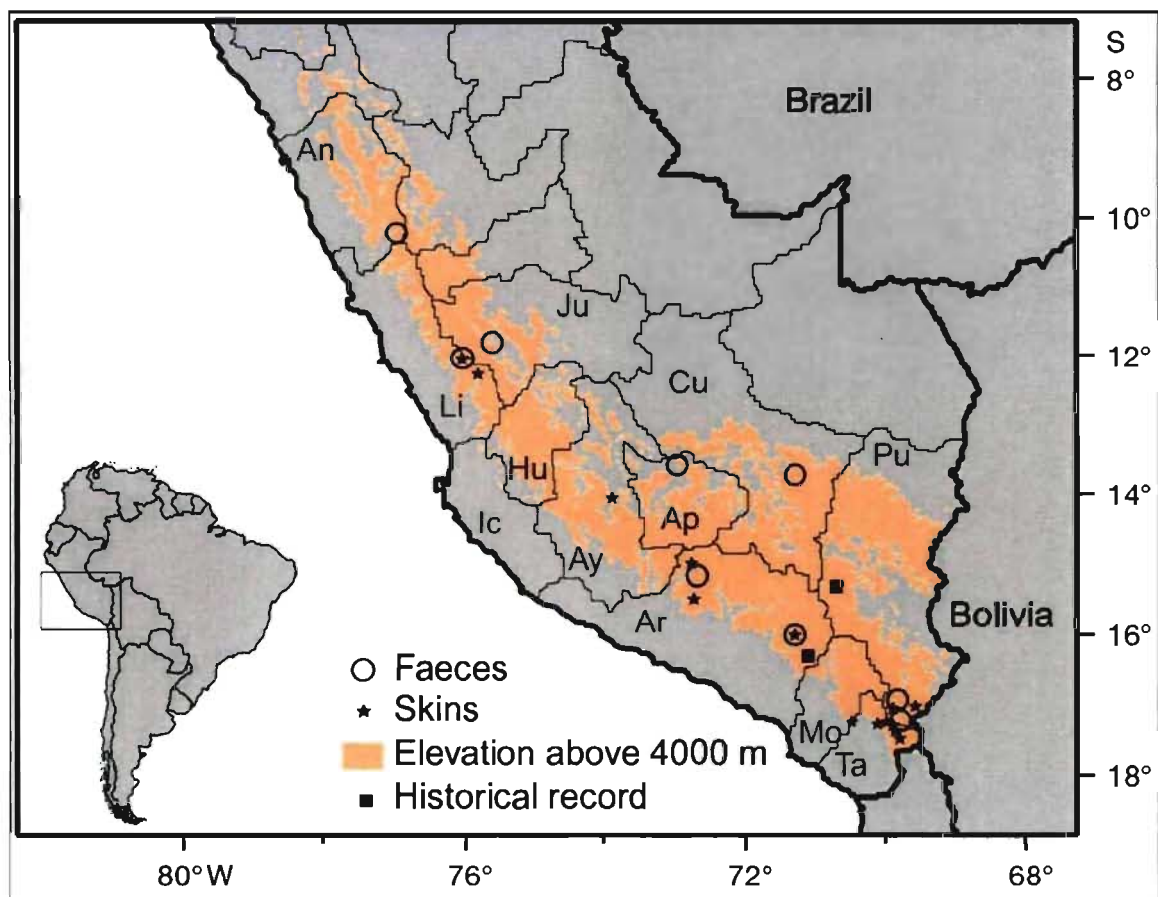
## Results

We obtained 30 new records for the Andean cat, and 268 for the pampas cat in Peru. In addition, we evaluated the presence of the Andean cat from interviews with local residents.

For the Andean cat, 19 of the records were skins owned by villagers and 11 were faecal samples (Table 1). With these results, the currently known distribution for the Andean cat in Peru now includes the Puna and Altoandino geographic provinces, in the highlands from the southern (Puno, Tacna, Cuzco, Apurímac, Ayacucho and Arequipa departments) and central regions of the country (Lima, Junin and Ancash departments) (Figure 1). The lowest altitude at which this species was recorded was 3326 m at Pachacpata, Apurímac, and the highest at 4804 m at Auzangate, Cuzco. The percentage of people interviewed who confirmed having seen Andean cats (when different from 0%) ranged from 6.1% (Central Ancash) to 85.7% (Southern Puno) (Table 2). All the faeces sampling sites and the descriptions of sites where villagers reported having seen Andean

cats corresponded to rocky environments with a vegetation dominated by herbs and the presence of viscachas *Lagidium* sp., Rodentia, which is one of the principal prey species of the Andean cat (Villalba *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2007).

The sites where we recorded skins or faeces of this species included the following 4 protected areas: Zona Reservada Aymara Lupaca (Puno), Reserva Nacional Salinas y Aguada Blanca (Arequipa), Reserva Paisajística Subcuenca del Cotahuasi (Arequipa) and Reserva Paisajística Nor Yauyos Cochabamba (Lima).



**Figure 1.** Andean cat distribution in Peru. Historical records in Puno and Arequipa departments are from Grimwood (1969) and Pearson (1957), respectively. An: Ancash; Li: Lima; Ju: Junin; Ic: Ica; Hu: Huancavelica; Ay: Ayacucho; Cu: Cuzco; Ap: Apurimac; Ar: Arequipa; Pu: Puno; Mo: Moquegua; Ta: Tacna

**Table 1.** Andean cat records in Peru between 2002 and 2006

Site	South	West	Skins	Faeces	Date
Tacna / Tarata/ Kallapuma	17°19'02,66''	69°43'51,77''	1		2005
Tacna / Tarata/Tacjata	17°10'24,61''	69°58'12,82''	2		2005
Tacna / Candarave/Tacalaya	17°06'07,7''	70°23'48,73''	3		2004
Puno / El Collao/ near Kovire	17°10'57,86''	69°54'51,31''	1		2002
Puno /El Collao/ near Jijuaña	17°13'50,57''	69°53'40,2''	3		2002
Puno/El Collao	16°42'37,23''	69°43'37,23''		1	2005
Puno/El Collao	17°08'09,81''	69°41'54,85''		1	2005
Puno/Lampa	15°15'28,56''	70°27'38,34''	1		2004
Puno/Chucuito/Chichillapi	16°55'47,58''	69°48'19,55''	1		2005
Puno /Chucuito/near Pisacoma	16°55'00,36''	69°29'03,85''	1		2002
Arequipa /Arequipa/Pillones	15°56'07,41''	71°14'45,43''	1	1	2004
Arequipa /Koyajo	15°26'00,87''	72°41'10,47''	1		2002
Arequipa/Huactapa	14°59'22,25''	72°42'53,97''	1		2002
Arequipa/Unión	15°07'22,40''	72°39'58,96''		2	2004
Ayacucho /Sucre/Tintay	14°04'43,57''	73°51'54,98''	1		2002
Cuzco /Canchis/Auzangate	13°44'37,04''	71°12'14,83''		1	2004
Apurimac /Abancay/Pachacpata	13°35'47,60''	72°58'08,75''		1	2004
Lima /Yauyos/ Laraos	12°19'60''	75°46'60''	1		2006
Lima /Yauyos/ Tanta	12°07'00''	76°01'00''	1		2006
Lima /Yauyos/ Tanta	12°04'08,01''	75°56'52,06''		1	2006
Junin /Jauja/ Canchayllo	11°49'27,53''	75°41'59,07''		1	2006
Ancash/Bolognesi/Huayhuash	10°13'26,03''	76°57'16,28''		2	2006
<b>TOTAL</b>			<b>19</b>	<b>11</b>	<b>30</b>

**Table 2.** Results of interviews relating to the presence of Andean cats by region.

Region	N	n	n/N x 100
Tacna	109	71	65,14
Southern Puno	56	48	85,71
Northern Puno	56	36	64,29
Arequipa	163	88	53,99
Huancavelica	38	16	42,11
Cuzco department	13	3	23,08
Apurimac department	38	16	42,11
Northern Ayacucho	75	21	28,00
Southern Ayacucho	47	4	8,51
Northern Junin	12	2	16,67
Southern Lima	21	14	66,67
Central Lima	15	4	26,67
Southern Ancash	20	14	70,00
Central Ancash	33	2	6,06
TOTAL	696	339	

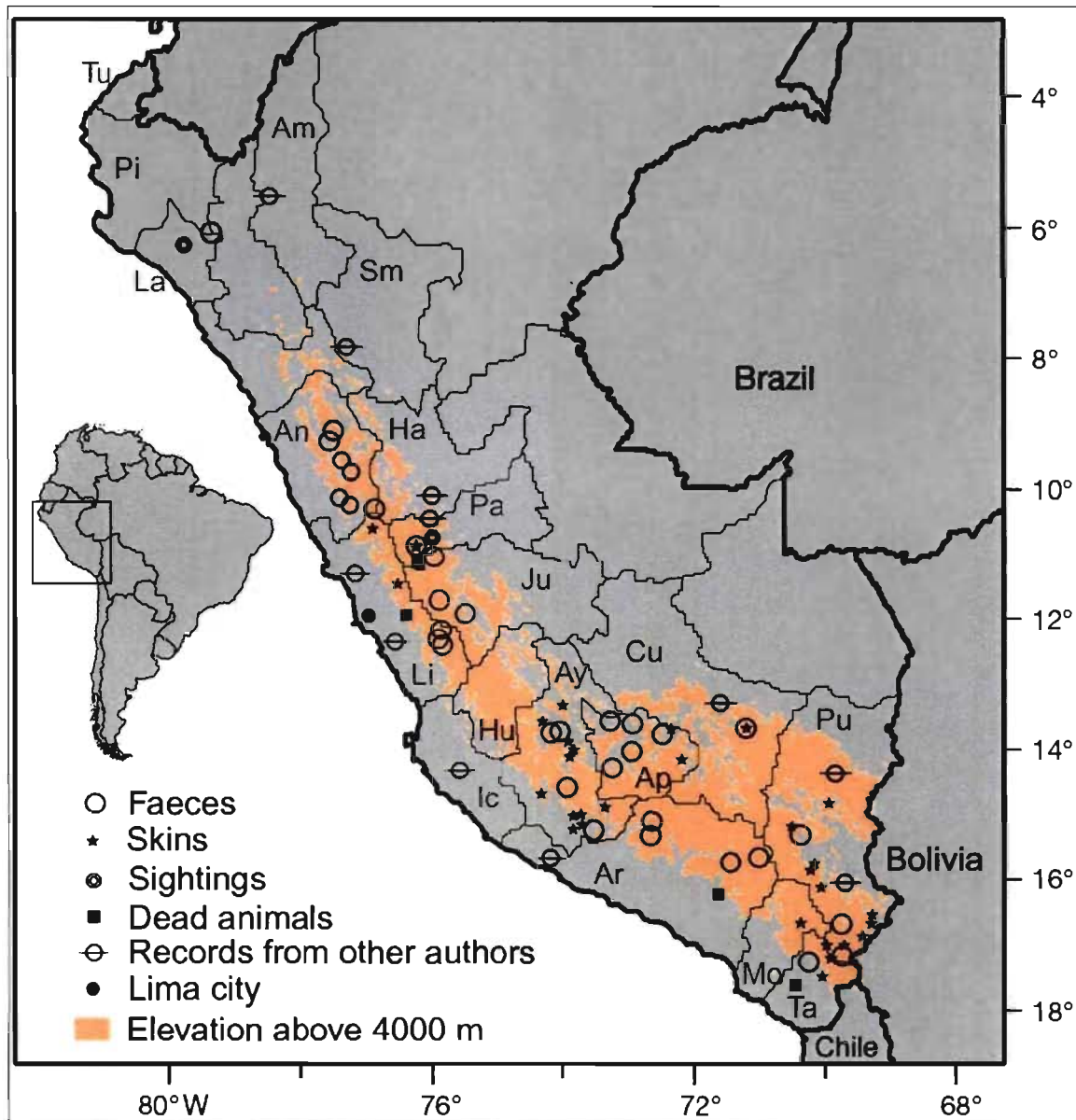
N = total number of interviews

n = number of interviewed people who said to have seen Andean cats

For the pampas cat, we obtained direct signs of presence (sightings, faeces, skins) and positive interviews throughout the entire area evaluated, with the exception of areas near big cities and some other specific sites. Some of the faecal samples were collected very close to villages, 100 m or less. Among the direct records for this species, 5 were sightings of live animals, 5 were dead animals, 67 were skins or stuffed cats owned by villagers and 191 were faecal samples (Appendix 1). The known distribution for the pampas cat in Peru (Figure 2) covers the Andes and includes the puna grasslands, high Andean forests, valleys, dry forests and some coastal hills, between 400 m (Lachay in Lima; Ramírez *et al.*, 2001; Atiquipa in Arequipa; Zeballos *et al.*, 2000) and 4982 m above sea level (Ancash department, central Peru).

These results and data from other sources (Appendix 2) indicate that the pampas cat is present in the following Peruvian protected areas: Zona Reservada Aymara Lupaca, Reserva Nacional Salinas y Aguada Blanca, Reserva Paisajística Subcuenca del Cotahuasi, Reserva Paisajística Nor Yauyos Cochas, Reserva Nacional de Junín, Santuario Nacional de Huayllay, Parque Nacional Huascaran, Parque Nacional Río Abiseo, Reserva Nacional de Lachay and Santuario Nacional Batán Grande.

The presence of the Andean cat, compared to that of the pampas cat, seems to be more important in the highlands of Tacna (37.5% of the wild cat skins found were those of the Andean cat,  $n = 16$ ) and Southern Puno (21.21% of the skins and 13.33% of the faecal samples,  $n = 33$  and  $n = 15$ , respectively), followed by Arequipa (11.11% of the faecal samples,  $n = 9$ ), Southern Ancash (9.09% of the faecal samples,  $n = 22$ ), and Southern Lima (5.71% of the faecal samples,  $n = 35$ ).



**Figure 2.** Pampas cat distribution in Peru. Tu: Tumbes; Pi: Piura; Am: Amazonas; La: Lambayeque; Sm: San Martín; An: Ancash; Ha: Huanuco; Pa: Pasco; Li: Lima; Ju: Junin; Ic: Ica; Hu: Huancavelica; Ay: Ayacucho; Cu: Cuzco; Ap: Apurimac; Ar: Arequipa; Pu: Puno; Mo: Moquegua; Ta: Tacna



## Discussion and conclusions

The Andean cat distribution in Peru is larger than suspected based on the information available prior to this study. The new records presented here extend its range an extra 892 km northwest and show that this felid is present in 9 departments and 4 protected areas. Faecal samples from the extreme south of the Ancash department suggest that the Andean cat could be present in 2 additional nearby protected areas: Reserva Paisajística Huayhuash and Parque Nacional Huascarán.

Although the sampling effort varied between localities, the quantity of signs of presence (Table 1) and the percentage of positive interviews for the Andean cat (Table 2, Figure 3) show that this species is more common in the extreme south of the country (south of Puno and Tacna, with 85.71% positive interviews), followed by southern Ancash (70%), southern Lima (66.67%), northern Puno (64.29%) and the Arequipa department (53.99%). These results show that there are variations in the probability of detection at different sites, this probably being due to variations in abundance or to a fragmented distribution.

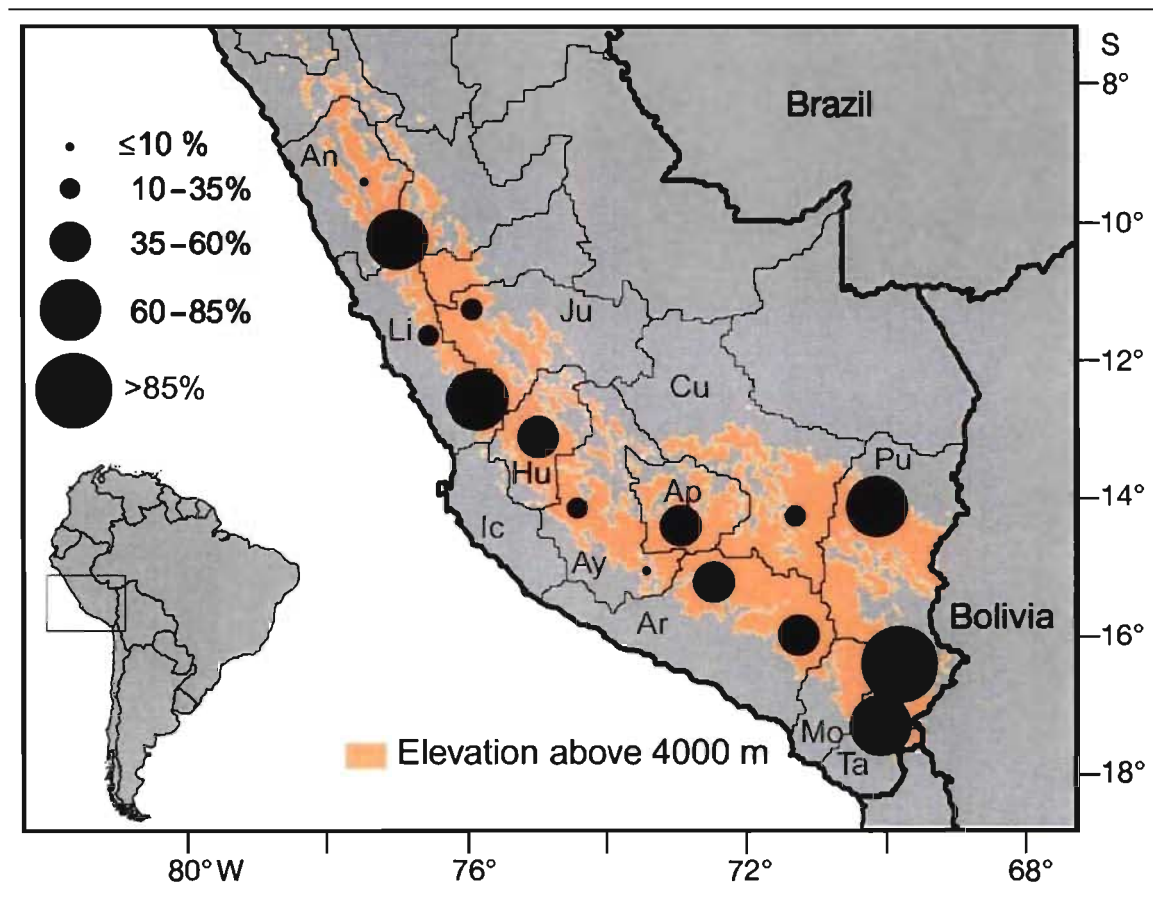
The Andean cat seems to be especially rare in Ayacucho and Cuzco, and it is probably absent in northern Junín (in the surroundings of the Junín National Reserve) and in central Ancash, regions that are both on the northern boundary of the known distribution of this species. The presence of the Andean cat in the extreme south of Peru is consistent with the records and observations presented by Chapron (1999), Iriarte (1999), Sanderson (1999) and Villalba *et al.* (2004) for northern Chile and northwestern Bolivia, which would indicate that the neighbouring zone between these 3 countries is an important area for the conservation of this felid species. To improve our knowledge of the Andean cat distribution, we recommend that surveys assessing the presence/absence of cats be conducted in Moquegua, southern Cuzco and the northern Lima departments, from which few or no data are currently available, as well as in northern Puno and Huancavelica, where only interviews were conducted. Information taken from the interviews would be used to determine the best locations to pursue surveys and further

research. Then, faecal sampling or another method would be used to confirm the presence of the species.

Contrary to what García-Perea (1994) showed, the pampas cat is common on the western slope of the Peruvian Andes. García-Perea (1994) considers that the pampas cats from northern Chile belong to the subspecies *Leopardus colocolo wolfshoni* and that they are different than the varieties described for the Peruvian Andes (*L. c. garleppi*) and the Bolivian Andes (*L. c. steinbachi*). Other authors, however, recognize a single subspecies for the region that includes southern Peru, northern Chile and northwestern Bolivia (Johnson *et al.*, 1999). Due to the lack of evident geographic barriers between the Peruvian and Chilean Andes, we believe that the pampas cats from the western Andean slope of both countries belong to the same subspecies.

We did not extensively monitor the northern region of the country, even though there are a few pampas cat records from San Martín (Romo, 1995; San Marcos University Natural History Museum unpubl.), Amazonas (García-Perea, 1994) and Lambayeque (present research). Grimwood (1969) made local enquiries in a large part of the country and concluded that the pampas cat was 'present in almost every department of the Andean region, from Piura in the north to Puno in the south' and he mentioned that this species was also present in the northern Amazonas and Tumbes departments. However, the current distribution of this species in the northern part of Peru is not well known and further research is needed. Grimwood (1969) mentioned the presence of the pampas cat in 'the upper part of the Manu National Park', even though the list of mammalian fauna presented by Solari *et al.* (2006) for this protected area does not include this species. This discrepancy could be due to a rare or occasional presence of the pampas cat in the area, to the limited accuracy of the methods used by Grimwood (1969), or to a recent local extinction.

In addition to the threats to cats reported by Villalba *et al.* (2004), we determined that wild cats in Peru are also killed for use in popular medicine, for consumption, and to reduce predation on aquatic fowl. The reasons for hunting cats differ in different regions.



**Figure 3.** Relative abundance of Andean cats in Peru, estimated from interviews with local inhabitants. Size of black circles reflects the percentage of people interviewed who said they had seen Andean cats. An: Ancash; Li: Lima; Ju: Junin; Ic: Ica; Hu: Huancavelica; Ay: Ayacucho; Cu: Cuzco; Ap: Apurimac; Ar: Arequipa; Pu: Puno; Mo: Moquegua; Ta: Tacna

The use of wild cats in magic/religious ceremonies and dances, and pursuit for superstitious reasons, are more common in the southern region of the country (Puno, Tacna and Arequipa departments), while their consumption, use in popular medicine and killings to reduce predation of fowl were recorded only in specific sites in central Peru. On the other hand, inter-specific competition between Andean and pampas cats could be a factor that affects the Andean cat populations in central Peru more than those in the south. These differences must be considered for the development of local conservation programs.

Because of the apparent rarity of the species, even occasional Andean cat hunting could cause its local extinction (Perovic *et al.*, 2003). In southern Peru, where hunting seems to be more common, the risk of extinction due to this factor could be even greater. The threats posed by human attitudes towards the felid species, in addition to the loss and fragmentation of their habitat, may be reducing populations of the Andean and pampas cats in many areas throughout their range.

-----oOo-----

## Chapitre III

---

### **Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*)**

Cossíos, E. D., Ruiz-García, M., Lucherini, M., Angers, B.

BMC Evolutionary Biology, 9:68

2009

## Résumé

Si de nombreuses études ont révélé le rôle majeur joué par les modifications environnementales du Quaternaire sur l'évolution de la biodiversité, les recherches concernant l'influence de cette période sur la faune sud-américaine sont rares et ont été centrées sur les régions de basse altitude. Dans cette étude, la structure génétique du chat des pampas (*Leopardus colocolo*), un féliné largement distribué, a été déterminée et liée aux fluctuations climatiques anciennes de la région andine. En utilisant des marqueurs d'ADN nucléaire et mitochondrial, nous en avons déduit l'existence d'au moins quatre groupes de populations dans les Andes centrales, qui doivent être considérées comme des unités de gestion différentes, et trois autres localités proposées ici comme des unités de gestion provisoires. La répartition de ces groupes est liée à la latitude, avec une zone centrale caractérisée par un mélange de plusieurs clades mitochondriaux. Cela suggère une colonisation à partir d'au moins trois refuges glaciaires, et une zone de contact entre les 20° et 23°S à la suite d'un événement glaciaire. La similarité entre les temps de coalescence des haplotypes mitochondriaux indique que les principaux clades se sont séparés il y a environ un million d'années, probablement au cours de la période glaciaire pré-Pastonienne (0,80 – 1,30 MYA), événement suivi par une expansion démographique dans chaque clade au cours de la période interglaciaire Aftonienne (0,45 - 0,62 MYA). La structure des populations trouvée correspond à peu près à la répartition reconnue actuellement pour les sous-espèces décrites et montre l'influence des anciennes périodes glaciaires sur la diversité du chat des pampas.

## Abstract

While numerous studies revealed the major role of environmental changes of the Quaternary on the evolution of biodiversity, research on the influence of that period on current South-American fauna is scarce and has usually focused on lowland regions. In this study, the genetic structure of the pampas cat (*Leopardus colocolo*), a widely distributed felid, was determined and linked to ancient climate fluctuations on the Andean region. Using both mitochondrial sequences and nuclear microsatellites, we inferred the existence of at least four groups of populations in the central Andes, that must be considered different management units, and three other localities proposed here as provisional management units. The distribution of these groups is correlated to latitude, with a central area characterized by admixture of numerous mitochondrial clades. This suggests colonization from at least three glacial refuges and a contact zone between 20° and 23°S following a glaciation event. The similar coalescence times of the mitochondrial haplotypes indicated that the major clades split approximately one million years ago, likely during the Pre-Pastonian glacial period (0.80 – 1.30 MYA), followed by a demographic expansion in every clade during the Aftonian interglacial period (0.45 – 0.62 MYA). Interestingly, this structure roughly corresponds to the current recognised distribution of morphological subspecies, indicating the influence of ancient glacial periods on the pampas cat diversity.

## Background

Previous bio- and phylogeographic studies in the northern hemisphere revealed the major role of the Quaternary in the evolution of biodiversity. Important climatic fluctuations resulted in alternations of glacial and interglacial periods that profoundly influenced the distribution of habitats, dispersal and isolation among populations (e.g. Hewitt, 1996; Avise *et al.*, 1998; Hewitt, 2000; Carstens *et al.*, 2005). In South America, climate fluctuation periods were equivalent to those known for the northern hemisphere (Lavenue, 1992; Clapperton, 1993). During the glacial periods, glacier boundaries descended hundreds of meters, and advanced dramatically in the southern part of the continent (Nilsson, 1983; Clapperton, 1993; Markraf, 1993). In the central Andes, although late Quaternary glaciations eliminated the material evidence of glacier advances older than 200 000 years (Clapperton, 1993), research has shown that the distribution of plant species and habitats cycled with climatic changes, descending to lower elevations during periods of reduced temperature (Flenley, 1998; Graham *et al.*, 2001). However, studies on the influence of the Quaternary on current South-American biodiversity are scarce and have usually focused on lowland regions (Richardson *et al.*, 2001; Noonan, Gaucher, 2005).

Species with broad ranges of distribution can be informative regarding glacial refugia, dispersal pathways and contact zones (Steele, Storfer, 2006; Ursenbacher *et al.*, 2006) and, then, provide useful insights about the role of climatic changes on biodiversity. The pampas cat (*Leopardus colocolo*) displays a large distribution in South America, from Central Ecuador to Patagonia, in a variety of habitats (Nowell *et al.*, 1996; Silveira, 1995). Based on morphological characteristics, between 8 and 11 subspecies are currently recognized (García-Perea, 1994; Nowell *et al.*, 1996; Wozencraft, 2005) and the scission of this taxon into three different species was proposed by García-Perea (1994): *L. colocolo* for populations distributed on the western slope of the southern Andes; *L. pajeros* distributed along the Andes; and *L. braccatus* found to the east of the Andes, in Brazil, Uruguay and Paraguay. Previous studies performed on mitochondrial genome (Johnson *et al.*, 1999; Napolitano *et al.*, 2008) also revealed that the Andean pampas cat



populations are genetically structured and may have experienced significant and lengthy periods of isolation and reduced gene flow.

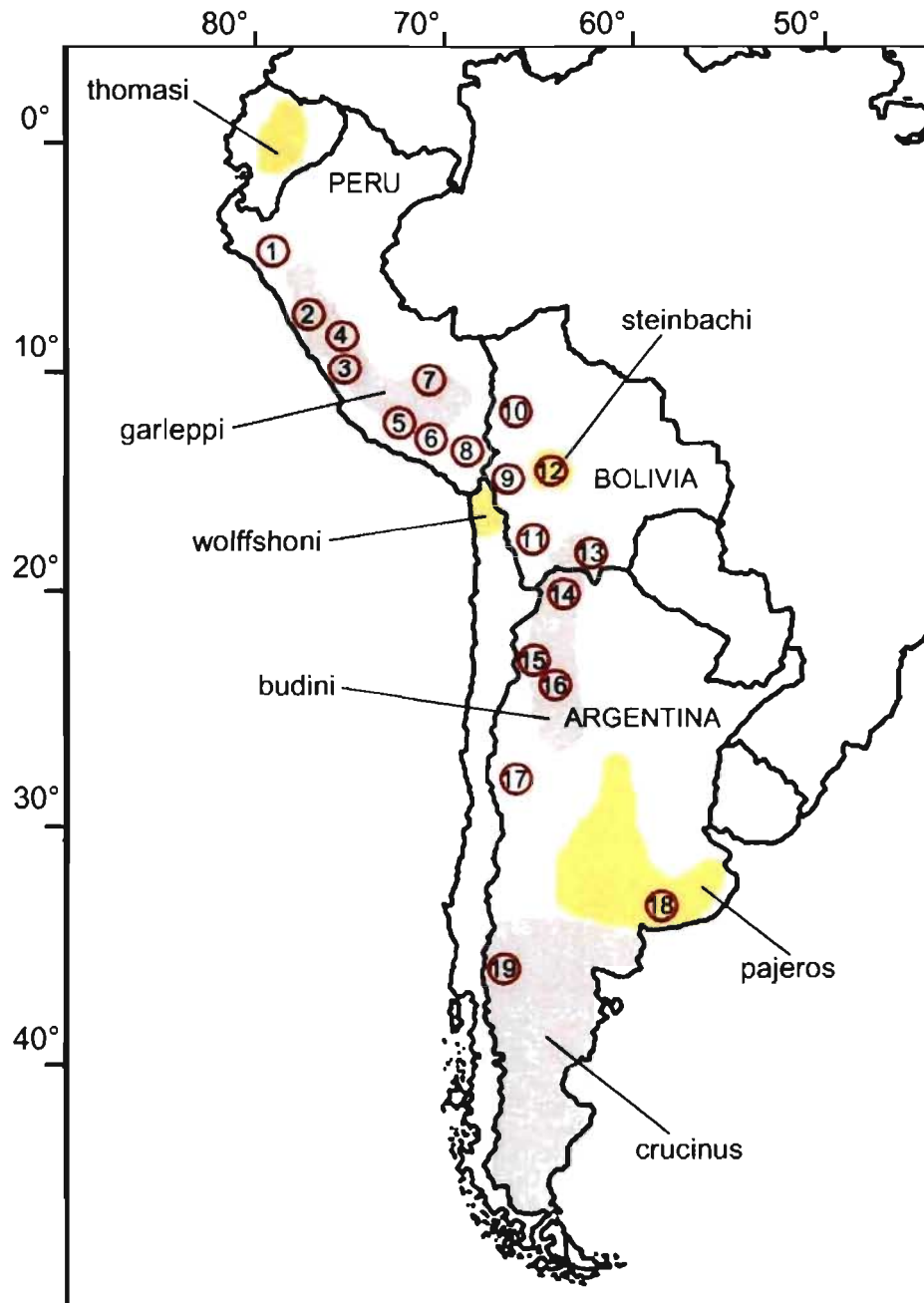
In spite of its wide distribution, the pampas cat is one of the less known felids (Nowell, 2002b) and its status is affected by a variety of threats, comprising habitat loss and fragmentation, hunting for traditional reasons and decline of prey populations (Villalba *et al.*, 2004; Cossíos *et al.*, 2007b). Lack of evaluation of its conservation status through its range causes the pampas cat to be considered as vulnerable (Nowell, 2002a) and to be included in the IUCN Near Threatened (NT) category (de Oliveira *et al.*, 2008).

The aim of the present study was to link the genetic diversity of the pampas cat throughout the central Andes to ancient climate fluctuations. To address this objective, the genetic structure of the pampas cat in 19 localities over a distance of more than 4000 km was inferred with both mitochondrial and nuclear genomes, using non-invasive sampling.

## **Methods**

### **Study localities and sampling**

A total of 39 skin samples and 532 faecal samples from 19 localities were analysed (Figure 1; Table 1). Samples were collected in the Andes of Argentina, Bolivia and Peru, covering more than 4350 km from 06°13'S to 41°07'S, with the exception of 5 tissue samples collected in the Argentine Pampas lowland of Buenos Aires province. Faecal samples were collected opportunistically in the field and kept in paper bags surrounded by silica gel in excess or in vials with ethanol for their transportation to the laboratory (Wasser *et al.*, 1997). Once in the laboratory, samples were kept at -20°C, without silica gel, until DNA extraction. Skin samples were taken from stuffed animals owned by villagers or from museum specimens. For skin samples, approximately 0.5-1 cm<sup>2</sup> was cut from the ear or, if that was not possible, from other areas, and kept in individual paper bags, in dry and cool conditions (Cossíos *et al.*, 2007a).



**Figure 1.** Pampas cat sampled localities. The locality numbers correspond to those in Table 1. The grey and yellow areas refer to the approximate distribution of the pampas cat subspecies mentioned in this research, as proposed by García-Perea (1994).

**Table 1.** Sampled localities, geographical coordinates and sample sizes. After the total number of pampas cat samples, number of skin samples is indicated in parentheses. Number of individuals as identified from microsatellite data.

<i>Locality</i>	<i>Coordinates</i>		<i>samples</i>	<i>individuals</i>
	S	W		
1-Lambayeque	06°13'	79°20'	3 (1)	3
2-Ancash	09°33'-10°12'	76°56'-77°23'	38 (1)	19
3-Yauyos / Canchayllo	11°50'-12°07'	75°41'-76°01'	40 (1)	19
4-Junin National Reserve	11°00'	76°07'	27 (2)	12
5-Ayacucho	13°45'-15°00'	73°46'-74°03'	15 (3)	8
6-Arequipa	15°06'-15°41'	70°40'-72°40'	8 (1)	6
7-Cuzco	13°47'	71°14'	1 (1)	1
8-Tacna / Puno	16°36'-17°25'	69°25'-70°03'	19 (19)	19
9-La Paz / Oruro	17°08'-18°26'	68°07'-69°22'	24	12
10-Apolobamba	14°45'	69°00'	2	2
11-Potosi	20°05'-22°09'	67°14'-67°53'	32	15
12-Cochabamba	17°35'	66°24'	3	3
13-Tarija	21°08'	65°04'	2 (2)	2
14-Jujuy	21°57'-23°04'	66°03'-66°18'	58	28
15-Catamarca / Salta	25°13'-26°39'	66°43'-67°39'	35	30
16-Tucuman	26°30'	65°48'	6	5
17-San Juan / Mendoza	29°10'-35°59'	69°21'-69°49'	8	7
18-Buenos Aires	38°10'-38°49'	62°16'-63°15'	5 (5)	5
19-Pilcaniyeu	41°7'	70°40'	3 (3)	3
Total			329 (39)	199

### **DNA extraction**

DNA from skin samples was isolated by the standard method of proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction and precipitation with ethanol (Sambrook *et al.*, 1989). DNA from faeces was isolated with the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions, with the following two modifications: i) instead of 180–220 mg, from 200 to 500 mg of the superficial faecal material was used per sample, and ii) the ASL buffer was heated to 70°C before being added to the samples. To prevent and monitor the contamination of the samples during the laboratory processes, pre-PCR and post-PCR activities were carried out in different laboratories and negative controls were included in each batch of extraction and amplification (Kohn, Wayne, 1997; Taberlet *et al.*, 1999).

### **Species identification**

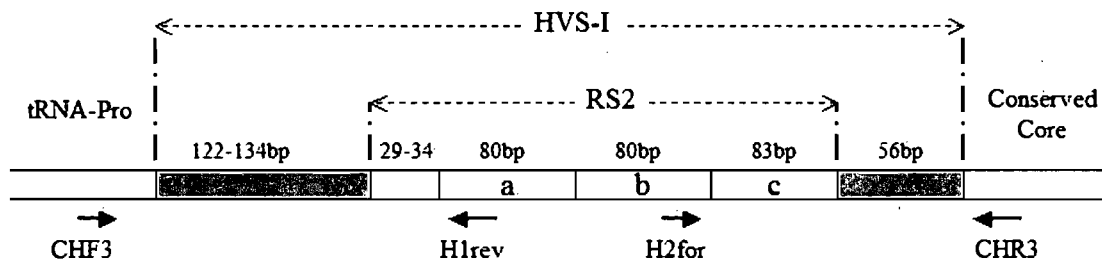
Faecal samples were identified to the species level by a PCR-RFLP method (Cossios, Angers, 2006). Briefly, a segment of 257-263bp of the *16S* mitochondrial gene was amplified by PCR and the product was exposed to the action of several restriction enzymes, resulting in species-specific fragment profiles which can be visualised on agarose gel.

### **MtDNA**

The hypervariable domain 1 (*HVS-I*) of the mtDNA control region was selected because it is a non-coding sequence that is expected to display high polymorphism within felid species (Eizirik *et al.*, 1998; Eizirik *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004). Because DNA from faeces and ancient tissues is often degraded (Lindahl, 1993; Frantzen *et al.*, 1998) and prevents the amplification of the complete *HVS-I*, primers were designed to amplify two short segments on the *HVS-I*. In order to design these primers, the complete *HVS-I* region was amplified using fresh tissues from four Peruvian pampas cats with the primers CH3F and CH3R developed by Freeman *et al.* (2001). Both strands were sequenced with a CEQ 8000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.). These sequences were aligned with the *HVS-I* region of domestic cat (Gene Bank accession number NC001700), cheetah *Acinonyx*

*jubatus* (NC005212), margay *Leopardus wiedii* (AF129663S1-2) and ocelot *Leopardus pardalis* (AF129645S1-2) using the program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Finally, sequences conserved among species were used to design the felid-specific primers H1rev (5'-CCTGTACATGCTTAATATTC-3') and H2for (5'-ACATAYTATGTATATCGTGC-3') which provide PCR products smaller than 300 bp when used with CH3F and CH3R primers, respectively (Figure 2).

Amplification reactions were carried out in a volume of 12.5µl containing a final concentration of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP and 0.8 pM of each primer, 0.8 mg/ml of BSA, 0.2 unit of Taq DNA polymerase, and approximately 20 ng of template DNA. PCR conditions included an initial denaturing step at 92°C for 2 min, 45 cycles of 92°C for 15 s, 52°C for 15 s, and 68°C for 30 s, and a final extension step at 68°C for 5 min. Mitochondrial DNA variation was detected using single-strand conformation polymorphism (SSCP; Orita *et al.*, 1989). The amplified products were electrophoresed on a 6% nondenaturing gel for 11h 30' at 20 W in 0.5x TBE (Angers, Bernatchez, 1998) and visualized using silver nitrate staining (Bassam *et al.*, 1991). A band was sliced from the gel for each of the different observed conformers and placed in a volume of 35µl of HPLC-grade water overnight. 2µl of the dissolved DNA were used for amplification, and the products were sequenced. Because H1rev and H2for primers fit on a sequence of repeated tandems, called RS2 (Lopez *et al.*, 1996; Figure 2), the product amplified with the CH3F-H1rev pair of primers was sequenced only in the forward direction, while that amplified with the H2for-CH3R primers was sequenced only in reverse. When possible, at least two individuals from different populations were sequenced for each observed conformer, to confirm the reliability of the SSCP protocol.



**Figure 2.** Pampas cat hypervariable sequence I (HVS-I). The position of the primers used in this study is shown. In this example, the repeated sequence 2 (RS2) contains three tandem repeats named here a, b and c. Although the primer H1rev anneals on the a, b and c repetitions and the primer H2for anneals on the a and b repetitions, only their positions on the sequences used in this research are shown.

The mitochondrial genes *NADH-5* (318 bp) and *ATP-8* (191 bp) were sequenced for a sub-sample of 19 individuals, using the primers developed by Johnson *et al.* (1998), to compare the phylogenetic relationships of the sampled individuals with pampas cats from other regions (Johnson *et al.*, 1998; Napolitano *et al.*, 2008). *HVS-I*, *NADH-5* and *ATP-8* sequences have been deposited in GeneBank (accession numbers FJ648644-84, FJ664428-46 and FJ664409-27, respectively).

### **Microsatellites**

Five microsatellite loci isolated from domestic cats (Fca24, Fca31, Fca45, Fca96 and Fca294; Menotti-Raymond *et al.*, 1999) were amplified and screened on acrylamide gels. Amplification reactions were carried out for all the pampas cat samples, with the same PCR conditions indicated above for the mtDNA. For the faecal samples, amplification and screening was made three times, following the multiple tube approach (Taberlet *et al.*, 1996) and only the samples showing concordant results were used for data analysis.

### **Data analysis**

Measures of population genetic diversity, including nucleotide diversity ( $\pi$ ) and haplotype diversity ( $hd$ ; Nei, 1987) were estimated from mtDNA sequences using the computer program ARLEQUIN 2.00 (Schneider *et al.*, 2000). Exact tests of population differentiation (Raymond, Rousset, 1995a) with a 10000 Markov chain, and estimations of  $F_{ST}$  between pairs of localities (Weir, Cockerham, 1984) were performed with the same software.

The phylogenetic relationships of the aligned sequences were analysed by distance (neighbour joining, NJ; Saitou, Nei, 1987) and maximum likelihood (ML) methods using the program PAUP 4.01b (Swofford, 1993). Gaps were treated as single haplotype variants. After an election using MODELTEST 3.7 (Posada, Crandall, 1998), the Tamura-Nei model (Tamura, Nei, 1993) was used for NJ and ML analyses, assuming a gamma distribution for substitution rates across sites. Node support was assessed using 1000 bootstrap replicates. Sequences of the equivalent control region segment from two

ocelots and two margays were used as outgroups. To assess the extent of differentiation among regions and sampled localities, we performed an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), with  $\Phi$ -statistics, using ARLEQUIN 2.00 (Schneider *et al.*, 2000), with statistical significance tested using 10000 permutations. Several groupings were tested with AMOVA, and the grouping that maximized differentiation among regions and minimized differentiation among localities within regions was assumed to represent to the most parsimonious geographical subdivisions.

To estimate the divergence times between different groups, we considered the *HVS-I* region, a divergence time of 2.91 MY between the pampas cat and the ocelot and the margay, with a confidence interval between 2.02 and 4.25 MY (Johnson *et al.*, 2006), and the mean Tamura-Nei molecular distances between haplotypes of the identified clades as calculated in ARLEQUIN 2.00. All the identified haplotypes were used for each clade. Regions corresponding to deletions or insertions in different species were not considered for this analysis.

For each microsatellite genotype, the probability that two samples with the same genotype represent two different individuals was calculated from the allele frequencies in each sampled locality (Paetkau, Strobeck, 1994). To obtain the value for the complete genotype, probabilities for each locus were multiplied, assuming independence of loci, as supported by the linkage map of microsatellite loci in the domestic cat (Menotti-Raymond *et al.*, 1999).

Measures of expected heterozygosity ( $H_E$ ) and number of alleles ( $k$ ) were estimated using the computer program ARLEQUIN 2.00 (Schneider *et al.*, 2000). Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each sampled locality with the method developed by Guo & Thompson (1992) using GENEPOP 3.4 (Raymond, Rousset, 1995b). The population structure was examined for the microsatellite data by a Bayesian clustering method, using STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000), with a 100000 burn-in period and 50000 MCMC repetitions, to infer the number of populations ( $K$ ) and to assign individuals to inferred population clusters. We performed 10 independent runs for each



value of  $K$ , from 1 to 10. The number of populations best fitting our data set was defined both using the mean value of the log probabilities [ $\Pr(X/K)$ ] for each  $K$  value, and the most positive  $\Delta K$  (Evanno *et al.* 2005). Additionally, a neighbour-joining phylogenetic tree of the sampled localities with five or more individuals was constructed with the program POPULATIONS 1.2.28 (Langella, 2002) with the microsatellite data, using Dce distances (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) and 200 bootstraps on locus. As for the mtDNA data, AMOVA was performed on several groupings to test the population structure.

## Results

### **Species identification and mtDNA variability**

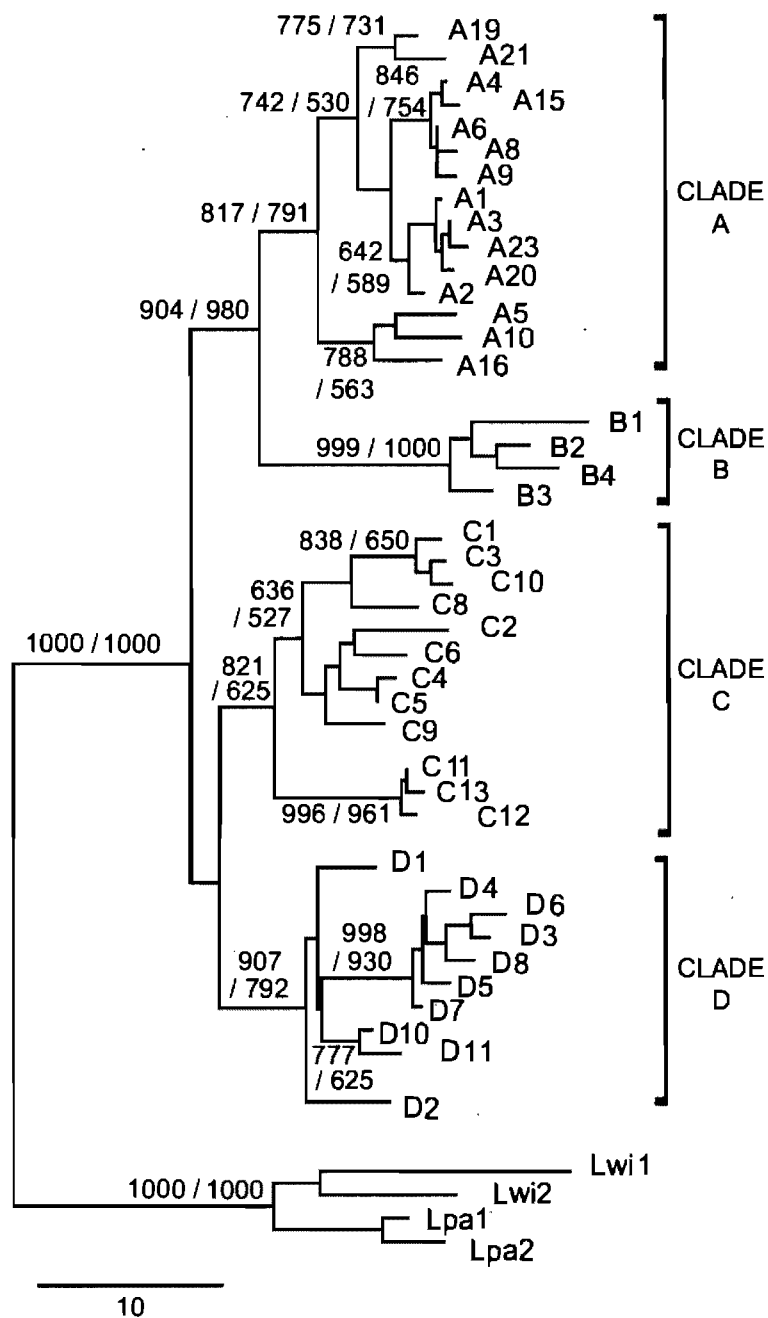
Of the 532 faecal samples analysed, 406 were unambiguously assigned to pampas cats according to the mtDNA *16S* region. The remaining samples were assigned to Andean cats *Leopardus jacobita* (40), domestic cats (11) or canid species (32). A small number of faecal samples (43) failed to be amplified and could not be identified. All skins were assigned to pampas cats.

The length of both control region segments combined varied between 336 and 351bp. Two variable mononucleotide repeats (T)<sub>3-7</sub> (C)<sub>3-11</sub> were identified but not considered for the analyses. Without considering the RS2 region composed of a variable number of large tandem repeats, the pampas cat *HVS-I* region contains between 178 and 190bp (Figure 2). The range known for other felid species is 231-245bp (Lopez *et al.*, 1996; Eizirik *et al.*, 1998; Burger *et al.*, 2004).

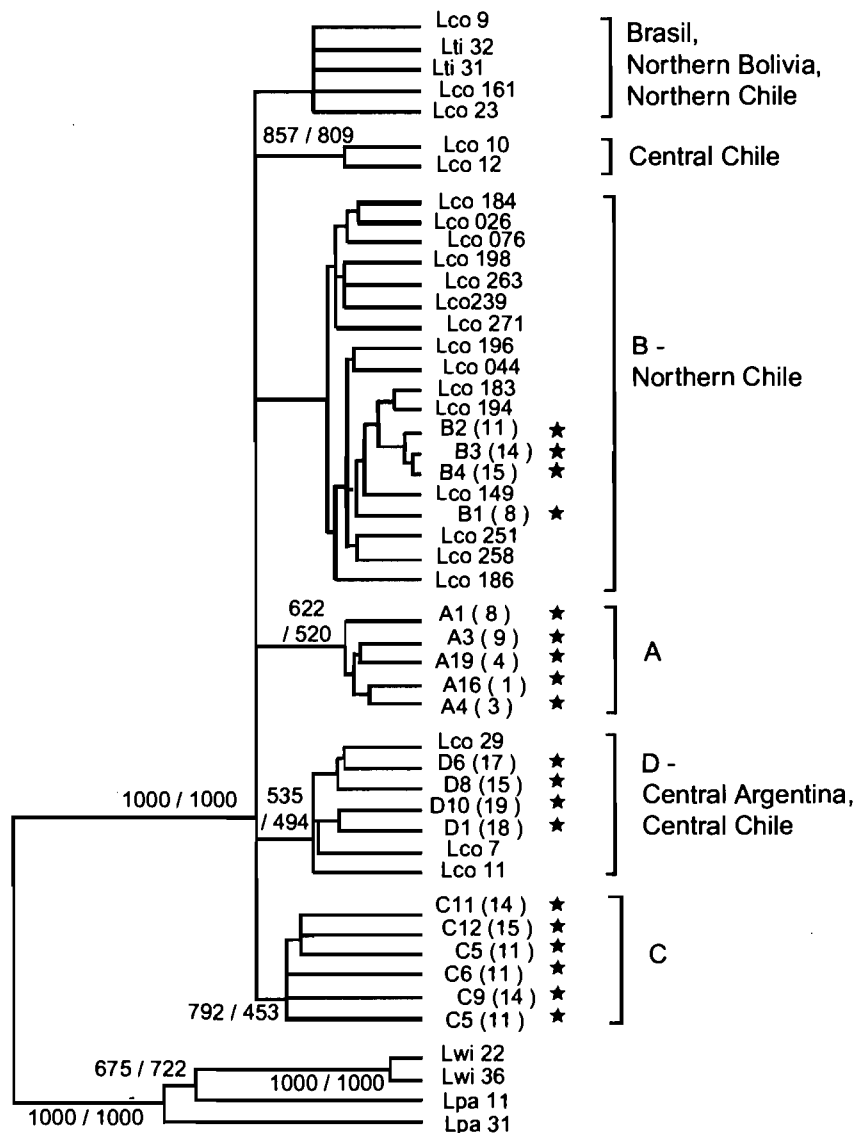
The SSCP results revealed a single allele per sample, excluding the presence of mtDNA sequences transferred into the nuclear genome (Numts; Lopez *et al.*, 1996). The SSCP survey of the 406 samples and the sequencing revealed a total of 41 *HVS-I* haplotypes and 94 variable sites. Phylogenetic relationships inferred among these haplotypes were consistent for both NJ and ML methods. The haplotypes clustered into

four major clades, named hereafter A to D, strongly supported by bootstrap values (Figure 3). However, relationships among clades were not completely resolved.

Sequencing of the *NADH-5* and *ATP-8* genes revealed 29 sites of additional variation for the 19 individuals selected from our sample. These individuals were selected randomly, with the constraints of choosing individuals with different *HVS-I* haplotypes and covering all the major *HVS-I* clades. The phylogenetic tree inferred using both the *NADH-5* and *ATP-8* genes was fully congruent with the one performed with *HVS-I* and allowed the four major clades to be recovered, while the resolution was lower. When individuals from previous studies (Johnson *et al.*, 1998; Napolitano *et al.*, 2008) were included into the present dataset, a total of 41 variable sites was detected for *NADH-5* and *ATP-8* genes. Most of these additional individuals clustered within clade B (15) and D (3) (Figure 4) while individuals geographically distant from the Andean region, located in central Chile and Brazil, formed two additional clades. Interestingly, individuals presenting *HVS-I* haplotypes of the clades A and C formed two clusters not identified by previous studies.



**Figure 3.** Neighbour-joining tree of the observed HVS-I sequences. Labels correspond to haplotype identification numbers. Only bootstrap values over 50% of 1000 bootstraps are shown, corresponding to the NJ / ML analyses. Two ocelots (Lpa1 and Lpa2) and two margays (Lwi1 and Lwi2) were used as outgroups. Scale bar represents an interval of Tamura-Nei genetic distance.



**Figure 4.** Neighbour-joining tree of the combined observed NADH-5 – ATP-8 sequences. Sequences obtained in this study are marked with a star and their labels indicate their haplotype and, between parentheses, their localities. Additional sequences from Chile, Bolivia and Brasil were previously released by Johnson *et al.* (1998) and Napolitano *et al.* (2008), and their labels correspond to individual identification numbers. For each cluster, the correspondent clades of the HVS-I are indicated for the individuals sequenced in this research, as well as the geographical origin of the samples analysed by the other authors. Only bootstrap values over 50% of 1000 bootstraps are shown, corresponding to the NJ / ML analyses. Two ocelots (Lpa11 and Lpa31) and two margays (Lwi22 and Lwi36), from Johnson *et al.* (1998), were used as outgroups.

### **Individual identification and population diversity**

Microsatellite amplifications provided results for 290 (71%) of the 406 pampas cat faecal samples and for the 39 skin samples (100%) for a total of 329 samples. The microsatellites were highly variable, with 10-21 alleles per locus (Table 2) and the probability of sampling two different individuals with the same genotype ranged between  $4.80 \times 10^{-3}$  and  $2.88 \times 10^{-16}$ . Unique multilocus genotypes were recorded for 99 faecal samples (30%). However, in several cases, two or more samples displayed the very same multilocus genotype indicating that the same individual had been sampled several times. According to the low probability of obtaining the same genotype in different individuals, samples with the same genotype were assigned to a unique individual, providing a final sample size of 199 pampas cat individuals. The number of individuals per locality varied from 5 to 30, except for 6 localities that had a sample size of 4 individuals or less (Table 1). Localities with sampling size lower than four individuals were not included in the following analyses, unless mentioned in the text.

The total number of alleles per population ranged from 17 to 48 (Table 2), but was correlated to sampling size (Pearson's  $r = 0.915$ ,  $P < 0.0001$ ). The total number of alleles estimated for 5 individuals per population (allelic richness, FSTAT 2.9.3; Goudet, 1995) ranged from 17.16 to 24.85, showing little variation between populations. The expected heterozygosity ranged from 0.35 to 0.93 (Table 2) and was not correlated to sampling size ( $r = 0.013$ ,  $P = 0.960$ ). None of the localities displayed deviation from HW expectations, indicating that no more than one population was sampled per locality.

For the mtDNA control region, the number of haplotypes per population ranged from 2 to 14 (Table 2) and was also correlated to sampling size ( $r = 0.884$ ,  $P < 0.0001$ ). Haplotype diversity values ranged from 0.60 to 0.93 between the sampled localities, and nucleotide diversity varied by one order of magnitude between 0.0059 and 0.0519.

**Table 2.** Haplotype and microsatellite diversity in pampas cat. The locality numbers correspond to those on the Table 1. Mean values were calculated with the localities with more than 4 individuals only. Total values were calculated for the entire sample. n = sample size; H = number of haplotypes; hd = haplotype diversity; S = number of polymorphic sites; P = percentage of variable sites;  $\pi$  = nucleotide diversity; k = number of alleles;  $H_E$  = expected heterozygosity.

Locality	mtDNA ( <i>HVS-I</i> )						Microsatellites										
	n	H	hd	S	P	$\pi \times 100$	Fca24		Fca31		Fca45		Fca96		Fca294		Total
							k	He	k	He	k	He	k	He	k	He	
1	3	1	0	0	0	0	2	0.73	3	0.60	3	0.73	2	0.33	2	0.60	12
2	19	5	0.59	9	2.64	0.96	6	0.49	5	0.69	9	0.74	6	0.58	9	0.78	35
3	19	6	0.81	9	2.64	0.95	4	0.57	6	0.68	8	0.80	9	0.93	7	0.81	34
4	12	5	0.83	13	3.82	1.46	6	0.64	6	0.75	4	0.70	5	0.59	4	0.70	25
5	8	5	0.86	13	3.82	1.25	4	0.65	8	0.84	5	0.63	5	0.68	6	0.77	28
6	6	5	0.93	9	2.64	1.41	3	0.59	6	0.80	5	0.77	5	0.74	5	0.68	24
7	1	1	0	0	0	0	2	1.00	1	0.00	2	1.00	1	0.00	2	1.00	8
8	19	8	0.91	42	12.3	2.6	4	0.56	6	0.75	6	0.74	7	0.76	8	0.87	31
9	12	8	0.92	24	7.06	2.26	4	0.42	5	0.74	6	0.72	7	0.76	7	0.85	29
10	2	1	0	0	0	0	2	0.50	3	0.84	3	0.84	2	0.67	3	0.84	13
11	15	7	0.88	58	17.06	5.2	5	0.62	7	0.71	3	0.45	5	0.74	5	0.36	25
12	3	2	0.67	11	3.23	2.17	4	0.87	4	0.80	2	0.33	3	0.73	3	0.60	16
13	2	1	0	0	0	0	2	0.50	3	0.84	2	0.50	3	0.84	1	0.00	11
14	28	14	0.9	67	19.7	5.18	7	0.68	7	0.67	8	0.70	8	0.86	7	0.35	37
15	30	14	0.8	66	19.41	4.59	7	0.69	12	0.67	9	0.73	8	0.81	12	0.82	48
16	5	4	0.9	38	11.2	4.76	5	0.89	3	0.61	2	0.25	3	0.55	4	0.79	17
17	7	4	0.81	22	6.47	3.25	4	0.74	6	0.86	4	0.75	6	0.74	5	0.79	25
18	5	2	0.6	8	2.35	1.4	3	0.69	5	0.82	4	0.76	4	0.53	4	0.78	20
19	3	2	0.67	3	0.88	0.59	3	0.73	2	0.33	4	0.87	5	0.93	3	0.73	17
Mean values	14.23	6.69	0.83	29.08	8.55	2.71	4.77	0.63	6.31	0.74	5.61	0.67	6	0.71	6.38	0.72	29.08
Total	199	41	0.94	94	27.65	6.09	10	0.79	21	0.89	15	0.88	14	0.83	14	0.79	74

### **Population structure**

The best value of the  $\ln \Pr(X | K)$  obtained with the program STRUCTURE on microsatellite data corresponded to  $K = 3$  population groups. These groups included the localities (2-6, 8, 9), (11, 14) and (15-18). Relationships among populations inferred from the microsatellite data supported this grouping, although bootstrap values between populations 2-6, 8 and 9 were low (Figure 5A). AMOVA analysis also supported this structure as the one displaying the highest variation among groups on either mitochondrial or microsatellite data (Table 3).

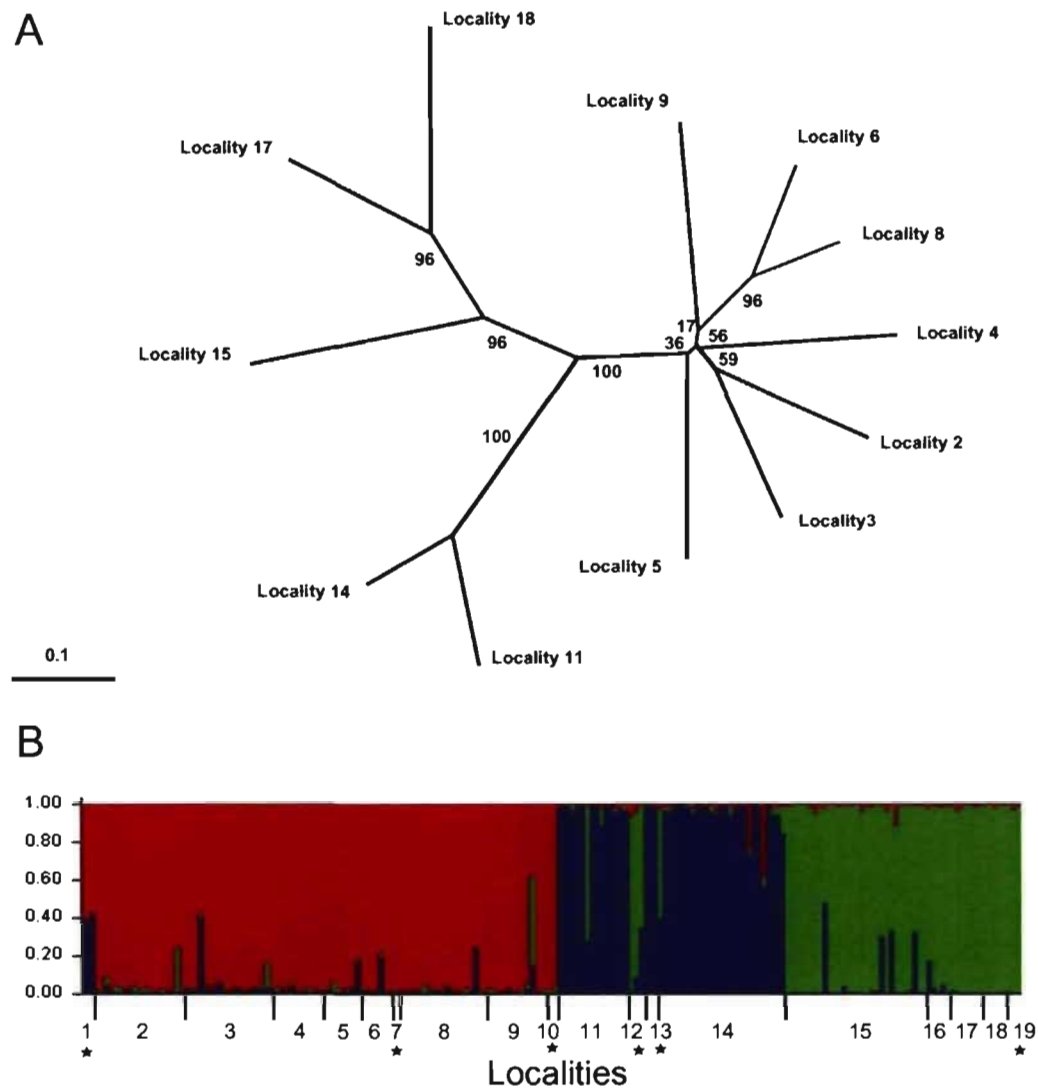
The distribution of the groups of populations appeared to be clearly correlated to latitude (Figure 6). The first group occupies the area north to 18°S and is formed almost exclusively by individuals of the clade A. The second group, distributed between 20° and 23°S, presents a great proportion of individuals of clade C, although clades B and D are present too. The third group, distributed south to 25°S, contains principally clade D individuals, with some clade B and C individuals in its northern region. The northernmost and the southernmost sampled localities are represented by private haplotypes of the clades A and D, respectively.

Including all localities did not modify the results provided by STRUCTURE: (1-10), (11, 13-14) and (12, 15-19) (Figure 5B) and the population structure remains strongly correlated to geography except for population 12. While geography and mtDNA data suggested including this population in the group (11-13-14) (Figure 6), the microsatellite data suggested a closer affiliation with the southernmost group (15-19) (Figure 5B).

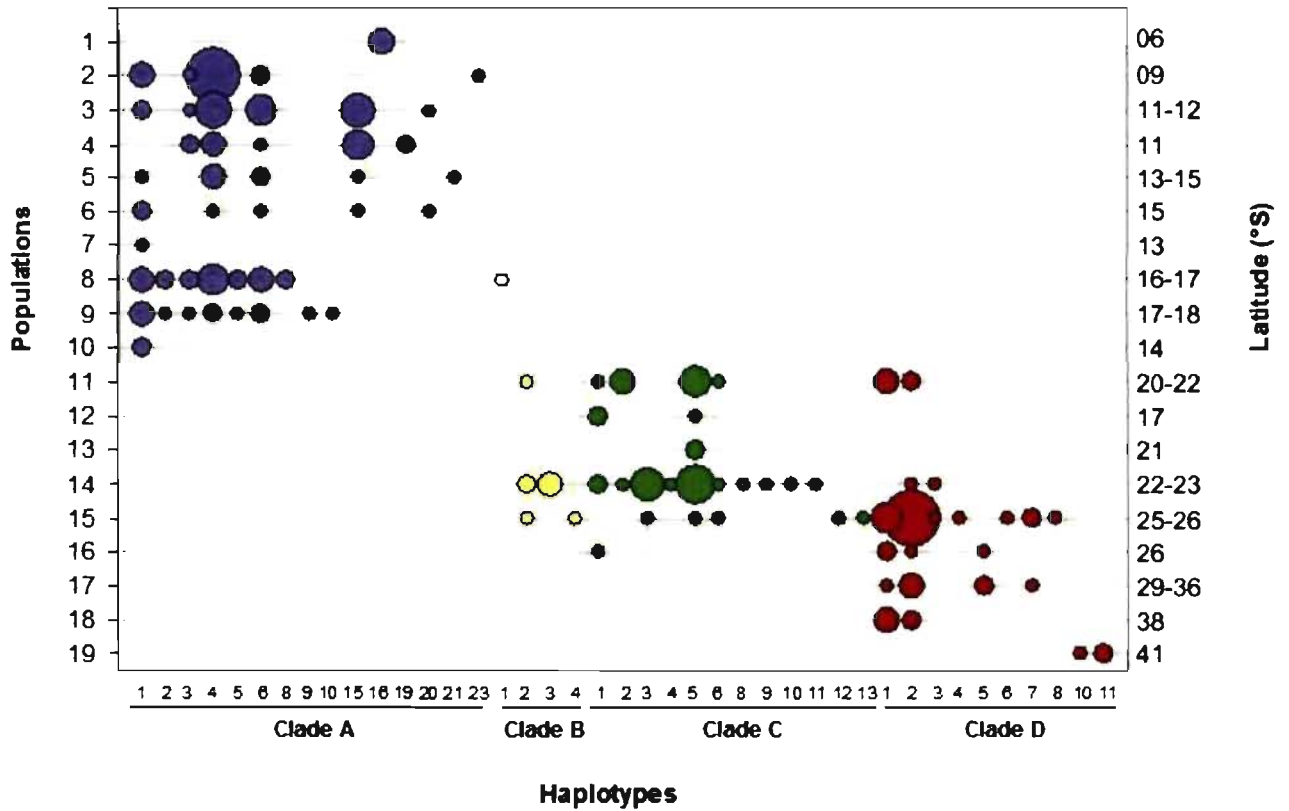
**Table 3.** AMOVA results for groupings of populations. Analyses were performed on mtDNA haplotypes using  $\Phi$ -statistics or microsatellite data using  $R_{ST}$ -statistics and distances. Localities with less than 5 individuals were not included. P-value was less than 0.001 for all the results.

Groupings	% of variation by source		
	Among groups	Among populations / within groups	Within populations
mtDNA			
[2-6, 8, 9] [11, 14-18]	58.2	7.16	34.64
[2-6, 8, 9] [11, 14] [15-18]	62.15	0.22	37.63
[2-6, 8, 9] [11, 14, 15] [16-18]	57.63	5.44	36.93
Microsatellites			
[2-6, 8, 9] [11, 14-18]	8.1	30.24	61.66
[2-6, 8, 9] [11, 14] [15-18]	43.85	0.93	55.22
[2-6, 8, 9] [11, 14, 15] [16-18]	18.42	21.86	59.72





**Figure 5.** Population structure inferred from microsatellite data. **A:** Neighbour-joining phylogenetic tree of the sampled localities with five or more individuals, constructed using Dce distances and 200 bootstraps on locus. **B:** Membership coefficients inferred with the program STRUCTURE (Pritchard *et al* 2000) for  $K = 3$ . Each individual is represented by a column and each of the three inferred population groups is represented by a colour. A star indicates localities with less than five individuals, that were not included in the neighbour joining tree showed in (A).



**Figure 6.** HVS-I haplotypes distribution and frequencies. Diameter of circles are proportional to the number of individuals. Numbers assigned to the haplotypes correspond to those on Figure 4.

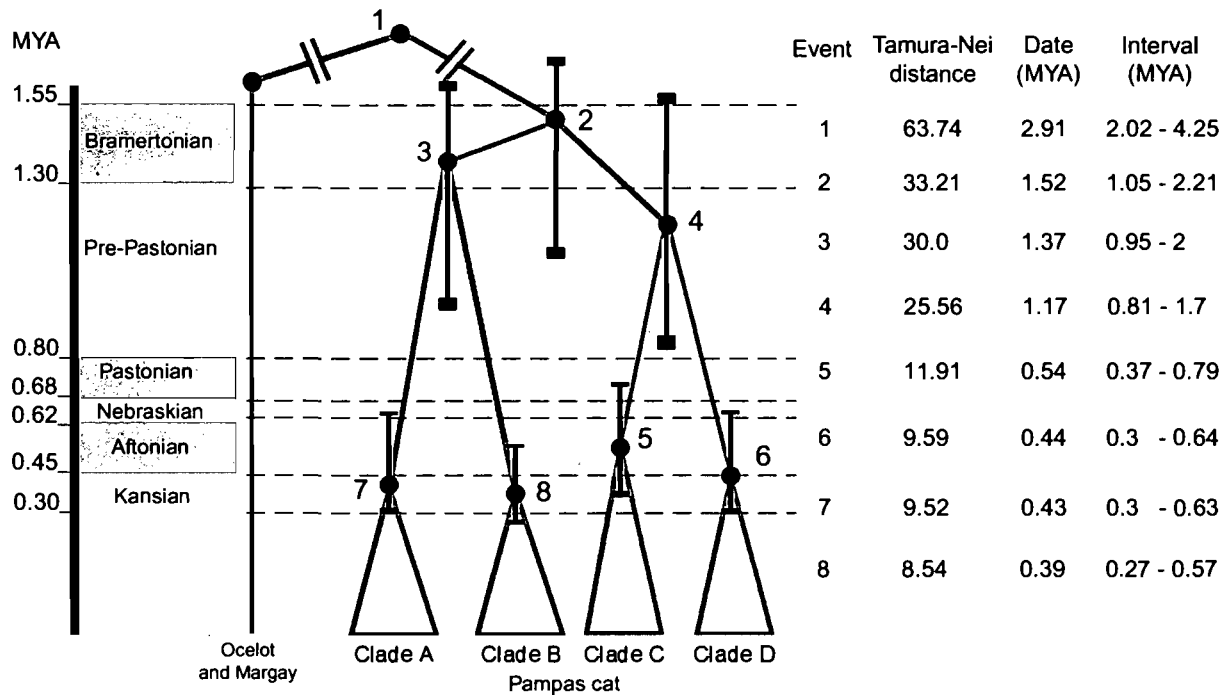
### **Evolutionary and demographic history**

Based on the *HVS-I* sequences, the coalescence times of the clades [A, B, C and D], [A - B], and [C - D] were estimated to 1.52 MY ago (with a confidence interval from 1.05 to 2.21 MYA), 1.37 MY ago (0.95 – 2) and 1.17 (0.81 – 1.7) MY ago respectively. Interestingly, the radiation of the clades A, B, C and D occurred almost simultaneously, with coalescence times of 0.43, 0.39, 0.54 and 0.44 MY ago, respectively. The results for Tamura-Nei distances between clades, coalescence times and confidence intervals are presented in Figure 7.

## **Discussion**

### **Genetic diversity**

Previous research has shown that pampas cats present a high genetic diversity at the species level (Johnson *et al.*, 1999). Results of the present study indicate that a large diversity is also present at populations level and that it is comparable to other non-endangered felid species, like the ocelot and margay (Eizirik *et al.*, 1998). Although we reported a higher *HVS-I* genetic diversity for some pampas cat populations ( $P = 2.35 - 19.70$ ; Table 2) than for those species ( $P = 3.71 - 14.73$ ; Eizirik *et al.*, 1998) this can be explained by bigger samples and the presence of highly divergent clades in the most diverse pampas cat populations (Figure 6).



**Figure 7.** Divergence times between pampas cat clades and their correspondence with glacial and interglacial periods. Values were estimated considering a divergence time of 2.91 MY between the pampas cat and the ocelot and the margay, with a confidence interval between 2.02 and 4.25 MY, as estimated by Johnson *et al.* (2006). Interglacial periods are highlighted in grey.

## **Genetic structure and geographic distribution**

Along the Andean region, analysis of mitochondrial and nuclear genomes revealed the presence of three groups of populations. These groups show a strong geographical structure, with latitudinal separations at 18°-20°S and 23°-25°S. Including results of previous studies based strictly on mitochondrial DNA indicated the existence of a fourth group in northern Chile (Napolitano *et al.*, 2008), as well as the two groups out of the Andean region, in Brazil and central Chile (Johnson *et al.*, 1999). This genetic structure roughly corresponds to the distribution of morphological subspecies described by García Perea (1994). Two of the museum samples, both from locality number 8, were identified as *L. c. garleppi* using the descriptions done by García-Perea (1994), although it was not possible to directly assign a genotype to a morphotype for other localities due to the nature of the samples. However, according to the type localities of the described subspecies, the pampas cat groups can be equivalent to *garleppi* (Clade A, 9°-18°S), *budini* (20°-23°S), *pajeros* (25°-38°S) and *wolffshoni* (Clade B northern Chile) subspecies (Figure 8).

The geographical location of populations 12 and 19 coincides with the subspecies *steinbachi* and *crucinus*, respectively, while population 1 is located between the supposed distribution ranges of *thomasi* and *garleppi* (Figure 8). These three localities are characterized by private *HVS-I* haplotypes or ncDNA that differs from those of adjacent populations, and had samples of only 3 individuals. Since a small sample size per locality can affect the results of the STRUCTURE program (Bamshad *et al.*, 2003) and other analyses, the correspondence between these localities and subspecies needs to be validated by further investigations. The further assignation of these localities to subspecies can be of conservation value since many authors (i.e. Johnson *et al.*, 1999; Wozencraft, 2005) do not recognise *steinbachi* and *crucinus* as valid taxa.

The Andean area between 18° and 23°S, approximately, corresponds to an extremely arid belt that separates a northern area, with summer rains, from a southern one, with winter rains (Ammann *et al.*, 2001; Kull *et al.*, 2002). This zone is considered to be a barrier between subspecies of other land mammals such as the vicuna *Vicugna*

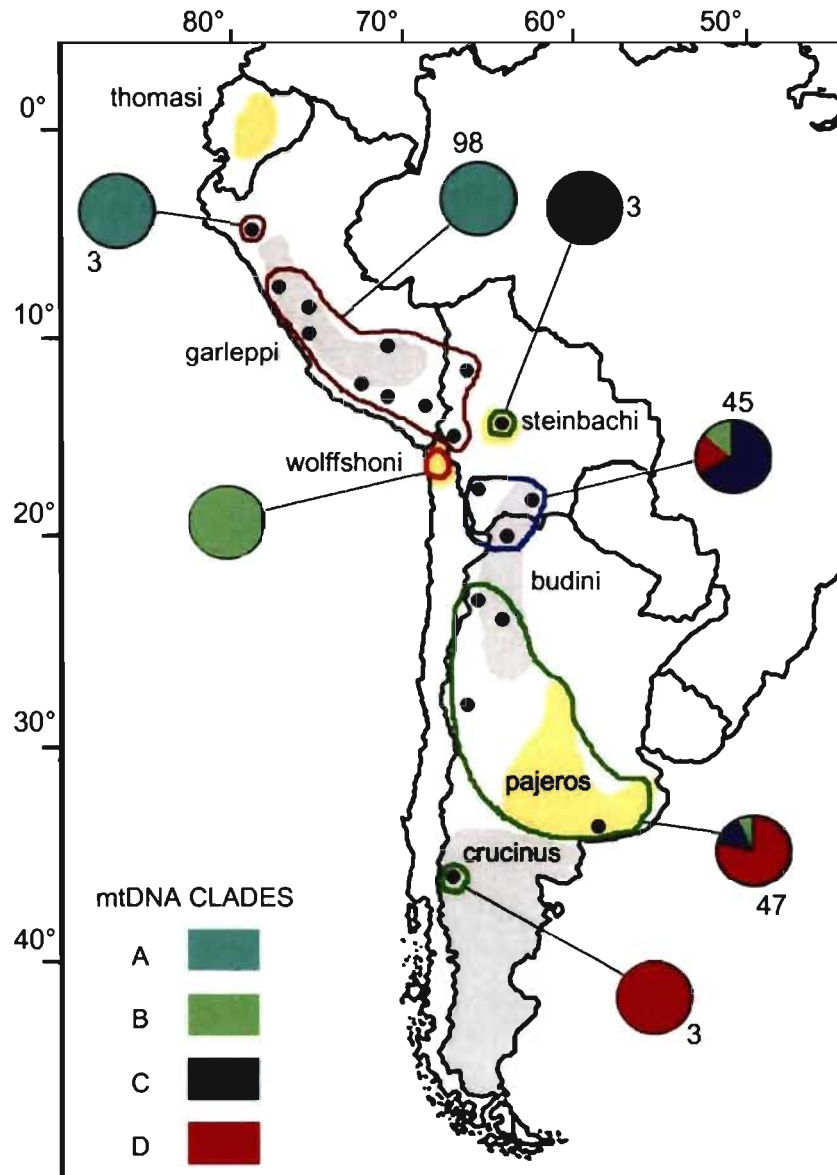
*vicugna* (Marin *et al.*, 2007) and the lesser grison *Galictis cuja* (Yensen, Tarifa, 2003), and represents a distribution limit for other species, like the long-tailed weasel *Mustela frenata* (Sheffield, Thomas, 1997). In contrast, the genetic structure of the puma *Puma concolor* from the high Andes is not affected by this barrier (Ruiz-García *et al.*, 2008), probably due to a higher dispersal capacity. The pampas cat populations distributed between 18°S and 25°S display three different phenotypes (García-Perea, 1994) and an important admixture of the clades typical of adjacent areas, suggesting that the arid belt is a contact zone.

### **Influence of Pleistocene**

The topology of the mtDNA trees enabled us to infer two periods of prime importance for the demographic history of the pampas cat. The lack of resolution for the relationships between pampas cat clades (as well as among haplotypes within clades) suggests a rapid radiation.

A first episode comprised the split of the clades A, B, C and D and occurred between the end of the Bramertonian Interglacial (1.30 – 1.55 MYA) and the beginning of the Pre-Pastonian glacial period (0.80 – 1.30 MYA; Figure 7). The Pre-Pastonian corresponds with the most extensive glaciations in southern South America (Mercer, 1976). This period also coincides with the estimated date of the divergence between the major clades of the Andean bird genus *Muscisaxicola* (Chesser, 2000), suggesting this period as an important phase in the diversification of the Andean fauna.

The very similar coalescence times of the current haplotypes of the clades A, B, C and D suggest these events took place simultaneously, during a second demographic episode. These splits were likely to be the result of demographic expansions caused by geographically extended phenomena associated with climate change. The calculated mean time for these events overlapped with the end of the Kansan glacial period (0.30 – 0.45 MYA) and the Aftonian interglacial (0.45 – 0.62 MYA), the interglacial period being the more likely moment of occurrence for these demographic events (Figure 7).



**Figure 8.** Distribution of the seven Management Units (MUs) proposed for the pampas cat in the Andean and Argentinean pampas regions, as defined by mtDNA and microsatellite analysis. The proportion of the mtDNA clades and the sample size are shown for each MU. MUs that are encircled with the same colour presented differences in only mitochondrial or nuclear markers, and those with only 3 individuals sampled are proposed as provisional. The MU without indicated sample size was proposed on the basis of Napolitano *et al* (2008) mtDNA results. The grey and yellow areas refer to the approximate distribution of the pampas cat subspecies mentioned in this research, and their names are indicated. Dots correspond to the sampled localities.

Interestingly, the divergence time between clades A, B, C and D is similar or longer than between some felid species, such as the Iberian lynx *Lynx pardinus*, Canadian lynx *Lynx canadensis* and Eurasian lynx *Lynx lynx* (between 1.18 and 1.61 MY), kodkod *Leopardus guigna*, little spotted cat *Leopardus tigrinus* and Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* (0.74-0.93 MY) and ocelot and margay (1.58 MY; Johnson *et al.*, 2006).

High diversity within clades, times of divergence and monophyletic origin in most of the regions indicated long-term isolation into distinct refuges (glacial) / regions (interglacial) rather than dispersal from a unique refuge. Considering the current distribution of the clades and the zones apparently less affected by the glaciations (Clapperton, 1993), clade A refuge probably existed in central Peru, while clade B and clade D refuges were possibly located in northern Chile and eastern Argentina, respectively. Clade C refuge was probably placed in eastern Bolivia. Individuals with haplotypes of clades B, C and D would subsequently migrate to a contact zone between 20 and 23°S during an interglacial period.

### **Implications for conservation**

The concepts of “evolutionarily significant units” (ESUs; Ryder, 1986) and “management units” (MUs; Moritz, 1994) were created with the objective of targeting operational units for conservation below the species level. Although the use of the ESUs concept and its importance for prioritising conservation efforts is currently well accepted, its definition was strongly debated (Fraser, Bernatchez, 2001). Many authors consider reciprocal monophyly as mandatory for the recognition of ESUs, as proposed by Moritz (1994), or subspecies, while for other definitions a different evolutionary history between populations is sufficient (Ryder, 1986; Waples, 1991; Dizon *et al.*, 1992; Vogler, DeSalle, 1994). MUs, in the other hand, are defined as population units with statistically significant differences of allelic frequencies at nuclear or mitochondrial level (Moritz, 1994).

The long divergence time among clades, as well as the differentiation at the ncDNA level, highlight the importance of recognizing the four pampas cat population



groups identified here (localities 2-10 / 11,13-14 / 15-18 / northern Chile) as different units for conservation in the Andean region. Since they have different allelic frequencies at both, mtDNA and ncDNA levels, all of these groups must to be recognised as MUs. In addition, we recommend the recognition of the localities 1, 12 and 19 as provisional MUs, since only private haplotypes were found for them (localities 1 and 19) or they differ at ncDNA level from adjacent MUs (locality 12; Figure 8).

The existence of an admixture zone in the central Andean region results in a lack of reciprocal monophyly between all the four population groups and makes their recognition as subspecies or ESUs controversial. However, cases of hybridization between subspecies or species are common in nature (Arnold, 1997), of particular interest being the identification of hybridization areas for tigrinas, Geoffroy's cats and pampas cats (Johnson *et al.*, 1999; Eizirik *et al.*, 2006). In this sense, pampas cats from central Andes can be regarded as a complex of at least four ESUs/subspecies, one of them being the result of a past hybridization event.

## Conclusion

Through the analyses of both mitochondrial and nuclear DNA, we inferred the population structure of the pampas cat in a broad portion of the Andean region, showing the existence of at least four groups of populations that must be considered different management units, and three other localities proposed here as provisional management units. The results revealed the influence of ancient climate fluctuations on the evolutionary history of this species, suggesting the split of four mtDNA clades during the Pre-Pastonian glacial period, long term isolation and further population expansions during the Aftonian interglacial. Based on a home range of more than 40 km<sup>2</sup> (Villalba, unpub.), the pampas cat can be considered as a species with a relatively high mobility. It is expected that the other species of land vertebrates with a smaller or similar mobility have been affected in the same manner by the glacial and interglacial periods in the central Andes and, hence, they show similar population structures at present, that should be considered for the future study and conservation of the Andean fauna.

## Chapitre IV

---

### **Between high-altitude islands and high-altitude corridors. The population genetic structure of the Andean cat (*Leopardus jacobita*)**

Cossíos, E. D., Ruiz-García, M., Lucherini, M., Angers, B.

Animal Conservation (submitted)

## Résumé

Le chat des Andes est considéré comme l'un des félidés les plus rares du monde. Avec comme objectif de maintenir l'intégrité génétique de cette espèce, nous avons déterminé des unités de conservation à partir de sa variabilité génétique, sa structure de populations et son histoire évolutive. À cause de l'extrême rareté du chat des Andes, une grande partie des échantillons d'ADN a été obtenue à partir de restes fécaux. Les résultats confirment que cette espèce possède une diversité nucléaire et mitochondriale extrêmement faible. Une comparaison avec le chat des pampas indique qu'un goulot d'étranglement historique et une faible population effective seraient responsables du peu de diversité chez le chat des Andes. La structure géographique de la diversité génétique est très forte, mais contraste avec celles d'autres espèces des Andes. Ces différences peuvent être expliquées par des populations isolées dans des "îles d'altitude" et par l'utilisation de corridors d'altitude inatteignables pour les autres espèces. La structure des populations de ce félidé permet de reconnaître deux unités évolutives significatives (ESUs), séparées entre 26°S et 35°S. Additionnellement, dans l'ESU du Nord, deux groupes génétiquement distincts devraient être considérés comme des unités d'aménagement (MUs) différentes.

## Abstract

The Andean cat is considered to be one of the rarest felids of the world. In order to maintain the genetic integrity of the species, conservation units were identified from genetic variability, population structure and evolutionary history. Due to the extreme scarcity of this species, most of the DNA samples were obtained from faeces collected during habitat surveys. Results confirm that the Andean cat populations harbour extremely low mitochondrial and nuclear genetic diversity. A comparison with the pampas cat suggests a historical bottleneck and a low effective population size as being responsible for the reduced diversity of the Andean cat. The geographic structure of the genetic diversity is very strong, but differs from that of other Andean species. These differences may be explained by populations isolated in “high-altitude islands”, as well as by the use of “high-altitude corridors” unattainable by other species. The unique population structure of this species enables the recognition of two evolutionarily significant units (ESUs), with a latitudinal separation between 26°S and 35°S. In addition, two genetically distinct groups within the northern ESU could be considered separate management units (MUs).

## Introduction

The Andean cat (*Leopardus jacobita*) is a small wild cat distributed along the Andes, from 10°S in central Peru (Cossíos *et al.*, 2007b), to 35°S in central Argentina (Sorli *et al.*, 2006). In spite of this relatively wide distribution, the scarcity of field observations and of other signs of its presence suggests a low population density (Villalba *et al.*, 2004; Lucherini *et al.*, 2008). Its rarity is also reflected in the low number of skulls that are kept in museum collections (Chapron, 1999) and in the inexistence of individuals in captivity. Many threats were reported for the Andean cat, including hunting, habitat loss, predation by domestic dogs and prey reduction by man (Villalba *et al.*, 2004; Cossíos *et al.*, 2007b; Lucherini, Merino, 2008). In fact, it has been postulated that the relatively recent and almost total extinction of chinchillas (*Chinchilla spp.*), thought to have been a main prey of the Andean cat in the past, could have produced a population decline in this wild cat (Nowell *et al.*, 1996). In light of all these factors, the Andean cat is considered to be one of the rarest cats of the world and the most endangered felid species of the Americas (Nowell *et al.*, 1996; Villalba *et al.*, 2004).

In the last decade, considerable efforts were made to increase our knowledge of this species, but recent research has mainly focused on distribution (Lucherini, Luengos, 2003; Perovic *et al.*, 2003; Cossíos *et al.*, 2007b) and ecology (Walker *et al.*, 2007; Napolitano *et al.*, 2008), and little is known about genetic diversity and population structure. Due to the preference of this species for the upland areas, some authors have suggested that the Andean cat could have naturally fragmented populations (Scrocchi, Halloy, 1986; Villalba *et al.*, 2004). Previous research using genetic methods have shown a moderate level of genetic variation in mitochondrial DNA for the species as a whole (Johnson *et al.*, 1998) but relatively low levels of genetic variation in mtDNA in a population from northern Chile (Napolitano *et al.*, 2008).

Here, using mitochondrial and nuclear DNA markers, we determine the variability and genetic structure of the Andean cat populations, to identify conservation units and

infer their population history. Our results are necessary to improve management and conservation policies for this rare and endangered felid.

## Materials and methods

### Sample collection

A total of 30 Andean cat skin samples and 1073 carnivore faecal samples were collected in 11 different locations in the Andes of Peru, Bolivia and Argentina, from 10°13'S to 35°59'S (Table 1), by many field work teams, covering the whole known distribution area of the species. Faecal samples were collected opportunistically in the field and kept in dry and cool conditions until DNA extraction (Wasser *et al.*, 1997). For skin samples, 0.5-1 cm<sup>2</sup> was cut from the ear of stuffed animals owned by villagers or from museum specimens and kept in paper bags (Cossíos *et al.*, 2007a).

**Table 1.** Localities and size of the Andean cat samples analysed in this study, as well as the number of individuals inferred *a posteriori* according to the number of different multiloci genotypes. Geographic positions of the localities are shown on Figure 3.

Locality	Coordinates		Samples			Individuals
	S	W	faeces	skins	total	
Peru						
1-Cuzco	13°44'	71°12'	2	0	2	2
2-Central Peru	10°13'-12°19'	75°41'-76°57'	4	2	6	5
3-Ayacucho	14°04'	73°51'	0	1	1	1
4-Arequipa	14°59'-15°56'	71°14'-72°42'	1	2	3	3
5-Tacna / Puno	16°29'-17°19'	69°29'-70°27'	2	9	11	10
Bolivia						
6-La Paz / Oruro	17°08'-18°26'	68°07'-69°22'	2	9	11	10
7-Potosi	20°05'-22°09'	67°14'-67°53'	14	3	17	7
Argentina						
8-Jujuy	21°57'-23°04'	66°03'-66°18'	30	0	30	7
9-Catamarca	25°13'-26°39'	66°43'-67°39'	7	0	7	4
10-Tucuman	26°30'	65°48'	1	0	1	1
11-Mendoza/Neuquén	35°59'-38°14'	65°48'-69°49'	2	4	6	6
TOTAL			65	30	95	56

### **Laboratory procedures**

DNA from skin samples was extracted following the standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.*, 1989). DNA from faecal samples was isolated using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with some modifications (Cossios *et al.*, 2009) and identified to the species level by a PCR-RFLP method (Cossios, Angers, 2006).

Two segments of the hypervariable domain 1 (HVS-I) of the mitochondrial control region were amplified with the pairs of primers CH3F - H1rev and H2for - CH3R, (Freeman *et al.*, 2001; Cossios *et al.*, 2009). Mitochondrial genes NADH-5, ATP-8 and 16S were amplified with the pairs of primers ND5·1F - ND5·2R, AP8·1F - AP8·2R and 16S·1F - 16S·4R, respectively (Johnson *et al.*, 1998). Amplification reactions were carried out in a volume of 12.5µl containing a final concentration of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP and 0.8 pM of each primer, 0.8 mg/ml of BSA, 0.2 unit of Taq DNA polymerase, and approximately 20 ng of template DNA. PCR conditions included an initial denaturing step at 92°C for 2 min, 45 cycles of 92°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 68°C for 40 s, and a final extension step at 68°C for 5 min. Mitochondrial DNA variation was detected using single-strand conformation polymorphism (SSCP; Orita *et al.*, 1989). The amplified products were electrophoresed on a 6% nondenaturing gel for 11h 30' at 20 W in 0,5x TBE (Angers, Bernatchez, 1998) and visualised using silver nitrate staining (Bassam *et al.*, 1991). A band was sliced from the gel for each of the different observed conformers and placed in a volume of 35µl of HPLC-grade water overnight. 2µl of the dissolved DNA were used for amplification and the products were sequenced with a CEQ 8000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.). Amplification reactions to obtain sequences were done under the same conditions previously described but were carried out in a volume of 30 µl. When possible, at least two individuals from different populations were sequenced for each observed conformer, to corroborate the reliability of the SSCP protocol. HVS-1, NADH-5, 16S and ATP-8 sequences have been deposited in GeneBank.

Eleven microsatellite loci characterized in domestic cats and located on different chromosomes were used (Fca8, Fca24, Fca31, Fca43, Fca45, Fca80, Fca90, Fca96, Fca173, Fca176 and Fca294; (Menotti-Raymond *et al.*, 1999). PCR conditions were the same than those for mtDNA but with an annealing temperature of 55°C. For the faecal samples, amplification and screening were performed three times, following the multiple tube approach (Taberlet *et al.*, 1996), and only the samples showing concordant results for the 3 screenings were used for data analysis.

### **Microsatellite Data analysis**

To determine whether faecal samples originated from the same individual, the probability that two samples with the same microsatellite genotype represent two different individuals was calculated from the allele frequencies (Paetkau, Strobeck, 1994). Assuming independence of loci as expected from the linkage map of microsatellite loci in the domestic cat (Menotti-Raymond *et al.*, 1999), the multilocus probability was obtained as the product of the probability for each locus.

To determine whether samples belong to a single population, Hardy-Weinberg equilibrium was tested for microsatellite data with the method developed by Guo & Thompson (1992) using GENEPOP 3.4 (Raymond, Rousset, 1995b). Measures of expected heterozygosity ( $H_E$ ) and number of alleles ( $k$ ) were estimated using the computer program ARLEQUIN 2.00 (Schneider *et al.*, 2000), while allelic richness ( $A_r$ ) was estimated with FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). The program CONVERT (Glaubitz, 2004) was used to identify private microsatellite alleles, that is alleles present in a population and not shared with any other.

A Bayesian clustering method was performed using STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000), with a 100 000 burn-in period and 50 000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions, to infer the number of populations ( $K$ ) and to assign individuals to inferred population clusters. We performed 10 independent runs for each value of  $K$ ,



from 1 to 6. The number of populations best fitting our data set was defined both using the mean value of the log probabilities [ $\Pr(X/K)$ ] for each  $K$  value, and the most positive  $\Delta K$  (Evanno *et al.* 2005). Additionally, the population structure was examined for the microsatellite data with a neighbour-joining phylogenetic tree of individuals constructed with the program POPULATIONS 1.2.28 (Langella, 2002), using DAS distances (Chakraborty, Jin, 1993) and 100 bootstraps on locus, with an outgroup formed by 16 pampas cats. A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was carried out using ARLEQUIN 2.00 with  $\Phi$ -statistics and statistical significance was assessed using 10000 permutations.

### **Mitochondrial Data analysis**

ARLEQUIN 2.00 was used to estimate nucleotide diversity ( $\pi$ ; Tajima, 1983) and haplotype diversity ( $h_d$ ; Nei, 1987) for the mitochondrial data. A statistical parsimony cladogram (Templeton *et al.*, 1992) was constructed with the mitochondrial sequences, using pampas cats from Cossios *et al.* (2009) and Napolitano *et al.* (2008) as outgroups and the program TCS 1.13 (Clement *et al.*, 2000). To infer historical phylogeographic processes, the haplotypes on this network were nested using rules of Templeton *et al.* (1987) and Templeton and Sing (1993), and a Nested Clade Analysis (NCA) (Templeton *et al.*, 1995) was performed as implemented in GEODIS 2.5 (Posada *et al.*, 2000). The interpretation of the NCA results was following the key done by Templeton *et al.* (1995).

To estimate time since the most recent ancestor of the current Andean cat haplotypes, three methods were performed. For the first method, a mutation rate of 0.67% / MY was assumed for the combined NADH-5, ATP-8 and 16S mitochondrial genes (Johnson *et al.*, 1999). The second method, based on a divergence time of 2.91 (2.02 – 4.25) MY between pampas cat, *Leopardus colocolo*, and ocelot, *Leopardus pardalis* (Johnson *et al.*, 2006), considered a mutation rate of 21.9% / MY for 341bp of the HVS-I (Cossios *et al.*, 2009). For the third method, we used 390bp of the HVS-I region and considered the same divergence time between Andean cat and the clade formed by the margay, *Leopardus wiedii* and the ocelot (Johnson *et al.*, 2006).

## Results

### **Species and individual identification**

From the 1073 faecal samples, 65 were identified as belonging to Andean cats (6 %), while 820 were from pampas cats (76,4 %). Three of the samples were from Geoffroy's cats, *Leopardus geoffroyi*, 19 were from domestic cats, 71 were from canid species and 95 failed to be amplified and could not be identified. The 30 skin samples were correctly identified as Andean cats, for a total of 95 Andean cat samples.

From the 11 evaluated microsatellites, one failed to provide consistent amplifications (Fca45) and three were monomorphic (Fca43, Fca80 and Fca90). The seven remaining loci (Table 3) were used for individual identification and further analyses. These markers were successfully amplified for the 30 skin samples (100%), but only for 46 (70.8%) of the 65 Andean cat faecal samples, for a total of 76 samples.

For these 76 samples, 51 unique multilocus genotypes were identified and assigned to the same number of individuals. The probability of sampling two different individuals with the same genotype ranged between  $1.45 \times 10^{-10}$  and  $1.81 \times 10^{-3}$  depending on the locality. In addition, samples similar for a multilocus genotype always involved faeces collected at the same locality. This strongly suggests that samples with the same genotype represented the same individual.

For the mtDNA analyses, 5 additional individuals were considered even in absence of satisfactory microsatellite amplification because they met one of the following conditions: a) were the unique faecal samples from a particular locality; b) differed on mtDNA sequences from the other faecal samples of the same locality. MtDNA analyses were therefore performed on 56 individuals.

### **Population structure and genetic diversity**

The highest value of the  $\ln \Pr(X | K)$  obtained with the program STRUCTURE on microsatellite data corresponded to  $K = 3$ , indicating that a clustering of the individuals in three groups best fits the data (Figure 1A). No individuals have had variable group assignments among the 10 independent runs. These three population groups are strongly geographically structured and corresponded to localities 2-6 (population group I), 7-10 (group II) and 11 (group III). The results from the hierarchical AMOVA confirmed the relevance of this structure as an important proportion of the total variation detected among groups (51.66%  $p = 0.017$ ) while only 1.59% (but not significant  $p = 0.086$ ) is accounted for by differences among populations within groups. The phylogenetic tree of individuals inferred from the microsatellite data also supports previous results in that little admixture is perceived between individuals of groups of localities 2-6 and 7-10, and the root separates these two groups from individuals of the locality 11 (Figure 1B).

Sequences of 459bp were obtained for the mitochondrial HVS-I and segments of 318bp, 189bp, and 282bp were determined for the NADH-5, ATP-8 and 16S genes, respectively, for a total of 1248bp. The SSCP survey over all individuals and the sequencing revealed a total of five haplotypes, named hereafter A to E. The HVS-I was the most variable surveyed locus, with 10 variable sites, followed by NADH-5 with five, 16S with two and, finally, ATP-8 with a single variable site (Table 2). Only five of the 18 variable sites were informative and were found in the Control Region (3) and in the NADH-5 gene (2).

The haplotypes Lja1 and Lja2 reported by Napolitano *et al.* (2008) for the NADH-5, ATP8 and 16S genes were identical to the homologous segments of the haplotypes A and D, respectively. On the other hand, the haplotypes reported by Johnson *et al.* (1998) for the same genes, were not detected in this research.

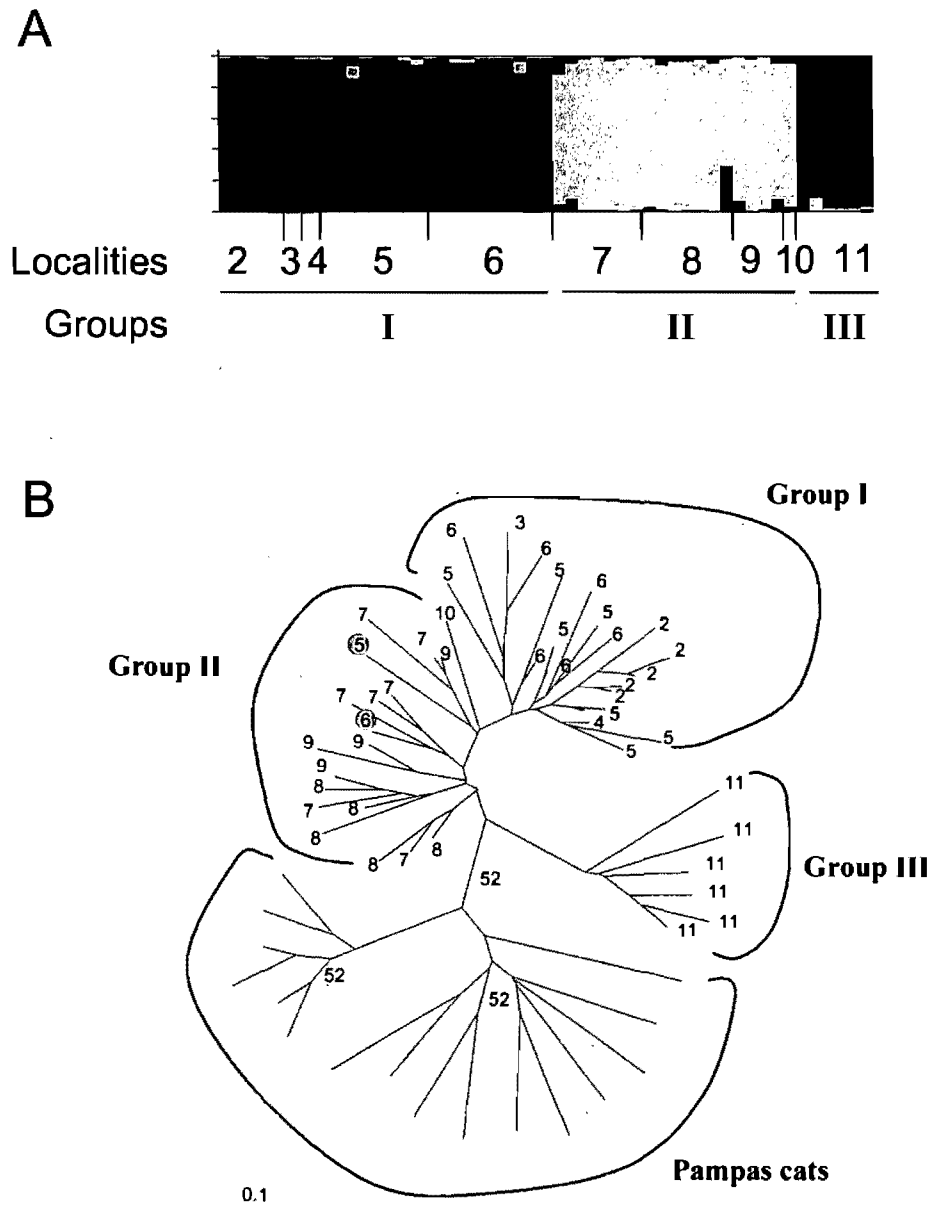
The parsimony network highlights the divergence among haplotypes (Figure 2). Excluding haplotypes A-C separated by a single mutation, all other pairwise are

separated by 5 to 12 mutations, with a mean of 7.0 mutations. The most recent ancestor of the Andean cat is not clearly defined as three haplotypes were equally parsimonious.

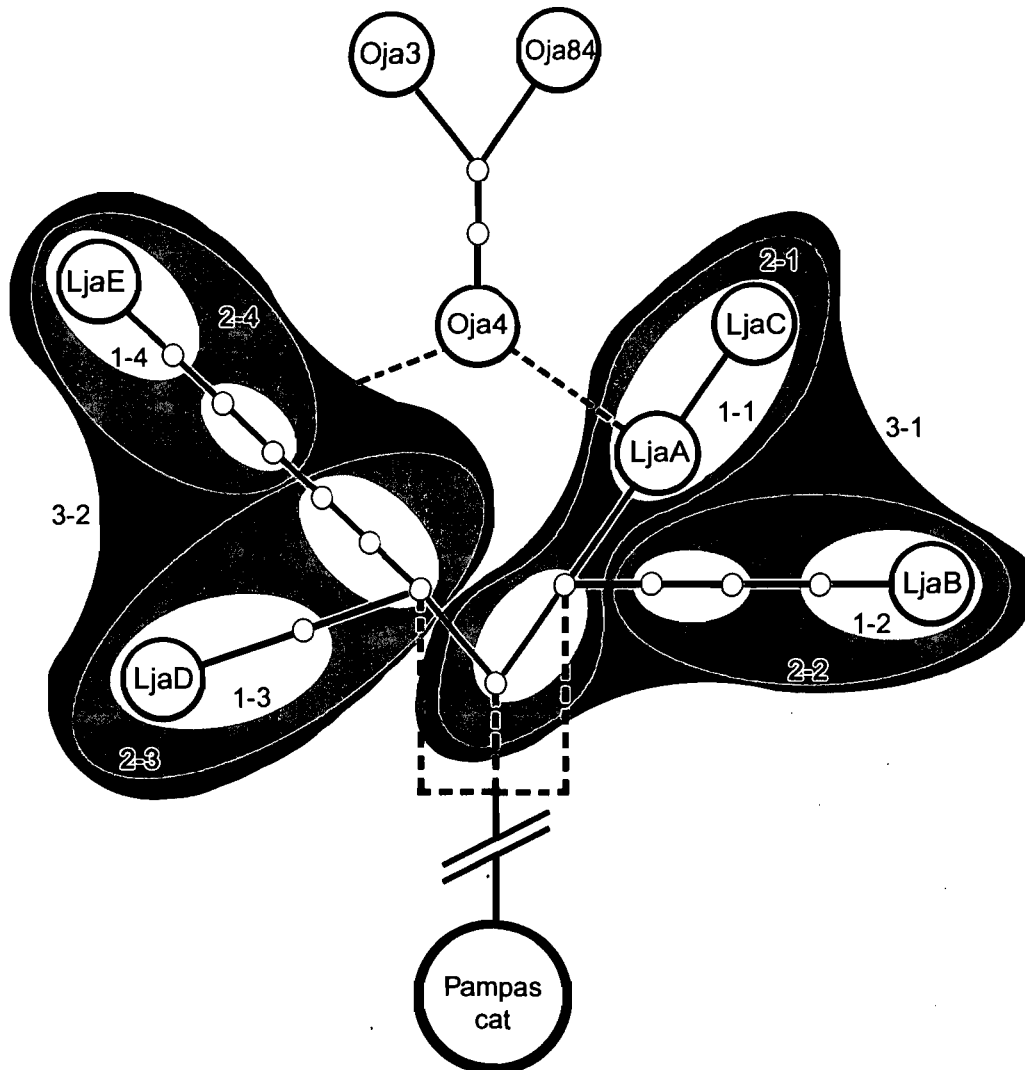
A strong geographic congruence is observed between microsatellites and mitochondrial genomes. Haplotype A is widely distributed and detected in nearly all sites. This haplotype is detected in 18 of the 19 individuals of sites 7-10 (group II). Haplotypes B, C and D are restricted to sites 1-6 (group I) while haplotype E, separated by eight mutations from the nearest haplotype (D) is characteristic of site 11 (group III).

Without considering localities with less than 5 sampled individuals, the total number of microsatellite alleles per locality and locus ranged from 1 to 5. None of the localities display deviation from HW expectations, indicating that no more than one population was sampled per locality. Population groups I, II and III presented 6, 4 and 4 private alleles, respectively (Table 3).

For the mtDNA control region, the number of haplotypes per locality ranged from 1 to 3. Group I is the most genetically diverse, especially localities 5 and 6 with three different haplotypes (Table 4). On the other hand, 6 of the 11 localities (2; 3; 8; 9; 10; 11) are characterized by a unique haplotype (Table 4 and Figure 3). For the variable localities, haplotype diversity values ranged from 0.28 to 0.67, and nucleotide diversity varied between 0.0011 and 0.0027.



**Figure 1.** Population structure inferred from microsatellite data. A.- Membership coefficients inferred with the program STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) for  $K = 3$ . Each individual is represented by a column and each of the three inferred population groups is represented by a colour. Localities correspond to those on Table 1. B.- Neighbour-joining phylogenetic tree of individuals inferred from DAS distances. 100 bootstraps on locus were performed and only values over 50% are shown. For the Andean cats, numbers correspond to the localities on Table 1.



**Figure 2.** Maximum parsimony network and corresponding nested design used in nested clade analysis for Andean cat HVS-I, NADH-5, ATP-8 and 16S combined sequences. Sizes of the circles are not proportional to the haplotype frequency. Each solid line represents one mutational step and small empty circles indicate undetected intermediate haplotype states. Dashed lines represent possible relationships between haplotypes, when more than one possibility exists. Haplotypes Oja3, Oja4 and Oja84, from Johnson *et al* (1998), are based in NADH-5, ATP-8 and 16S sequences only. Haplotypes A and D have the same sequences than Lja1 and Lja2, reported by Napolitano *et al.* (2008), for the NADH-5, ATP-8 and 16S genes.

**Table 2.** Reduced CLUSTAL W alignment of part of the Andean cat HVS-I, 16S, ATP-8 and NADH-5 mitochondrial sequences, showing only variable sites. Oja3, Oja4, and Oja84 from Johnson *et al.* (1998). Pampas cat sequences show only sites equivalent to those variable in Andean cat (Napolitano *et al.*, 2008; Cossíos *et al.*, 2009). Dash ( - ) and question marks ( ? ) represent deletions and missing data, respectively. Position refers to the complete domestic cat mtDNA sequence (Lopez *et al.*, 1996)

Haplotype	Marker and nucleotide position															
	16S		ATP-8	NADH-5					HVS-I							
				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	3	8	2	2	2	2	2	6	6	6	6	6	6	6	6
	0	0	7	6	7	7	8	9	7	7	7	7	7	7	7	8
	2	4	5	6	2	4	6	2	0	2	3	8	8	8	8	9
	7	6	7	3	2	6	8	6	0	0	1	0	2	3	8	7
LjaA	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	A	T	T	C	T	A
LjaB	.	C	.	.	.	.	A	.	.	-	.	.	C	.	.	.
LjaC	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
LjaD	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	C	T	.	.
LjaE	.	.	A	C	.	.	.	.	T	.	.	C	C	T	C	T
Oja84	.	C	.	C	.	C	.	C	?	?	?	?	?	?	?	?
Oja3	G	C	.	C	.	C	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Oja4	.	.	.	C	.	.	.	.	?	?	?	?	?	?	?	?
Pampas cat	.	.	A	.	G	C	A	.	C/T	.	.	.	T/C	.	.	.

**Table 3.** Microsatellite diversity in Andean cat. Numbers 1 to 11 refer to localities described in Table 1. Groups were inferred from STRUCTURE analysis performed on microsatellite diversity.

Group	Locality	n	Microsatellites														Ar	p
			Fca08		Fca24		Fca31		Fca96		Fca173		Fca176		Fca294			
			k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>	k	H <sub>E</sub>		
I	2	5	1	0	2	0.18	2	0.18	1	0	2	0.32	2	0.5	2	0.18	10.58	2
	3	1	1	0	2	1	1	0	2	1	2	1	1	0	2	1	—	0
	4	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	1	1	0	—	0
	5	9	2	0.2	5	0.69	3	0.29	2	0.34	2	0.1	3	0.62	3	0.62	16.48	0
	6	10	2	0.1	3	0.54	4	0.54	2	0.32	2	0.09	4	0.67	4	0.69	16.39	1
	Total	26	2	0.11	5	0.56	4	0.43	2	0.45	3	0.18	4	0.61	4	0.67	16.03	6
II	7	7	2	0.13	4	0.58	5	0.67	3	0.5	2	0.13	2	0.24	3	0.49	16.92	1
	8	7	3	0.25	4	0.6	3	0.44	2	0.41	2	0.15	3	0.59	4	0.53	17.30	0
	9	4	3	0.4	3	0.53	4	0.56	2	0.47	2	0.37	1	0	4	0.66	19.00	0
	10	1	1	0	-	-	2	1	1	0	1	0	2	1	1	0	—	0
	Total	19	3	0.29	4	0.59	5	0.63	3	0.45	2	0.2	3	0.28	4	0.54	16.84	4
III	11	6	2	0.44	3	0.4	4	0.54	3	0.65	1	0	3	0.29	2	0.28	15.46	4
TOTAL	51	4	0.24	8	0.79	6	0.66	4	0.45	3	0.52	6	0.62	5	0.65	20.38		

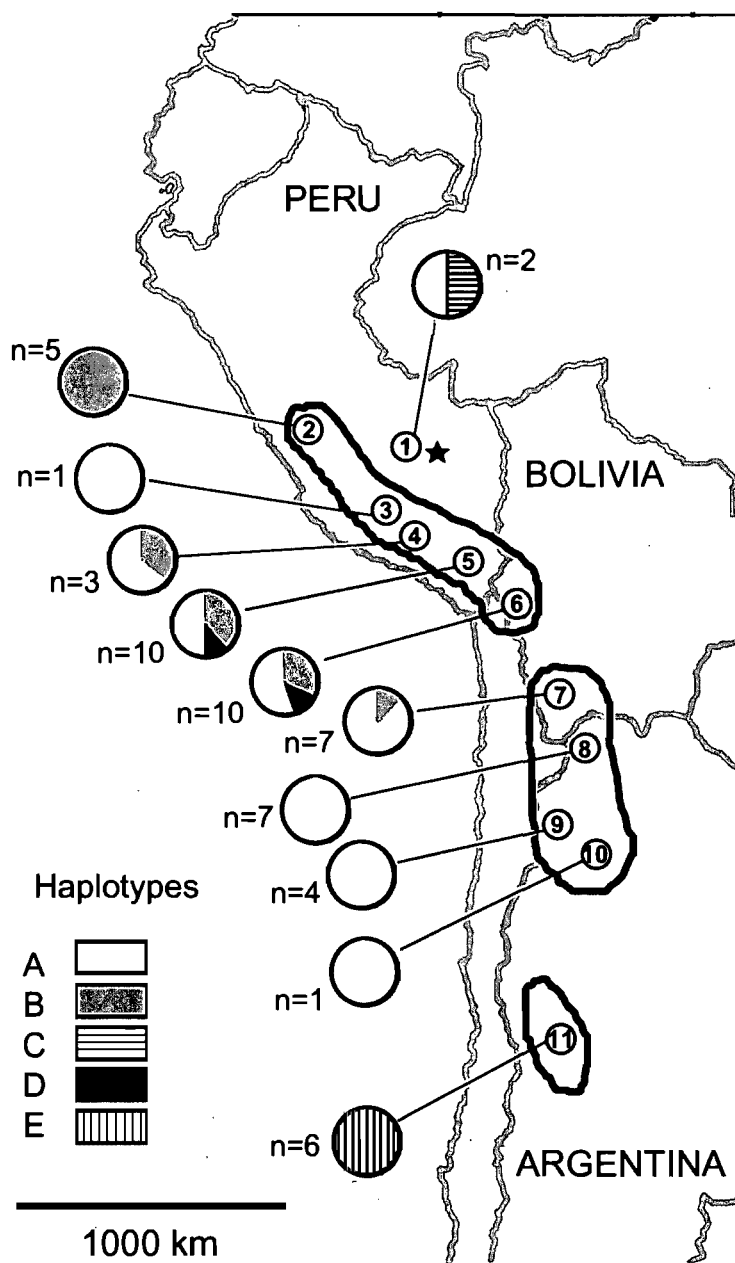
k = number of alleles; H<sub>E</sub> = expected heterozygosity; Ar = allelic richness estimated for 4 individuals per population over all loci; p = number of private alleles



**Table 4.** Mitochondrial DNA diversity in Andean cat, for the combined HVS-I, NADH-5, ATP8 and 16S sequences.

Group	Locality	Haplotypes					n	H	hd	S	P	$\pi \times 100$
		A	B	C	D	E						
	1*	1	-	1	-	-	2	2	1	1	0.08	0.0801
I	2	-	5	-	-	-	5	1	0	0	0	0
	3	1	-	-	-	-	1	1	0	0	0	0
	4	2	1	-	-	-	3	2	0.67	5	0.4	0.2671
	5	5	4	-	1	-	10	3	0.64	8	0.64	0.2724
	6	6	3	-	1	-	10	3	0.60	8	0.64	0.2511
	Total	14	13	-	2	-	29	3	0.58	8	0.64	0.2431
II	7	6	1	-	-	-	7	2	0.28	5	0.4	0.1145
	8	7	-	-	-	-	7	1	0	0	0	0
	9	4	-	-	-	-	4	1	0	0	0	0
	10	1	-	-	-	-	1	1	0	0	0	0
	Total	18	1	-	-	-	19	2	0.10	5	0.4	0.0422
III	11	-	-	-	-	6	1	0	0	0	0	
TOTAL		33	14	1	2	6	56	5	0.60	15	1.2	0.3090

\* Locality I was not included in the structure analysis in absence of microsatellite data; n = sample size; H = number of haplotypes; hd = haplotype diversity; S = number of polymorphic sites; P = proportion of variable sites;  $\pi$  = nucleotide diversity



**Figure 3.** Geographical structure of genetic diversity in Andean cat populations. The proportion of the mtDNA haplotypes is shown for each sampled locality. Locality numbers correspond to those on Table 1. Populations assigned to a given group according to STRUCTURE analysis are circled. Locality 1, represented by a star, was not included in the structure analysis due to the absence of microsatellite data.

### **Demographic and evolutionary history**

The results of the NCA suggested that population history played an important role in determining the geographical associations of the haplotypes (Figure 4). The null hypothesis of no geographical association was rejected for the unique nested clade at the lowest level (clade 1-1), with the inference of restricted gene flow with isolation by distance as an explanation for the relationship between haplotypes A and C. However, this inference was made from a very little sample, and it needs to be regarded with caution. Due to the undetected intermediate haplotypes, the results for all the 2-step nested clades were the same than for the 1-step clades and are not shown in Figure 4. For the 3-step nested clade 3-1, containing the haplotypes A-C and B, contiguous range expansion was diagnosed. Past fragmentation was inferred for the clade 3-2, containing the haplotypes D and E.

The three methods used to estimate time since the most recent ancestor of the current Andean cat haplotypes provided similar results. For the combined NADH-5, ATP-8 and 16S mitochondrial genes, an average of 2.3 mutations, equivalent to 0.29% of the sequence, was found between Andean cat haplotypes and indicates a coalescence time of 216 418 years. For the HVS-I region, an average of 5.97 differences was found between haplotypes A-B-C and D-E, situated at opposite sides of the inferred parsimony network (Figure 2). When using the 341bp homologous portion of the pampas cat HVS-I, these 5.97 differences were equivalent to 1.75% of the sequence, and the common ancestor of the current Andean cat haplotypes was dated at 272 529 (189 178–398 024) years. Finally, an average of 60.11 differences was found for the HVS-I region between Andean cat and the ocelot-margay clade, dating the Andean cat ancestor at 288 989 (200 603–422 064) years.

0-step clades	A	C	B	D	E
Dc	486 L p=0.028	0			
Dn	496 L p=0.028	794 S p<0.001			
Nested clade	1-1				
I-Tc	486 L p=0.028				
I-Tn	-298 L p<0.001				
Inference	restricted gene flow with isolation by distance				
2-step clades	2-1		2-2	2-3	2-4
Dc	517		371 L p=0.026	81	0
Dn	554		679	1835 S p<0.001	367 L p<0.001
Nested clade	3-1		3-2		
I-Tc	N/A		81		
I-Tn	N/A		1468 S p<0.001		
Inference	range expansion		past fragmentation		
3-step clades	3-1		3-2		
Dc	590 L p=0.026		611		
Dn	624 L p=0.028		1623 S p<0.001		
Nested clade	total cladogram				
I-Tc	N/A				
I-Tn	N/A				
Inference	don't reject Ho				

**Figure 4.** Results of the nested clade analysis of geographic distances. Clade (Dc) and nested clade (Dn) distances are given for the clades containing geographic and genetic variation. Interior (I-Tc) and tip (I-Tn) distances are given for nested clades for which both interior and tip components exist. P-value is given for significantly small (S) and significantly large (L) distances. Inferences are given following Templeton *et al.* (1995).

## Discussion and conclusions

### Genetic diversity

The first striking result is the extremely low genetic diversity of the Andean cat. Only five mitochondrial haplotypes were detected for the entire species. Furthermore, half of the localities had no mtDNA diversity and no more than three haplotypes were detected within a population. Such a low level of diversity is comparable to that observed in other endangered species, such as the Iberian lynx *Lynx pardinus* (1-2 haplotypes per population; Johnson *et al.*, 2004), the cheetah *Acinonyx jubatus* (1-6, considering HVS-I only; Freeman *et al.*, 2001), the Ethiopian wolf *Canis simensis* (1-4, HVS-I only; Gottelli *et al.*, 2004) and the spectacled bear *Tremarctos ornatus* (1-3, HVS-I only; Ruiz-García, 2007).

The microsatellite diversity of the Andean cat is also very low compared to other members of the genus *Leopardus*. Allelic richness estimated for 4 loci (Fca24, 31, 96 and 294) and 6 individuals per population is always far lower in the Andean cat ( $A_r = 11.00 - 12.58$ ; this study) than in pampas cat ( $A_r = 16.25 - 22.91$ ; Cossíos *et al.*, 2009) living in the same localities. Similarly, the number of alleles for the loci Fca08 and Fca96 is 3-5 times larger in ocelots (*Leopardus pardalis*), margays (*Leopardus wiedii*) and little spotted cats (*Leopardus tigrinus*) from Brazil (Grisolia *et al.*, 2007) than in the Andean cat. In addition, an important part of the genetic variability of the Andean cat is partitioned among regions, exacerbating the extremely low genetic diversity at the population level. In conclusion, both nuclear and mitochondrial data revealed that the Andean cat harbours extremely low genetic diversity.

The origin of the Andean cat's current populations seems to be relatively recent, the common ancestor of their haplotypes being dated to approximately 216 000 – 290 000 years ago. In South America, climate fluctuations during the Pleistocene were equivalent to those known for the northern hemisphere (Clapperton, 1993) and the coalescence of the Andean cat's current haplotypes therefore coincides with the Yarmouthian interglacial period (0.2 – 0.3 / 0.38 MYA).

The Andean cat and the pampas cat are expected to be sister species and to have had a common ancestor 1.8 MY ago (Johnson *et al.*, 2006). After this divergence, the pampas cat's lineage diversified into multiple mitochondrial clades, currently distributed along South America (Johnson *et al.*, 1999; Cossíos *et al.*, 2009), whereas the diversification that should have occurred during the same period in the Andean cat's lineage has left no trace. Therefore, the current mtDNA variability of the Andean cat, at the species level, can be explained by the occurrence of an ancient bottleneck that took place during the Yarmouthian interglacial or possibly earlier, at the end of the Kansan glacial period (0.3 / 0.38 – 0.45 MYA). During interglacial periods, the habitat available for high-altitude specialised organisms is expected to decrease (e.g. Ethiopian wolf; Gottelli *et al.*, 2004), which is why the Yarmouthian is the most likely moment for the occurrence of the inferred bottleneck.

The reduced mitochondrial diversity at the population level and the separation of the current haplotypes by several mutational steps could be indicative of additional and more recent bottlenecks, while a historically low effective population ( $N_e$ ) size may have contributed in maintaining such a reduced diversity (Palstra, Ruzzante, 2008).

### **Population structure**

Our analyses of ncDNA data indicate the existence of at least three significantly differentiated groups of Andean cat populations, distributed as follows, from North to South: group I (localities 2-6) occupies central Peru and north-western Bolivia, between 10° and 18° S; group II (localities 7-10) is situated between 20° and 26° S, in southern Bolivia and northern Argentina; and group III (locality 11) is in central Argentina (Figure 3). Based on the NADH-5, ATP-8 and 16S sequences, the population studied by Napolitano *et al.* (2008) in northern Chile seems to belong to the group I identified here.

Interestingly, these population groups have a strong geographical correspondence with Andean biogeographic units, differentiated by vegetation and precipitation conditions, although all of them are characterized by a dry climate. Group I is situated in the central Altoandino and in the Wet Puna units, while groups II and III mainly occupy Dry Puna and a zone of the Andean Patagonian steppe biogeographic unit, respectively (Cabrera, Willink, 1973). The Altoandino is characterized by snow precipitation and is present along most of the Andes. The Wet and Dry Punas, separated approximately at 20° S, have drastically different rain conditions, with summer precipitations north of 20° S and extreme aridity or winter rains south of this limit. The hyper arid zone between these two areas has been considered a distributional limit for other Andean mammal species and subspecies (Cossíos *et al.*, 2009).

The retraction of the Andean cat habitat could have produced isolated populations in inland islands, which explains the spatial isolation of southernmost populations and the divergence of the haplotype E compared to other haplotypes. The results obtained with the NCA analysis for the nested clade 3-2, suggesting past fragmentation, are consistent with this hypothesis.

Contiguous range expansion was inferred as the main cause of geographical association between haplotypes A-C and B. An alternative hypothesis is that haplotype B was present in the same geographic range than A, but disappeared from the southern part of its distribution by genetic drift. In both cases, however, individuals with the haplotype A had to have crossed the barrier between humid and arid Punas, which has not been observed for other species such as the pampas cat within the last million years (Cossíos *et al.*, 2009). This difference between small Andean felids can be explained by the preference of the Andean cat for high-altitude habitats, and the probable use of parts of the Andes as corridors. This could also explain the continuity of the Andean cat populations between 20 and 26° S, as opposed to the existence of a structured population for the pampas cat in this same region (Cossíos *et al.*, 2009).

### **Conservation implications**

In the objective of targeting operational units for conservation at the species level, the concepts of “evolutionarily significant units” or ESUs (Ryder, 1986) and “management units” or MUs (Moritz, 1994) were created. The ESU concept implies a different evolutionary history between units and usually uses a reciprocal monophyly at the mitochondrial level for their recognition (Moritz, 1994). MUs, on the other hand, are defined as population units with statistically significant differences of allelic frequencies at nuclear or mitochondrial level (Moritz, 1994).

Geographic separation of haplotype E from other haplotypes, in addition to the topology of the haplotype network and the nuclear data, shows that the populations of central Argentina (group III) have had a different evolutionary history and that they would be monophyletic in relation to the northern populations. For these reasons, the Andean cat populations of these two regions must be recognised as different ESUs, for which conservation efforts should be a priority to maintain the genetic diversity of the species. Within the northern ESU, two genetically distinct groups (groups I and II) were recognised. Although these groups are not monophyletic for mitochondrial haplotypes, they present an important divergence for both mitochondrial and nuclear genomes, and for this reason should be considered separate MUs.

In addition to these three geographic groups, populations 1 and 2 show characteristics that suggest they could be different to the other groups: although locality 2 has only one “neighbour locality” and it was not separated from the others when analysed using STRUCTURE, the clustering of its individuals in the microsatellite phylogenetic tree (Figure 1B), the presence of two private microsatellite alleles (Table 3) and the presence of only one mitochondrial haplotype (Table 4) suggests limited gene flow with other localities. Differences between population 2 and other populations could be mediated by some inter-Andean valleys acting as gene flow barriers. On the other hand, although locality 1 had a very small sample (n=2), it was the only locality where haplotype C was present and it is separated from other localities by the Apurimac and



Urubamba valleys, which separates the Cordillera Vilcanota from the main central Andean massif in Peru and which has been considered a major geographic barrier and distribution limit for many species and subspecies (Vuilleumier, 1969; Weske, 1985; Lehr, Catenazzi, 2008). This apparently limited gene flow between localities 1, 2 and the southern ones suggests that additional MUs could exist, although further analyses with more extensive sampling are needed to support this.

As a general conclusion, the Andean cat presents a very low genetic diversity as a result of ancestral bottlenecks in addition to more recent demographic reductions or chronic low  $N_e$ . The strong and particular population structure associated to the high altitude preferences of this species must be taken into account in conservation efforts, including the choice of areas for monitoring, conservation programs and reserve creation, as well as for possible captive breeding and reintroduction programs in the future. We recommend special conservation efforts for the populations of central Argentina, where no large protected areas are present, and to perform further research to better understand the population structure of the Andean cat in its northern distribution area.

-----oOo-----

---

## **Discussion**

Comme signalé plusieurs fois tout le long de cette thèse, le chat des Andes et le chat des pampas, bien que plus commun, sont des espèces insaisissables, difficiles à capturer et même à observer en liberté. À cause de ces caractéristiques, il aurait été très difficile, voire impossible, d'obtenir des réponses aux questions posées dans les chapitres précédents par des méthodes autres que les analyses génétiques ou par une approche invasive. Ainsi, ces méthodes nous ont permis d'étudier la répartition, la structure des populations et la phylogéographie des espèces choisies, connaissances qui constituent des outils importants pour leur conservation et qui fournissent une meilleure compréhension des effets des changements du Pléistocène sur la faune des Andes.

## **Identification génétique de restes fécaux**

Le développement d'une méthode pour différencier les excréments de carnivores des Andes (Chapitre I) a permis l'obtention d'échantillons significativement plus grands que ceux qu'on aurait pu obtenir à partir exclusivement de tissus. Dans le cas du chat des Andes, 46% de notre échantillonnage (26 individus, d'un total de 56) correspond à des individus identifiés par l'analyse génétique d'excréments. Dans le cas du chat des pampas, ce pourcentage a été encore plus important : 80% (160 de 199 individus). En plus, pour certaines localités, les restes fécaux ont été les seuls échantillons obtenus (4/11 ou 36% des localités pour le cas du chat des Andes et 8/19 ou 42% pour le cas du chat des pampas). Ces faits montrent l'importance que cette méthode a eu pour le développement de mon projet de recherche. Cette méthode est simple, peu onéreuse, et peut être reproduite avec un minimum d'équipement de laboratoire ; elle permet aussi l'identification des autres espèces de félidés présents dans les Andes (puma, chat de Geoffroy, chat domestique) et peut être appliquée pour l'identification d'autres types de matériel organique, tel que des poils, du sang, des peaux et d'autres tissus difficiles à identifier par inspection visuelle. À cause de ces caractéristiques, elle devrait être utile pour le développement de futurs projets de recherche en Amérique du Sud.

## Répartition des petits félidés des Andes

Cette recherche a amélioré nos connaissances sur la répartition des espèces étudiées. Les peaux trouvées sur le terrain et l'identification d'excréments ont permis d'accroître la répartition connue du chat des Andes de 892 km vers le nord-ouest (au Pérou central), et de confirmer sa présence à l'est de la rivière Urubamba (à Cusco, Pérou). Elles ont aussi permis de confirmer que le chat des pampas est présent à l'ouest des Andes péruviennes, à l'encontre de ce qu'on pensait avant (García-Perea 1994). Les populations du chat des Andes découvertes ainsi nous ont permis de connaître avec plus d'exactitude la structure des populations et la phylogéographie de cette espèce, comme cela est montré au chapitre IV. Le fait d'avoir ajouté aux répartitions connues de ces deux espèces plusieurs localités et même des régions entières (comme c'est le cas de la zone ouest des Andes péruviennes pour le chat des pampas), montre qu'il y a encore beaucoup à investiguer sur la faune de l'Amérique du Sud.

## La région de contrôle comme marqueur génétique

La région de contrôle est la région de l'ADNmt avec le taux de mutation le plus élevé, c'est pourquoi elle est très utile pour étudier les relations phylogénétiques entre populations ou entre espèces proches. Pourtant, la difficulté que cause pour son analyse la présence d'une région répétée (la RS2) a fait que la plupart des recherches sur ce sujet, chez les félidés, utilise les gènes mitochondriaux NADH-5, ATP-8 et 16S comme marqueurs substitués (mais voir Eizirik *et al.*, 1998; Eizirik *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004 comme contre exemples). Aux chapitres III et IV de la présente thèse, on montre que la région de contrôle possède plus de variabilité que la combinaison des gènes NADH-5, ATP-8 et 16S chez les espèces étudiées. Cette variabilité plus grande a permis d'obtenir une meilleure résolution des relations entre les différents clades du chat des pampas (chapitre III). Elle a été indispensable pour décrire les relations entre les haplotypes trouvés pour le chat des Andes, reconnaître des ESUs et calculer leur temps de

divergence (chapitre IV). Ces résultats revalorisent donc l'utilité de la région de contrôle dans le cadre de la génétique des populations des félidés.

## **Structure des populations et phylogéographie des espèces étudiées**

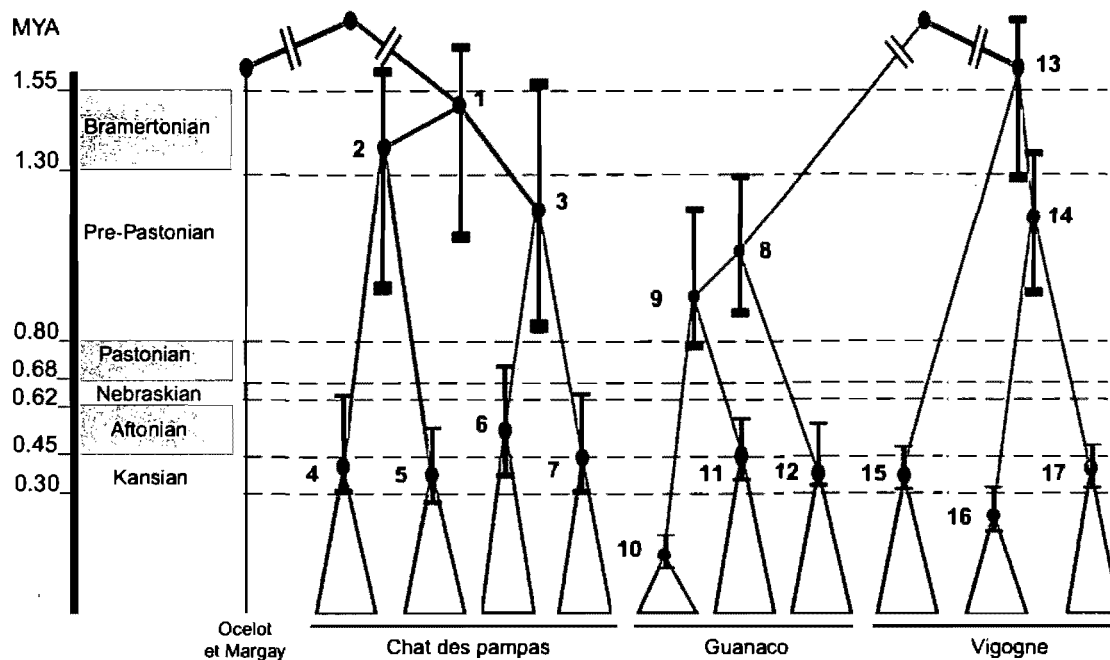
Un des principaux résultats des recherches qui font partie de cette thèse est la description des structures de populations des espèces étudiées. Pour le chat des pampas, on a reconnu quatre groupes de populations génétiquement différenciés, tandis que pour le chat des Andes, les analyses ont révélé l'existence d'au moins trois groupes. Les structures génétiques des populations du chat des Andes et du chat des pampas montrent des différences qui pourraient être expliquées par des préférences d'habitat et des capacités de dispersion distinctes. Contrairement au chat des pampas, la préférence du chat des Andes pour les grandes altitudes (ou, plus précisément, pour les habitats alliant les caractéristiques typiques des grandes altitudes des Andes centrales) pourrait lui permettre de se déplacer par ces zones en les utilisant comme des "corridors". Ceci expliquerait la continuité des populations du chat des Andes entre 21°S et 26°S, tandis qu'existerait une barrière pour le chat des pampas entre 23°S et 25°S. De la même façon, les vallées profondes semblent être des barrières plus importantes pour le chat des Andes que pour le chat des pampas. On peut ainsi expliquer les différences trouvées entre les populations du chat des Andes situées au nord et au sud du 13°S, et de celles se trouvant séparées par la vallée de l'Urubamba (à Cusco, Pérou).

Bien qu'elles présentent de différences, les structures de populations des deux chats partagent une barrière située entre 18°S et 20°S, à la hauteur de la région hyper aride du sud de la Bolivie. Cette barrière coïncide avec les limites reconnues de répartition de certaines espèces de mammifères comme la belette à longue queue, *Mustela frenata* (Sheffield, Thomas, 1997) et pour des sous-espèces identifiées au niveau morphologique (e.g. le petit grison, *Galictis cuja*; Yensen, Tarifa, 2003) ou au niveau de l'ADNmt (i. e. la vigogne, *Vicugna vicugna*; Marin *et al.*, 2007). Étant donné l'adaptation

du chat des Andes aux grandes altitudes et aux milieux arides, on aurait pu s'attendre à ce qu'il n'y ait pas de séparation de ses populations à cette latitude. Ces résultats soulignent l'importance du rôle de la région hyper-aride bolivienne dans la formation de la biodiversité des Andes.

Les effets des changements climatiques du Pléistocène sur la biodiversité des Andes centrales ont été très peu étudiés. Même si plusieurs auteurs ont signalé l'expansion des glaciers et la descente de la ligne de végétation comme des résultats des glaciations (e. g. Simpson, 1969; Pielou, 1979; Smith *et al.*, 2005), des refuges pléistocéniques ou des barrières formées pendant les glaciations n'ont pas été identifiés au nord du 35°S de la région des Andes. Les résultats des chapitres III et IV montrent que les clades trouvés pour le chat des pampas et le chat des Andes ont divergé durant le Pléistocène. Ils signalent un lien entre ces divergences et des périodes glaciaires ou interglaciaires précises, ce qui prouve le rôle et l'importance des changements climatiques du Pléistocène dans la diversification de la faune des Andes centrales.

Pour voir si d'autres espèces habitant les Andes ont réagi d'une façon similaire à celle inferée pour les félidés étudiés, les haplotypes connus pour la région de contrôle de la vigogne (Marin *et al.*, 2007) et du guanaco *Lama guanicoe* (Marin *et al.*, 2008), peuvent être utilisés. Trois clades d'haplotypes sont reconnus pour chaque espèce, tandis que plusieurs tests démographiques suggèrent des expansions pour chacun d'entre eux (Marin *et al.* 2007, 2008). La Figure 1 montre les relations entre les différents clades à partir d'un arbre construit avec la méthode de Neighbour-Joining et le modèle K81uf+I+G, choisi avec le programme MODELTEST (Posada, Crandal, 1998). En considérant un temps de divergence de 2-3 millions d'années entre ces deux espèces habitant les Andes (Stanley *et al.*, 1994; Kadwell *et al.*, 2001), et un taux de mutation constant, on obtient des temps de divergence entre les principaux clades et des expansions démographiques coïncidant assez bien avec ceux trouvés pour le chat des pampas (Figure 1). Cela suggère que la période glaciaire Pré-Pastonienne et l'interglaciaire Aftonienne auraient eu une influence spécialement importante sur la faune des Andes.



Chat des pampas		Guanaco		Vigogne	
Événement	MA	Événement	MA	Événement	MA
1 (divergence)	1,05 - 2,21	8 (divergence)	0,85 - 1,28	13 (divergence)	1,28 - 1,93
2 (divergence)	0,95 - 2,0	9 (divergence)	0,74 - 1,12	14 (divergence)	0,92 - 1,38
3 (divergence)	0,81 - 1,7				
4 (expansion)	0,3 - 0,63	10 (expansion)	0,13 - 0,19	15 (expansion)	0,32 - 0,47
5 (expansion)	0,27 - 0,57	11 (expansion)	0,37 - 0,56	16 (expansion)	0,21 - 0,31
6 (expansion)	0,37 - 0,79	12 (expansion)	0,35 - 0,53	17 (expansion)	0,32 - 0,48
7 (expansion)	0,3 - 0,64				

**Figure 1.** Temps estimés pour les divergences entre les différents clades et pour les expansions démographiques inférées pour le chat des pampas, le guanaco et la vigogne.

Les différences entre l'histoire inférée des populations pour le chat des Andes et celles du chat des pampas, de la vigogne et du guanaco montrent l'importance des différences entre les préférences d'habitat de ces espèces : le chat des Andes, spécialisé à des environnements arides et froids, typiques des hautes altitudes, aurait subi un goulot d'étranglement dû au rétrécissement de son habitat pendant une période interglaciaire (la période Yarmouthienne) tandis que les autres espèces citées auraient vécu des expansions pendant une période similaire (vraisemblablement l'interglaciaire Aftonienne).

## Conservation

À la fin de 2008, le groupe de spécialistes en félidés de l'UICN a fait une réévaluation des statuts de conservation des félidés du monde. J'ai eu la chance d'y participer et, ainsi, les observations faites pendant mon travail sur le terrain et au laboratoire ont servi à la préparation des rapports qui en ont résulté. Les statuts de conservation du chat des pampas et du chat des Andes n'ont pas varié après cette évaluation, mais les nouvelles connaissances sur ces deux espèces ont servi à envisager les besoins de recherches dans le futur (Acosta *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2008). D'un autre côté, les résultats de nos recherches devraient aussi être utiles dans les processus de réévaluation des statuts de conservation de la faune du Pérou, qui aura lieu au cours de 2009.

Les résultats obtenus ont des implications pour la conservation des deux espèces étudiées. L'existence de structures bien définies montre le besoin d'assurer l'origine des individus qui pourraient être sujets de programmes d'élevage ou de réintroductions. Pour la même raison, pour assurer la conservation de la diversité génétique, les programmes de conservation *in situ* devraient considérer des aires d'aménagement dans les régions correspondant à chaque ESU et MU identifiée : Pérou+Altiplano Nord, Altiplano Sud+Jujuy, Nord de l'Argentine (provinces de Catamarca, Salta et Tucuman), Centre de l'Argentine (provinces de Mendoza et Neuquén). Ces considérations devraient également être prises en compte pour les unités proposées comme MUs provisionnelles pour le chat



des pampas au chapitre III, et situées au Nord du Pérou, à l'Est de la Bolivie (province d'Apolobamba) et en Patagonie argentine.

La présence du chat des Andes a été confirmée dans plusieurs aires protégées. Si on considère 47,12 km<sup>2</sup> comme la grandeur du domaine vital estimé pour un individu (Villalba non publié, donnée tirée de Napolitano *et al.* 2008) et que les territoires des félidés peuvent avoir entre 0 et 100% de superposition (i. e. entre 1 et 2 individus pour chaque 47,12 km<sup>2</sup>; Redford, Eisenberg, 1992; Nowell *et al.*, 1996), des estimations des populations que les différentes aires protégées seraient capables de maintenir peuvent être faites. Ainsi, si toute la surface des aires protégées évaluées était appropriée au mode de vie du chat des Andes, ces aires auraient une capacité de entre >1 et 303 individus (Tableau 1), ce qui est toujours en dessous des 500 – 1000 individus considérés généralement comme population viable minimale (Lehmkuhl, 1984; Thomas, 1990). Logiquement, une analyse plus détaillée, considérant uniquement les habitats appropriés au chat des Andes dans chaque aire protégée, aggraverait la situation. Bien que ces estimations soient totalement théoriques et qu'elles ne devraient pas remplacer des futures recherches sur le terrain pour mesurer les populations, elles donnent une idée de l'importance d'établir des corridors entre les aires protégées actuelles.

Le cas du chat des Andes au centre de l'Argentine est spécialement urgent. Cette région correspond à une MU particulière (chapitre IV) récemment menacée par plusieurs activités humaines : développement de l'activité pétrolière et extraction de minéraux (Susan Walker –WCS Argentina– communication personnelle). En plus, en Argentine centrale, le chat des Andes est enregistré uniquement dans deux aires protégées de petite taille (Tableau 1). Des actions de conservation semblent être plus cruciales dans cette région.

**Tableau 1.** Aires protégées où les différentes unités d'aménagement (MUs) du chat des Andes ont été enregistrées, surface et population estimée. Pour estimer la grandeur des populations, un domaine vital de 47,12 km<sup>2</sup> (Villalba, non publié) et une superposition de territoires de 0-100% ont été considérés.

Groupe (MU)	Aire protégée			Population
	Nom	Pays	Surface (km <sup>2</sup> )	
I	Reserva Paisajística Nor Yauyos-Cochas	Pérou	2212	46 - 93
	Zona Reservada Huayhuash	Pérou	675	14 - 28
	Reserva Nacional Salinas y Aguada Blanca	Pérou	3669	77 - 155
	Zona Reservada Aymara Lupaca	Pérou	3000	63 - 127
	Parque Nacional Sajama	Bolivie	7147	151 - 303
	Reserva Nacional Las Vicuñas	Chili	2091	44 - 88
	Parque Nacional Lauca	Chili	1378	29 - 58
	Monumento Nacional Salar de Surire	Chili	112	2 - 4
	Parque Nacional Tunari	Bolivie	3000	63 - 127
II	Reserva Nacional Eduardo Avaroa	Bolivie	7147	151 - 303
	Reserva Laguna de los Pozuelos	Argentine	944	20 - 40
	Reserva Provincial Olaroz-Caucharí	Argentine	2202	46 - 93
	Reserva Provincial Laguna Vilama	Argentine	3100	65 - 131
	Parque Nacional Campo de los Alisos	Argentine	27	>1 - 1
	Reserva Provincial Laguna Blanca	Argentine	6318	134 - 268
	Parque Nacional San Guillermo	Argentine	7802	165 - 331
III	Monumento Natural Caverna de las Brujas	Argentine	5	>1 - >1
	Reserva Provincial Auca Mahuida	Argentine	770	16 - 32

## **Pour le futur**

La biologie des petits félidés des Andes recèle encore un grand nombre d'inconnues. Même si cette thèse a permis d'en savoir plus sur quelques aspects de l'écologie et la génétique de ces animaux, elle a peut-être généré encore plus de questions.

### **Sur le chat des pampas**

Parmi les sujets qui nécessitent des recherches, le plus évident est la clarification des relations phylogénétiques entre les différents clades du chat des pampas au niveau global. Les recherches antérieures, sur la base de plusieurs gènes mitochondriaux, n'ont pas eu une résolution assez grande et, ainsi, les relations entre les populations situées le long des Andes (groupe *pajeros*) et celles que l'on trouve à l'Est (groupe *braccatus*, situé au Brésil, à l'Uruguay, au Paraguay et au Sud-Est de la Bolivie) et à l'ouest de cette chaîne montagneuse (groupe *colocolo*, au Chili central) ne sont pas claires. Une telle recherche devrait se faire alors avec des marqueurs plus variables, telle que la région de contrôle, et permettrait de mieux comprendre l'histoire évolutive du chat des pampas et d'en savoir plus sur le rôle des Andes comme barrière biogéographique. Elle permettrait aussi d'élucider si les populations du nord du Chili sont phylogénétiquement plus semblables de celles du centre du même pays (ce que propose García-Perea (1994)), que d'autres populations géographiquement plus proches, comme celles du Pérou et du Nord de la Bolivie.

Quatre sous-espèces du chat des pampas sont actuellement sujets à controverse. Bien que l'existence d'un clade mitochondrial particulier dans le Nord du Chili prouve la validité de la sous-espèce *Leopardus colocolo wolffsohni* (chapitre III), d'autres sous-espèces continuent à être controversées. Constatant ces controverses, je suggère des recherches pour essayer de les résoudre :

- *Leopardus colocolo crespoid* (Cabrera, 1957) a été décrite à partir d'un seul individu, déposé actuellement au Museo Argentino de Ciencias Naturales (musée argentin de sciences naturelles) de Buenos Aires. Il est le seul exemplaire connu. Araguay, la localité type, se trouve dans la province argentine de Salta, cependant la répartition de cette variété de chat des pampas occuperait aussi les forêts de la province de Tucuman (Cabrera, 1958). García-Perea (1994) et Wozencraft (2005) considèrent qu'il pourrait s'agir d'un synonyme de *L. c. budini* (Nord-Ouest de l'Argentine et Sud de la Bolivie). Étant donné le mauvais état de l'holotype et l'apparente rareté du chat des pampas aux localités nommées, travailler avec de l'ADN de l'individu type s'avère la solution la plus viable.
- *L. c. steinbachi* (Pocock, 1941), décrite aussi à partir d'un seul individu de la localité bolivienne de Cochabamba, situé dans l'Est du pays, a été mise en doute par plusieurs chercheurs. Cabrera (1958) l'a considérée synonyme de *L. c. garleppi*, tandis que García-Perea (1994) a noté des différences entre ces deux sous-espèces, bien que la petite taille de son échantillon (n=2 pour *L. c. steinbachi*) l'ait empêché d'assurer sa validité. Wozencraft (2005) la considère comme une sous-espèce valide. Au chapitre III de cette thèse, nous montrons que des individus de chat des pampas de Cochabamba (n=3) partagent des haplotypes avec les populations du sud de la Bolivie et seraient donc plus proches à *L. c. budini*, mais la relation entre ces deux populations devrait être vérifiée avec un échantillonnage plus grand.

- *L. c. crucinus* (Thomas, 1901) représente probablement le cas de controverse le plus intéressant chez le chat des pampas. García-Perea (1994) a considéré que les différences de taille et de coloration du manteau avec les autres taxa décrits justifient son statut de sous-espèce. D'autres auteurs l'ont présenté comme équivalente à *L. c. pajeros* (Pocock, 1941; Cabrera, 1958), ou à *L. c. budini* (Wozencraft, 2005). Cette dernière opinion est vraisemblablement une erreur, étant donné que *L. c. crucinus* et *L. c. budini* sont géographiquement séparées par la répartition de *L. c. pajeros*, et que cette dernière a été décrite antérieurement à *L. c. budini*. Notre travail montre que des individus trouvés à la limite nord de la répartition supposée pour *L. c. crucinus* présentent des haplotypes mitochondriaux particuliers (n=3) mais appartenant au même clade que ceux de *L. c. pajeros* (chapitre III). L'évaluation d'un plus grand échantillon, incluant des individus de plusieurs régions de Patagonie -et particulièrement de Santa Cruz, localité type de *L. c. crucinus*- est nécessaire pour vérifier les relations entre les populations pouvant appartenir à cette sous-espèce controversée et celles situées plus au nord.

Une autre question intéressante sur le chat des pampas est la possibilité d'hybridation entre les différents clades identifiés. Comme le montre le chapitre III, le nombre de mutations et le temps de divergence estimé entre plusieurs de ces clades sont similaires à ceux existant entre les différentes espèces de lynx (*Lynx* spp), entre le chat de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), le chat-tigre (*Leopardus tigrina*) et le chat tigre (*Leopardus guigna*) et entre l'ocelot (*Leopardus pardalis*) et le margay (*Leopardus wiedii*). Puisque les populations de chat des pampas situées au sud et au nord de la région hyper-aride bolivienne seraient géographiquement isolées depuis plus d'un million d'années, un isolement reproducteur est aussi possible et, dans ce cas, elles pourraient être considérées comme des espèces distinctes. Pour résoudre cette question, des essais de reproduction en captivité devraient être menés entre des individus de ces deux populations, et des études similaires pourraient être faites incluant des chats des groupes *braccatus* (sous espèces décrites à l'est des Andes) et *colocolo* (sous espèce *Leopardus colocolo colocolo*, situé à l'ouest des Andes), proposées comme des espèces différentes par García-Perea (1994).

Malgré un effort considérable, il m'a été impossible d'obtenir des échantillons de chats de pampas du Sud de la Patagonie et de l'Equateur pendant mes études doctorales. Espérant obtenir plus d'informations sur ces populations, j'ai effectué un voyage de 12 jours en Patagonie, en décembre 2008, pour chercher cette espèce. Même si, sur le terrain, quelques personnes m'ont confié avoir vu des chats des pampas, les rapports visuels sont très rares et les musées locaux ne possèdent pas d'exemplaires de ce félidé dans leurs collections. Ces observations confirment la rareté de cette espèce en Patagonie, comme a déjà été enregistrée au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Allen, 1905), mais suggèrent aussi qu'il est encore possible de trouver des individus. Pour le cas de l'Equateur, plusieurs mammalogistes de ce pays m'ont informé n'avoir jamais enregistré cette espèce en liberté et que leurs musées sont aussi dépourvus de peaux que d'autres restes. Des recherches sur le dénombrement, l'écologie et la diversité génétique du chat des pampas dans ces régions où il serait très rare seraient particulièrement importantes pour assurer sa conservation.

### **Sur le chat des Andes**

Les résultats du chapitre IV montrent l'existence de deux groupes de chats des Andes géographiquement séparés et présentant des histoires évolutives différentes. Une recherche sur leurs différences morphologiques, comportementales et écologiques serait intéressante pour permettre la description de deux sous-espèces possibles. Actuellement, le nombre de peaux et de crânes de ce félidé est assez réduit dans les collections des musées (Scrocchi, Halloy, 1986; Chapron, 1999), et on dispose d'un seul crâne du centre de l'Argentine (Walker –WCS Argentine–, communication personnelle), ce qui rend impossible une telle étude. Néanmoins, le regain d'intérêt pour le chat des Andes a entraîné une multiplication des informations sur sa répartition au cours des dernières années. Ces nouveaux rapports sont spécialement nombreux pour le centre de l'Argentine (e. g. Di Martino *et al.*, in press; Sorli *et al.*, 2006a; Martinez *et al.*, 2008), ce qui me permet de penser que les collections des musées disposeront bientôt du matériel nécessaire pour l'étude proposée.

### **Sur la biogéographie des Andes**

Tel qu'indiqué plus haut, il existe des différences importantes entre les structures génétiques des populations du chat des pampas et du chat des Andes, probablement dues aux préférences d'habitats et à des capacités de dispersion distinctes. On peut s'attendre à trouver ces différentes barrières chez d'autres espèces de mammifères des Andes, suivant leurs capacités de dispersion et leurs répartitions altitudinales. La vérification du rôle de ces barrières dans la structure des populations d'autres espèces amplement répandues peut être importante pour mieux connaître la biogéographie des Andes et pour le développement d'un réseau d'aires protégées plus efficace, avec comme but de mieux protéger la diversité génétique de la faune des Andes.

-----oOo-----

## Références

---

- Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos W (2003) Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* **422**, 35.
- Acosta G, Cossios D, Lucherini M, Villalba L (2008) *Leopardus jacobita*. In: *2008 IUCN Red List of Threatened Species*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 13 February 2009 (ed. IUCN).
- Allen JA (1905) *Mammalia of Southern Patagonia* American Museum of Natural History, NY.
- Allendorf FW, Leary RF (1986) Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. Dans: *Conservation biology, the science of scarcity and diversity* (ed. E. SM). Sinauer Associates, Massachusetts.
- Ammann C, Jenny B, Kammer K, Messerli B (2001) Late Quaternary Glacier response to humidity changes in the arid Andes of Chile (18-29 degrees S). *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **172**, 313-326.
- Amos W, Worthington-Wilmer J, Fullard K, Burg TM, Croxall JP, Bloch D, Coulson T (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 2021-2027.
- Angers B, Bernatchez L (1998) Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 143-159.
- Aparicio JM, Cordero PJ, Veiga JP (2001) A test of the hypothesis of mate choice based on heterozygosity in the spotless starling. *Animal Behaviour* **62**, 1001-1006.
- Aquadro CF, Greenberg BD (1983) Human Mitochondrial-DNA Variation and Evolution - Analysis of Nucleotide-Sequences from 7 Individuals. *Genetics* **103**, 287-312.
- Arkush KD, Giese AR, Mendonca HL, McBrice AM, Marty GD, Hedrick PW (2002) Resistance to three pathogens in the endangered winter-run Chinook salmon: effects of inbreeding and MHC genotypes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**, 966-975.
- Arnold ML (1997) *Natural hybridization and evolution* Oxford University Press, Oxford.
- Avise JC (1989) A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution* **4**, 279-281.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.



- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Avise JC, Ball RM (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Dans: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (eds: Futuyama D, Antonovics J). Vol. 7, pp. 45-67. Oxford University Press, New York.
- Avise JC, Walker D, Johns GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1707-1712.
- Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB (2003) Human population genetic structure and inference of group membership. *American Journal of Human Genetics* **72**, 578-589.
- Bassam BJ, Caetanoanollés G, Gresshoff PM (1991) Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* **196**, 80-83.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* **7**, 367-369.
- Bernatchez L, Dodson JJ (1991) Phylogeographic Structure in Mitochondrial-DNA of the Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and Its Relation to Pleistocene Glaciations. *Evolution* **45**, 1016-1035.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C, Sbisá E (1986) Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* **192**, 503-511.
- Burbrink FT (2000) Lawson R, Slowinski J.B. Mitochondrial DNA Phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* **54**, 2107-2118.
- Burger PA, Steinborn R, Walzer C, Petit T, Mueller M, Schwarzenberger F (2004) Analysis of the mitochondrial genome of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with neurodegenerative disease. *Gene* **338**, 111-119.
- Cabrera A (1940) Notas sobre carnívoros sudamericanos. *Notas del Museo de La Plata*, **5**, *Zoología* **29**, 1-22.
- Cabrera A (1957) Dos félidos argentinos inéditos. *Neotropica* **3**, 70-72.
- Cabrera A (1958) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* *Zoología* **4**, 1-308.
- Cabrera A, Willink A (1973) *Biogeografía de América Latina* OEA, Washington D. C.
- Cabrera A, Yepes J (1960) *Mamíferos sudamericanos* Carlos C. Wiedner, Buenos Aires.

- Cann RL, Brown WM, Wilson AC (1984) Polymorphic Sites and the Mechanism of Evolution in Human Mitochondrial-DNA. *Genetics* **106**, 479-499.
- Carmichael LE, Clark W, Strobeck C (2000) Development and characterization of microsatellite loci from Lynx (*Lynx canadensis*), and their use in other felids. *Molecular Ecology* **9**, 2197-2199.
- Carstens BC, Brunsfeld SJ, Demboski JR, Good JD, Sullivan J (2005) Investigating the evolutionary history of the Pacific Northwest mesic forest ecosystem: hypothesis testing within a comparative phylogeographic framework. *Evolution* **59**, 1639-1652.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **32**, 550-570.
- Chakraborty R, Jin L (1993) Determination of Relatedness between Individuals Using DNA-Fingerprinting. *Human Biology* **65**, 875-895.
- Chapron G (1999) Évaluation du statut du chat des Andes (*Oreailurus jacobita*) par interviews des populations locales dans les Andes centrales. *Recueil de Médecine Vétérinaire* **175**, 119-125.
- Chesser RT (2000) Evolution in the high Andes: the phylogenetics of Muscisaxicola ground-tyrants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**, 369-380.
- Clapperton CM (1993) Glacier Readvances in the Andes at 12500-10000 Yr Bp - Implications for Mechanism of Late-Glacial Climatic-Change. *Journal of Quaternary Science* **8**, 197-215.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1660.
- Collier GE, O'Brien SJ (1985) A molecular phylogeny of the Felidae : immunological distance. *Evolution* **39**, 437-487.
- Coltman DW, Bowen WD, Wriqht JM (1998) Birth weith and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**, 803-809.
- Cossíos ED, Angers B (2006) Identification of Andean felid feces using PCR-RFLP. *Journal of Neotropical Mammalogy* **13**, 239-244.
- Cossíos D, Beltrán Saavedra F, Bennet M, Bernal N, Fajardo U, Lucherini M, Merino J, Marino J, Napolitano C, Palacios R, Perovic P, Ramirez Y, Villalba L, Walker S, Sillero-Subiri C (2007a) *Manual de metodologías para relevamientos de carnívoros altoandinos*. Alianza Gato Andino, Buenos Aires, Argentina.
- Cossíos ED, Madrid A (2003) Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) and other Andean carnivores. Status survey in Ayacucho, Arequipa, Puno and Tacna departments, Peru. Cat Action Treasury, Unpublished report.

- Cossíos ED, Madrid A, Condori JL, Fajardo U (2007b) An update on the distribution of Andean cat *Oreailurus jacobita* and pampas cat *Lynchailurus colocolo* in Peru. *Endangered Species Research* **3**, 313-320.
- Cossíos ED, Ruiz-García M, Lucherini M, Angers B (2009) Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *BMC Evolutionary Biology* **9**, 68.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 290-295.
- Davidson A, Birks JDS, Brookes RC, Braithwaite TC, Messenger JE (2002) On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. *Journal of Zoology London* **257**, 141-143.
- de Oliveira T, Eizirik E, Lucherini M, Acosta G, Leite-Pitman R, Pereira J (2008) *Leopardus colocolo*. In: *2008 IUCN Red List of Threatened Species* (ed. IUCN). <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 14 January 2009.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews of Genetics* **5**, 702-712.
- Di Martino S, Monteverde M, Novaro A, Walker S (in press) New records of the Andean cat (*Leopardus jacobita*) in Neuquén Province, Patagonia, Argentina. *Wildlife Society Bulletin*.
- Dizon AE, Lockyer C, Perrin WF, Demaster DP, Sisson J (1992) Rethinking the Stock Concept - a Phylogeographic Approach. *Conservation Biology* **6**, 24-36.
- Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE, Crawshaw PG, Vie JC, Brousset DM, O'Brien SJ, Salzano FM (1998) Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution* **47**, 613-624.
- Eizirik E, Indrusiak C, Trigo TC, Sana DA, Mazim FD, Freitas TRO (2006) Refined Mapping and Characterization of the Geographic Contact Zone Between *Oncilla* and Geoffroy's Cat in Southern Brazil. *IUCN Cat News* **45**, 8-11.
- Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ, Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* **10**, 65-79.
- Ernest HB, Boyce WM, Bleich VC, May B, Stiver SJ, Torres SG (2003) Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics* **4**, 353-366.
- Ernest HB, Penedo MCT, May BP, Syvanen M, Boyce WM (2000) Molecular tracking of mountain lion in the Yosemite Valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* **9**, 433-441.

- Estoup A, Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: *Advances in Molecular Ecology* (ed. Carvalho GR), pp. 55-86. IOS Press, Amsterdam.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Faircloth BC, Reid A, Valentine T, Eo SH, Terhune TM, Glenn TC, Palmer WE, Nairn CJ, Carroll JP (2005) Tetranucleotide, trinucleotide, and dinucleotide loci from the bobcat (*Lynx rufus*). *Molecular Ecology Notes* **5**, 387-389.
- Farrel LE, Roman J, Sunquist ME (2000) Dietary separation of sympatric canivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* **9**, 1583-1590.
- Ferrari M, Greig O, Saltzman J, Palermo MA, Marchetti B (1984) El gato montés. *Fauna Argentina* **57**.
- Flenley JR (1998) Tropical forests under the climates of the last 30,000 years. *Climatic Change* **39**, 177-197.
- Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT, Kempenaers B (2003) Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* **425**, 714-717.
- Foran DF, Crooks KR, Monta SC (1997) Species identification from scat: an ambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin* **25**, 835-839.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Frantzen MAJ, Silk JB, Ferguson JWH, Wayne RK, Kohn MH (1998) Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* **7**, 1423-1428.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* **10**, 2741-2752.
- Freeman AR, MacHugh DE, McKeown S, Walzer C, McConnell DJ, Bradley DG (2001) Sequence variation in the mitochondrial DNA control region of wild African cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Heredity* **86**, 355-362.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J (1996) Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 31-46.

- García-Perea R (1994) The pampas cat group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858) (Carnivora: Felidae), a systematic and biogeographic review. *American Museum Novitates* **3096**, 1-35.
- García-Perea R (2002) Andean mountain cat, *Oreailurus jacobita*: Morphological description and comparison with other felines from the Altiplano *Journal of Mammalogy* **83(1)**, 110-124.
- Glaubitz JC (2004) CONVERT (version 1.2): A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* **4**, 309-310.
- González JO, González JG (1996) Situación del lince ibérico en Sierra de Gata. *Doñana, Acta Vertebrata* **23**, 91-98.
- Gottelli D, Marino J, Sillero-Zubiri C, Funk SM (2004) The effect of the last glacial age on speciation and population structure of the endangered Ethiopian wolf, (*Canis simensis*). *Molecular Ecology* **13**, 2275–2286.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Graham A, Gregory-Wodzicki KM, Wright KL (2001) Studies in Neotropical botany. XV. A Mio-Pliocene palynoflora from the Eastern Cordillera, Bolivia: implications for the uplift history of the Central Andes. *American Journal of Botany* **88**, 1545-1557.
- Gray MW (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology* **5**, 25-50.
- Green R (1991) *Wild cat species of the world* Basset, Plymouth.
- Grimwood IR (1969) *Notes on the distribution and status of some Peruvian mammals 1968. Special Publication n°21* New York Zoological Society, Bronx.
- Grisolia AB, Moreno VR, Campagnari F, Milazzotto MP, Garcia JF, Adania CH, Souza EB (2007) Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. *Genetics and Molecular Research* **6**, 382-384.
- Groom MJ, Meffe GK, Carroll CR (2006) *Principles of conservation biology*, 3ème édition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Groves P (1997) Intraspecific variation in mitochondrial DNA of muskoxen, based on control-region sequences. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **75**, 568-575.
- Guggisberg C (1975) *Wild cats of the world* David and Charles, London.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.

- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of population genetics*, 4ème edition. Sinauer Associates, Sunderland-Massachusetts.
- Hedrick PW (2004) Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management* **197**, 3-19.
- Hemmer H (1978) The evolutionary systematics of living Felidae: present status and current problems. *Carnivore* **1**, 71-79.
- Herrington SJ (1983) *Systematics of the Felidae: a quantitative analysis*, Thèse de maîtrise, Université d'Oklahoma, Norman.
- Herrington SJ (1986) *Phylogenetic relationships of the wild cats of the world*, Thèse de doctorat, Université de Kansas, Lawrence.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM (1991) Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* **251**, 1488-1490.
- Hoelzel AR, Lopez JV, Dover GA, O'Brien SJ (1994) Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *Journal of Molecular Evolution* **39**, 191-199.
- Hunt MH (1996) Biogeography of the Order Carnivora. In: *Carnivore behavior, ecology and evolution* (ed. Gittleman JL), pp. 485-541. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Ilmonen P, Penn DJ, Damjanovich K, Clarke J, Lamborn D, Morrison L, Ghotbi L, Potts WK (2008) Experimental infection magnifies inbreeding depression in house mice. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 834-841.
- Ilmonen P, Penn DJ, Damjanovich K, Morrison L, Ghotbi L, Potts WK (2007) Major histocompatibility complex heterozygosity reduces fitness in experimentally infected mice. *Genetics* **176**, 2501-2508.
- Iriarte A (1999) Gato montés andino en Chile: Estado de conservación y distribución geográfica.
- IUCN TWCU (2006) 2006 IUCN redlist of threatened species. Available at: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Accessed on 26 April 2007.
- Jacquemyn H, Vandepitte K, Brys R, Honnay O, Roldán-Ruiz I (2007) Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Biological Conservation* **139**, 203-210.
- Johnson WE, Culver M, Iriarte JA, Eizirik E, Seymour KL, O'Brien SJ (1998) Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *Journal of Heredity* **89**, 227-232.

- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ (2006) The Late Miocene radiation of modern Felidae: A genetic assessment. *Science* **311**, 73-77.
- Johnson WE, Godoy JA, Palomares F, Delibes M, Fernandes M, Revilla E, O'Brien SJ (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity* **95**, 19-28.
- Johnson WE, O'Brien SJ (1997) Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution* **44**(Suppl 1), S98-S116.
- Johnson WE, Slattery JP, Eizirik E, Kim JH, Raymond MM, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, Seuanez HN, Moreira MAM, Seymour KL, Simon F, Swanson W, O'Brien SJ (1999) Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* **8**, S79-S94.
- Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW (2001) Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B Bio* **268**, 2575-2584.
- Keller LF, Walker DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 230-241.
- Kohn MH, Wayne RK (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **12**, 223-227.
- Kull C, Grosjean M, Veit H (2002) Modeling modern and Late Pleistocene glacio-climatological conditions in the north Chilean Andes (29-30 degrees S). *Climatic Change* **52**, 359-381.
- Langella O (2002) POPULATIONS, a free population genetic software. CNRS UPR9034.
- Lavenu A (1992) Formation and geological evolution. In: *Lake Titicaca: a synthesis of limnological knowledge* (eds. Dejoux C, Iltis A), pp. 3-15. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Lehmkuhl JF (1984) Determining Size and Dispersion of Minimum Viable Populations for Land Management Planning and Species Conservation. *Environmental Management* **8**, 167-176.
- Lehr E, Catenazzi A (2008) A new species of *Bryophryne* (Anura: Strabomantidae) from southern Peru. *Zootaxa* **1784**, 1-10.
- Lindahl T (1993) Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lopez JV, Cevario S, O'Brien SJ (1996) Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. *Genomics* **33**, 229-246.

- Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi WS, O'Brien SJ (1994) Numt, a transposition and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* **39**, 174–190.
- Lucherini M, Luengos E (2003) Intraguild competition as a potential factor affecting the conservation of two endangered cats in Argentina. *Endangered Species Update* **20**, 211–220.
- Lucherini M, Merino MJ (2008) Perceptions of human-carnivore conflicts in the High Andes of Argentina. *Mountain Research and Development* **28**, 81-85.
- Lucherini M, Vidal EL, Merino MJ (2008) How rare is the rare Andean cat? *Mammalia* **72**, 95-101.
- Lunt DH, Hyman BC (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* **387**, 247.
- Marin JC, Casey CS, Kadwell M, Yaya K, Hoces D, Olazabal J, Rosadio R, Rodriguez J, Spotorno A, Bruford MW, Wheeler JC (2007) Mitochondrial phylogeography and demographic history of the Vicuna: implications for conservation. *Heredity* **99**, 70-80.
- Marin JC, Spotorno AE, Gonzalez BA, Gonzalez BA, Bonacic C, Wheeler JC, Casey CS, Bruford MW, Palma RE, Poulin E (2008) Mitochondrial DNA variation and systematics of the guanaco (*Lama guanicoe*, Artiodactyla : Camelidae). *Journal of Mammalogy* **89**, 269-281.
- Markraf V (1993) Climatic history of Central and South America since 18000 yr B.P.: Comparison of pollen records and model simulations. In: *Global climates since the Last Glacial Maximum* (eds. Wrigth HE, Kutzbach JE, Webb T, *et al.*), pp. 357-385. University of Minnesota Press, Minnesota.
- Martinez F, Chebez JC, Berlanga P, Yacante R, A. NN (2008) Nueva localidad para el gato andino *Oreailurus jacobita* (Cornalia, 1865) en la provincia de Mendoza, Argentina. *Nótulas Faunísticas, Segunda Serie* **26**, 1-5.
- Masuda R, Lopez J, Pecon Slattery J, Yuhki N, O'Brien SJ (1996) Molecular Phylogeny of Mitochondrial Cytochrome b and 12S rRNA Sequences in the Felidae: Ocelot and Domestic Cat Lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 351-365.
- Mayr E, Ashlock PD (1991) *Principles of Systematic Zoology* McGraw-Hill, New York.
- Menotti-Raymond M, David VA, Agarmada R, Schäffer AA, Stephens R, O'Brien SJ (2003) Radiation hybrid mapping of 304 novel microsatellites in the domestic cat genome. *Cytogenetics Genome Research* **102**, 272-276.
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien SJ (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* **57**, 9-23.
- Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1995) Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity* **86**, 319-322.



- Mercer JH (1976) Glacial history of Southernmost South America. *Quaternary Research* **6**, 125-166.
- Milton JB (1993) Enzyme heterozygosity, metabolism and developmental stability. *Genetica* **89**, 47-65.
- Moritz C (1994) Defining Evolutionarily-Significant-Units for Conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373-375.
- Napolitano C, Bennett M, Johnson WE, O'Brien SJ, Marquet PA, Barria I, Poulin E, Iriarte A (2008) Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic Andean cat species using genetic identification of faecal samples. *Molecular Ecology* **17**, 678-690.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics* Columbia University Press, New York.
- Nilsson T (1983) *The Pleistocene, geology and life in the quaternary ice age* D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Netherlands.
- Noonan BP, Gaucher P (2005) Phylogeography and demography of Guianan harlequin toads (*Atelopus*), diversification within a refuge. *Molecular Ecology* **14**, 3017-3031.
- Nowell K (2002a) The Cat Specialist Group digital library as a measure of cat conservation effort. *Cat News* **37**, 23-24.
- Nowell K (2002b) Revision of the Felidae Red List of Threatened Species. *Cat News* **37**, 4-6.
- Nowell K, Jackson P, IUCN/SSC Cat Specialist Group (1996) *Wild cats : status survey and conservation action plan* IUCN, Gland, Switzerland.
- Núñez A, Gallardo G (2002) Distribución de tres especies de felinos: gato andino (*Oreailurus jacobitus*), gato de las pampas (*Lynchailurus pajeros*) y oskollo (*Oncifelis geoffroyi*) en Bolivia. Cat Action Treasury - COCGA, Unpublished report, La Paz, Bolivia.
- O'Brien SJ (1994) A Role for Molecular-Genetics in Biological Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5748-5755.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR, Bush M (1983) The Cheetah Is Depauperate in Genetic-Variation. *Science* **221**, 459-462.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel-Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2766-2770.
- Paetkau D, Strobeck C (1994) Microsatellite Analysis of Genetic-Variation in Black Bear Populations. *Molecular Ecology* **3**, 489-495.

- Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Johnson WE (2002) Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* **11**, 2171-2182.
- Palstra FP, Ruzzante DE (2008) Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology* **17**, 3428-3447.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* **79**, 361-382.
- Paxinos E, McIntosh K, Ralls K, Fleishcher R (1997) A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* **6**, 483-486.
- Pearson OP (1957) Additions to the mammalian fauna of Peru and notes on some other Peruvian mammals. *Breviora* **73**, 1-7.
- Perovic P, Walker S, Novaro A (2003) New records of the Endangered Andean mountain cat in northern Argentina. *Oryx* **37**, 374-377.
- Pielou EC (1979) *Biogeography* John Wiley & Sons, New York.
- Pirez AE, Fernandes ML (2003) Last lynxes in Portugal? Molecular approaches in a pre-extinction scenario. *Conservation Genetics* **4**, 525-532.
- Pocock RI (1941) The examples of the Colocolo and of the Pampas Cat in the British Museum. *Annals and Magazine of Natural History, eleventh series* **39**, 257-274.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Molecular Ecology* **9**, 487-488.
- Primack RB (2006) *Essentials of conservation biology*, 4ème édition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Prugh LR, Ritland CE (2005) Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. *Wildlife Society Bulletin* **33**, 189-194.
- Putman RJ (1984) Facts from faeces. *Mammal Review* **14**, 79-97.
- Ramírez O, Arana M, Kunimoto C, De la Cruz C, Guabloche A (2001) Lista comentada de los mamíferos no voladores de la Reserva Nacional de Lachay. *Biota* **100**, 108-113.

- Randi E, Lucchini V (1998) Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution* **47**, 449-462.
- Raymond M, Rousset F (1995a) An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**, 1280-1283.
- Raymond M, Rousset F (1995b) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Redford KH, Eisenberg JF (1992) *Mammals of the Neotropics* Univ. Chicago Press, Chicago.
- Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD, Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of Neotropical rain forest trees. *Science* **293**, 2242-2245.
- Riddle AE, Pilgrim KL, Scott Mills L, McKelvey KS, Ruggiero LF (2003) Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetics* **4**, 241-243.
- Romo MC (1995) Food habits of the Andean fox (*Pseudalopex culpaeus*) and notes on the mountain cat (*Felis colocolo*) and puma (*Felis concolor*) in the Río Abiseo National Park, Perú. *Mammalia* **59**, 335-343.
- Ruiz-García M (2007) Genética de poblaciones: Teoría y aplicación a la conservación de mamíferos neotropicales (oso andino y delfín rosado). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección Biológica* **102**, 99-126.
- Ruiz-García M, Pacheco L, Alvarez D (2008) Caracterización genética del puma andino boliviano. *Revista Chilena de Historia Natural* **81**, 470-492.
- Ryder OA (1986) Species Conservation and Systematics - the Dilemma of Subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* **1**, 9-10.
- Saccone C, Pesole G, Sbisa E (1991) The Main Regulatory Region of Mammalian Mitochondrial-DNA - Structure-Function Model and Evolutionary Pattern. *Journal of Molecular Evolution* **33**, 83-91.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanderson J (1999) Andean mountain cats (*Oreailurus jacobita*) in Northern Chile. *Cat News* **30**, 25-26.
- Sauermann U, Nurnberg P, Bercovitch FB, Berard JD, Trefilov A, Widdig A, Kessler M, Schmidtke J, Krawczak M (2001) Increased reproductive success of MHC class II heterozygous males among free-ranging rhesus macaques. *Human Genetics* **108**, 249-254.

- Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**, 125-140.
- Schaller GB, Liu W, Wang X (1996) Status of Tibet red deer. *Oryx* **30**, 269-274.
- Schneider S, Roessli D, Excofier L (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Scribner KT, Pearce JM (2000) Microsatellites : evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In: *Molecular methods in ecology* (ed. Baker AJ), pp. 235-265. Blackwell Science.
- Scrocchi GJ, Halloy SP (1986) Notas sistemáticas, ecológicas, etológicas y biogeográficas sobre el gato andino. *Acta Zoológica Lilloana* **23**, 157-180.
- Seddon N, Amos W, Mulder RA, Tobias JA (2004) Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**, 1823-1829.
- Sheffield SR, Thomas HH (1997) *Mustela frenata*. *Mammalian Species* **570**, 1-9.
- Silveira L (1995) Notes on the Distribution and Natural-History of the Pampas Cat, *Felis colocolo*, in Brazil. *Mammalia* **59**, 284-288.
- Simpson GG (1969) South American Mammals. In: *Biogeography and ecology in South America* (eds. Fittkon EJ, Illies J, Klinge H, Schwabe GH, Sioli H), pp. 879-910. Dr. Junk N.V. Publishers, The Hague.
- Singh A, Shailaja K, Gaur A, Singh L (2002) Development and characterization of novel microsatellite markers in the Asiatic lion (*Panthera leo persica*). *Molecular Ecology Notes* **2**, 542.
- Smith JA, Seltzer GO, Rodbell DT, Klein AG (2005) Regional synthesis of last glacial maximum snowlines in the tropical Andes, South America. *Quaternary International* **138**, 145-167.
- Solari S, Pacheco V, Luna L, Velazco PM, Patterson BD (2006) Mammals of the Manu Biosphere Reserve. In: *Mammals and birds of the Manu Biosphere Reserve, Peru* (eds. Patterson BD, Stotz DF, Solari S), pp. 13-23. Fieldiana (Zoology).
- Sorli LE, Martínez FD, Lardelli U, Brandi S (2006) Andean cat in Mendoza, Argentina – furthest south and lowest elevation ever recorded. *Cat News* **44**, 24.
- Spielman D, Brook BW, Franckham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15261-15264.

- Stanley HF, Kadwell M, Wheeler JC (1994) Molecular Evolution of the Family Camelidae - a Mitochondrial-DNA Study. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **256**, 1-6.
- Steele CA, Storfer A (2006) Coalescent-based hypothesis testing supports multiple Pleistocene refugia in the Pacific Northwest for the Pacific giant salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *Molecular Ecology* **15**, 2477-2487.
- Swofford DL (1993) PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Massachusetts.
- Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial-DNA Polymorphism, Phylogeography, and Conservation Genetics of the Brown Bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **255**, 195-200.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 323-327.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**, 437-460.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 512-526.
- Tautz D (1989) Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple Sequences Are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Taylor, G (2001) *Waruchiri. Ñawpa machunkunap kawsasqan*. Instituto Francés de Estudios Andinos, Lima, Perou.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* **117**, 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. *Genetics* **132**, 619-633.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**, 767-782.

- Templeton AR, Sing CF (1993) A cladistic analysis of pheno-typic associations with haplotypes inferred from restrictionendonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogramuncertainty and recombination. *Genetics* **134**, 659–669.
- Thomas CD (1990) What Do Real Population-Dynamics Tell Us About Minimum Viable Population Sizes. *Conservation Biology* **4**, 324-327.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Ursenbacher S, Carlsson M, Helfer V, Tegelstörn H, Fumagalli L (2006) Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* **15**, 3425-3437.
- Van Dyke F (2008) *Conservation biology, foundations, concepts applications*, 2ème édition. Springer.
- Vawter L, Brown WM (1986) Nuclear and Mitochondrial-DNA Comparisons Reveal Extreme Rate Variation in the Molecular Clock. *Science* **234**, 194-196.
- Villalba L, Lucherini M, Walker S, Cossíos D, Iriarte A, Sanderson J, Gallardo G, Alfaro F, Napolitano C, Sillero-Zubiri C (2004) *The Andean cat: A conservation action plan* Andean Cat Alliance, La Paz, Bolivia.
- Vogler AP, DeSalle R (1994) Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology* **6**, 170-178.
- Vuilleumier F (1969) Systematics and evolution in *Diglossa* (Aves: Coerebidae). *American Museum Novitates* **2381**, 1-44.
- Walker RS, Novaro AJ, Perovic P, Palacios R, Donadio E, Lucherini M, Pia M, Lopez MS (2007) Diets of three species of Andean carnivores in high-altitude deserts of Argentina. *Journal of Mammalogy* **88**, 519-525.
- Wan QH, Fang SG, Chen GF, Wang ZM, Ding P, Zhu MY, Chen KS, Yu JH, Zhao YP (2003) Use of oligonucleotide fingerprinting and faecal DNA in identifying the distribution of the Chinese tiger (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer). *Biodiversity and Conservation* **12**, 1641-1648.
- Waples RS (1991) Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp. & the definition of ‘species’ under the endangered species act. *Marine Fisheries Review* **53**, 11-22.
- Wasser SK, Davenport B, Ramage RE, Hunt KE, Parker M, Clarke C, Stenhouse G (2004) Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears i the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **82**, 475-492.
- Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain SR (1997) Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* **6**, 1091-1097.

- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Werdelin L (1985) Small pleistocene felines of North America. *Journal of Vertebrate Paleontology* **5**, 194-210.
- Weske JS (1985) A new subspecies of Collared Inca Hummingbird (*Coeligena torquata*) from Peru. *Ornithological Monographs* **36**, 41-45.
- Williamson JE, Huebinger RM, Sommer JA, Louis EE, Barber RC (2002) Development and cross-species amplification of 18 microsatellite markers in the Sumatran tiger (*Panthera tigris sumatrae*). *Molecular Ecology Notes* **2**, 110-112.
- Wozencraft WC (1993) Order Carnivora. In: *Mammal species of the world* (eds. Wilson DE, Reeder DM), pp. 279-348. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Wozencraft WC (2005) Order Carnivora. In: *Mammal species of the world* (eds. Wilson DE, Reeder DM), pp. 532-628. John Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Wu CI (1991) Inference of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms. *Genetics* **127**, 429-435.
- Yapu F (2001) *Leyendas del Titikaka, Cosmovisión y leyenda del lago sagrado*. La Paz, Bolivia.
- Yensen E, Seymour KL (2000) *Oreailurus jacobita*. *Mammalian Species* **611**, 1-6.
- Yensen E, Tarifa T (2003) *Galictis cuja*. *Mammalian Species* **728**, 1-8.
- Young KA (2001) Defining units of conservation for intraspecific biodiversity: Replay to Dimmick et al. *Conservation Biology* **15**, 784-787.
- Zeballos H, L. V, R. G, K. C, P. J (2000) Vertebrados de las lomas de Atiquipa y Mejía, sur del Perú. *Revista de Ecología Latinoamericana* **7(3)**, 11-18.
- Zink RM (1996) Comparative phylogeography in North American birds. *Evolution*, **50**, 308-317.
- Zink RM (2004) The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**, 561-564.
- Zuercher GL, Gipson PS, Stewart GC (2003) Identification of carnivore feces by local peoples and molecular analyses. *Wildlife Society Bulletin* **31**, 961-970.

## Annexes

### Annexe 1 : Enregistrements pour le chat des pampas au Pérou, utilisés au Chapitre II

#### A- Enregistrements faits pendant cette recherche

Département / Province / Localité	Sud	Ouest	Altitude	Peaux	Animaux morts	Excré- ments	Observation d'animaux vivants	Année
Tacna/Tarata/Kovire	17°13'08''	69°54'51''	4318	1				2002
Tacna/Tarata/Tarata	17°29'40''	70°02'08''		6				2005
Tacna/Candarave/ Candarave	17°17'24''	70°14'35''				1	2	2004/ 2005
Tacna	17°25'12''	69°57'49''		1				2004
Tacna	17°38'42''	70°27'37''			1			2005
Tacna/Tacna/Churuyo	17°01'48''	69°57'43''	4563	2				2002
Puno/Puno/Laraqueri	16°08'59''	70°03'47''	3973	1				2002
Puno/Puno/Tiquillaca	15°47'58''	70°10'46''	3887	1				2002
Puno/El Collao/ Jijuaña	17°13'50''	69°53'40''	4400	13				2005
Puno/Puno/ Hacienda Ucumani	15°52'14''	70°11'50''	3992	1				2002
Puno/El Collao	16°42'55''	69°43'38''				5		2004
Puno/El Collao	17°08'09''	69°41'54''				1		2004
Puno/El Collao	17°08'05''	69°45'49''				1		2004
Puno/El Collao	17°08'06''	69°46'19''				1		2004
Puno/El Collao/Tiracollo	17°02'12''	69°41'44''	4199	1				2002
Puno/Chucuito/Pisacoma	16°54'30''	69°22'15''	3934	1				2002
Puno/Chucuito/Arakachi	16°41'39''	69°14'24''	3856	1				2002
Puno/Chucuito/Tanca	16°35'10''	69°15'36''	3868	2				2002
Puno/Huaychacarani	14°52'41''	69°56'09''	4202	1				2002
Puno/Paccha	11°27'58''	75°57'49''	3725	1				2002
Puno/Calera	15°21'16''	70°22'29''		1				2004
Puno/Lampa	15°21'52''	70°21'58''				4		2004
Puno/Lampa	15°15'41''	70°28'45''		1				2004
Puno/Lampa	15°21'54''	70°21'58''		1				2004
Moquegua/Titire	16°40'53''	70°22'47''		1				2005
Apurímac/ Grau/ Cerro Quilchiua	13°48'05''	72°29'31''				1		2004
Apurímac/Abancay/ Pachacpata	14°02'57''	72°57'51''				1		2004
Apurímac/Andahuaylas/ Apurímac	13°36'25''	73°15'59''				1		2004
Apurímac/Abancay/ Pachachaca	13°39'33''	72°56'40''				1		2004
Apurímac/Chalhuanca/ Pairaca	14°17'28''	73°15'14,9 9''				1		2004



Apurimac/Haquira	14°12'45"	72°11'22,3 5"		1				2005
Apurimac/Cotabamba	13°44'49"	72°21'22,1 1"		1				2005
Arequipa/Ararahui	15°32'31"	77°27'06,3 6"	4274	1				2002
Arequipa/Arequipa/ Yura	16°14'03"	71°39'41,9 4"	2777		1			2002
Arequipa/Colca Huallata/RNSAB	15°41'15"	71°01'09,5 0"				1		2004
Arequipa/Parcco/ Achacota/RNSAB	15°46'11"	71°27'49,6 3"				1		2004
Arequipa/Condesuyos	15°23'36"	70°38'26,8 0"				2		2004
Arequipa/Condesuyos	15°19'11"	72°40'41,5 0"				2		2004
Arequipa/La Union	15°06'49"	72°40'46,8 2"				1		2004
Arequipa/La Union	15°07'22"	72°39'58,9 6"				1		2004
Ayacucho/near Coracora	15°00'31"	73°46'11,9 8"	3175	5				2002
Ayacucho/Upahuacho	14°54'30"	73°23'53,6 8"	3405	1				2002
Ayacucho/ Incuyo	15°14'36"	73°33'58,2 2"	3350			1		2002
Ayacucho/Parinacochas/ Pullo	15°12'17"	73°49'32,5 0"	3200	1				2002
Ayacucho/Huamanpampa	15°02'53"	73°46'27,3 1"	3150	1				2002
Ayacucho/Vilcas Huaman/Intihuatana	15°10'41"	73°44'11,0 2"	3550	1				2002
Ayacucho/Lucanas/ Nacalla	15°02'39"	73°52'32,8 6"	3520	1				2002
Ayacucho/Lucanas/ Pampa Galeras	14°39'44"	74°22'13,0 3"	4020	1				2002
Ayacucho/lac Yaurihuri	14°35'30"	73°57'03,7 2"	4450			2		2002
Ayacucho/Huamanga/ Matará	13°18'39"	73°59'32,8 3"	3500	1				2002
Ayacucho/Huamanga/ Yanahuanco bajo	13°19'10"	74°00'24,6 5"	3680			1		2002
Ayacucho/ Cancha Cancha	13°36'19"	74°18'48,2 6"	3350	1				2002
Ayacucho/Huancapi	13°45'09"	74°03'57,4 3"	3106			2		2002
Ayacucho/Patacancha	13°44'11"	74°09'53,0 6"	4040			1		2002
Ayacucho/Canaria	13°55'26"	73°54'16,2 6"	3100	2				2002
Ayacucho/Querobamba	14°00'54"	73°50'28,8 8"	3840	1				2002
Ayacucho/Tintay	14°04'43"	73°51'54,9 8"	4200	2				2002
Cuzco/Quispicanchis/	13°44'37"	71°12'14,8		1		4		2004

Auzangate		3''						
Lima/Cajatambo/ Huancanayoc	10°30'38''	76°58'07,1 4''		1				2005
Lima/Huaro-chiri/ Matucana	11°53'04''	76°26'23,0 2''			1			2001
Lima/La Oroya	11°37'37''	76°01'00,2 8''	4057			1		2006
Lima/Tanta	12°07'17''	76°01'27,8 9''	3876			2		2006
Lima/Tanta	12°02'42''	75°58'18,3 4''	4433			1		2006
Lima/Tanta	12°01'49''	75°58'15,5 7''	4476			5		2006
Lima/Tanta	12°04'00''	75°56'53,1 2''	4142			6		2006
Lima/Tanta	12°03'54''	75°56'33,4 2''	4126			1		2006
Lima/Tanta	12°05'04''	75°57'14,3 2''	4217			1		2006
Lima/Tanta	12°14'12''	76°00'29,1 5''	4481			2		2006
Lima/Tanta	12°13'58''	76°00'34,9 6''	4540			2		2006
Lima/Tanta	12°09'38''	75°59'27''	4578			1		2006
Lima/Canta/Huaros	11°24'19''	76°34'26''		2				2006
Junin/Canchayllo	11°50'24''	75°41'41''	3959			1		2006
Junin/Canchayllo	11°49'49''	75°41'59''	3890			3		2006
Junin/Canchayllo	11°51'36''	75°45'35''	3847			7		2006
Ancash/Bolognesi/ Huayhuash	10°12'51''	76°56'11''				12		2006
Junin/Junin National Reserve	11°00'45''	76°01'43''		4	1	22	2	2005/ 2006
Pasco/Pasco/Huayllay	10°56'07''	76°20'15''			1	15		2005/ 2006
Ancash/Recuay	10° 8'17"	77°20'54"	4230			1		2006
Ancash/Recuay	10° 5'26"	77°21'43"	4256			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'40"	77°23'20"	4025			1		2006
Ancash/Recuay	10° 7'1"	77°23'49"	4129			2		2006
Ancash/Recuay	10° 6'2"	77°24'52"	4356			1		2006
Ancash/Recuay	10° 5'51"	77°18'50"	4235			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'10"	77°19'7"	4423			1		2006
Ancash/Recuay	10° 5'52"	77°18'53"	4486			2		2006
Ancash/Recuay	10° 6'32"	77°19'25"	4329			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'31"	77°27'20"	4156			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'39"	77°27'24"	4523			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'48"	77°27'18"	4462			1		2006
Ancash/Recuay	10° 7'0"	77°27'35"	4451			1		2006
Ancash/Recuay	10° 7'12"	77°27'51"	4435			1		2006
Ancash/Recuay	10° 7'21"	77°28'23"	4445			2		2006
Ancash/Recuay	10° 6'34"	77°27'37"	4458			1		2006
Ancash/Recuay	10° 6'21"	77°27'32"	4399			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'33"	77°25'12"	4582			2		2006
Ancash/Huaraz	9°32'33"	77°24'52"	4877			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'29"	77°24'44"	4577			2		2006

Ancash/Huaraz	9°32'18"	77°24'43"	4589			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'11"	77°24'40"	4558			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'12"	77°24'26"	4560			3		2006
Ancash/Huaraz	9°32'23"	77°24'15"	4532			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'27"	77°24'14"	4235			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'30"	77°24'11"	4243			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'32"	77°24'18"	4532			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'35"	77°24'24"	4102			1		2006
Ancash/Huaraz	9°32'56"	77°23'46"	4487			2		2006
Ancash/Huaraz	9°33'4"	77°23'56"	4857			1		2006
Ancash/Huaraz	9°33'9"	77°23'55"	4902			2		2006
Ancash/Huaraz	9°33'10"	77°23'55"	4920			1		2006
Ancash/Huaraz	9°43'28"	77°17'31"	4565			2		2006
Ancash/Huaraz	9°43'34"	77°17'4"	4423			2		2006
Ancash/Huaraz	9°30'23"	77°25'17"	4687			2		2006
Ancash/Huaraz	9°30'28"	77°25'8"	4586			1		2006
Ancash/Huaraz	9°30'38"	77°24'51"	4721			2		2006
Ancash/Huaraz	9°30'36"	77°24'26"	4690			1		2006
Ancash/Huaraz	9°30'20"	77°24'23"	4982			2		2006
Ancash/Asunción/Chacas	9°13'49"	77°27'10"				3		2004
Ancash/Huaraz/Vicos	9°20'01"	77°30'51"				3		2004
Batán Grande	6°28'59"	79°39'57"		1			1	2003
Lambayeque/Ferrenafe/ Inkawasi	6°14'28"	79°16'43"				1		2005
Lambayeque/Shupicaga	6°13'31"	79°20'17"				1		2005
Lambayeque/ Kampanayqun	6°14'06"	79°20'45"				2		2005
Lambayeque/Inkawasi	6°13'13"	79°17'58"				1		2005
TOTAL				67	5	183	5	

### B- Enregistrements provenant d'autres sources

Localité	Sud	Ouest	Altitude	Source
Amazonas/Condechaca	5°30"	78°32"	2134	Garcia-Perea 1994
San Martín/Río Abiseo	7°39'	77°30'		Romo 1995
Arequipa/Atiquipa	15°47'46"	74°21'49"		Zeballos et al 2000
Huanuco/Ambo	10°05"	76°07"	2064	Garcia-Perea 1994
Pasco/Huariaca	10°27'	76°07'	2745	Garcia-Perea 1994
Lima/Lima/Lurin	12°13'04,80"	76°48'03,24"		MUSM*
Lima/Huaura/Huacho	11°21'	77°22'59,88"		MUSM*
Cuzco/Hacienda Campana	13°28"	71°25"	3500-4000	Garcia-Perea 1994
Ica/Ica/Ocucaje	14°21'56,52"	75°40'57,72"	2500	MUSM*

\* = Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Marcos, Lima

## Annexe 2 : Fréquences alléliques des microsatellites

A- Chat des pampas, données utilisées au chapitre III. n= nombre d'individus diploïdes

Microsatellite : Fca24

Localité	n	taille d'allèle										
		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	
		2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	
1	3							1		5		
2	19					4	28	3	1	1	1	
3	18					6	23	5		2		
4	13					1	11	6	6	1	1	
5	8					3	9		1	3		
6	6					4	7		1			
7	1					1			1			
8	18					10	22		3	1		
9	12	1				4	18	1				
10	2					3	1					
11	15			1			2	16	10	1		
12	3					2	1	1	2			
13	2							1	3			
14	26		2			2	2	23	21	1	1	
15	28		9	27	1	12	3		3	1		
16	4			2		2	1	2	1			
17	7			4		6	3	1				
18	5			3		5	2					
19	3			2		4						



## Microsatellite : Fca45

Localité	n	taille d'allèle																
		1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	
		4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	
1	3									3	2					1		
2	19				1	5	15		1			1	8	1	4	1		
3	18					7	7		8			1	1	8	4	1		
4	12					3	7			3				11				
5	7					7	2		1					3	1			
6	6					3	6							1	1	1		
7	1					1								1				
8	19					9	18							1	6	3	1	
9	12					6	4	1	1		1			11				
10	2					1	2								1			
11	15	21						8	1									
12	3		5				1											
13	2	3						1										
14	26	22				3		18	3	1	3	1			1			
15	30	1				2	1	24	1						4	17	2	5
16	2								1	3								
17	7						3		1				5			5		
18	6						1	1					3			7		
19	3						2		2				1			1		



## Microsatellite : Fca294

Localité	n	taille d'allèle													
		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	6
1	3			3											
2	19		2	16	2					2	5	4	5	1	
3	19		3	15				2			6	2	9	1	
4	12			7				11			4		2		
5	8		1	7				4	1		2	1			
6	5			2				4	1		2		1		
7	1			1										1	
8	19		3	12				8	2	1	6	4	1		
9	12	1		4			1	5		2	6	4			
10	2			1				2			1				
11	15			24	2		1		1		2				
12	13	1		4				1							
13	2			4											
14	28			46	1		4		1	2	1		1		
15	29	1	2	9	20	1	1		5	3	10	3	1	1	
16	4			3	1						3	1			
17	7		1		3					1	4	5			
18	6				1				2		7	2			
19	3				3						1	2			



**B- Chat des Andes, données utilisées au chapitre IV. n= nombre d'individus diploïdes**

**Microsatellite : Fca08**

Localité	n	taille d'allèle			
		1	1	1	1
		1	1	2	2
		6	8	0	2
2	5	10			
3	1	2			
4	1	2			
5	9	16			2
6	9	17			1
7	7	13		1	
8	7	2	11	1	
9	4	1	6	1	
10	1	2			
11	6	4	8		

**Microsatellite : Fca24**

Localité	n	taille d'allèle							
		2	2	2	2	2	2	2	2
		1	2	2	2	2	2	3	3
		8	0	2	4	6	8	0	2
2	5							9	1
3	1						1	1	
4	1							2	
5	8				1	5	1	7	2
6	9					1	7	10	
7	7	8	1	4	1				
8	7	8	2	3	1				
9	4	5	2	1					
10	0								
11	6	1	2	9					

## Microsatellite : Fca31

Localité	n	taille d'allèle						
		2	2	2	2	2	2	
		3	3	3	3	3	4	
		0	2	4	6	8	0	2
2	5	1	9					
3	1				2			
4	1		2					
5	8		15	1	2			
6	9		12	1	6	1		
7	7		3	1	1		6	1
8	7		3		1		10	
9	4		5	1	1		1	
10	0		1				1	
11	6			4		1	7	

## Microsatellite : Fca96

Localité	n	taille d'allèle				
		2	2	2	2	2
		0	0	0	1	1
		4	6	8	0	2
2	5					10
3	1			1		1
4	1					2
5	9			4		14
6	10			4		16
7	7			1	4	9
8	7				4	19
9	4				3	5
10	1					2
11	6	3			5	4



## Microsatellite : Fca294

Localité	n	taille d'allèle				
		2	2	2	2	2
		2	2	3	3	3
		6	8	0	2	4
2	5			9	1	
3	1		1		1	
4	1		2			
5	9		9	3	6	
6	10	1	6	7	6	
7	6		1	3	8	
8	7		3	1	9	1
9	4		1	2	4	1
10	1				2	
11	6		2		10	