

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis de la variabilidad genética de *Cuniculus paca*
utilizando ADN mitocondrial.**

Lucas Ale

Orientador: Mag. Natalia Mannise. Departamento de Biodiversidad y Genética Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Co- orientador: Dra. Mariana Cosse. Departamento de Biodiversidad y Genética Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Laboratorio de ejecución: Departamento de Biodiversidad y Genética Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Noviembre 2016

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. Biología de la especie.....	7
1.2. Métodos de muestreo genético no invasivos.....	10
1.3. El ADN mitocondrial como marcador molecular.....	11
1.4. Antecedentes genéticos de la especie.....	13
2. Materiales y métodos.....	16
2.1. Obtención de muestras.....	16
2.2. Extracción de ADN.....	17
2.3. Amplificación por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
2.4. Secuenciación.....	24
2.5. Análisis de secuencias.....	24
2.6. Construcción de árboles filogenéticos y redes de haplotipos.....	26
3. Resultados.....	28
3.1. Extracciones.....	28
3.2. Amplificación por PCR y secuenciación.....	29
3.3. Análisis de secuencias.....	31
3.4. Arboles filogenéticos y redes de haplotipos.....	34
Discusión.....	42
Referencias Bibliográficas.....	47
Anexo.....	55

Agradecimientos

A la colección de vertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República y al Museo Nacional de Historia Natural, principalmente a Enrique González -encargado de la sección de mastozoología- por haberme permitido tomar muestras de las colecciones.

Al Dr. Mauricio Barbanti Duarte del Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos de UNESP por la colecta de muestras de ejemplares de criadero.

A la división de Mastozoología del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia de Buenos Aires por permitirme el acceso a secuencias de ejemplares.

A Olivia Lluch -representante de Caaobetí- por haber dedicado tiempo y trabajo en el campo y colaborar con la colecta de muestras que fueron muy valiosas para este estudio.

Al grupo del Departamento de Biodiversidad y Genética, y al grupo de Genética Humana del IIBCE: Florencia Grattarola, Pia Aristimuño, Jorge Souto, Carolina Beloso, Adriana Mimbacas, quienes de alguna manera u otra dedicaron parte de su tiempo a sacarme dudas, apoyarme e invitarme a ser uno más del grupo. En especial a Nadia Bou que me ayudó incontables veces en los trabajos de laboratorio.

A Leticia Bidegaray por su aporte en las correcciones y participar en la evaluación del trabajo.

A Susana González, quien confió en mí y me abrió las puertas del laboratorio para trabajar libremente.

A Mariana Cosse por haberme ayudado en todo momento y confiar en mi trabajo.

Especialmente agradecer Natalia Mannise, quién me invitó e hizo posible que desarrollara este trabajo de tesis, acompañándome, enseñándome y guiándome en todo momento, dedicándole tiempo y trabajo, y confiando en mi para poder llevarlo a cabo.

A mi familia, y en especial a mis padres, quienes me acompañaron y apoyaron durante todo este proceso en mi carrera.

Resumen

La paca (*Cuniculus paca*) es el segundo roedor actual más grande del mundo. Su rango de distribución abarca la región Neotropical y se extiende desde México hasta Uruguay, siendo este último su punto de distribución más austral. Si bien existen algunos estudios sobre la genética de la especie, no existen trabajos en los cuales se incluyan muestras procedentes del sur de su distribución.

La utilización de técnicas de biología molecular en especímenes depositados en colecciones científicas, ofrece grandes ventajas desde el punto de vista ecológico y evolutivo. Los ejemplares se encuentran almacenados en un mismo sitio sin la necesidad de realizar colectas y muestreos de campo. Sin embargo, el ADN en estas muestras se encuentra generalmente degradado debido a la antigüedad de las mismas y a los productos químicos que suelen utilizarse para su preservación.

El objetivo de este estudio fue analizar la variabilidad genética de *C. paca* incluyendo ejemplares del sur de su rango de distribución. Para ello se utilizaron ejemplares depositados en colecciones científicas y se amplificaron por PCR dos fragmentos de marcadores moleculares del ADN mitocondrial correspondientes a las regiones del citocromo oxidasa I (*COI*) y *D-loop*. Se utilizaron oligonucleótidos especie-específicos para cada región analizada, lo que permitió la exitosa amplificación de cada fragmento en este tipo de muestras. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de ejemplares procedentes del norte de América del Sur depositadas en el banco de datos del *GenBank*.

Se detectó una alta variabilidad genética para la especie con ambos marcadores utilizados, cuyos índices de diversidad haplotípica fueron 0,66 para *COI* y 0,98 para *D-loop*. El grado de diferenciación genética encontrado entre Norte y Sur mostró valores de F_{st} de 0,93 y 0,65 para *COI* y *D-loop* respectivamente, ambos estadísticamente significativos. Estos resultados permiten postular la presencia de dos unidades genéticas distintas. Sin embargo, se considera necesario profundizar estas diferencias utilizando otras aproximaciones como la craneometría en ejemplares a lo largo de su distribución.

1. Introducción

1.1. Biología de la especie.

Con un largo aproximado de 60-80cm, la paca -*Cuniculus paca*- es el segundo roedor viviente más grande del mundo (Pérez 1992). Posee un pelaje corto y áspero de color amarronado con una serie de bandas y manchas de color blanco en sus laterales que la caracterizan (Bonilla et al. 2013) (Figura 1).

Habita en la región Neotropical y su rango de distribución se extiende desde México hasta Uruguay, siendo este último su punto de distribución más austral (Queirolo et al. 2008) (Figura 2).

La especie ocupa distintos tipos de bosques en áreas húmedas, como los bosques de galería. Allí construye sus madrigueras comúnmente a distancias menores a 60 metros de los cursos de agua. Estas madrigueras constan de uno a tres orificios de entrada y salida, y de uno a cuatro para la fuga circunstancial; a su vez tienen una cavidad interna para dormir durante el día (Aquino et al. 2009).

La paca se alimenta principalmente de frutos, cumpliendo un rol ecológico importante como dispersor de semillas (Eisenberg & Redford 1999; Queirolo et al. 2008). Puede reproducirse durante todo el año, teniendo entre una y dos crías por camada (Pérez 1992).



Figura 1. Ejemplar de *Cuniculus paca*. Se pueden observar las características morfológicas típicas de la especie como su hocico puntiagudo, las manchas blancas en sus laterales y el color amarronado del pelaje. (La imagen pertenece a Jose Rafael Lopez Luciano y fue tomada de https://www.flickr.com/photos/lopez_luciano).

Si bien existen escasos estudios acerca de su biología y comportamiento (Matamoros et al. 1981; Laska 2003; Montes-Pérez et al. 2004; Bonatelli et al. 2005, entre otros) se han desarrollado diversos proyectos de zootecnia debido al valor comercial de su carne en zonas de América Central y norte de América del Sur (Smythe 1987; Fiedler 1990). En dichas regiones, la paca es utilizada como fuente de alimento principalmente por comunidades indígenas y por la población rural (Bonilla-Morales et al. 2013).

La especie está catalogada como “preocupación menor” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Queirolo et al. 2008),

pero en Uruguay es considerada una especie prioritaria para la conservación (Soutullo et al. 2013). En el territorio nacional existen pocos registros de *C. paca*. Hasta el momento se encontraba descrita únicamente para la Reserva Departamental Paso Centurión, área que se caracteriza por la presencia de relictos de mata Atlántica (González & Martínez-Lanfranco 2012). Recientemente Leuchtenberg y colaboradores (2016), publicaron un registro de la especie para el departamento de Artigas en Uruguay.

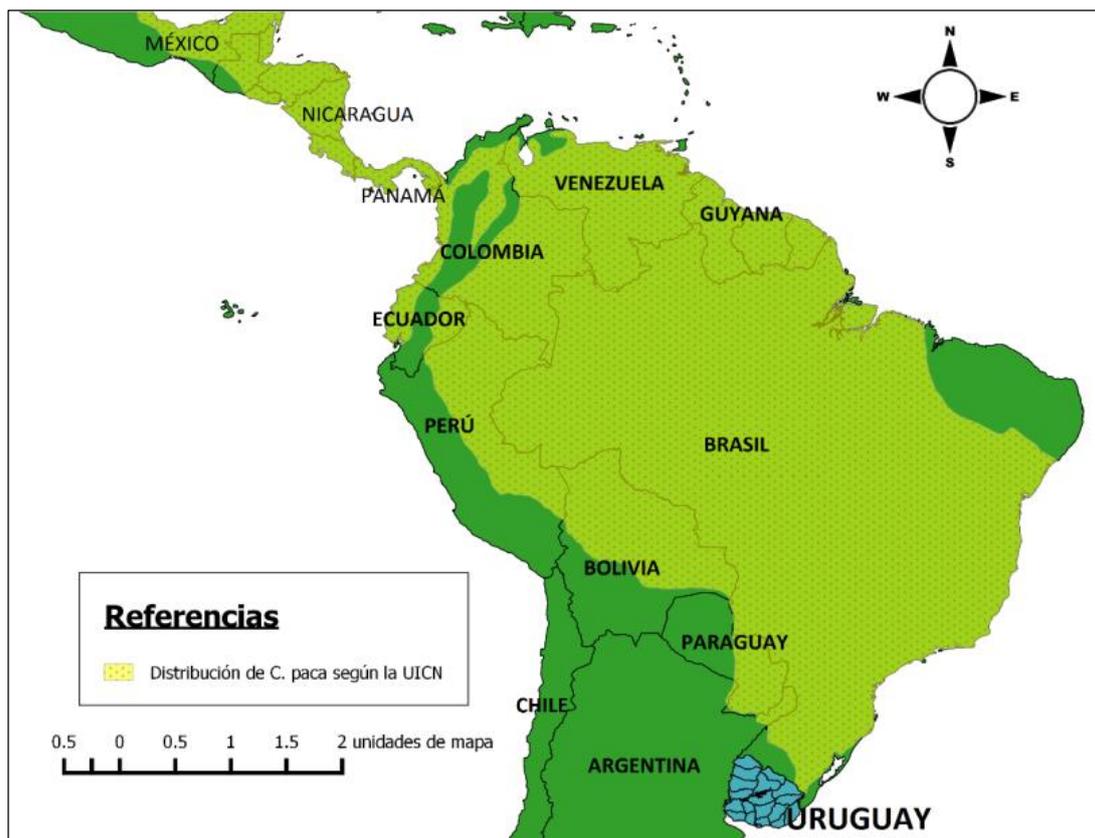


Figura 2. Distribución geográfica. Mapa de América del Sur y América Central en donde se señala el rango de distribución geográfica de la especie *C. paca* según la UICN. (Capa descargada de la UICN y realizada con el software Quantun Gis).

1.2. Métodos de muestreo genético no invasivos.

El muestreo genético no invasivo suele ser utilizado para estudiar especies crípticas, con comportamiento elusivo o que se encuentran presentes en bajas densidades. Las muestras son depositadas en el ambiente y por lo tanto no es necesario capturar individuos (Taberlet et al. 1999). Si bien este tipo de métodos suelen ser más costosos y laboriosos, arrojan buenos resultados disminuyendo el impacto provocado en la naturaleza (Nardelli et al. 2011). Se han realizado estudios genéticos a partir de diversas fuentes como pelo, fecas, orina, plumas, saliva y restos de animales atropellados (Smith & Wang 2014). El ADN aislado a partir de dichas muestras suele encontrarse típicamente en baja cantidad y calidad (Taberlet et al. 1999). Esta dificultad puede ser superada evitando contaminaciones y seleccionando oligonucleótidos que amplifiquen fragmentos entre 200-300 pares de bases de longitud (Taberlet et al. 1999).

La utilización de colecciones científicas como fuente de ADN ofrece ventajas únicas. La presencia de ejemplares depositados en un único lugar permite desarrollar proyectos de investigación sobre aspectos evolutivos y ecológicos sin la necesidad de realizar salidas de campo (Cooper 1994). Las moléculas de ADN en este tipo de muestras se encuentran generalmente degradadas, debido a sustancias que se utilizan para la preservación de los ejemplares, así como a la degradación natural del ADN que aumenta con el transcurso del tiempo (Ossa 2012). Sin embargo, la posibilidad de amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento seleccionado generó una revolución en esta área de la genética (Cooper 1994).

Durante las últimas décadas, las investigaciones en ADN antiguo han avanzado en obtener pequeños fragmentos de ADN mitocondrial (Willerslev & Cooper 2004).

1.3. El ADN mitocondrial como marcador molecular

La mitocondria es un orgánulo celular que cumple la función de la fosforilación oxidativa y producción de ATP. Contiene un genoma de ADN propio que se replica independientemente del genoma nuclear y codifica para proteínas específicas que participan en la cadena respiratoria (Castro et al. 1998).

El ADN mitocondrial (ADNm) es una doble cadena, circular covalentemente cerrada, de aproximadamente 16569 pares de bases (pb). Posee una tasa de evolución de 5 a 10 veces mayor que la del genoma nuclear, principalmente porque no posee enzimas para la reparación en la replicación ni para daños del ADN (Castro et al. 1998). Cada célula contiene múltiples copias de este ADN (10-2500), por lo que su amplificación en muestras de baja cantidad y calidad resulta eficiente (González 2005).

El ADNm no recombina y su transmisión se produce por descendencia materna, por lo que las inferencias en estudios poblacionales utilizando marcadores de este tipo se realizan sobre los linajes maternos. Debido a que el ADNm solo explica la historia matrilineal, suelen realizarse estudios que complementarían la información (como en el cromosoma sexual Y en mamíferos) (Castro et al. 1998).

El ADNm contiene distintas regiones dentro de su secuencia, con características diferentes en cuanto a su variabilidad (Figura 3). La región control (o

D-loop) es una región no codificante del ADNm que posee secuencias híper-variables que presentan una tasa de evolución 4 o 5 veces mayor que la tasa de evolución propia del ADNm (Taberlet 1996). Una de las ventajas de esta región, es que posee secuencias altamente conservadas en sus extremos sobre las cuales pueden diseñarse cebadores para su amplificación por PCR (Galtier et al. 2009).

Por otro lado la región del ADNm que codifica para la subunidad I de la *citocromo oxidasa* (COI) con frecuencia es utilizada para la identificación de especies, lo que comúnmente es conocido como el código de barras de la vida (Francis et al. 2010). Esta región presenta una tasa de evolución que permite discriminar especies e incluso puede distinguir en muchos casos grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Hebert et al. 2003), aunque en mamíferos se han encontrado inconvenientes en poder definir niveles taxonómicos superiores (Luo et al. 2011).

Los estudios filogenéticos y filogeográficos generan importantes aportes en taxonomía y evolución tanto de caracteres como de procesos de divergencia y adaptación a largo plazo. En este sentido, las unidades evolutivas representan conjuntos de poblaciones que han permanecido aisladas genéticamente unas de otras, y que en conjunto reflejan la diversidad evolutiva de un taxón (Moritz 1995). De esta manera, las unidades evolutivas significativas (ESUs) fueron definidas como conjuntos de poblaciones que evolucionan de manera independiente y son diagnosticadas como conjuntos de poblaciones que resultan monofiléticas (Moritz 1999).

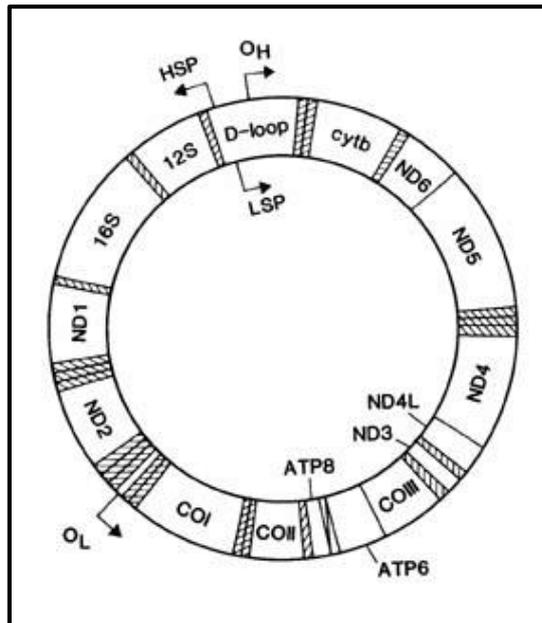


Figura 3. Esquema del genoma del ADN mitocondrial humano. Se visualizan las diferentes regiones incluyendo las de *D-loop* y *COI* utilizadas en este trabajo. (La imagen fue tomada Fernández E. 2000).

1.4. Antecedentes genéticos en la especie

En un estudio realizado a partir de fragmentos del gen 12S del ADN mitocondrial y del gen nuclear del receptor de la hormona de crecimiento (GHR), Adkins y colaboradores (2001) analizaron la mayoría de los grupos pertenecientes al orden *Rodentia* y los compararon con un diverso grupo de mamíferos no roedores. Allí establecieron la presencia de una tasa muy elevada de evolución respecto al resto de los grupos de mamíferos comparados.

Los estudios genéticos previos realizados en *Cuniculus paca* fueron desarrollados principalmente en ejemplares del norte de su distribución (Van Vuuren et al. 2004; Silva-Neto et al. 2016). A partir de análisis combinados empleando un fragmento del gen del *citocromo b* y de la región control del ADN mitocondrial en

muestras de Guyana Francesa, detectaron la presencia de cuatro clados maternos y evidenciaron un evento de expansión poblacional (Van Vuuren et al. 2004). Por otro lado, recientemente se utilizó un fragmento del gen de *citocromo b* para identificar animales provenientes de la caza furtiva (Silva-Neto et al. 2016). Los resultados generaron un protocolo efectivo que permite diferenciar ejemplares de paca de aquellos pertenecientes a especies domésticas. Esto ayudaría a tomar medidas frente a eventos de tráfico ilegal o de caza furtiva (Silva-Neto et al. 2016).

Sin embargo, existe un vacío de información acerca de la variabilidad genética de la especie en su límite más austral, así como estudios comparativos que permitan evaluar las relaciones entre las poblaciones del norte y del sur de su distribución.

Hipótesis de trabajo

En base a la extensa distancia entre los extremos norte y sur del continuo de distribución geográfica de *C. paca* se propone la siguiente hipótesis:

- La especie *Cuniculus paca* presenta niveles de variabilidad genética que permiten diferenciar unidades evolutivas entre los ejemplares del norte y del sur de su distribución.

Objetivo General

- Analizar la variabilidad genética de *C. paca* entre los extremos norte y sur de su distribución geográfica en América del Sur, utilizando marcadores moleculares de ADN mitocondrial.

Objetivos específicos

- Diseñar cebadores específicos para amplificar fragmentos pequeños de ADNm en *C. paca* (para *D-loop* y *COI*).
- Amplificar mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) los fragmentos de interés.
- Alinear y comparar las secuencias obtenidas en el extremo sur de su distribución con aquellas disponibles en el *GenBank* para ejemplares procedentes del norte.
- Identificar la presencia de distintos haplotipos y sus relaciones.
- Determinar la presencia de distintas unidades genéticas evolutivas.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de muestras

Se colectaron muestras de músculo, huesos turbinales nasales y cuero de las almohadillas plantares de especímenes de *Cuniculus paca* (n=9), depositados en las colecciones científicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República y del Museo Nacional de Historia Natural de Uruguay. A su vez se utilizó ADN de pelos y fecas de *C. paca* colectado en Paso Centurión - Departamento de Cerro Largo depositado en el banco de ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE (n=2). Se incluyeron secuencias de muestras depositadas en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia de Buenos Aires (n=3) y de ejemplares del Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECE) de Unesp (Jaboticabal-Sao Paulo, Brasil) (n=3).

La procedencia de los ejemplares se presenta en la Figura 4, mientras que el tipo de muestra colectada se encuentra detallado en la Tabla I. Para la toma de muestras se utilizaron guantes, pinzas y hojas de bisturí estériles. Las muestras fueron depositadas en tubos de 1,5ml en alcohol 95° y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN.

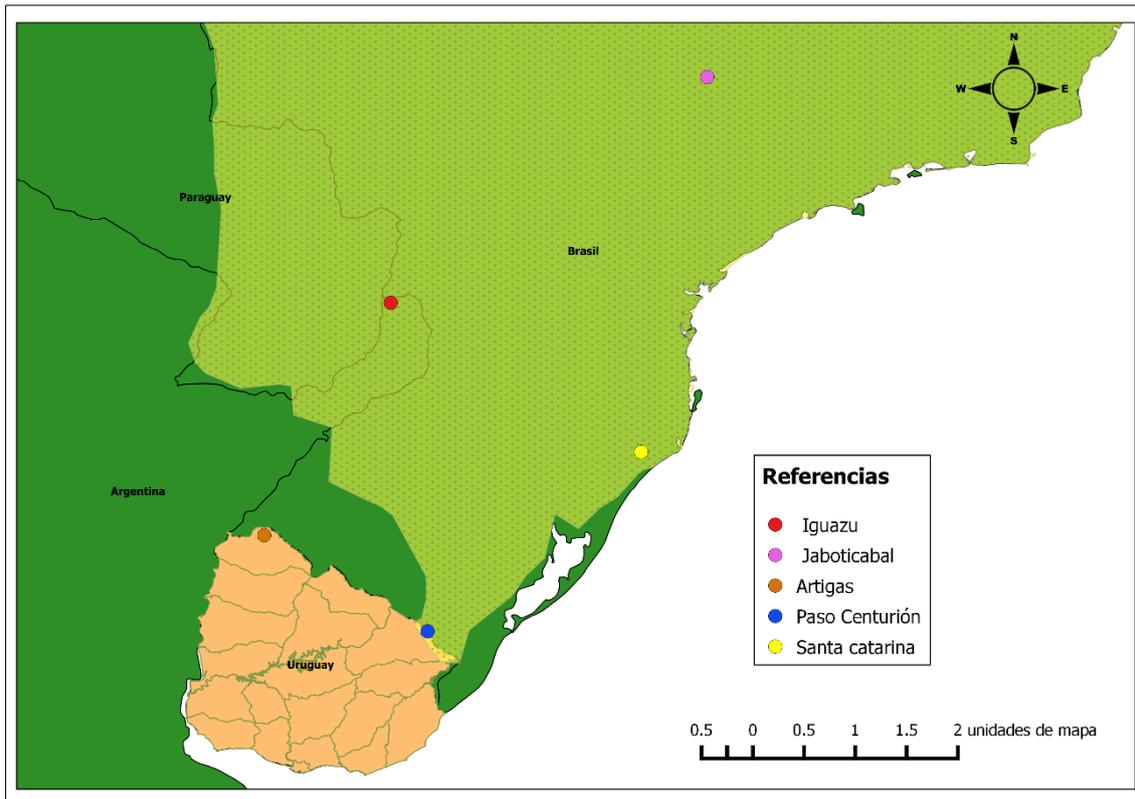


Figura 4. Procedencia de los ejemplares de *C. paca* utilizados para este estudio. En las referencias se indica la localidad de cada punto de muestreo. El número de muestras colectadas en cada localidad fue el siguiente: Artigas (n=1), Paso Centurión (n=7), Iguazú (n=3), Santa Catarina (n=2) y Jaboticabal (n=3).

2.2. Extracción de ADN

Se aisló ADN total a partir de tejidos, siguiendo el protocolo de Medrano (1990) con modificaciones (González et al. 2015) (Anexo). Las extracciones de ADN a partir de fecas fueron realizadas utilizando el kit comercial DNeasy mericon Food Kit (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La cantidad y la calidad del ADN aislado se visualizaron a través de espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000). Para ello el programa mide la absorbancia (Abs) a 260 y 280 nanómetros (nm) de longitud de onda y calcula la relación entre ambas (Abs260/Abs280). Esta relación es un estimador de la pureza

de los ácidos nucleicos, debido a la propiedad que tienen las bases puricas y pirimidicas que los componen, de presentar un pico de absorbancia a 260nm de longitud de onda (Poutou 2009). Se considera una muestra de ADN de pureza adecuada cuando la relación Abs260/Abs280 presenta valores estándar próximos a 1,8 y 2,0.

El software estima la concentración de ADN por medio de la correlación con la absorbancia mediante la ecuación de Beer-Lambert (Nanodrop 1000):

A = E x b x c (**A**: absorbancia; **E**: coeficiente de extinción; **b**: longitud de la trayectoria; **c**: concentración).

El ADN extraído fue almacenado en tubos de 1,5ml en heladera, dejando un respaldo de ADN en el freezer. A partir de las extracciones obtenidas se realizaron diferentes diluciones a 80ng/μl aproximadamente, para ser utilizadas en las posteriores amplificaciones por PCR.

Tabla I. Detalle de las muestras utilizadas. Se describe la localidad de procedencia, el año de colecta, tipo de muestra, la concentración de ADN extraído y la relación de Absorbancia 260/280nm medidos con *Nanodrop 1000*. Los asteriscos (*) indican aquellas muestras de las cuales no se logró extraer ADN, y que por lo tanto no fueron utilizadas para el estudio.

N° de muestra	Procedencia	Año	Tipo de muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	Abs 260/260nm
AP1	Paso Centurión, Uruguay	2010	Feca y pelos	780,8	1,94
AP2	Santa Catarina, Brasil	2012	Cuero y pelos	418,7	1,86
AP3	Artigas, Uruguay	2012	Cuero y pelos	343,5	1,85
AP4	Paso Centurión, Uruguay	1987	Cuero y pelos	82	1,75
AP5	Paso Centurión, Uruguay	1982	Cuero	120,1	1,41
AP6	Paso Centurión, Uruguay	1987	Cuero y hueso turbinado nasal	281,7	1,59
AP7	Paso Centurión, Uruguay	2012	Cuero y hueso turbinado nasal	41,1	1,38
*AP8	Paso Centurión, Uruguay	2012	Hueso turbinado nasal	-	-
AP9	Jaboticabal, Brasil	2013	Cuero	161,5	1,79
AP10	Jaboticabal, Brasil	2013	Cuero	982,9	1,85
AP11	Jaboticabal, Brasil	2013	Cuero	660,1	1,84
AP12	Santa Catarina, Brasil	2012	Músculo	256,9	1,23
*AP13	sin procedencia	-	Hueso turbinado nasal	-	-
AP14	Iguazú, Argentina	1996	Hueso turbinado nasal	213,8	1,72
*AP15	Iguazú, Argentina	1990	Hueso turbinado nasal	-	-
*AP16	Iguazú, Argentina	1991	Hueso turbinado nasal	-	-
S5M3	Paso Centurión, Uruguay	2014	Feca	30,2	1,84

2.3. Amplificación por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para examinar la variabilidad genética de *C. paca*, se amplificaron mediante la técnica de PCR en tiempo final dos fragmentos de ADN. Uno de ellos perteneciente al *D-loop* de la región control; mientras que el otro corresponde a un fragmento del gen que codifica para la subunidad I de la enzima *citocromo oxidasa* (*COI*).

Para amplificar la región *COI* se utilizó un juego de cebadores universales LCO1490 y HCO2198 (Tabla II), diseñados por Folmer et. al (1994). Para la región de *D-loop*, se utilizó un juego de cebadores universales diseñados para mamíferos Thr-L15926 y DL-H16340 (Tabla II; Vila et al. 1999).

Cada mezcla de PCR consistió en un volumen final de 20 μ l que contenía: 6ng/ μ l de ADN; 0,4 μ M de cada uno de los cebadores correspondientes; 1 μ M de BSA; 0,2 μ M de dNTPs; 0,2 μ M de MgCl; 0,2 unidades de Taq ADN polimerasa *Invitrogen*TM; 1x de buffer de reacción *Invitrogen*TM. Para todas las reacciones de PCR se utilizaron controles positivos y negativos.

Las condiciones de termociclado para cada fragmento amplificado por PCR variaron de acuerdo a la temperatura de unión al cebador correspondiente y al tamaño del fragmento a amplificar. Para la amplificación del fragmento de *D-loop* utilizando el juego de cebadores universales las condiciones fueron: 94°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 2 minutos y 72°C durante 90 segundos, con una extensión final de 72°C durante 7 minutos. Para amplificar el fragmento de *COI* con cebadores universales las condiciones fueron: 94°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C

durante 45 segundos y 72°C durante 30 segundos, con una extensión final de 72°C durante 7 minutos.

El éxito de cada reacción de PCR fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa (SBS ®) al 1%. Los geles fueron teñidos con *GoodviewTM*. Este es un agente intercalante que se ubica entre las bases del ADN y permite la observación bajo la exposición a radiación ultravioleta. En cada pocillo se cargó 4µl de la mezcla de producto de PCR con azul de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular *HyperladderTM 100pb* (*BiolineTM*), el cual permite diferenciar bandas de cien pares de bases. El tiempo aproximado de cada corrida electroforética fue de 50 minutos.

Se diseñaron cebadores especie-específicos para amplificar fragmentos de menor tamaño para ambas regiones del ADNm de *C. paca*. Esto se realizó con algunas secuencias obtenidas y aquellas disponibles en la base de datos del *GenBank*. Para ello se empleó el software de libre acceso *Primer3Plus* (Rozen and Skaletsky, 2000). Los cebadores diseñados para cada región se muestran en la Tabla II. A su vez se utilizó un juego de cebadores desarrollados en el Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE, para la región control en mamíferos MAMCODEF y MAMCODER. Estos permiten la identificación de especies de mamíferos por presentar un polimorfismo en secuencia y longitud del fragmento, que varía entre diferentes especies pero que mantiene su identidad entre especímenes de la misma especie (Tabla II; Grattarola et al. 2014). Para amplificar el fragmento de la región control de paca, se diseñó únicamente el cebador *Reverse* que fue utilizado con el MAMCODEF como *forward*.

Los protocolos de las reacciones de PCR utilizados, fueron aquellos descritos previamente en esta sección. Las condiciones de termociclado para la amplificación del fragmento de *D-loop* utilizando el par de cebadores MAMCODEF/DLOOPpacaR fueron: 94°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, con una extensión final de 72°C durante 15 minutos.

Para la amplificación del fragmento de *COI* utilizando el juego de cebadores especie-específico diseñado en este estudio, las condiciones fueron: 94°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 57°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, con una extensión final de 72°C durante 15 minutos.

Tabla II. Características de los cebadores utilizados. Para cada cebador se muestra su secuencia de bases en sentido 5'-3' y el tamaño en pares de bases esperado del fragmento amplificado. Los cebadores marcados con un asterisco (*) fueron diseñados específicamente para el presente trabajo.

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Fragmento amplificado	Tamaño de fragmento (pares de bases)
LCO1490 (Folmer et al. 1994)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	<i>COI</i>	710
HC02198 (Folmer et al. 1994)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	<i>COI</i>	
Thr-L15926 (Vila et al. 1999)	CAATTCCCCGGTCTTGTAACC	<i>D-loop</i>	600
DL-H16340 (Vila et al. 1999)	CCTGAAGTAGGAACCAGATG	<i>D-loop</i>	
*COIF	ACCAAACCCCTCTGTTCGTC	<i>COI</i>	150
*COIR	AATAGGGTCTCCACCCCTG	<i>COI</i>	
*DLOOPR	TCGTGCATTATTGTATGTCCCA	<i>D-loop</i>	
MAMCODEF (Grattarola et al. 2014)	ATGGGCCCGGAGCGAGAAGA	<i>D-loop</i>	350

2.4. Secuenciación

Se purificaron los productos de PCR mediante el kit comercial *Zymo DNA clean and concentrator*, siguiendo las condiciones del fabricante. Los productos purificados fueron medidos en el espectrofotómetro UV/VIS (*Nanodrop 1000*) y luego fueron enviados al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo. Este cuenta con un secuenciador automático ABI3130 (*Applied Biosystems*) de 4 capilares.

2.5. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) a través de la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (Altschul et al. 1990). De esta manera se comprobó la correcta amplificación de los fragmentos de interés en los ejemplares de *C. paca*.

Para D-loop se utilizaron 24 secuencias de ejemplares procedentes de Guyana Francesa y una de Venezuela, mientras que para COI se descargaron de la base de datos 25 secuencias de ejemplares de Guyana.

Los distintos cromatogramas de las secuencias fueron analizados mediante el software *MEGA version 6* (Tamura et al 2013). Para cada fragmento se llevó a cabo un alineamiento utilizando la herramienta *MUSCLE*. Este algoritmo utiliza dos medidas de distancia entre un par de secuencias: kmer y la corrección de Kimura (Edgar 2004), lo que otorga una gran fidelidad al alineamiento. Los cambios fueron confirmados de manera manual y visual, comparando los distintos cromatogramas y alineamientos obtenidos.

Para analizar el grado de variabilidad genética de la especie para las regiones *D-loop* y *COI* analizadas se construyeron las matrices de distancia genética a partir de los alineamientos. Para ello se utilizó el modelo de *Tamura-Nei* con el programa *MEGA version 6*. También se determinó el N° de sitios variables, N° de sitios conservados y N° de sitios informativos del conjunto de muestras obtenidas para cada una de las regiones mitocondriales analizadas.

Por otro lado, utilizando el programa *DnaSP®* se calcularon los índices de diversidad haplotípica (H_d), el número de sitios polimórficos (S), índice de diversidad nucleotídica y el número de haplotipos (H) para cada región de ADNm. El índice de diversidad haplotípica se refiere a la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes (Nei 1987).

Con el total de muestras se definieron tres agrupaciones tomando como parámetro su localización dentro del rango de distribución geográfica de la especie. Una agrupación fue definida con los individuos procedentes del norte (Guyana/Venezuela), otra con los procedentes de Brasil/Argentina y otra con los procedentes de Uruguay. Con estos datos ingresados en el *DnaSP®* se construyeron las matrices correspondiente para ingresar en el software *Arlequin* (Excoffier et al. 1992). Utilizando dicho programa se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y se obtuvieron los valores de los estadísticos de Fischer F_{ST} , F_{SC} y F_{CT} , así como el *p-valor* para cada uno de los agrupamientos en cada fragmento. Se utilizó como parámetro de significancia estadística $\alpha=0,05$. De esta manera los valores de p menores a 0,05 se consideran significativos y los valores de p mayores a 0,05 se consideran no significativos (Sokal & Rolph, 1979). El índice F_{ST} o índice de fijación

proporciona una estimación del grado de diferenciación genética entre sub-poblaciones en relación a la población total (Freeland, 2005). Los estadísticos FCT y FSC representan las diferencias entre grupos y entre las poblaciones dentro de cada grupo respectivamente (Chu et al. 2014).

Con la matriz de distancia genética obtenida para la región de *D-loop* analizada y la de distancia geográfica, se realizó un test de Mantel utilizando el software *Past* (Hammer et al. 2001). Este se usa habitualmente para determinar la correlación entre la distancia geográfica y genética entre poblaciones (Eguiarte et al. 2010).

2.6. Construcción de árboles filogenéticos y redes de haplotipos

Se construyeron las redes de haplotipos para cada fragmento analizado a través del software *PopART*, utilizando el estadístico TCS (Templeton et al. 1992). Este algoritmo realiza un cálculo comparando los caracteres de cada secuencia y el número de cambios entre secuencias (Clement et al. 2000).

Los árboles filogenéticos fueron construidos para cada región mediante el algoritmo *Maximum likelihood* utilizando el modelo de sustitución nucleotídica *Kimura 2-parámetros*, con un número de 1500 repeticiones a través del software *Mega 6* (Tamura et al., 2013), evaluando el soporte de los nodos generados por medio del método de *bootstrap*.

Para la elección del grupo externo, se seleccionó un organismo perteneciente al mismo *Orden* y al *suborden Hystricomorpha* (Blanga-Kanfi et al., 2009). Para ello se realizó una búsqueda en la base de datos del *GenBank* con la herramienta *BLAST* utilizando como referencia las secuencias obtenidas de *D-loop* y *COI* para paca. En el fragmento de *COI* se utilizó como grupo externo la especie *Thryonomys swinderianus*. Este es un pequeño roedor de la familia *Thryomyidae* que habita en el continente africano (Hoffmann 2008). Sin embargo, para *D-loop* se utilizó como grupo externo la especie *Mesomys hispidus*. Este es un roedor de la familia *Echimyidae*, distribuido en gran parte del Amazonas, Guyana Francesa y Surinam (Catzeflis et al. 2016). La elección de dos grupos externos distintos, uno para cada fragmento de ADNm, fue debido a que no se encontraban disponibles secuencias de ambos fragmentos para un mismo organismo en la base de datos del *GenBank*.

3. Resultados

3.1. Extracciones

El método de extracción de ADN utilizado para las muestras depositadas en colecciones científicas fue exitoso, ya que el 76,4% de las mismas revelaron concentraciones y relaciones de pureza adecuadas para ser amplificadas por PCR (Tabla I, Fig. 5).

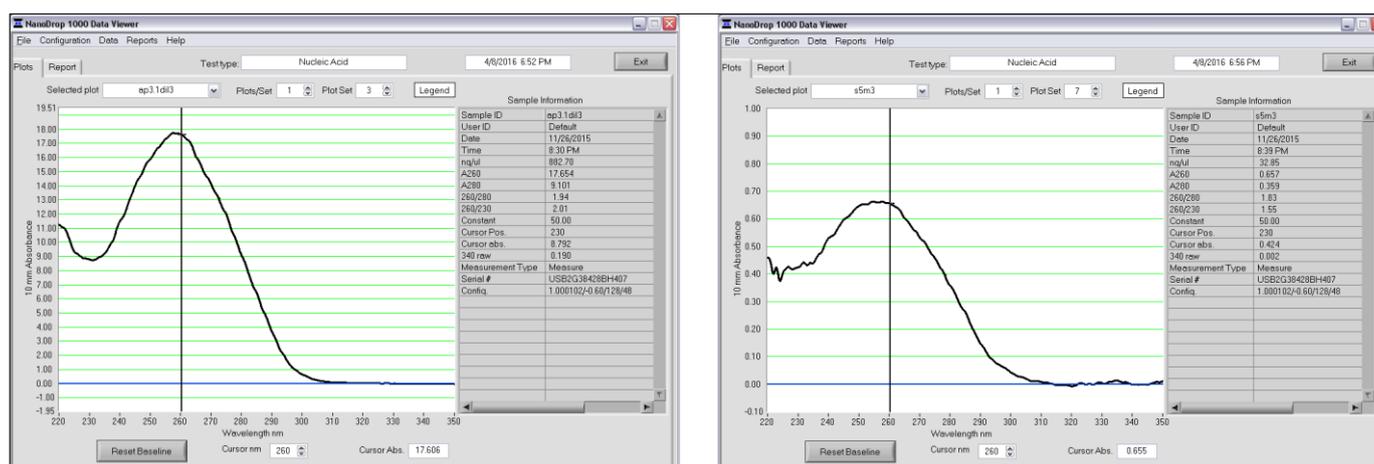


Figura 5. Calidad y cantidad de ADN extraído. Se observa la curva de absorbancia en función de la longitud de onda para dos muestras de *C. pacca* procedentes de Paso Centurión-Departamento de Cerro Largo, Uruguay. La imagen de la izquierda corresponde una muestra extraída de tejido (AP3), mientras que la de la derecha pertenece a una muestra de feca (S5M3). En los gráficos se observa el coeficiente de Abs_{260}/Abs_{280nm} y el valor de la concentración de las muestras en ng/μl (Nanodrop 1000).

3.2. Amplificación por PCR y Secuenciación

El éxito de amplificación para el fragmento de *D-loop* utilizando el par de cebadores universales Thr-L15926/DL-H16340 fue muy bajo (Figura 6). Luego de varias amplificaciones se obtuvieron secuencias de baja calidad e ilegibles y por lo tanto fueron descartadas (Figura 7). Por otro lado, con los cebadores MAMCODEF/DLOOPR diseñados para un fragmento más pequeño de la región *D-loop*, se logró secuenciar exitosamente el 54% de las muestras colectadas (Figura 7). El fragmento secuenciado osciló en un tamaño de entre 312 y 371pb.

Para el fragmento de *COI* utilizando el juego de cebadores universales se consiguió amplificar tan solo el 31% de las muestras. Las secuencias obtenidas también fueron de muy difícil lectura debido a la presencia de múltiples secuencias en el cromatograma y baja señal. Sin embargo, empleando el par de cebadores especie-específicos COIF/COIR diseñados en este trabajo para *C. paca*, se logró amplificar y secuenciar el 85% de las muestras procesadas (Figura 6; Figura 7). El fragmento secuenciado fue de 154pb de longitud.

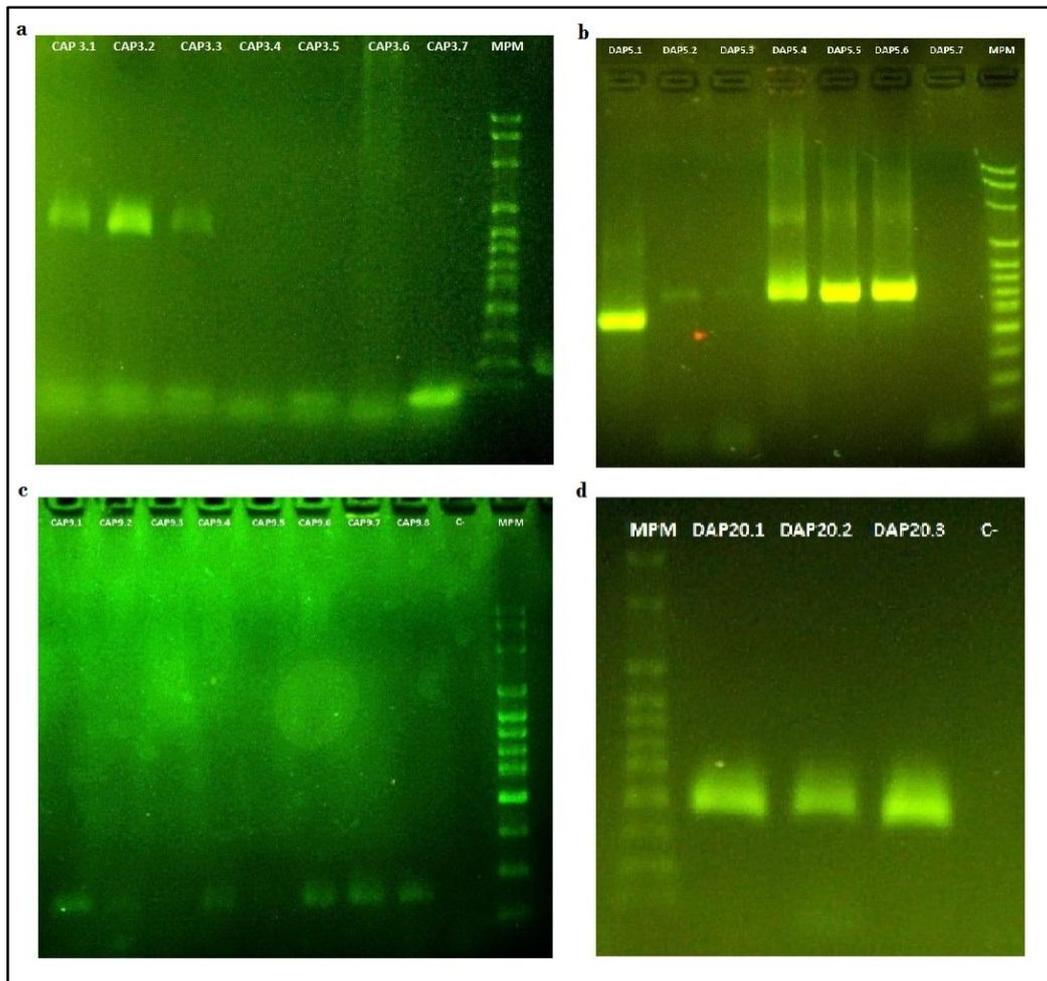


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Las imágenes a y b corresponden a productos de PCR donde se utilizaron los cebadores universales para *COI* y *D-loop* respectivamente. Las imágenes c y d corresponden a productos de PCR con los cebadores especie-específicos diseñados en este estudio para *COI* y *D-loop* respectivamente. En cada pocillo se indica las muestras cargadas, MPM: marcador de peso molecular y c-: control negativo.

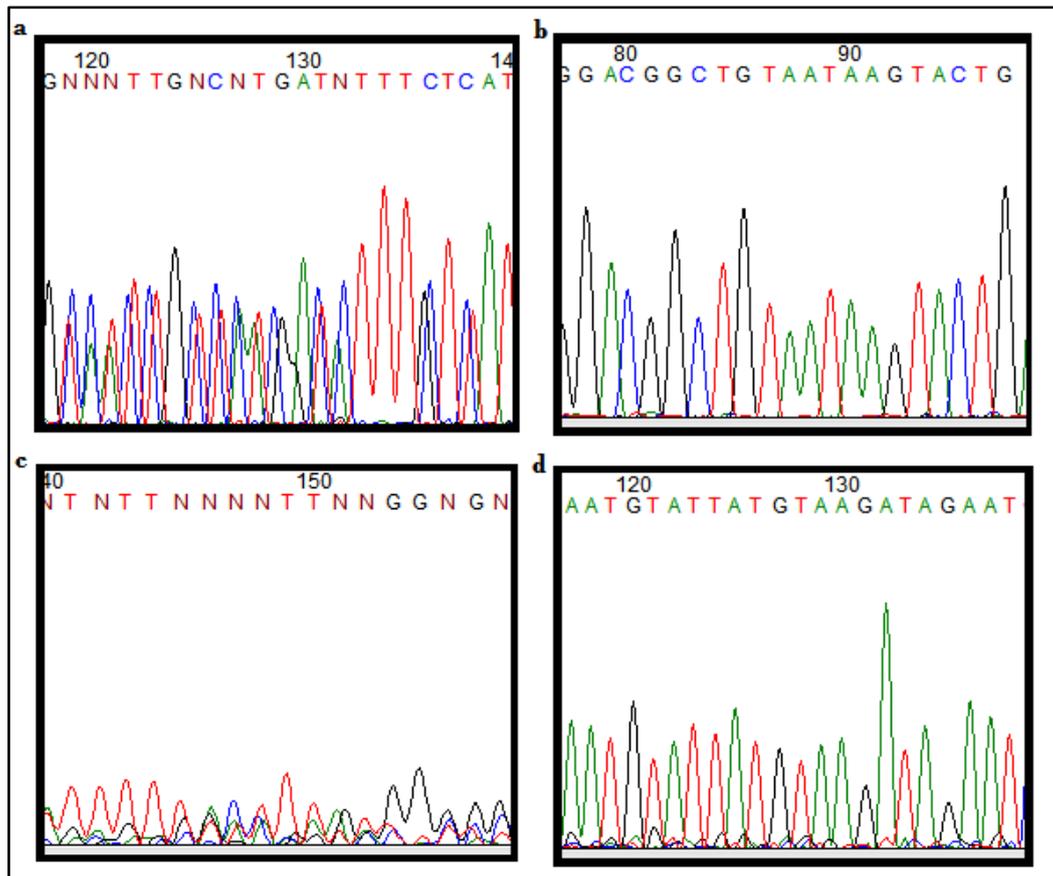


Figura 7. Cromatogramas de las secuencias obtenidas. En la imagen se muestran los cromatogramas para dos fragmentos de *COI* (a y b) y dos fragmentos de *D-loop* (c y d) de ADNm de *C. paca*. Para la amplificación de las muestras de a y c se utilizaron los cebadores universales de *COI* y *D-loop* respectivamente, mientras que para las muestras de b y d se utilizaron los cebadores diseñados específicamente para este estudio.

3.3 Análisis de secuencias

Análisis del fragmento de la región *COI* del ADNm

A partir del alineamiento de las secuencias para el fragmento de *COI* del ADNm se encontraron mediante parsimonia 143 sitios conservados, 11 sitios variables y 8 sitios informativos. A través del software *DnaSP*® los resultados mostraron: 9 sitios

polimórficos, 9 haplotipos distintos, y un valor de diversidad haplotípica de $H_d = 0,65714$. La diversidad nucleotídica hallada fue $\Pi=0,02622$.

Para el análisis de varianza molecular se definieron tres agrupamientos distintos: Uruguay (1), Brasil-Argentina (2) y Norte (3), en este último se incluyeron todas las secuencias procedentes de Guayana. Los valores de FST obtenidos entre el Norte y Uruguay, así como entre el Norte y Brasil-Argentina fueron significativos y cercanos a 1. Los valores de FST y resultados del AMOVA se muestran en las tablas III y IV.

Tabla III. Valores de FST calculados con *Arlequin*. Se muestran los resultados obtenidos mediante la comparación de los distintos grupos para el fragmento de *COI*.

Fst <i>COI</i>	1	2	3
1	-	-	-
2	-0,03448	-	-
3	0,93327**	0,89850**	-

* $p\text{-valor} \leq 0,05$ // ** $p\text{-valor} \leq 0,01$

Tabla IV. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para el fragmento de *COI* de *C. paca* obtenido con el software *Arlequin*.

Fuente de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadísticos F
Entre grupos	1	47,081	3,07053	91,92	FCT: 0,91922 p-valor: 0,34018
Entre poblaciones dentro de grupos	1	0,227	-0,00956	-0,29	FSC: -0,03541 p-valor: 1,0
Entre todas las poblaciones	33	9,220	0,27939	8,36	FST: 0,91636 p-valor: 0,0

La mayor variabilidad encontrada fue entre los distintos grupos (91,92%), seguida por la variabilidad entre las distintas poblaciones (8,36%). Sin embargo, el valor obtenido del estadístico FCT (entre grupos) no fue significativo, en cambio la variabilidad entre las poblaciones (FST) presenta diferencias significativas. A su vez las poblaciones dentro de los grupos si bien son distintas no presentan diferencias que se consideren significativas (FSC).

Análisis del fragmento de *D-loop* del ADNm

Con los alineamientos del fragmento de *D-loop* se encontraron 385 sitios conservados, 63 sitios variables y 45 sitios informativos por parsimonia. Se obtuvieron 59 sitios polimórficos, 25 haplotipos diferentes y un índice de diversidad haplotípica de $H_d = 0,97782$. La diversidad nucleotídica hallada fue $\pi = 0,04859$.

Para el análisis de varianza molecular de *D-loop* se realizó el mismo agrupamiento indicado para el fragmento *COI*. Los valores de FST obtenidos entre Norte/Uruguay y Norte/Argentina-Brasil fueron del orden de 0,6 y estadísticamente significativos. El detalle del FST y AMOVA se muestran en las tablas V y VI respectivamente.

Tabla V. Valores de Fst calculados con *Arlequin*. Se muestran los datos obtenidos mediante la comparación de los distintos grupos para el fragmento *D-loop*.

Fst <i>D-loop</i>	1	2	3
1	-	-	-
2	0,62693	-	-
3	0,62383**	0,64640**	-

* *p*-valor $\leq 0,05$ // ** *p*-valor $\leq 0,01$

Tabla VI. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para el fragmento de *D-loop* de *C. paca* obtenido con el software *Arlequin*.

Fuente de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadísticos F
Entre grupos	1	101,803	8,85973	65,28	FCT: 0,65281 p-valor: 0,34702
Entre poblaciones dentro de grupos	1	4,757	0,02434	0,18	FSC: 0,00517 p-valor: 0,0479
Entre todas las poblaciones	29	135,940	4,68759	34,54	FST: 0,65460 p-valor: 0,0**

Si bien la variación más alta encontrada (65,28%) fue entre grupos, esta no se corresponde con un valor estadísticamente significativo. En cambio la diferenciación encontrada entre las poblaciones de Brasil y Argentina baja y estadísticamente significativa. El grado de variabilidad hallado entre las poblaciones (FST) fue de 34,54% con una marcada diferenciación entre las mismas y valores significativos.

3.4. Árboles filogenéticos y redes de haplotipos

El fragmento *COI* mostró 9 haplotipos a partir de 36 muestras analizadas. Si bien el número de diferencias entre los haplotipos más cercanos (según la red haplotípica) es en su mayoría de un único cambio, se observa una clara división en dos grandes grupos: ejemplares del norte y del sur de la distribución. Los ejemplares procedentes del sur fueron representados por un único haplotipo, excepto el animal de Iguazú AP14 (Figura 8) que constituye un haplotipo distinto y único. Este ejemplar presenta menos diferencias respecto a las pacas procedentes de Guyana que a las de la región más austral. Por otro lado, para la región norte se observa un haplotipo central que

está representado por 19 ejemplares, a partir del cual derivan 6 haplotipos diferentes obteniendo una red en forma estrella (Figura 8).

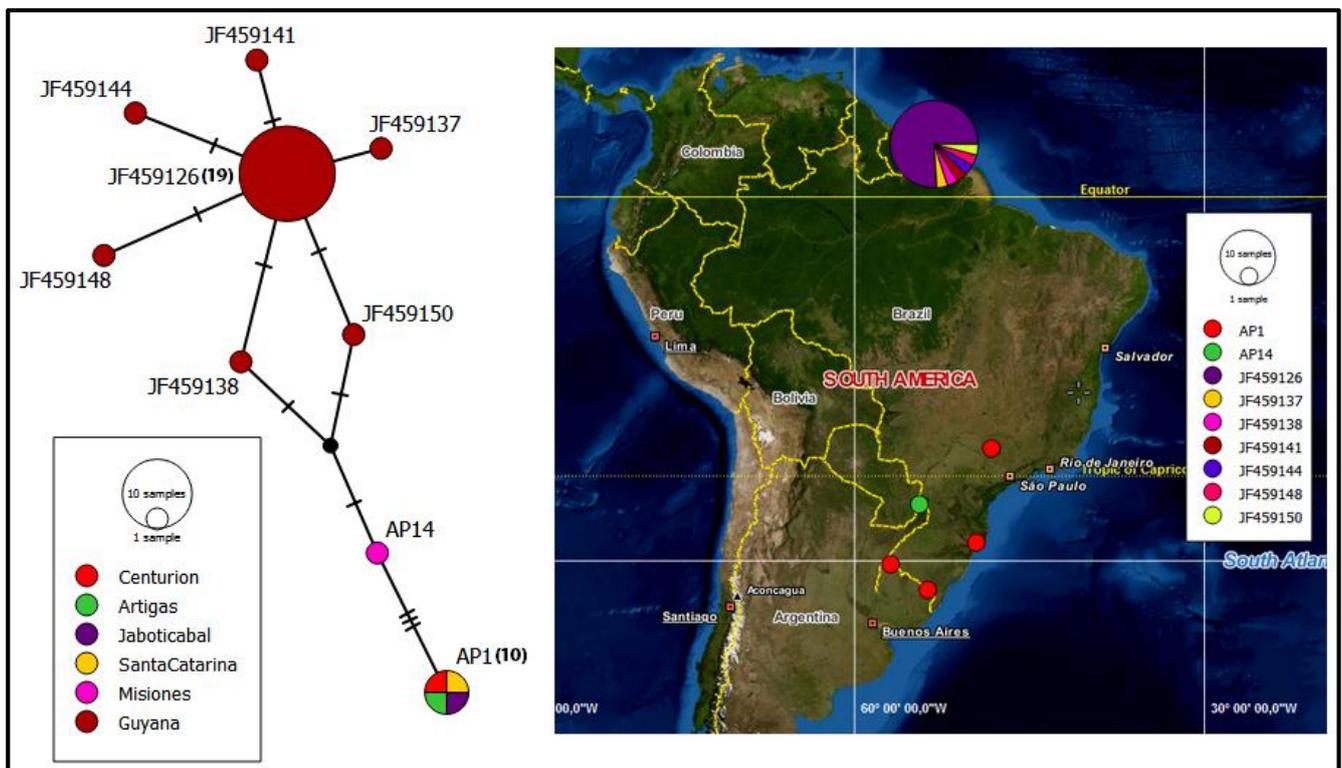


Figura 8. Red de haplotipos para el fragmento de ADN_m COI de *C. paca* obtenida mediante el software PopART. Cada esfera representa un haplotipo distinto, y la procedencia de las muestras se detalla en las referencias de la figura. Los puntos negros representan haplotipos hipotéticos designados por el programa utilizado. Si bien el tamaño de las esferas es indica la frecuencia de cada haplotipo, en cada una se muestra únicamente un nombre representativo para cada haplotipo. El número de diferencias entre haplotipos está representado mediante líneas transversales sobre las líneas de unión entre ellos. Los números entre paréntesis representan la cantidad de muestras con haplotipos idénticos en las esferas correspondientes.

En el árbol filogenético construido para el fragmento *COI* se observan claramente dos grupos diferenciados. Al igual que en la red haplotípica, las dos grandes agrupaciones generadas son: una entre los individuos del sur y otra entre los del norte (Figura 9). El grupo que contiene a la mayoría de las muestras colectadas en el sur (a excepción de AP14) presenta un alto valor de *bootstrap* de 94/100, mientras que el grupo que contiene a todas las muestras del norte presenta un valor de *bootstrap* de 53/100.

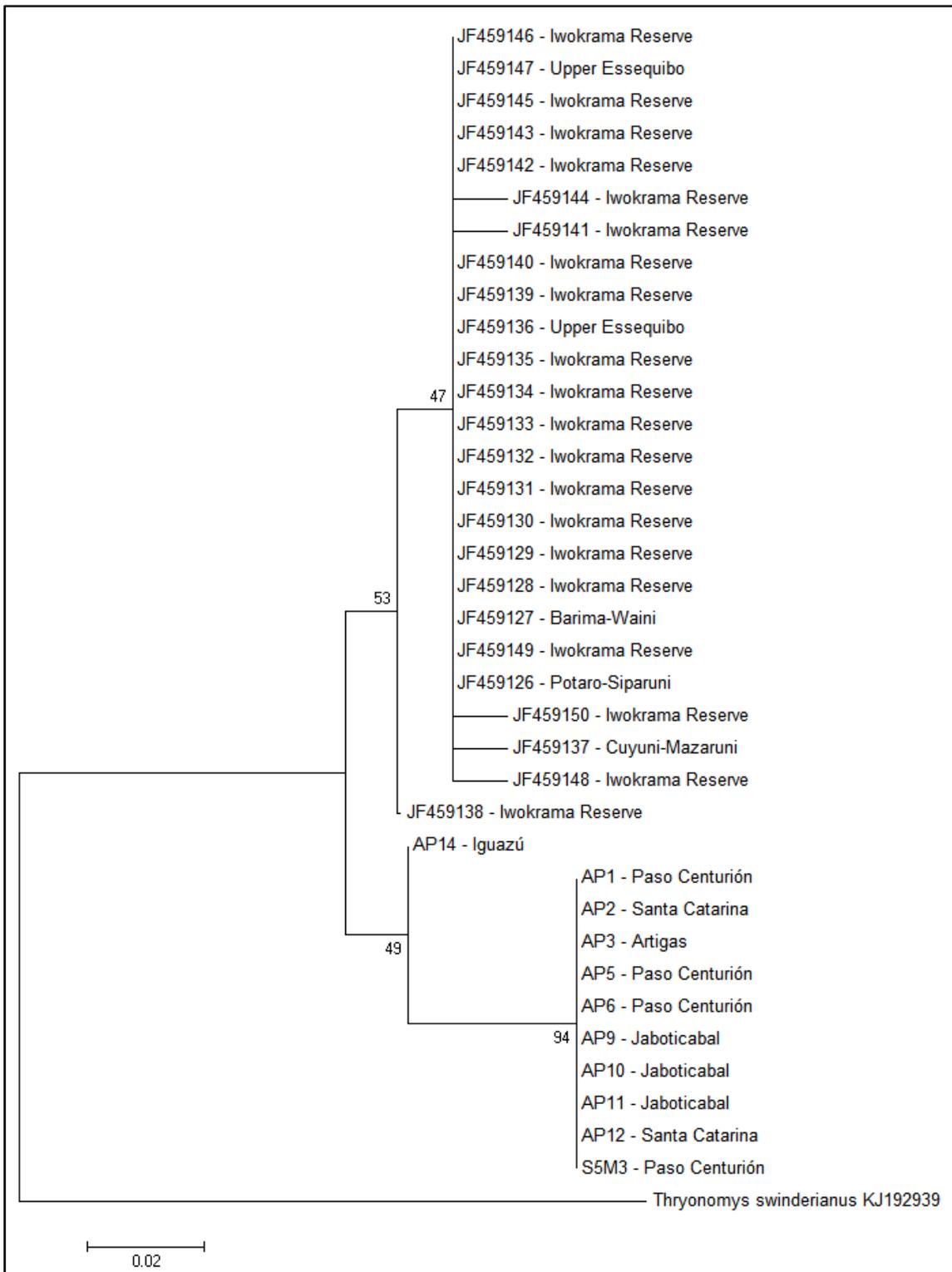


Figura 9. Árbol filogenético de *C. paca* construido para el fragmento de ADNm *COI* a través del programa *MEGA versión 6*. El método estadístico utilizado fue *Maximum likelihood* y el número de réplicas (*bootstrap*) fue de 1500. Para cada muestra utilizada se detalla el lugar de procedencia y se indica valor de apoyo en cada nodo. Las secuencias obtenidas de la base de datos del *GenBank* se encuentran descritas con su número de acceso correspondiente.

Los datos recogidos para el análisis de las muestras de *D-loop* mostraron 25 haplotipos distintos en un total de 32 ejemplares analizados. Se observan dos grupos diferenciados entre los individuos del sur y los procedentes del norte. Sin embargo en la región sur se encontraron 5 haplotipos distintos, a diferencia de lo ocurrido para el fragmento *COI* (Figura 10). En la región del norte, la paca de Venezuela (AY206576), mostró 14 cambios.

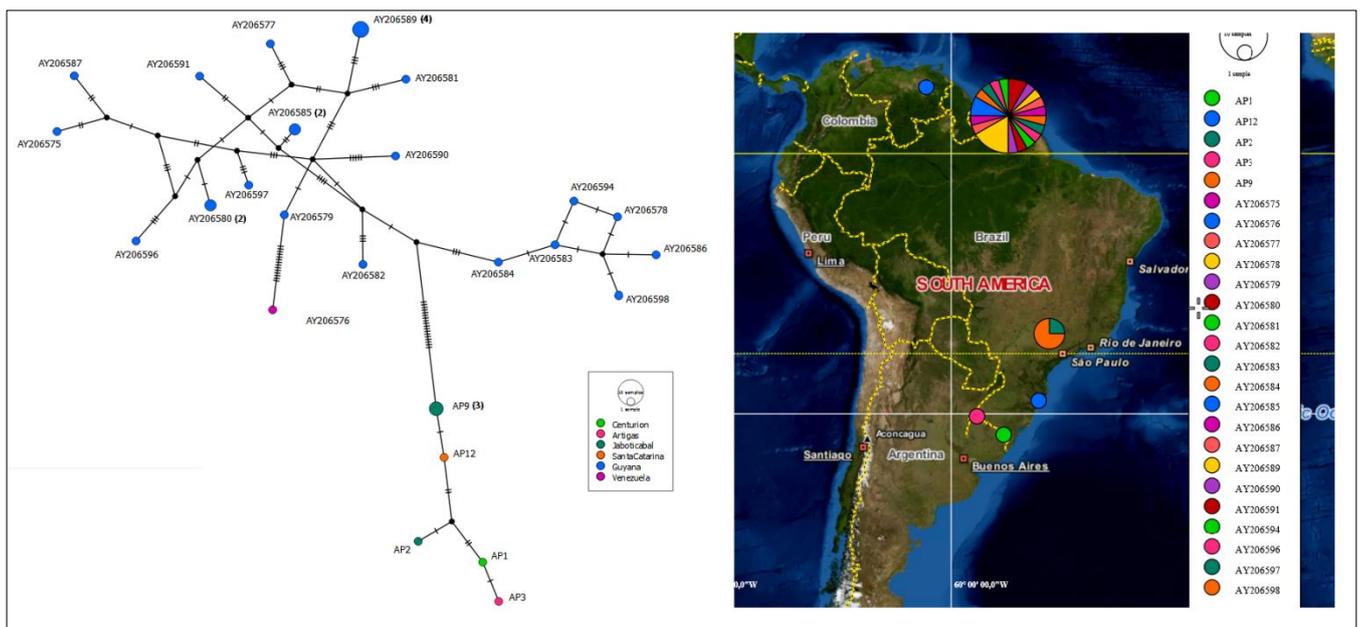


Figura 10. Red haplotipos para el fragmento de ADNm *D-loop* de *C. paca* obtenida mediante el software *PopART*. El modelo utilizado fue TCS (Templeton et al. 1992). Cada esfera representa un haplotipo distinto, y la procedencia de las muestras se detalla en las referencias de la figura. Los puntos negros representan haplotipos hipotéticos por el programa. Si bien el tamaño de las esferas representa la frecuencia de cada haplotipo, en cada una se muestra únicamente un nombre representativo para cada haplotipo. El número de diferencias entre un haplotipo y otro está representado mediante líneas transversales sobre las líneas de unión entre ellos. Los números entre paréntesis representan la cantidad de muestras con haplotipos idénticos en las esferas correspondientes

El árbol obtenido para el fragmento de *D-loop* agrupa en dos grupos diferentes a las pacas procedentes de Guayana y a las del sur. Los valores de *bootstrap* fueron de 52 y 96 para el norte y el sur respectivamente (Figura 11).

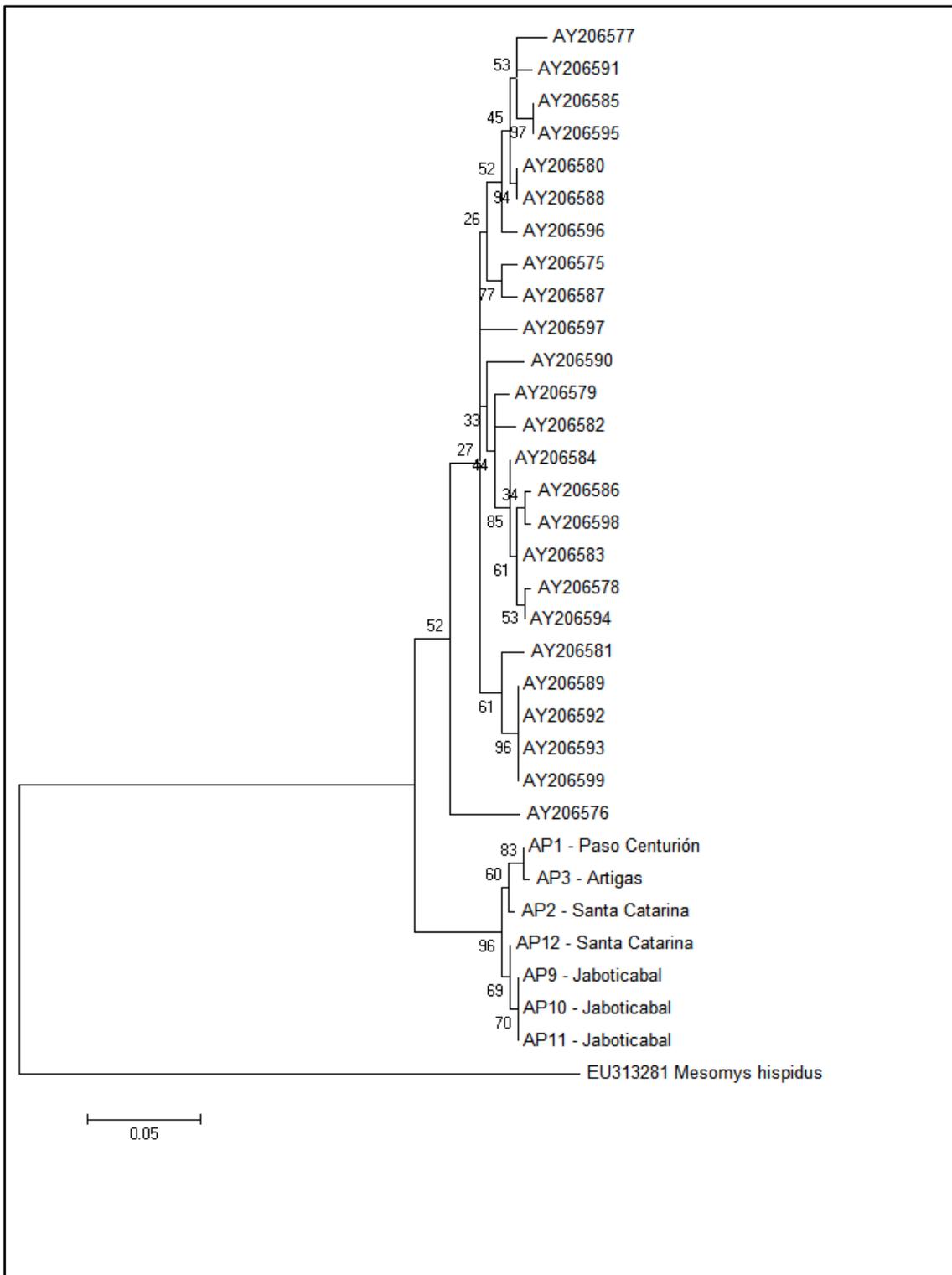


Figura 11. 3rbol filogen3tico construido para el fragmento de ADNm *D-loop* a trav3s del programa *MEGA versi3n 6*. El m3todo utilizado fue *Maximum likelihood* y el n3mero de r3plicas (*bootstrap*) fue de 1500. Para cada muestra utilizada se detalla el lugar de procedencia y el soporte de cada nodo. Las secuencias obtenidas de la base de datos del *GenBank* se encuentran descritas con su n3mero de acceso correspondiente.

El test de Mantel realizado para el fragmento de *D-loop* muestra un correlación entre las distancias genéticas y geográficas ($R=0,5419$ y $p=0,0002$). Esto determina una correlación positiva y estadísticamente significativa entre estas distancias para las muestras analizadas.

4. DISCUSIÓN

El método utilizado para las extracciones de ADN, demostró ser eficiente a partir de colecciones científicas. Sin embargo, como era esperable, se presentaron dificultades en la amplificación de fragmentos mayores a 300pb. Se analizaron muestras provenientes de colecciones científicas depositadas en museo y en su mayoría con una antigüedad aproximada de unos 30 años. Este tipo de muestras presentan inconvenientes debido a los factores que afectan la preservación del ADN, tales como la presencia de inhibidores y a la degradación del ADN, entre otros (Saiz et al. 2013). Esto se vio reflejado en las secuencias obtenidas a partir de cebadores universales, en donde los cromatogramas eran prácticamente ilegibles. El diseño de nuevos cebadores para obtener fragmentos más pequeños específicos de ADNm de *C. paca* brindó resultados exitosos. Aunque el tamaño en pares de bases de las secuencias obtenidas fue menor, se logró secuenciar un alto porcentaje de las muestras procesadas.

El grado de variabilidad haplotípica encontrado para *D-loop* refleja las características de hipervariabilidad intrínsecas previamente descritas acerca de la región control (Taberlet 1996). Esto también puede compararse con estudios realizados sobre la misma región del ADNm en distintas especies de roedores, donde se observó en un largo de secuencia entre 878 y 1317 nucleótidos, diferencias significativas en individuos del mismo género, lo que se determinó como un grado de variabilidad alto (Larizza et al. 2001)

Los valores de los índices de diversidad aquí obtenidos en ambos fragmentos analizados, sugieren en general la existencia de una alta variabilidad genética para la especie. Por otro lado Cevallos (2010) analizó mediante fragmentos de restricción (AFLPs) distintas regiones del genoma nuclear de paca determinando un alto nivel de diversidad para la especie. Esto concuerda con los resultados de este trabajo y por lo tanto *Cuniculus paca* posee una alta variabilidad genética.

En la red de haplotipos para el fragmento de *COI* se reconoce una forma similar a una estrella para las muestras del norte. Esto sugiere que los ejemplares del norte (específicamente los de Guyana), podrían haber pasado por un evento de expansión poblacional, en donde el haplotipo central es considerado el ancestro de donde derivan el resto de los haplotipos más recientes (Avise, 2000).

Con las redes de haplotipos obtenidas, se establece una clara separación entre las poblaciones del sur y del norte de paca, ya que para ninguno de los dos fragmentos analizados se encontró un haplotipo compartido entre dichas regiones. Estudios realizados en caviomorfos de América del Sur (Maestri & Patterson 2016) mostraron como la riqueza de especies de dicho grupo es favorecida con los patrones de temperatura latitudinales. Los valores más altos de riqueza específica están presentes en las regiones tropicales cercanas al ecuador, relacionado a una mayor tasa de cambio. Esto podría vincularse al hecho de que los ejemplares *C. paca* de Guyana presenten un mayor número de haplotipos cuando se los compara con los ejemplares del sur de la distribución de la especie. Este hecho también puede

atribuirse a que el número de muestras provenientes del norte fue considerablemente mayor a las utilizadas de la distribución sur durante este trabajo.

Se destaca la importancia de AP14, ya que presenta mayor número de diferencias respecto a las demás muestras del sur para *COI* que con las del norte. Esta muestra podría ser muy informativa si se obtuviera la secuencia de *D-loop*, ya que permitiría una mejor reconstrucción de las relaciones filogeográficas entre ambas regiones.

Los árboles construidos para ambos fragmentos de ADN_m estudiados determinaron dos grupos diferentes en ambos casos, lo que reflejaría una historia demográfica distinta para cada región.

Los valores obtenidos de $F_{ST} = 0,91636$ para *COI* y $F_{ST} = 0,6546$ para *D-loop* apoyan la existencia de una marcada diferenciación genética entre las muestras de individuos provenientes del norte y los individuos del sur (Wright 1949). Este es un factor importante a considerar debido a que poblaciones con este grado de diferenciación genética podrían llegar a evolucionar de manera independiente con el transcurso del tiempo por la ausencia de flujo génico (Slatkin 1994). También los valores obtenidos con el test de Mantel mostraron que existe una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas, lo que apoya la existencia de aislamiento por distancia entre las dos regiones (Slatkin, 1994). A su vez el grado de diferenciación genética encontrado en este estudio, en general suele hallarse cuando se comparan ejemplares de una misma especie de localidades distantes en un continuo de distribución geográfica (Moritz et al. 1987). Este concepto apoya los resultados obtenidos y la hipótesis de trabajo.

Estudios previos realizados por Castro et al. (2010) en la paca de montaña (*Cuniculus taczanowskii*) compararon cariotipos, morfometría y análisis moleculares de ADNm con Citocromo b, NADH5 y RPB entre ejemplares de la región andina. Allí se determinó que la cordillera representaba una barrera geográfica, permitiendo demostrar la presencia de dos especies diferentes de paca a los lados de la cadena montañosa. En *C. paca* se propone que el efecto de la distancia explicaría estas diferencias encontradas entre las poblaciones del norte y sur.

Si bien la cantidad de muestras analizadas (principalmente las del sur) fue reducida para un análisis de este tipo, probablemente las poblaciones del sur y del norte posean procesos evolutivos distintos que hayan establecido las diferencias entre los individuos de estas dos regiones (Moritz 1994). Esto podría llevar a considerar a las poblaciones del sur y del norte de *C. paca* como dos unidades evolutivas distintas. Para establecer unidades genéticas evolutivas resulta necesario realizar muestreos a lo largo de toda su distribución, así como análisis que permitan determinar la existencia de grupos coalescentes divergentes, por ejemplo con el método GMYC (Pons et al. 2006).

Conclusiones

- El diseño de cebadores específicos para la amplificación de los fragmentos de ADN_m analizados, se considera exitoso debido a que permitió obtener secuencias de buena calidad e informativas.
- *Cuniculus paca* presenta una alta variabilidad genética en base a los marcadores moleculares utilizados.
- El grado de diferenciación genética encontrado entre los ejemplares de Guyana y los de la distribución más austral para la especie, permite postular la posible presencia de al menos dos unidades evolutivas distintas.

Perspectivas

Se propone realizar un análisis con un número mayor de muestras a lo largo de toda su distribución, que permita apoyar los resultados obtenidos en este estudio. También se sugiere realizar un estudio comparativo de morfometría entre los dos grupos establecidos, para profundizar en las diferencias genéticas encontradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins, R. M., Gelke, E. L., Rowe, D., & Honeycutt, R. L. (2001). Molecular Phylogeny and Divergence Time Estimates for Major Rodent Groups: Evidence from Multiple Genes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 777-791.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.

Aquino, R., Gil, D., & Pezo, E. (2009). Aspectos ecológicos y sostenibilidad de la caza del majás (*Cuniculus paca*) en la cuenca del río Itaya, Amazonía peruana. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 067- 072.

Avice, J.C. (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, London, 447 pp.

Blanga-Kanfi, S., Miranda, H., Penn, O., Pupko, T., Debry, R. W., & Huchon, D. (2009). Rodent phylogeny revised: Analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 71. doi:10.1186/1471-2148-9-71.

Bonatelli, M., Carter, A., Fernandes, M., De Oliveira, M., Cardoso de Lima, M., Miglino, M. (2005). Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005, 3(9), 1- 12.

Bonilla-Morales, M., Rodríguez, J., Murillo, R. (2013). Biología de la lapa (*Cuniculus paca* Brisson): una perspectiva para la zootecnia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootécnica*; Vol 8 (1): 82-95.

Castro, J.A., Picornell, A, Ramon, M (1998). Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Internatl Microbiol* 1: 327–332.

Castro, J., Bautista López, J., Becerra, F. (2010). Una nueva especie de *Cuniculus* (*rodentia: cuniculidae*) de la cordillera central de Colombia. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 22: 122-131.

Catzefflis, F., Patton, J., Percequillo, A., Bonvicino, C. & Weksler, M. (2016). *Mesomys hispidus*. The IUCN Red List of Threatened Species <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 August 2016.

Cevallos, G. (2010). Estudio de la variabilidad genética de la guanta *Cuniculus paca* en el Ecuador. Tesis de grado. Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 82pp.

Chu, D., Guo D., Tao, Y., Jiang, D., Li, J. & Zhang, Y. (2014). Evidence for rapid spatiotemporal changes in genetic structure of an alien whitefly during initial invasion. *Scientific Reports*. 4: 4396, doi: 10.1038/srep04396.

Clement, M., Posada, D. and Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1660.

Cooper, A., (1994). DNA from museum specimens, in Ancient DNA, eds. Hermann, B & Hummel, S. Springer, 149-65.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340.

Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio

de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Eisenberg, J.F., Redford, K.H. (1999). Mammals of the Neotropics: The central Neotropics. Volume 3. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131, 479–491.

Fernández, E. (2000). Polimorfismos de DNA Mitocondrial en Poblaciones Antiguas de la Cuenca Mediterránea. Tesis de Doctorado. *Unitat d' Antropologia del Departament de Biologia Animal de la Universitat de Barcelona*. Pp674

Fiedler, L.A. (1990). Rodents as a food source. *Proceedings of the Fourteenth Vertebrate Pest Conference 1990*. Paper 30.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3:294–299.

Francis, C., Borisenko, A., Ivanova, N., Eger, J., Lim, B., Guillén-Servent, A. (2010). The Role of DNA Barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia. *PLoS ONE* 5(9): e12575. doi:10.1371/journal.pone.0012575.

Freeland, J. R. (2005). Molecular ecology, Chichester: John Wiley & Sons. England.

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541-4550.

González, S. (2005). Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. *Agrociencia IX*, 545-550.

González, S., N. Mannise, L. Repetto & J. E. Maldonado, 2015. Sex determination of three Neotropical canids by high resolution melting analysis. *Conservation Genetics Resources*, 7(3), 643- 5.

González, E.M., Martínez-Lanfranco, J.A. (2012). Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Ediciones de la Banda Oriental, Montevideo, Uruguay.

Grattarola, F. (2015). Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos en Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA – Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.

Grattarola, F., González, S., Cosse, M. (2014). A novel primer set for mammal species identification from feces samples. *Conservation Genetics Resources* 7 (1), 57-59.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan P. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*. 270(1512), 313–321.

Hoffmann, M. (2008). *Thryonomys swinderianus*. The IUCN Red List of Threatened Species <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 August 2016.

Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A., Sbisà, E., Saccone, C. (2002). Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *Journal of Molecular Evolution*. 54: 145-155. doi:10.1007/s00239-001-0063-4.

Laska, M. (2003). Food preference and nutrient composition in captive pacas, *Agouti paca* (*Rodentia, Dasyproctidae*). *Mammalian Biology* 68 (1) 31-41.

Leuchtenberger, C., Tirelli, F. P., Mazim, F. D., Peters, F. B., Oliveira, Ê S., Cariolatto, L., & Queirolo, D. (2016). New records of *Cuniculus paca* (*Rodentia: Cuniculidae*) in a temperate grassland dominated landscape of Pampas region of Brazil and Uruguay. *Mammalia*, 0(0). doi:10.1515/mammalia-2015-0129.

Luo, A., Zhang, A., Ho, S., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., Cameron, S., Zhu, C., (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC Genomics*, 12, 84.

Maestri, R., & Patterson, B. (2016). Patterns of Species Richness and Turnover for the South American Rodent Fauna. *Plos One*, 11(3). doi:10.1371/journal.pone.0151895

Matamoros, Y. (1981). Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). *Revista de Biología Tropical*. 29(1): 1 55-164, 1 981.

Medrano, J.F., Aasen, E., Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *BioTechniques*, 8(1), 43.

Montes-Pérez, R., Echeverría, A., Zavala, J. & Alfaro, M. (2006). Variaciones nucleotídicas de dos grupos de tepezcuintles, *Agouti paca* (*Rodentia: Agoutidae*), en cautiverio provenientes de dos localidades de Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 54 (3): 911-917, ISSN-0034-7744.

Moritz, C. (1995). Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 349, 113-8.

Moritz, C., Dowling, T., Brown, W. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18 : 269-292.

Nardelli, M., Túnez, J., Centrón, D., Cassini, M. (2011). Técnicas de muestreo no invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia*, 36() 404-411.

Nei, M., (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

Ossa, L., Paula, A., Giraldo, M., Javier Mauricio, López, G., Germán Ariel, Dias, Lucimar G., & Rivera P., Fredy A.. (2012). Colecciones biológicas: una alternativa para los estudios de diversidad genética. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 143-155.

Pérez, E.M. (1992) *Agouti paca*. *Mammalian Species*, 4, 1-7.

Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Vogler, A. (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595-609.

Poutou, R. (2009). Reseña de "Prácticas de biología molecular" de Concepción J. Puerta Bulla y Claudia P. Uruena. *Universitas Scientiarum*, Enero-Abril, 106-108.

Queirolo, D., Vieira, E., Emmons, L. & Samudio, R. 2008. *Cuniculus paca*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 September 2015.

Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Saiz, M., Álvarez-Cubero, M., Martínez González, L., Álvarez, J., Lorente, J. El ADN antiguo una herramienta para descifrar la historia. Cuadernos de Prehistoria y Arqueología de la Universidad de Granada, Norteamérica, 22, sep. 2012.

Silva-Neto, A. A., Ferreira, P. B., Torres, R. A., Texeira, R. H. F., Duarte, J. M. B., Barbosa, A. C., Vargas, R. C., & Garcia, J. E.. (2016). Diagnostic Cytochrome b gene profiles for the identification of paca (*Cuniculus paca*) bushmeat: implications for the monitoring of illegal hunting and wildlife trade. *Brazilian Journal of Biology*, 76(1), 55-58. Epub January 05, 2016

Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton.

Smith, O., Wang, J. (2014). When can non-invasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies. *Molecular Ecology Resources*, 14(5), 1011- 23.

Smythe, N. (1987). The Paca (*Cuniculus paca*) as a Domestic Source of Protein for the Neotropical, Humid Lowlands. *Applied Animal Behaviour Science*, 17(1) 155-170.

Sokal, R., Rohlf, F. (1999). Introducción a la bioestadística (Ed. en español.). Barcelona [etc.]: Reverté.

Soutullo, A., Clavijo, C., Martínez-Lanfranco, J. (2013). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA Y DICYT/MEC, Montevideo.

Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L., Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research.*, 24, 3189–3194.

Taberlet, P., Waits, L., Luikhart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology Evolution*, 14, 323– 327.

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

Templeton, A., Crandall, K., Sing, C. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619–633

Termo Fisher Scientific Inc. 2008. Thermo Scientific, Nanodrop 1000 Spectrophotometer. User 's Manual. Apendice 19-2. Thermo Fisher Scientific Inc., 3411 Silverside Road, Bancroft Building, Suite 100, Wilmington, DE 19810 U.S.A, phone: 302-792-7155, fax: 302-792-7155, e-mail: info@nanodrop.com, WEB: <http://www.nanodrop.com>.

Van Vuuren, B., Kinet, S., Chopelet, J., Catzefflis, F. (2004). Geographic patterns of genetic variation in four Neotropical rodents: conservation implications for small game mammals in French Guiana. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(2), 203-218.

Vilà, C., Amorin, I., Leonard, J., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K., Ellegren, H., Wayne, R. (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8(12), 2089-2103.

Willerslev, E., Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1558), 3–16. <http://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>

Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*, 15: 323–354.

ANEXO

Protocolo empleado en este estudio para las extracciones de ADN (Medrano *et al.*, 1990 con modificaciones de González *et al.* 2015)

DIA 1

1. Cortar tejido con material estéril
2. Colocar en eppendorf
3. Centrifugo 1min. si la muestra fue conservada en alcohol para eliminarlo.
4. Se lava con buffer STE 1ml.
5. Centrifugo 1 min.
6. Descarto el STE
7. Agregar buffer de lisis (550 ul) + proteinasa K (10 mg/ml) (20 ul)
8. Dejar en baño a 55 °C con agitación dos horas, o a 37°C por toda la noche

Buffer de lisis

50mM Tris HCl, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0; 1% SDS; 100mM NaCl; 1% beta mercaptoetanol

Buffer STE

Ver Maniatis

DIA 2

1. Adicionar 5,5 ul. RNAsa A y dejar incubando 1 hora mas a 55 °C
 2. Centrifugar 14.000 rpm por 10 min.
 3. Transferir sobrenadante a otro eppendorff y medir (ul.) con la pipeta
 4. Agregar NaCl, lo tenemos a 5M, y lo tengo que llevar a 2M
 $V_i = V_f (\text{Sobrenadante}) \times 2 (\text{Concentración final}) = x$
5 (Concentración inicial)
- Hacer tabla
- | | | | | | |
|--------------|--------|--------------|----------------|----------------------|------------|
| N° individuo | V.ini | V.ini X 0.66 | V.ini + V.NaCl | (V.ini + V.NaCl) / 2 | V.c/tubo*2 |
| | V.NaCl | c/tubo | V.Etanol | | |
- p.3 p.4 p.7 p.8
5. Vortexear 5 seg. cada muestra
 6. Centrifugar 14000 rpm durante 30 min.
 7. Distribuir el sobrenadante en dos tubos eppendorff (aprox. 400ul. cada uno)
 8. Adicionar el doble en volumen de Etanol absoluto frío (aprox. 800ul.) en este momento se debería observar el ADN
 9. Se deja precipitando en la heladera toda la noche

DÍA 3

1. Centrifugar 30 min. a máxima rpm
2. Desechar sobrenadante
3. Adicional 1ml de Alcohol 70%
4. Centrifugar 5min. a 6000 rpm-descartar sobrenadante
5. Adicional 1ml de Alcohol 70%
6. Centrifugar 5min. a 6000 rpm- descartar sobrenadante
7. Incubar 30 min. a 37°C o hasta secar
8. Agregar 50 ul 1xTE (Tris EDTA o agua destilada)