

Variabilidad genética en el Huemul,
Hippocamelus bisulcus
Molina, 1782.



Elina Gregorini

Departamento de Genética. Laboratorio de Genética de la
Conservación

IIBCE – Unidad Asociada Facultad de Ciencias–UDELAR
Responsable de Profundización en Genética: Dr. Ruben Pérez

Orientador: Dra. Susana González

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCION.....	6
2.1 Características de la especie	6
2.2 Distribución	8
2.3 Importancia del estatus actual de la especie.....	9
2.4 Antecedentes	10
2.5 Marcador molecular: ADN mitocondrial.....	11
2.6 Genética de la conservación.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES & METODOS.....	16
4.1 Obtención de muestras.....	16
4.2 Extracción de ADN.....	16
4.2.1 Extracción de ADN en fecas	16
4.2.2 Extracción de ADN en tejidos.....	18
4.3 Calidad del ADN	19
4.4 Amplificación por PCR	19
4.5 Secuenciación.....	20
4.6 Análisis de secuencias	20

5. RESULTADOS	22
5.1 Extracción y amplificación de secuencias	22
5.2 Análisis de secuencias	22
5.3 Análisis Filogenéticos	23
6. DISCUSION	26
6.1 Variabilidad genética	26
6.2 Implicancias en la Conservación.....	28
7. BIBLIOGRAFIA	30
8. ANEXOS.....	35

Índice de Imágenes

Figura 1. Ejemplar macho de <i>Hippocamelus bisulcus</i>	7
Figura 2. Ejemplar hembra de <i>Hippocamelus bisulcus</i>	7
Figura 3. Mapa Google Earth [™] muestra donde se localizan los puntos de distribución de las poblaciones actuales de Huemul.....	9
Figura 4. Esquema de ADN mitocondrial, en donde se representa las distintas regiones de genes codificantes y la región hipervariable <i>D-loop</i>	12
Figura 5. Fecas de Huemul. Foto de Alejandro Vila.....	14
Figura 6. Imagen de una región de las distintas secuencias donde se señalan los sitios polimórficos.....	24
Figura 7. Árbol filogenético, construido con el método de Neighbor - Joining (Unión de vecinos).....	25

Índice de tablas

Tabla 1. Posición de las transiciones y transversiones en las secuencias analizadas.....	23
Tabla 2. Matriz de distancia, se visualizan las diferencias nucleotídicas entre los haplotipos del fragmento <i>D-loop</i>	25
Tabla 3. Características más distintivas entre las cuatro especies representativas de ciervos neotropicales.....	27

RESUMEN

El Huemul, *Hippocamelus bisulcus*, es un ciervo endémico de Sudamérica, solo habita la región andino-patagónica de Chile y Argentina. Actualmente es considerado uno de los cérvidos neotropicales más amenazados y se encuentra catalogado por UICN en peligro crítico de extinción debido a que ha sufrido una marcada reducción, tanto en sus números poblacionales como en su rango de distribución original.

La fragmentación de las poblaciones por pérdida de hábitat y el aislamiento, son algunos de los factores más importantes que afecta a la especie, y probablemente han incidido en la pérdida de variabilidad genética del Huemul.

Con el objetivo de estudiar a nivel genético la especie se analizaron secuencias de ADN con marcadores moleculares de ADN mitocondrial, los cuales son de gran utilidad para determinar la estructura genética de las poblaciones y analizar los niveles de variación interpoblacional e intrapoblacional que aún retiene la especie.

A partir de esto, se determinaron 3 haplotipos para la región *D-loop* para los ejemplares de Argentina en un total de 7 muestras analizadas. Se incluyeron en el estudio 3 haplotipos de distintas poblaciones de Chile, a modo de poder efectuar un análisis interpoblacional para la especie.

Los resultados obtenidos revelaron una baja diversidad genética y una discreta estructuración entre las poblaciones de Chile y Argentina sugiriendo que no existiría flujo génico entre ellas. Una evaluación más amplia que incluya mayor cantidad de secuencias permitirá establecer si la limitada variabilidad encontrada es una característica general de esta especie.

2. INTRODUCCION

El Huemul, *Hippocamelus bisulcus* (Molina 1782) es un cérvido endémico de Sudamérica que habita los bosques andino–patagónicos de Argentina y Chile. Huemul es el nombre común que se usa actualmente para este ciervo, el cual procede de la lengua Araucana (también llamado “yeqchal” o “jegel”) (Cabrera & Yepes, 1960).

2.1 Características de la especie

Los Huemules tienen apariencia robusta, sus miembros son fuertes y relativamente cortos indicando su adaptación a los ambientes montañosos. El pelaje, que muda dos veces al año, es pardo, grueso, neumático (posee aire en su interior) y algo oleoso, permitiéndole nadar con facilidad las frías aguas de lagos, ríos y arroyos, además de ser un excelente abrigo para las bajas temperaturas y los fuertes vientos. El ciervo Huemul presenta dimorfismo sexual, solo los ejemplares machos exhiben una marcada mancha color negro en su rostro en forma de Y, variando su intensidad en distintas épocas del año. Además poseen un par de astas bifurcadas que pueden tener diferente longitud dependiendo básicamente de su nutrición y edad, las astas alcanzan un tamaño máximo de 30 cm (Fig.1). Su peso ronda entre los 40 y 100 Kg. (Díaz & Smith – Flueck, 2000).

La nutrición de esta especie es variada, se alimenta principalmente de arbustos, hierbas y brotes de árboles, como también de líquenes, que encuentra entre las rocas en los altos montañosos. Viven en pequeños grupos de dos a tres animales; estos grupos están constituidos por una hembra (Fig.2), y sus crías, y también hay ejemplares solitarios (Díaz & Smith – Flueck, 2000). A diferencia de otros ciervos, las crías de Huemul no presentan manchas al momento de su nacimiento (Vidal, 2010).



Figura 1. Ejemplar macho de *Hippocamelus bisulcus*

Tomada de www.arkive.org



Figura 2. Ejemplar hembra, *Hippocamelus bisulcus*.

Tomada de www.rodrigoverdugo.cl



Mapa antiguo de la Patagonia (Said, 2011)

2.2 Distribución

En Chile, la distribución original del Huemul, antes de la colonización Europea, abarcaba desde los 34° S hasta el Estrecho de Magallanes (Osgood, 1943). Actualmente, las poblaciones de Huemules se encuentran reducidas a un pequeño núcleo ubicado en los Nevados de Chillán (36° S) y las Regiones de Aysén y Magallanes (43° a 54° S). Además se encuentran en la Provincia de Ñuble, Lago Cochrane y en la Reserva Nacional Torres del Paine. La distribución actual sólo representa un 50 % de la original (Drouilly, 1983).

En Argentina, la distribución de la especie también se ha restringido en forma significativa. Hasta comienzos del siglo XX incluía la franja boscosa cordillerana y los ambientes esteparios y ecotonales subandinos (Díaz & Smith - Flueck, 2000). Actualmente, el extremo septentrional de la

distribución del Huemul en Argentina parece encontrarse en el Parque Nacional Nahuel Huapi (40° 30' S). Los registros actuales más australes se localizan en la zona central del Parque Nacional Los Glaciares (49° 54' S) (Smith–Flueck & Flueck, 1995; Serret, 1992).

En la actualidad las poblaciones de Huemul están drásticamente reducidas, se estiman 2000 individuos, corresponde a menos del 1% de su abundancia histórica (Redford & Eisenberg, 1992). La subpoblación en Nevados de Chillán, Chile, tiene el mayor grado de aislamiento territorial y se encuentra a una distancia de aproximadamente 425 km de la subpoblación del Parque Nacional Nahuel Huapi (Fig. 3) (Vila *et al.*, 2006).

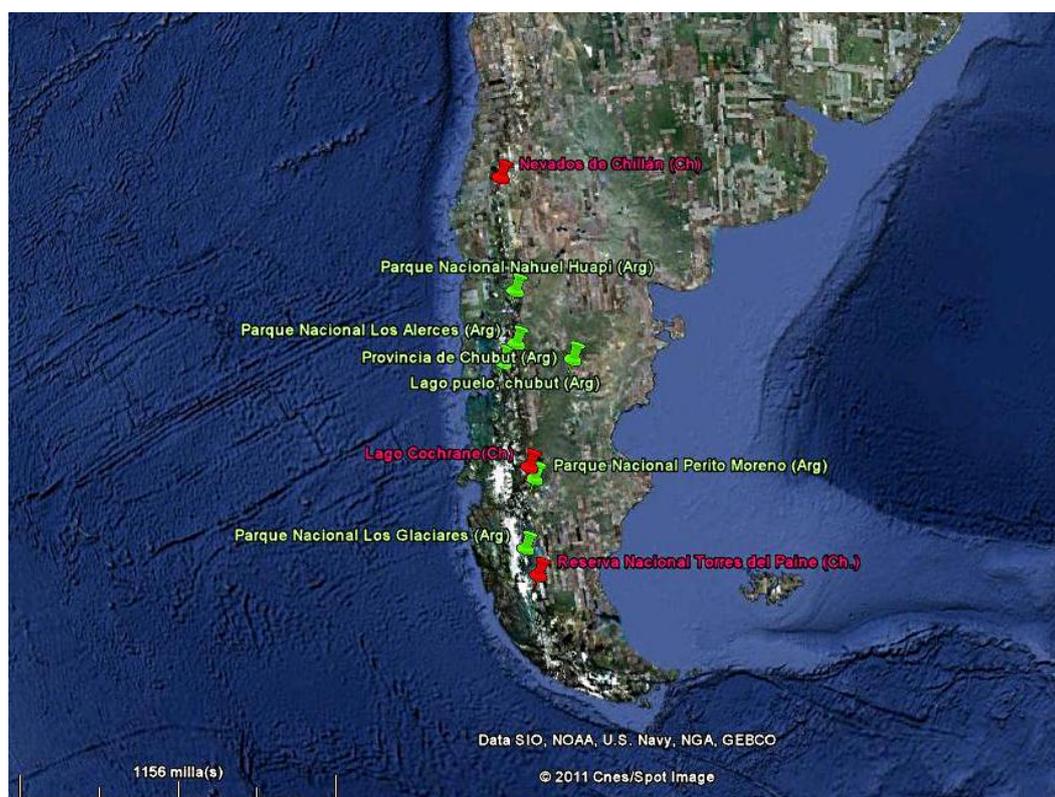


Figura 3. Mapa Google Earth™ muestra donde se localizan los puntos de distribución de las poblaciones actuales de Huemul (■ Argentina ■ Chile)

2.3 Importancia del estatus actual de la especie

Los factores que han contribuido al descenso del Huemul en todo su área de distribución geográfica son debidos principalmente a la acción humana: siendo la de mayor impacto la destrucción o deterioro de su hábitat, producto de los incendios forestales, las explotaciones de bosque nativo, el sobrepastoreo, las obras de infraestructura y la caza furtiva (Vidal, 2010).

Además son afectados por la transmisión de enfermedades de animales domésticos; como el perro, que no sólo transmite enfermedades, sino que le causa la muerte por ataque y persecución a la crías de Huemul. También existe competencia por los recursos debido la introducción de especies exóticas (Vidal, 2010).

Debido a su disminución numérica y a la retracción de su área de distribución, ha sido clasificado como "en peligro de extinción" por la UICN (Unión Internacional para la conservación de la naturaleza) desde 1996. Esta especie ha sido protegida por ley desde 1929 en Chile y desde 1989 en algunas partes de la Argentina (Díaz & Smith-Flueck, 2000). El Huemul también fue incluido en el Apéndice I de la Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora Silvestres (CITES) y en el Apéndice I de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestre (CMS), por tratarse de una especie

compartida entre dos países y que se desplaza habitualmente entre sus límites.

Esta especie cumple la función de “especie paraguas” en términos ecológicos, por lo tanto, los esfuerzos que se realicen para proteger este ciervo tendrán efectos positivos en la protección de muchas otras especies, de manera tal que se mantenga la biodiversidad biológica del ecosistema (Díaz & Smith-Flueck, 2000).

2.4 Antecedentes

Jara *et al.* (2003) analizaron 20 individuos de cuatro poblaciones chilenas de Huemul con marcadores de ADN mitocondrial, región *D-loop* y *Citocromo b*. Aunque corresponde a un análisis preliminar, los resultados mostraron una baja variabilidad genética. Los autores sugieren que es necesario disponer de más cantidad de secuencias para determinar el grado de flujo génico entre poblaciones y entender el patrón filogeográfico de esta especie.

En un análisis filogenético mediante el gen del *Citocromo b*, Duarte *et al.* (2008) realizaron un estudio que incluyó a todos los géneros de las especies representativas de ciervos neotropicales, incluido el Huemul. De un total de cinco secuencias analizadas obtuvieron dos haplotipos para esta especie. Los autores también proponen, que el género *Hippocamelus*, el Huemul (*H. bisulcus*) y la Taruka (*H. antisensis*), se encuentran separados en el árbol

filogenético, sugiriendo un origen polifilético y por lo tanto, la necesidad de una reevaluación taxonómica del género *Hippocamelus*.

2.5 Marcador molecular: ADN mitocondrial

La genética molecular cuenta con un gran conjunto de técnicas y marcadores que se están aplicando a la biología de la conservación y el manejo de la vida silvestre. Los marcadores asociados al ADN mitocondrial han mostrado poseer suficiente variación entre especies, permitiendo realizar determinaciones taxonómicas utilizando un set de variantes suficientemente homogéneos dentro de una especie (Avice, 1995).

El ADN mitocondrial consiste en una molécula de ADN doble hebra circular de aproximadamente 16 kb (Fig.4). Es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, que contiene 37 genes funcionales sin regiones intergénicas; 13 de los genes codifican para proteínas, 2 para ARN ribosómico, 22 para ARN transferencia, y un segmento no codificante de 1000 pb correspondiente a la región *D-loop* en vertebrados (Taberlet, 1996). Este genoma extranuclear es transmitido por vía materna sin producirse recombinación genética. Sus secuencias evolucionan 10 veces más rápido en su región control, *D-loop* en comparación al ADN nuclear (Ryder & Fleisher, 1996). La región *D-loop* es hipervariable, posee alta variabilidad a nivel intraespecífica, característica que la hace adecuada para estudios taxonómicos y filogenéticos (Kocher *et al.*, 1989).

Los marcadores asociados al ADN mitocondrial son de gran utilidad para determinar la estructura genética de las poblaciones, para detectar subdivisiones en la variación genética y para revelar eventos demográficos históricos. El uso de estos marcadores ha permitido realizar estudios filogeográficos y determinar e implementar estrategias de conservación (Brown *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1986).

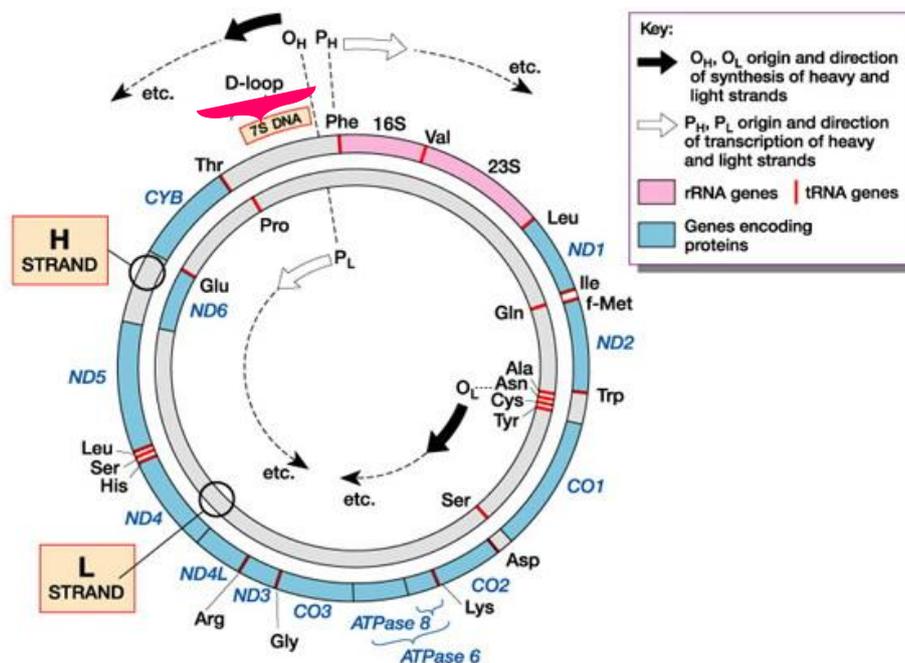


Figura 4. Esquema de ADN mitocondrial, en donde se representa las distintas regiones de genes codificantes y la región hipervariable *D-loop*.

Los estudios sobre variabilidad genética del Huemul tienen gran importancia en la conservación de éste y se sabe que entre otros factores, la disminución actual de individuos posibilita que existan cruzamientos entre consanguíneos aumentando el grado de endogamia. De tal manera que la diversidad de genes se reduce en poblaciones pequeñas (Díaz & Smith-Flueck, 2000).

Es necesario conservar la variabilidad genética, debido a que un déficit puede afectar la posibilidad de respuesta de la especie frente a cambios en factores ambientales, como enfermedades o catástrofes naturales, lo que vuelve a estos animales más vulnerables. Principalmente en áreas donde la densidad y el hábitat están disminuyendo a causa de la actividad humana (Díaz & Smith - Flueck, 2000).

2.6 Genética de la conservación

La problemática de conservación que presenta esta especie, hace imprescindible la búsqueda de estrategias de muestreos no invasivos, que no lesionen o alteren al individuo o a su hábitat (Moritz, 1994; Avise, 1996).

A través de este tipo de técnicas es posible analizar la presencia y uso de áreas de las especies. Estas estrategias de muestreos, son uno de los factores limitantes para desarrollar estudios de caracterización genética, que permitan aplicar esta información para diseñar programas de manejo de la población.

En el momento de planificar el muestreo es importante considerar cual será la estrategia más adecuada, que permita obtener un mayor número de muestras representativas. Los métodos de muestreos no invasivos incluyen el empleo de: huellas y trillos, imágenes, estaciones olfativas, vestigios de ejemplares y de fecas (González, 2005).

Existen estudios de genética poblacional de especies amenazadas, que se han efectuado muestreando pelos de los ejemplares (González *et al.*, 1998). La colecta de pelos se realiza en dormideros o lugares de pasaje por medio de instrumentos que los arranquen o peguen, y a través del bulbo piloso se extrae el ADN para posteriormente realizar el análisis génico (González, 2005).

Otra técnica de muestreo no invasivo frecuente en el estudio de especies amenazadas o en peligro de extinción, es la colecta de fecas (Fig.5), se encuentran en abundancia y con una mínima cantidad se puede extraer ADN. Las fecas contienen restos de alimentos no absorbidos por el aparato digestivo y también células del epitelio intestinal, que se descaman en el proceso de absorción de nutrientes (Bradley *et al.*, 2001).

El ADN obtenido de células presentes en las fecas, se encuentra en general degradado y en bajas concentraciones, pero es útil para amplificar por la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), con primers de ADN mitocondrial y ADN nuclear, especialmente de microsatélites (Kohn & Wayne, 1997).



Figura 5. Fecas de Huemul. Foto de Alejandro Vila

Los análisis genéticos permiten dar solución a problemas de tipo taxonómico. Dado que no se pueden conservar todas las poblaciones de una especie es necesario establecer poblaciones prioritarias para la conservación, se definen así las unidades evolutivamente significativas (ESU) y unidades de manejo. Éstos son conceptos operacionales para definir poblaciones o conjuntos de poblaciones sobre las cuales se deben concentrar los esfuerzos de conservación (Moritz, 1994, 1995). Además permiten implementar estrategias de conservación de las poblaciones y verificar si en cambio se debe efectuar un manejo de metapoblaciones (Ballou, 1994). Así como para poder proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar el grado de variabilidad genética de ejemplares de Huemul de los países de Argentina y Chile, utilizando marcadores moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Analizar los niveles de variabilidad genética interpoblacional e intrapoblacional que retiene la especie.
- ❖ Determinar si existen patrones filogeográficos correlacionados con subestructuración poblacional.

4. MATERIALES & METODOS

4.1 Obtención de muestras

Las muestras fueron colectadas por el Dr. Alejandro Vila en Argentina, en los Parques Nacionales: Los Alerces (42° 55´ S, 71°51´ O, Provincia de Chubut), Nahuel Huapi (41° 08´ S, 71° 17´ O, Provincia de Neuquén) y Los Glaciares (49° 59´ S, 73° 09´ O, Provincia de Santa Cruz). Las 41 muestras corresponden a pelos, cuero, tejidos y fecas, colectadas en corredores y dormideros de ejemplares de *Hippocamelus bisulcus*.

4.2 Extracción de ADN

4.2.1 Extracción de ADN en fecas

La extracción de ADN en las muestras de fecas se realizó siguiendo el protocolo del Kit QIAGEN DNeasy[®] Blood & Tissue Handbook. Las fecas contienen células del epitelio intestinal que se descaman en el proceso de absorción de nutrientes, el ADN contenido en las células es el que se extrae y permite el análisis genético. El inconveniente que se presenta al trabajar con muestras de fecas es que existe mayor probabilidad que las hebras de ADN se encuentren degradadas.

Para seguir el protocolo se utilizó materiales estériles y guantes, las muestras se manipularon por separado, de modo de reducir al mínimo la probabilidad de contaminación. Utilizando el protocolo sugerido por los fabricantes. Siguiendo los pasos del mismo, se colocó en un eppendorff de 1.5 mililitros, una pequeña cantidad de la muestra de feca a analizar, aproximadamente 25 miligramos. Luego a cada tubo se le agregó 180 µl de buffer AT1 y luego 20 µl de proteinasa K.

Luego de mezclar con cuidado el tubo, se colocó en un baño a 55°C hasta que la feca estuviera bien diluida (3hs o toda la noche). En este caso se dejaron las muestras toda una noche en un baño a 55°C. Al otro día se agregaron en los tubos 200 µl de buffer AL, mezclando bien hasta homogeneizar. Las muestras fueron encubadas en un baño a 70°C durante 10 minutos. Se agregaron 200 µl de etanol (96–100%) a los tubos, con el fin de precipitar al ADN, mezclando bien la solución en cada tubo.

La solución se colocó en una columna de 2 µl en un eppendorff, y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el eppendorff con la elución, se agregaron a la columna 500 µl de buffer AW1, y se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

Se colocó la columna en un nuevo eppendorff de 2 µl, y se le agregaron 500 µl de buffer AW2. Se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 3 minutos.

Finalmente como último paso, se colocó la columna en un eppendorff de 2 µl y se agregaron 50 µl de buffer AE directamente en la membrana, esto se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. Se retiró el eppendorff y se repitió el último paso.

No se recomienda el uso del Vortex[®] para el mezclado de las soluciones al trabajar con muestras fecales, ya que el ADN presente en las muestras, se encuentra bastante degradado. Por este motivo, el proceso de homogenización aumentaría aún más la degradación de este tipo de muestras.

4.2.2 Extracción de ADN en tejidos

En las extracciones de ADN a partir de pelos y tejidos se utilizó el protocolo de Medrano *et al.* (1990). Al igual que las muestras de fecas, éstos se manipularon con material estéril. El protocolo consistió en 2 lavados con buffer STE 1X (0.1M NaCl, 100mM Tris, 1mM EDTA), pH: 8.0, centrifugando 1 minuto entre cada lavado y descartando el sobrenadante. Luego se agregaron 550 µl de buffer de lisis (50mM Tris HCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 100mM NaCl, 1% beta mercaptoetanol); y 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), se procede a homogeneizar con Vortex[®]. Se incubaron a 37°C en baño con agitación toda la noche. Al día siguiente se adicionaron 5,5 µl de ARNasa (10mg/ml) y se incubaron 1 hora a 55°C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron 10

minutos a 14000 rpm, y se transfirió el sobrenadante a otro eppendorff, donde se adicionó NaCl hasta llegar a una concentración de 2M.

Se adicionó el doble de volumen de sobrenadante de etanol absoluto. Las muestras se mantuvieron en heladera hasta el día siguiente para que precipite el ADN.

El último día, se centrifugaron 30 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante, se adicionó 1ml de alcohol 70%, se repite el proceso de centrifugación, en esta ocasión 5 minutos a 6000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitieron los 3 últimos pasos y posteriormente se dejaron incubar 30 minutos a 37°C y se agregó 50 µl de agua destilada para resuspender el ADN.

4.3 Cuantificación del ADN

Se comprobó la calidad y cantidad de ADN extraído en las muestras de fecas y tejidos mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000, que provee la concentración de ADN (ng/µl) y además permite detectar si se dispone de impurezas, a través de la relación de $ABS=260/280$, si el valor obtenido es ≥ 1.80 se considera que la muestra es de ADN y en alto estado de pureza, si el valor es ≥ 2.00 hay una mayor concentración de ARN. Valores < 1.80

indican la presencia de proteínas. Para el estudio de las muestras con el espectrofotómetro; como primer paso para estandarizar, se colocó 2µl de agua destilada y se midió para corroborar que el valor sea cero o este por debajo del cero, una vez estandarizado se mide cada una de las muestras de ADN, obteniéndose los resultados de concentración, pureza y curva de absorbancia. Entre muestra y muestra se limpia el lector del NanoDrop™ 1000 para evitar contaminación (Termo Fisher Scientific I. 2008).

También se verificó la calidad y cantidad del ADN extraído, mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE 1% y BrEt. El mismo se preparó mezclando 0.8 microgramos de agarosa 1% y 80ml de buffer TBE 1%, esto se puso a calentar unos minutos hasta fundir la agarosa en el buffer TBE. Luego agregaron 4 µl de bromuro de etidio (BrEt 5ug/ml). Se colocó en un molde con los respectivos peines, y se dejó a temperatura ambiente aproximadamente 40 minutos hasta gelificar.

4.4 Amplificación por PCR

Para la amplificación del fragmento de 601 pb correspondiente a la región control (*D-loop*) del ADN mitocondrial, se utilizaron primers universales DL-H16498 y Thr-L15910 (Kocher *et al.*, 1989):

DL -H (5´ CCTGAACTAGGAACCAGATG 3´)

Thr -L (5´ GAATTCCCCGGTCTTGTAACC 3´)

Cada mix de PCR contiene aproximadamente 80 ng de muestra de ADN, 2,0 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM BSA, 2U Taq ADN polimerasa en un buffer 10X en 25µl de volumen total, la reacción contiene 25 pmoles de cada primer. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador mediante 35 ciclos, se realizó una desnaturalización inicial por 3 minutos a 94°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Cada ciclo consiste en una etapa de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, hibridación a 50°C por 120 segundos, y extensión a 72°C por 90 segundos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa a una concentración del 1%.

En todas las reacciones se incluyeron controles negativos para descartar contaminación, y controles positivos para verificar que no existieran errores en la manipulación o en los reactivos del mix del PCR. Además permite comparar el tamaño del fragmento amplificado.

4.5 Secuenciación

Los productos de PCR que amplificaron para la secuencia en estudio, se enviaron a secuenciar al Instituto Pasteur de Montevideo, Unidad de Secuenciación, con el fin de encontrar variabilidad genética entre los individuos estudiados.

4.6 Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias se alinearon con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), el cual permite confirmar los cambios creados mediante edición manual de las bases nucleotídicas. De la alineación correcta de la secuencia, se clasificaron los distintos haplotipos.

Los árboles de distancia se construyeron usando la opción “pairwise deletion”, los sitios que contienen datos deficientes de alineación se eliminan del análisis para todas las muestras.

Actualmente existen disponibles dos secuencias de ADN de *Hippocamelus bisulcus* (Duarte *et al.*, 2008) en la página de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estas secuencias corresponden al análisis de la región de *Citocromo b*, con lo cual no fueron incluidas para este trabajo.

A modo de evaluar las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *Hippocamelus bisulcus* se construyó una matriz de relación entre haplotipos a partir de diferencias pareadas de las secuencias de la región de *D-loop*. La distancia genética fue estimada utilizando el modelo de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980). Como algoritmo de agrupamiento para obtener el árbol más adecuado se utilizó el criterio de “unión de vecinos” (Neighbor Joining) (Saitou & Nei, 1987), este método agrupa los pares de secuencia que se encuentran más relacionadas.

Para llevar a cabo un estudio interpoblacional, se utilizaron las secuencias depositadas en el laboratorio de Genética de la Conservación de la Dra. Susana González, las mismas corresponden a muestras *H. bisulcus* de la Provincia de Ñuble que forma parte de la región de Biobío en Chile (36° 08´ S, 72° 46´ N) y de Cochrane ciudad perteneciente a la Provincia Capitán Prat, que se encuentra en la región de Aysén, Chile (47° 15´ S, 72° 34´ N). Las 5 secuencias incluidas en el análisis son: h16, h30, h24, h26 y h97.

5. RESULTADOS

5.1 Extracción y amplificación de secuencias

La calidad del ADN de las muestras obtenidas luego de la extracción, se verificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Anexo 1).

Se realizaron varias reacciones de amplificación para la región *D-loop*, tanto para las muestras de pelo / tejidos como las de fecas. A partir de estos ensayos se logró amplificar muy pocas muestras; HB22, HB35, HB36, HB52 y HB57 (fecas), HB33 y HB37 (pelos / tejidos). Aunque se obtuvieron pocas muestras amplificadas, éstas son representativas de distintas regiones geográficas, por lo tanto aportan información relevante en estudios de variabilidad genética.

5.2 Análisis de secuencias

Una vez disponibles los cromatogramas, se realizó la corrección de algunos nucleótidos, en los cuales el cromatograma tenía inconsistencias en cuanto a que nucleótido era el correcto, esto se realizó en todas las secuencias debido a que la calidad de las mismas no era muy buena. A continuación, luego de la verificación, las secuencias fueron alineadas con el

programa MEGA 5. Se cortaron los extremos de secuencias, obteniéndose un fragmento de tamaño final de 574pb.

De las 41 muestras colectadas en Argentina, se obtuvieron 7 secuencias (HB22, HB33, HB35, HB36, HB37, HB52 y HB57) que amplificaron para el segmento de la región de ADN mitocondrial. Del análisis de estas secuencias se hallaron tres haplotipos distintos para las muestras de Argentina: **HB33**, **HB35** y **HB57**.

En el análisis, se agregaron las cinco secuencias correspondientes a Chile, de los cuales se encontraron tres haplotipos: **h16**, **h24** y **h97**.

Se registraron un total de nueve transiciones y dos transversiones (Fig. 6). En relación al análisis de secuencias, se hallaron siete sitios polimórficos siendo solo dos sitios informativos (129 / 190).

Tabla 1. Se detallan las Transiciones / Transversiones encontrados.

Muestras	Posición	Transición	Transversión	Cambio	Sitio Informativo
HB33	129	Si	--	G x A	Si
HB35	129	Si	--	G x A	Si
HB57	129	--	Si	G x C	Si
h97	154	Si	--	G x A	No
HB57	159	--	Si	T x A	No
h97	172	Si	--	C x T	No

HB33	190	Si	--	G x A	Si
HB35	190	Si	--	G x A	Si
HB57	190	Si	--	G x A	Si
h24	196	Si	--	G x A	No
HB33	224	Si	--	T x C	No

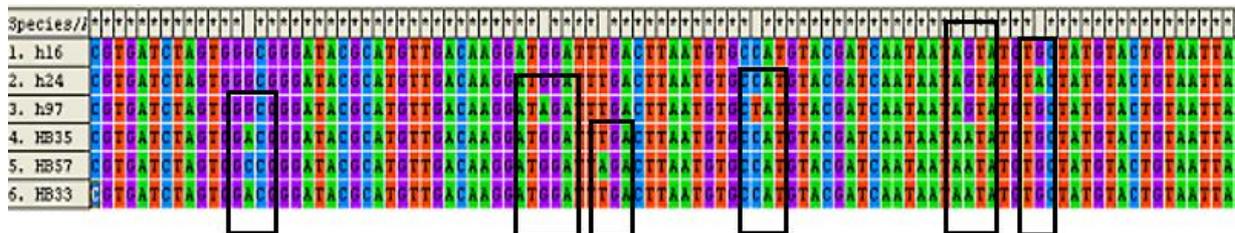


Figura 6. En la siguiente imagen se muestra una región donde se visualizan algunos de los sitios polimorficos en las distintas secuencias analizadas, donde fueron remarcados los cambios en las bases nucleotídicas.

5.3 Análisis Filogenéticos

En la matriz de distancia, construida a través del programa MEGA 5, se muestran las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para el fragmento amplificado de la región *D-loop* (Tabla 2). Se incluyeron en el análisis las cinco secuencias correspondientes de Chile. La mayor diferencia nucleotídica entre pares de secuencias es de 5pb entre las secuencias de Argentina HB57 (PN Los Alerces) y HB33 (Provincia de Chubut) y la menor diferencia es 1pb entre h24 (Ch.), h 16 (Ch) y HB33 (Arg).

Tabla 2. Matrix de distancia.

	h 16	h 24	h 97	HB35	HB57	HB33
h 16 (Ch.)	0					
h 24 (Ch.)	1	0				
h 97 (Ch.)	2	3	0			
HB35 (Arg.)	2	4	4	0		
HB57 (Arg.)	3	4	5	2	0	
HB33 (Arg.)	3	4	5	1	3	0

El árbol filogenético de “unión de vecinos” se visualiza en la Figura 7. Se muestran los haplotipos encontrados correspondientes a las muestras de Argentina y Chile. Se utilizó como grupo externo una secuencia de *Mazama gouazoubira* del banco de ADN del Laboratorio de Genética de la Conservación.

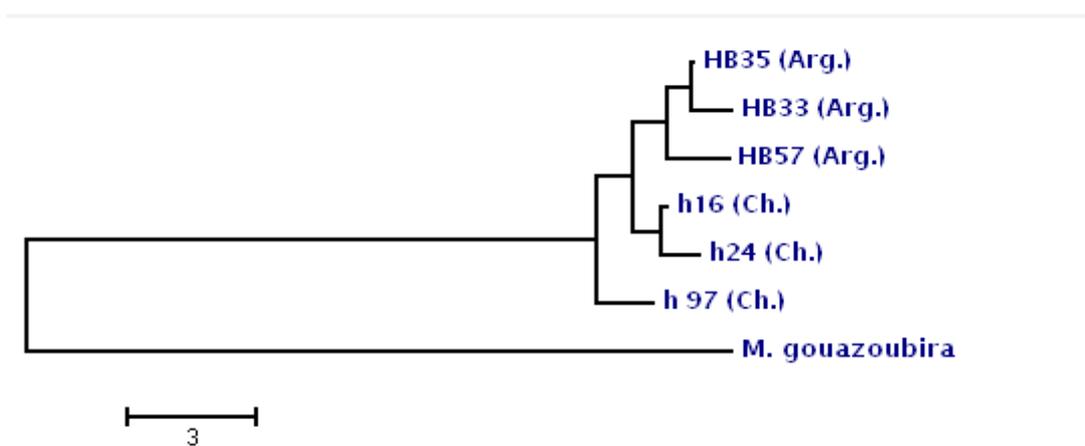


Figura 7. Árbol filogenético interpoblacional, en el cual se visualizan los haplotipos de Argentina y Chile.

6. DISCUSION

6.1 Variabilidad genética

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan una baja variabilidad genética para la región *D-loop*. Se obtuvieron seis haplotipos de un total de 12 secuencias analizadas, un fragmento de 574 pb. Las muestras corresponden a las poblaciones de Argentina y Chile.

En un estudio previo Jara *et al.* (2003), también encontraron para este marcador mitocondrial baja variabilidad genética.

Los bajos niveles de diversidad genética para la especie, también se han confirmado, utilizando como marcadores loci de microsatélites. Los valores de Heterocigosidad obtenidos fueron $H=0.34$. Sin embargo, en el mismo estudio se encontró que el coeficiente de endogamia fue bajo $FIS=0.009$, sugiriendo que existe apareamiento casi al azar (Corti *et al.*, 2009).

La taruca (*Hippocamelus antisensis*), también se caracteriza por presentar un nivel de heterocigosidad menor a otras especies de cérvidos neotropicales, en estudios de microsatélites se han obtenido valores de $H=0.503$ (Ruíz-García *et al.*, 2009). Sin embargo la Taruca no se encuentra en peligro de extinción, esta catalogada por la UICN en estado vulnerable, presenta un mayor rango de distribución ya que se encuentra en Argentina, Bolivia, Perú y Chile (Barrio, 2004). Ambos cérvidos tienen en común la fragmentación de su

hábitat que representa una grave amenaza para las poblaciones actuales y existe una tendencia hacia la disminución de dichas poblaciones.

En el ciervo de los pantanos, *Blastocerus dichotomus*, se realizaron estudios con ambos marcadores mitocondriales, *D-loop* y *Citocromo b*, en cual los datos obtenidos por los autores reflejan una baja variabilidad genética para esta especie (Márquez *et al.*, 2006).

La baja diversidad genética encontrada en el Huemul, es poco frecuente en otros ciervos neotropicales. Corti *et al.* (2009) en su trabajo con loci de microsatélites, en un estudio de la población de la Reserva del Lago Cochrane (Chile), propone que esta población sufrió una reducción en el tamaño poblacional relativamente reciente, y se ha mantenido aislada durante mucho tiempo. Sugiriendo que esta población ha sufrido más de un evento de cuello de botella, tanto histórico como contemporáneo. Estos efectos, junto con la fragmentación del hábitat, exposición a enfermedades, entre otras amenazas, probablemente sean responsables de la reducción de la diversidad genética en el Huemul *Hippocamelus bisulcus*.

En otros ciervos neotropicales, como es el ejemplo del venado de campo, *Ozotoceros bezoarticus*, presentaron una alta diversidad genética en la misma región *D-loop* (González *et al.*, 1998). Al igual que la corzuela roja, *Mazama americana*, de 18 individuos analizados, cada uno tenía un único haplotipo (Abril *et al.*, 2010). El análisis comparativo de la variabilidad genética de las cuatro especies neotropicales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características más distintivas entre las cuatro especies representativas de ciervos neotropicales. Se detalla la diversidad haplotídica (Índice haplotípico: N° haplotipos / N° Individuos analizados). Los datos fueron obtenidos de distintas publicaciones.

Especies	Hábitat	Índice Haplotípico	Marcador Molecular
Venado de campo <i>Ozotoceros bezoarticus</i> (González <i>et al.</i> , 1998)	Pradera	0.830	<i>D-loop</i>
Corzuela roja <i>Mazama americana</i> (Abril <i>et al.</i> , 2010)	Bosque	1	<i>D-loop</i>
Huemul <i>Hippocamelus bisulcus</i> (Presente trabajo)	Andino	0.130	<i>D-loop</i>
Ciervo de los pantanos <i>Blastocerus dichotomus</i> (Márquez <i>et al.</i> , 2006)	Pantanos- bañado	0.134	<i>D-loop</i>

La baja diversidad genética que se encuentran en los ciervos Huemul y ciervo de los pantanos, pueden probablemente relacionarse a la historia demográfica de las especies, con la disminución del tamaño poblacional, la fragmentación y aislamiento de sus poblaciones, así como también las condiciones particulares de su hábitat (Márquez *et al.*, 2006).

Los ejemplos analizados como el venado de campo y la corzuela roja mantienen aún un alto nivel polimórfico, reflejado en los altos valores de

Índice haplotípico. Estas especies se caracterizan por tener un amplio rango de distribución y (Duarte *et al.*, 2010).

6.2 Implicancias en la Conservación

Los datos obtenidos revelan una discreta estructuración entre las poblaciones de Chile y Argentina sugiriendo que no existiría flujo génico entre ellas. Sin embargo, una evaluación más amplia que incluya mayor cantidad de secuencias, de las distintas poblaciones distribuidas de Huemul, permitirá establecer si la limitada variabilidad encontrada es una característica general de esta especie y determinar el grado de flujo génico entre las poblaciones, permitiendo establecer unidades de conservación para la especie.

El Huemul es la especie más amenazada de ciervo neotropical, encontrándose las poblaciones de Argentina y Chile en peligro de extinción por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). En este estudio se realizaron los análisis de extracción y amplificación con marcadores mitocondriales, en base a muestras colectadas en forma no invasiva.

A pesar que la eficiencia de amplificación fue muy bajo (17 %), se lograron obtener datos importantes para comprender los patrones

filogeográficos de la especie. En un próximo paso, continuando con el estudio de esta especie, se pretenderá realizar nuevas amplificaciones utilizando primers que han sido diseñados en el Laboratorio de Genética de la Conservación. De este modo lograr amplificar un mayor número de muestras, la región polimórfica (124 - 228 pb) que permitan alcanzar mejores resultados para poder comprender la variabilidad genética del Huemul.

Los esfuerzos de conservación para el Huemul, deberán procurar implementar algunas acciones prioritarias como; incrementar los esfuerzos para obtener la información sobre la distribución, abundancia, y enfermedades; fomentar la identificación de las poblaciones para poder protegerlas; diversos planes que aseguren mantener el hábitat adecuado en áreas protegidas públicas y privadas. Sólo el 28%, de los 101 subpoblaciones identificadas en ambos países, se encuentran dentro de las áreas protegidas existentes, el 63% se encuentra fuera de las áreas protegidas, mientras que el 9% se localizan parcialmente dentro de áreas protegidas (Vila *et al.* , 2006).

También es importante promover el establecimiento de corredores biológicos que permitan facilitar el flujo génico y mantener la variabilidad genética. Por último es importante establecer políticas educativas y actividades que fomenten el conocimiento sobre esta especie en peligro de extinción (Vidal, 2010).

7. BIBLIOGRAFIA

Abril, V.V., Gutierrez Carnelossi, E. A., González, S. & Duarte, J. M. B. 2010. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (ARTIODACTYLA; *Cervidae*). *Cytogenetic and Genome Research*, 128, pp: 177 - 187.

Avise, J.C., 1996. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. *Ibis* 138: pp.16–25.

Avise, J.C., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9: pp. 686–690.

Ballou, J., 1994. Small population overview. In: *Vortex Users Manual. A Stochastic Simulation of the Extinction Process*. (eds. Lacy RC, Hughes KA, Kreeger TJ), IUCN SSC/CBSG. pp. 2–11.

Barrio, J., 2004. Possible cattle influence on the population of two deer species at the highlands of Rio Abiseo National Park, Peru. *IUCN Deer Specialist Group News*, 19: pp. 6–9.

Bradley, B. J., Chambers, K.E. & Vigilant, L., 2001. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conservation Genetics* 2: pp. 179 - 181.

Brown, W.M., 1986. The mitochondrial genome of animals. in Molecular evolutionary biology (R. MacIntyre, ed.) Cornell University Press, Ithaca, New York. pp. 95 – 128.

Brown, W.M., Prager, E. M., Wang, A. & Wilson, A. C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18: pp. 225–239.

Cabrera, A. & Yepes, J., 1960. Mamíferos sudamericanos, 2da. Edición. Ed. Ediar, Buenos Aires, Argentina 2: pp. 1 – 160.

Corti, P., Shafer, A.B.A., Coltman, D.W. & Festa-Bianchet, M., 2009. Past bottlenecks and current population fragmentation of endangered huemul deer (*Hippocamelus bisulcus*): implications for preservation of genetic Diversity. *Conservation Genetics*, 12: pp. 119 – 128.

Díaz, N. & Smith – Flueck, J., 2000. El Huemul Patagónico: Un misterioso cérvido al borde la extinción. L.O.L.A., Monografía N° 3 Bs. Aires, Argentina, pp. 170.

Drouilly, P., 1983. Recopilación de antecedentes biológicos y ecológicos del Huemul chileno y consideraciones sobre su manejo. Boletín Técnico CONAF (5): pp. 57.

Duarte, J.M.B., & González, S., (eds.) 2010. *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Jaboticabal: Brasil Funep and Gland, Switzerland, IUCN, pp.393.

Duarte, J. M. B., González, S. & Maldonado J. E., 2008. The surprising evolutionary history of South American deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: pp. 17–22.

González, S., 2005. Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. *Agrociencia*. Vol. IX N°1 y N°2, pp. 545–550.

González, S., Maldonado, J.E., Leonard, J.A. Vilà, C., Barbanti Duarte, J.M., Merino, M., Brum–Zorrilla, N. & Wayne, R.K., 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7: pp. 47–56.

Jara, A., Maldonado, J.E., Ortega, J., Cosse, M., Victoriano, P. & González, S., 2003. Genetic studies of the Huemul: Preliminary results and progress to date in Huemul ecology research for conservation planning final conference. Darwin project (Saucedo, C. & A. Echenique ed.). CD–Rom. CONAF, RI, FRA, MLURI.

Kocher, TD., Thomas, W.K., Edwards, A., Pääbo, S.V., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86: pp. 6196 – 6200.

Kohn, M.H. & Wayne, R.K., 1997. Facts from feces revisited. *Tree* 12:6, pp. 223–227.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: pp. 111–120.

Márquez, A., Maldonado, J, E., González, S., Beccaceci, M, D., García, J, D. & Duarte J, M, B., 2006. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics* 7: pp. 563–575.

Medrano, J.F., Aasen E., & Sharrow. L., 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8, pp. 43.

Moritz, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst. Biol.* 51(2):238–254.

Moritz, C., 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of Royal Society of London, B, Biological Sciences*, 349, pp. 113–118.

Moritz, C., 1994. Defining "evolutionarily significant units" for conservation. *Trends Ecol Evol* 9: pp. 373–375.

Osgood, W., 1943. Mammals of Chile – Zool. Series, Field Museum of Natural History, 30: pp. 268.

Redford, K. H. & Eisenberg, J. F., 1992. Mammals of the Neotropics: The southern Cone. Volume 2. Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 435.

Ruíz-García, M., Martínez-Aguero, M., Álvarez, D. & Goodman, S., 2009. Variabilidad genética en géneros de ciervos neotropicales (Mammalia: Cervidae) según loci microsatelitales. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 57 (3): pp. 879–90.

Ryder, O.A. & Fleisher, R.C., 1996. Genetics Research and Its Application in Zoos. In : D.G. Kleiman, M.E. Allen, K. V. Thompson, S. Dumpkin, eds. *Wild Mammals in Captivity. Principles and Techniques*. The University Chicago Press, pp. 255–262.

Said, H. Jaime., 2011. *Patagonia*. 1a. Ed. Patagonia media, Antártica, Chile. pp. 209.

Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4: pp. 406–425.

Serret, A., 1992. Distribución actual del huemul (*Hippocamelus bisulcus*) en la República Argentina. Boletín Técnico N° 1. Fundación Vida Silvestre Argentina. Proyecto Huemul, Buenos Aires, pp. 16.

Smith–Flueck, J., Flueck, W., 1995. Threats to huemul in the southern Andean *Nothofagus* forest. En: Bissonette J. y Krausman P. (eds). *Integrating People and Wildlife for a Sustainable Future*. The Wildlife Society, Bethesda, Md. pp. 402–5.

Taberlet, P., 1996. The use of mitochondrial DNA control Region Sequencing in Conservation Genetics. En: *Molecular Genetics Approaches in Conservation*, (eds Smith, B.; Wayne, K). Oxford University Press, New York, pp.125–141.

Termo Fisher Scientific I. 2008. Termo Scientific, NanoDrop 1000 Spectrophotometer. User´s Manual. Wilmington, DE 19810 U.S.A. Apéndice pp. 2–19.

UICN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. www.iucnredlist.org. Downloaded on 13 mar 2011.

Vidal, F., 2010. El Huemul, Un Futuro Posible. Fundación Huilo – Huilo. Ed. Servicio Agrícola y Ganadero 2006, vol.13, N° 2, pp. 263–269.

Vila., A. R., López, R., Pastore, H., Faúndez, R., & Serret, A., 2006. Current distribution and conservation of the huemul (*Hippocamelus bisulcus*) in Argentina and Chile. Mastozool. Neotropical, 13(2): pp. 263–269.

Programa

MEGA 5.0 <http://www.megasoftware.net/>. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution.

8. ANEXOS

Anexo 1.

Listado de ejemplares de Huemul de Argentina. Se detalla: código de identificación del ejemplar, fecha de recolección, sexo estimado por el colector, tipo de muestra y lugar de recolección. Además se marcaron las secuencias que se lograron amplificar, junto con los valores cuantitativos y de Absorbancia.

Código	Fecha	Muestra	Ejemplar	Lugar	ng/ μ l	ABS	Amp
HB20	15/07/03	F	♂ juvenil o ♀	PN Los Alerces	8.5	1.3	
HB21	25/07/03	F	♀	PN Los Alerces	42.9	1.53	
HB22	22/07/03	F	♂	PN Los Alerces	60.3	1.00	Si
HB23	16/07/03	F	NI	PN Los Alerces	12.8	2.32	
HB24	13/07/03	F	♂ juvenil o ♀	PN Los Alerces	12.8	2.32	
HB25	21/07/03	P	NI	PN Los Alerces	217.0	1.60	
HB26	25/07/03	P	♀ o juvenil	PN Los Alerces	11.5	1.74	
HB27	16/07/03	P	Varios ejemplares	PN Los Alerces	220.4	1.60	
HB28	25/07/03	P	NI	PN Los Alerces	19.4	1.04	
HB29	25/07/03	P	♀ o juvenil	PN Los Alerces	6.6	0.86	
HB30	18/07/03	P	NI	PN Los Alerces	41.5	1.89	
HB31	s/d	P	NI	Chubut	42.2	1.98	
HB32	s/d	P	♂	Chubut	39.3	1.80	
HB33	s/d	P	♂	Chubut	151.5	1.91	Si

HB34	07/03	P	NI	PN Los Alerces	77.0	1.91	
HB35	28/05/04	F	NI	PN Nahuel Huapi	5.7	1.91	Si
HB36	11/03	F	♂	PN Los Glaciares	25.7	1.87	Si
HB37	11/03	P	♂	PN Los Glaciares	87.5	1.82	Si
HB38	06/03/02	P	♂	PN Los Glaciares	456.2	1.20	
HB39	14/06/04	F	Juvenil	PN Los Alerces	26.8	2.11	
HB40	14/06/04	F	♀	PN Los Alerces	76.2	2.17	
HB41	14/06/04	F	♀	PN Los Alerces	18.7	2.38	
HB42	14/06/04	F	♂	PN Los Alerces	3.0	1.98	
HB43	24/06/04	F	Juvenil	PN Los Alerces	10.3	1.36	
HB44	24/06/04	F	♂	PN Los Alerces	31.6	2.50	
HB45	24/06/04	F	♀	PN Los Alerces	29.6	2.28	
HB46	24/06/04	F	Juvenil	PN Los Alerces	80	2.08	
HB47	24/06/04	F	Juvenil	PN Los Alerces	101.9	1.31	
HB48	24/06/04	F	♀	PN Los Alerces	178	2.19	
HB49	18/06/04	P	Juvenil	PN Los Alerces	25.0	1.24	
HB50	18/06/04	P	Juvenil	PN Los Alerces	11.7	1.42	
HB51	16/05/04	P	NI	PN Los Alerces	4.3	1.79	
HB52	23/05/04	F	NI	PN Los Alerces	22.9	1.39	Si
HB53	05/12/00	P	♂	PN Los Alerces	3.3	1.09	
HB54	15/12/01	P	NI	PN Los Alerces	5.8	1.45	
HB55	20/09/04	F	♂	PN Los Alerces	41.1	1.65	
HB56	25/09/04	F	NI	PN Los Alerces	24.5	1.67	
HB57	22/09/04	F	NI	PN Los Alerces	35.5	1.51	Si
HB58	23/09/04	F	NI	PN Los Alerces	31.4	1.43	
HB59	1991	P	NI	PN Los Alerces	38.8	1.00	

*NI: No Identificado, F = Muestra de Feca, P = Muestra de Pelo. Las muestras marcadas en corresponden a las que se logró amplificar (Amp)

GTAGTTTATATAATTAATGACAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAT
TAAAGTTTTTTGGAAATTTAATACTGATAAGGCTCTTAAATTTTACGGAGCTATATTAATAGTGCCTC
AGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATAGTGGGGCTATAGCT

HB57

AAGCTCGTGATCTAGTGGCCGGGATACGCATGTTGACAAGGATGGATTAGACTTAATGTGCCATGTA
CGATCAATAATAATATGTGCTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCAT
ATAATGTAATGTACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACGCAAAT
CATATTATACTACATGTGTTATGTAGTTTATATAATTAATGACAATTAATTATAATATAGCTATTGA
GTGCAAACTGTATTAATTATTAAGTTTTTTGGAAATTTAATACTGATAAGGCTCTTAAATTTTAC
GGAGCTATATTAATAGTGCCTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCT

HB33

AGCTACCCCCACGATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGTTGCTGGTTT
CACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGATGGATTT
GACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAATATGTGCTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACCTG
CTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTAT
GTACTATACACGCAAATCATATTATACTACATGTGTTATGTAGTTTATATAATTAATGACAATTA
TTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTATTAAGTTTTTTGGAAATTTAATACTGAT
AAGGCTCTTAAATTTTACGGAGCTATATTAATAGTGCCTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGC
T

