

Variabilidad genética en poblaciones de *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae; Fischer, 1814) de Uruguay y la región



María Pía Aristimuño

Tesis de grado

Orientador: Dra. Susana González

Tribunal: Dra. Mariana Cosse, Dra. Gabriela Bedó, Dra. Susana González.

Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación.

IIBCE – Unidad asociada a Facultad de Ciencias-UdelaR.

Febrero, 2013

AGRADECIMIENTOS

A Susana, por aceptarme en su laboratorio, guiarme y acompañarme durante toda esta etapa.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética de la Conservación y Genética Humana del IIBCE, por los momentos agradables que compartimos, su compañerismo y su ayuda siempre.

A la Agencia Nacional de Innovación e Investigación, por la beca para realizar esta investigación y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica por el financiamiento para el proyecto.

A Antonella Bruno, Dr. José Maurício Barbanti Duarte, Dr. Rodrigo Texeira, Dra. Patricia Black-Décima, Dra. Silvia Villar, Dr. Eduardo Tavares y Dra. Amalia Villalba que facilitaron las muestras para este trabajo.

A mis padres y Marta, por sus consejos y aliento constante durante toda la carrera.

A Ernesto, por compartir conmigo toda esta etapa, apoyarme y acompañarme cada día.

A mis amigas y amigos que conocí en Facultad, por hacer de cada examen mucho más llevadero, y a mis amigas de la vida, por estar siempre conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Introducción

- I.I Historia y actualidad de los cérvidos neotropicales
- I.II Los ciervos del género *Mazama* y *Mazama gouazoubira*
- I.III Marcador molecular: ADN mitocondrial
- I.IV Justificación de la propuesta

II. Objetivos

- II.I Objetivos generales
- II.II Objetivos específicos

III. Materiales y métodos

- III.I Área de estudio
- III.II Obtención de las muestras
- III.III Extracción de ADN
- III.IV Cuantificación y verificación de la calidad de ADN extraído
- III.V Amplificación de ADN
- III.VI Secuenciación
- III.VII Análisis de las secuencias
- III.VIII Análisis de variación genética

IV. Resultados

- IV.I Extracción, amplificación y obtención de secuencias
- IV.II. Análisis de las secuencias
- IV.III Análisis poblacional

V. Discusión

- V.I Análisis de secuencias
- V.II Análisis poblacional
- V.III Conclusiones finales
- V.IV Perspectivas

VI. Bibliografía

VII. Anexos

VII.I Anexo 1: Muestras

VII.II Anexo 2: Secuencias

I – INTRODUCCIÓN

I.I Historia evolutiva de los cérvidos neotropicales

La región Neotropical es una de las regiones más biodiversas del mundo. Con respecto a la Familia Cervidae, posee la mayor diversidad, con seis géneros y 17 especies descritas.

El origen de la familia Cervidae y su diversificación temprana, ocurrieron posiblemente durante el Mioceno en Asia (Eisenberg, 1987). Este período se caracterizó por cambios climáticos dramáticos que afectaron el ambiente y el paisaje en Asia, coincidiendo con un incremento global en la estacionalidad y aridez, lo que resultó en la extensión de los pastizales en Asia y el este de África. En base a la distribución de caracteres morfológicos en árboles filogenéticos, Gilbert *et al.* (2006) sugieren que los cérvidos ancestrales probablemente fueron habitantes de áreas abiertas, de gran tamaño, con astas ramificadas en tres puntas y sin caninos superiores. Sin embargo, la historia evolutiva de los cérvidos en las regiones Neártica y Neotropical aún es poco clara. Posiblemente, llegaron a América a través del estrecho de Bering durante el Plioceno temprano, y el Istmo de Panamá (aproximadamente 2.5 – 3 millones de años atrás) permitió a algunos taxa extenderse hacia el sur, participando del “Intercambio faunístico americano” (Stehli & Webb, 1985). El éxito de estos ciervos en la región Neotropical pudo deberse en parte a la ausencia de otros rumiantes en ese entonces (Webb, 2000).

Los cérvidos sudamericanos se clasifican en dos grandes grupos en base a su morfología: **a)** las especies de pequeño tamaño (adultos de menos de 60 cm a la cruz) con astas sin ramificaciones,

consideradas adaptaciones a la vida en ambientes de vegetación densa (géneros *Mazama* y *Pudu*), y **b**) las demás especies de mayor tamaño y astas ramificadas que habitan áreas abiertas, pastizales, praderas y humedales (*Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* y *Blastocerus*) (Eisenberg, 2000; Merino *et al.*, 2005).

La sistemática de los cérvidos neotropicales ha sido poco estudiada y, además, es profundamente controvertida debido a que el registro fósil es escaso y se ha cuestionado la utilidad de los caracteres morfológicos por su alto nivel de homoplasia (Merino & Rossi, 2010). Asimismo, la familia Cervidae posee una de las tasas evolutivas más altas en sus cariotipos, debido a su fragilidad cromosómica (Vargas-Munar, 2003), y la taxonomía de algunos géneros (en particular *Mazama*) es problemática, debido a que bajos niveles de diferenciación morfológica no están correlacionados a los altos niveles de diferenciación cariotípica entre las especies (Groves & Grubb, 1987; Duarte & Merino, 1997). El esquema de clasificación taxonómica de estos cérvidos ha atravesado por muchos cambios (Bianchini & Delupi, 1979; Duarte & Merino, 1997; Groves & Grubb, 1987; Grubb, 2000; Grubb, 2005; Janis & Scott, 1987; Webb, 2000) y aún no ha sido completamente esclarecido.

Duarte *et al.* (2008) a través del análisis de marcadores moleculares en cérvidos neotropicales, encontró un complejo patrón evolutivo y de relaciones entre especies. Los resultados muestran dos clados, que divergieron aproximadamente cinco millones de años atrás (MYA) (aproximadamente dos millones de años antes de su colonización de América del sur). Uno de ellos incluye a *Mazama gouazoubira*, *Blastocerus dichotomus*,

Hippocamelus bisulcus, *Ozotoceros bezoarticus* y *H. antisensis*, y otro clado, más basal, incluye las especies de ciervos rojos *Mazama bororo*, *M. nana*, *M. americana* y *M. temama*, y el género *Odocoileus*. Este análisis sitúa a los “ciervos rojos” más cercanos filogenéticamente al género *Odocoileus* que a otros miembros del género *Mazama*, ya descrito en estudios anteriores (Smith *et al.*, 1986; Pitra *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2006), apoyando el origen polifilético del género *Mazama*, y sugiere que los “ciervos rojos” presentaron una diversificación explosiva e independiente de los “ciervos grises”, muy cercana a la colonización de América del sur. La adaptación a ambientes de vegetación densa puede haber causado evolución morfológica convergente entre estas especies, existiendo en la actualidad varias especies crípticas en este género (González *et al.*, 2010).

La caza, deforestación, fragmentación y destrucción de hábitat, enfermedades introducidas por animales domésticos, predación por perros y la competencia con especies de ungulados introducidas (ciervos y ganado) son las mayores amenazas que presentan los cérvidos neotropicales en la actualidad, llevando a que casi la mitad de las especies de América latina estén amenazadas de extinción en algún grado (Wemmer, 1998).

I.II Los ciervos del género *Mazama* y *Mazama gouazoubira*.

El género *Mazama* (Rafinesque, 1817) presenta amplia distribución en la región Neotropical, abarcando desde México hasta el sur de Argentina (Weber & González, 2003). La taxonomía, distribución, ecología y status de las especies dentro de este género

permanecen poco claros (Wemmer, 1998). Habitan un amplio rango de ecosistemas, desde montes y florestas hasta sabanas, encontrándose generalmente en ambientes cerrados. Son elusivos y difíciles de observar en la naturaleza (Vogliotti & Duarte, 2009). Las diferentes especies varían en tamaño desde pequeño a mediano porte, y comparten caracteres morfológicos como astas simples de aproximadamente 12 cm que se renuevan anualmente en machos adultos. Sin embargo, existe gran diversidad en cuanto a los patrones de coloración entre las especies (Eisenberg, 2000; Duarte & Merino, 1997).

La primer revisión taxonómica del género, fue realizada por Allen en 1915, quién clasificó 18 especies, separándolas en dos grupos según la coloración del pelaje (rojizos y marrones). En las últimas décadas, se han realizado varias revisiones taxonómicas (Czernay, 1987; Geist, 1998; Medellín, 1998; Duarte, 1996; Duarte & Jorge, 1998; Rossi, 2000) y el descubrimiento reciente de tres especies nuevas dentro del género (Duarte, 1996; Duarte & Jorge, 2003; Duarte & Merino, 1997; Medellín *et al.*, 1998) ha aumentado considerablemente el interés en el status taxonómico y las relaciones filogenéticas de los miembros del género. Actualmente, se distinguen diez especies dentro del mismo (Merino & Rossi, 2010). Sin embargo, la separación de las especies del género *Mazama* en dos clados separados reportada por Gilbert *et al.* (2006), Duarte *et al.* (2008) y más recientemente Hassanin *et al.* (2012) en análisis filogenéticos usando ADN mitocondrial y marcadores nucleares sugiere que lo que hoy es reconocido como un único género corresponde a un clado polifilético y *M. gouazoubira* y *M. nevorivaga* deberían considerarse géneros separados del género *Mazama*.

Particularmente, el “guazubirá” (*Mazama gouazoubira*; Fischer, 1814) es una de las dos especies de cérvidos autóctonos de Uruguay. Su distribución abarca el este de la región preandina en Argentina y Bolivia, extendiéndose hasta la costa del océano Atlántico, siendo el límite norte de su distribución el sur de la región Amazónica, y su límite sur incluye todo el territorio uruguayo hasta la provincia de Entre Ríos, Argentina. Aunque algunos autores reportan su presencia a lo largo de todo Brasil, evidencia más reciente indica su sustitución por *Mazama nemorivaga* en la región Amazónica (Black-Décima *et al.*, 2010) (Fig. 1).

Czernay (1987) estableció que esta especie habita en ambientes de vegetación densa a media, prefiriendo campos y bosques de poco desarrollo. En Uruguay, este cérvido habita zonas de monte exótico y nativo, haciendo también incursiones a lugares de campo abierto (Bidegaray *et al.*, 2003). Existen pocos estudios acerca de su distribución exacta, pero se considera una especie abundante en el país. González & Elizondo (2010) a partir de muestras de fecas y colocación de cámaras remotas, determinaron su presencia en Rocha, Rivera, Tacuarembó, Río Negro, Maldonado y Salto, y plantean que los altos niveles de diversidad genética junto a patrones moderados de estructura poblacional, sugieren tamaños poblacionales grandes y niveles moderados de flujo génico entre las localidades.



Figura 1. Mapa de distribución de *Mazama gouazoubira*. Adaptado de Duarte & González, 2010.

Las principales características morfológicas de la especie son su pequeño a mediano tamaño y la presencia de astas simples sin bifurcar de hasta 12cm en los machos adultos, siendo éstas consideradas adaptaciones morfológicas a su hábitat. Presenta una gran variabilidad morfológica externa en tamaño y coloración del pelaje, relacionada a los diferentes ambientes que habita, variando desde el marrón en los individuos de ambientes de sabana, hasta el grisáceo en los que habitan ambientes de bosque (Duarte & Merino, 1997) (Fig. 2).

Seis formas morfológicas fueron descritas como subespecies (Avila–Pires, 1959; Cabrera, 1961; Czernay, 1987; Pinder & Leeuwenberg, 1997). En su revisión, Rossi (2000) interpretó a las subespecies de Brasil como formas de variación

individual entre especímenes, no analizando la subespecie argentina. Duarte & González (2010) analizaron la descripción original de esta subespecie propuesta por Lonnerberg (1919), y consideraron que no hay caracteres en el ejemplar tipo que no puedan ser explicados como variación geográfica o individual. Por lo tanto, al presente no se reconocen subespecies para *M. gouazoubira*.

Esta especie está catalogada como “Preocupación menor” por la IUCN (International Union for Conservation of Nature). A pesar de ello se ha detectado en diversas localidades sudamericanas una tendencia al decrecimiento poblacional, debido en parte a la caza deportiva y furtiva (Black & Vogliotti, 2008) y también por el avance de la urbanización. Datos obtenidos en Argentina a través de entrevistas, indican que la presión de caza tanto por deportiva así como de subsistencia es alta (Juliá, 2002) y en Bolivia, el guazubirá representa un 39% de la biomasa silvestre consumida (Cuéllar, 1999).

Hasta el momento no se han efectuado estudios que confirmen la existencia de poblaciones fragmentadas, pero la especie denota grandes variaciones en densidad poblacional, desapareciendo en ámbitos cercanos a poblaciones humanas (IUCN, 2011). Para realizar un manejo adecuado de esta especie, es necesario conocer en mayor detalle su distribución geográfica, así como realizar la evaluación periódica de aspectos demográficos como abundancia y densidad poblacional en los diferentes biomas, además de incluir aspectos sanitarios relativos a zoonosis (Black – Décima *et al.*, 2010).



Figura 2. Individuos de *M. gouazoubira* (a) Hembra adulta. ©Marcelo Casacuberta (b) Macho adulto. (c) Juvenil. ©Ricardo Kuehn.

I.III Marcador molecular: ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (mtADN) es un pequeño genoma extranuclear, consistente en una molécula de ADN de doble hebra circular (Taberlet, 1996). Exhibe gran conservación en su contenido genético en animales. Las moléculas de mtADN de vertebrados, insectos y equinodermos incluyen dos genes de ARN ribosomales (rRNAI), 22 genes de ARN de transferencia y 13 genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de electrones para la

síntesis de ATP (Brown, 1985). El orden de los genes dentro de la molécula también es muy conservado dentro de los vertebrados, aunque comparaciones entre phyla indican que han ocurrido rearreglos. La molécula de ADN mitocondrial es compacta, con pocas secuencias intergénicas y no posee intrones. Su tamaño varía entre especies, desde 14 hasta más de 30 kilobases. (Harrison, 1989). La región de control (denominada también D-loop) es una región no codificante del ADN mitocondrial encargada del inicio de la replicación. Análisis comparativos entre diversos taxa han mostrado que la región de control está altamente estructurada (Saccone *et al.*, 1991), con una región conservada central (CCR) flanqueada por dos dominios periféricos altamente divergentes entre especies (Clayton, 1992).

La CCR contiene secuencias que controlan la replicación y transcripción del ADN mitocondrial, las cuales evolucionan lentamente, mayormente a través de mutaciones puntuales y con bajas tasas de acumulación de deleciones (Saccone *et al.*, 1991). En contraste, los dominios periféricos acumulan rápidamente mutaciones puntuales, deleciones y números variables de repetidos en tándem. Por su alta tasa de cambios nucleotídicos en los dominios periféricos, la región de control es muy utilizada en genética de poblaciones y genética evolutiva en mamíferos (Harrison, 1989), ya que es comúnmente variable al nivel intraespecífico y por lo tanto adecuada para estudios de variabilidad genética, filogeografía y asignación de unidades de manejo (Kohn & Wayne, 1997).

El ADN mitocondrial es heredado exclusivamente por vía materna, y esto posee importantes consecuencias para los estudios

genéticos. Como sólo una fracción de la población (la mitad, si la proporción de sexos es 1:1) pasa su mtADN a la progenie, el tamaño poblacional efectivo encontrado para el mtADN es menor que para genes nucleares. Consecuentemente, los procesos estocásticos serán particularmente importantes al determinar frecuencias de genotipos, y las afinidades genéticas determinadas con mtADN reflejarán solamente una parte de la genealogía. Además debido a que no ocurre recombinación, este marcador es particularmente apropiado para rastrear la historia evolutiva reciente (efecto fundador, cuellos de botella, expansiones demográficas). Estudios realizados en algunos cérvidos neotropicales usando esta región como marcador molecular, han mostrado que es polimórfica e informativa (González *et al.*, 1998; Bidegaray *et al.*, 2003; Elizondo, 2010; Black-Décima, 2010).

I.IV Justificación del estudio

En el neotrópico, una gran porción de los ambientes naturales ha sido convertida en tierras para agricultura y ganadería, y algunos de los últimos remanentes de estos ambientes se encuentran ubicados en terrenos privados. En particular en Uruguay, la transformación de ambientes como consecuencia de las actividades antropogénicas, ha alterado pastizales, bosques y humedales nativos, lo que ha resultado en la reducción de las poblaciones de mamíferos silvestres.

En particular en el caso del “guazubirá”, no se tienen datos concretos de su abundancia y estructura poblacional en el país, y se cree que las poblaciones se encuentran aisladas limitando el flujo génico entre ellas (González *et al.*, 1998; Wemmer, 1998).

La genética de la conservación cuenta con un conjunto de técnicas y marcadores que se pueden aplicar a la biología de la conservación y al manejo de la vida silvestre (González & Duarte, 2007) y son útiles para intentar responder estas preguntas. Estas técnicas, combinadas con un muestreo no invasivo son una nueva herramienta que provee información biológica valiosa previniendo disturbios ecosistémicos y tratando de minimizar el impacto humano en el proceso de obtención de información (González & Duarte, 2007). El muestreo no invasivo es también útil para obtener información genética en mamíferos silvestres de pequeño tamaño, hábitos nocturnos y elusivos, que resultan difíciles de observar (Kohn *et al.* 1999).

Es necesario e importante conocer y conservar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, debido a que un déficit en la misma puede afectar la posibilidad de respuesta de la especie frente perturbaciones ambientales (como enfermedades o catástrofes naturales), volviendo a estas poblaciones más vulnerables (Díaz & Smith-Flueck, 2000). Es, por lo tanto, importante un relevamiento de la especie *M. gouazoubira* que permita obtener información acerca de su estatus poblacional. Recientemente, se han realizado aproximaciones en este sentido. Bidegaray *et al.* (2003) realizó un estudio comparativo del género *Mazama* utilizando como marcador molecular el gen de citocromo b del ADN mitocondrial, incluyendo individuos de *M. gouazoubira*

de Uruguay. Elizondo (2010) empleando el gen citocromo b, encontró altos niveles de polimorfismos, y el análisis poblacional mostró una tendencia discreta hacia la subestructuración. Los altos niveles de diversidad genética y los patrones moderados de estructura poblacional sugieren grandes tamaños poblacionales y niveles moderados de flujo de genes entre las localidades, con una leve tendencia hacia la divergencia.

Este trabajo es el primer estudio a nivel poblacional que se realiza para esta especie en el país, y además pretende complementar la aproximación realizada utilizando citocromo b, utilizando un marcador molecular hipervariable, e incorporar muestras de otras localidades.

II – OBJETIVOS

II. I Objetivos generales

- Estimar niveles de variabilidad genética en *M. gouazoubira* en algunas poblaciones de Uruguay y la región utilizando como marcador molecular la región control del ADN mitocondrial.

II. II Objetivos específicos

- Analizar la variabilidad genética a nivel intrapoblacional en la población de Parque Salus.
- Analizar la variabilidad genética a nivel interpoblacional utilizando muestras de algunas poblaciones de Uruguay y la región.
- Determinar si existe subestructuración y flujo génico entre las poblaciones analizadas.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

III.I. Área de estudio

El Parque Salus está ubicado al sur—oeste de la ciudad de Minas en el departamento de Lavalleja, Uruguay ($34^{\circ}23'36,79''S$; $55^{\circ}18'58,54''O$) y posee un total de 1500 hectáreas. Está compuesto mayormente por un ambiente de monte serrano, encontrándose también zonas de campo abierto y zonas inundables, y pozos surgentes y semi-surgentes de agua.

III.II. Obtención de las muestras

Para la extracción, amplificación y secuenciación de ADN se utilizaron 26 muestras fecales colectadas en una población silvestre de “guazubirá” en Parque Salus, depositadas en el Laboratorio de Genética de la Conservación del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

También se utilizaron 37 secuencias de la región control de la especie, representativas de su rango de distribución geográfica (Anexo 1) (González, 2004). Estas muestras provienen de tejidos y pelos de animales silvestres, en cautiverio o régimen de semi-cautiverio, colectadas en años anteriores en otras localidades de Uruguay, Brasil, Argentina, Bolivia y Paraguay (Fig.3).



Figura 3. Mapa de las localidades de procedencia de los individuos estudiados. Se muestran en diferentes colores los diferentes países. Tomado de Google Earth ©.

III.III. Extracción de ADN

Las fecas contienen células del epitelio intestinal del individuo, por lo tanto, es posible la extracción y purificación de ADN a partir de las mismas. La extracción de ADN, se realizó

siguiendo el protocolo del Kit QIAGEN DNeasy[®] Blood & Tissue Handbook. Se utilizaron materiales estériles y guantes durante el proceso para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación.

III.IV. Cuantificación y verificación de la calidad de ADN extraído

Para cuantificar y verificar la calidad del ADN extraído a partir de las fecas se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop[®] 1000, que provee información acerca de la concentración de ADN de la muestra (ng/ μ l) a través de la medida de absorbancia a 260 nm y además permite detectar la presencia de impurezas a través de la relación de absorbancia a 260 nm /280 nm (valores ≥ 1.80 , indican que la muestra es ADN en alto grado de pureza, ≥ 2.00 indican que existe una mayor concentración de ARN, y valores < 1.80 demuestran presencia de proteínas). A partir de la relación de absorbancia 260 nm/230 nm, se pueden además identificar otras impurezas, como productos químicos orgánicos y contaminación con disolventes. También se verificó la calidad y cantidad de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% en Buffer TBE 1X y GoodView para la visualización de las bandas en ultravioleta. La técnica se basa en la separación de moléculas cargadas, que migran diferencialmente según su tamaño a través de la matriz del gel cuando este es sometido a un campo eléctrico. Para ADN degradado se espera encontrar un “smear” (chorro) característico debido a que el ADN de mayor tamaño migra más lentamente a través de la matriz y el ADN de menor tamaño migra más rápido.

III.V. Amplificación de ADN

Se realizaron experimentos de amplificación utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Final (TF - PCR) con el objetivo de amplificar un fragmento de 601 pb correspondiente a la región de control (d - loop) del ADN mitocondrial utilizando primers universales (Kocher *et al.*, 1989):

DL – H16498 (5' CCTGAACTAGGAACCAGATG 3')

Thr – L15910 (5' GAATTCCCCGGTCTTGTAACC 3')

El mix de PCR estaba compuesto por aproximadamente 2,5µl de ADN (concentración aproximada inicial 60 ng/µl, y concentración aproximada final de 5 ng), 1 µl de primers (concentración 25 pM), 12,5 µl de InmoMix © y agua ultra pura hasta completar un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Thermal Cycler 2720 Applied BioSystems ©, utilizando 35 ciclos en la siguiente forma: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos (según las especificaciones del InmoMix), desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 50° C por 2 minutos, extensión a 72°C por 1:30 minutos y extensión final a 72°C por 7 minutos. Debido a que el ADN obtenido a partir de fecas se encontraba degradado y en bajas concentraciones (lo cual dificultó la obtención de este producto de amplificación), se procedió a utilizar un fragmento de menor tamaño (159 pb) que se encuentra enmarcado dentro del fragmento de 601 pb, para mejorar la eficiencia de amplificación. Estas reacciones se realizaron utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real (RT – PCR), ya que resultó más eficiente, utilizando los primers DLHB F y DLHB R diseñados en el

Laboratorio de Genética de la Conservación del IIBCE (González *et al.*2012):

DLHB F (5' GCGGCATGGTAATTAAGCTC 3')

DLHB R (5' CATTACATTATATGCCCCATGC 3')

Esta técnica posee el mismo principio que la técnica de PCR en tiempo final, pero al mix de PCR se le agrega una sustancia marcada con un fluoróforo. Este fluoróforo se une inespecíficamente al ADN, y emite una mayor señal de fluorescencia a medida que aumenta el producto de amplificación. Por lo tanto, permite identificar fragmentos amplificados de ADN a partir de la temperatura de *melting* (dependiente de la composición de bases de la secuencia) observando la curva de desnaturalización de las diferentes muestras. El mix de PCR estaba compuesto por aproximadamente 1 µl de ADN (concentración aproximada inicial 30 ng/µl, y concentración aproximada final de 1,2 ng), 1 µl de primers (concentración 25 pM), 12,5 µl de InmoMix ©, 1 µl de Syto 9 y agua ultra pura hasta completar un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en un Corbett Rotor Gene 6000 QIAGEN ©, utilizando 35 ciclos. Se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 95° C por 10 minutos, según las especificaciones del InmoMix, y cada ciclo consistió en desnaturalización a 95° C por 30 segundos, hibridación a 55° C por 30 segundos, extensión a 72° C por 30 segundos, y por último una extensión final a 72° C por 5 minutos. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos para descartar posibles contaminaciones y controles positivos para verificar que no existieran errores de manipulación.

III.VI. Secuenciación

Los productos obtenidos a partir de las reacciones de PCR, se enviaron a secuenciar a Macrogen. El método de secuenciación empleado es el Método Enzimático de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Este método consiste en la utilización de una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, una ADN polimerasa con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN.

III. VII. Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, debido a que las muestras utilizadas provenían de fecas, se realizó un “BLAST search” utilizando la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para comprobar que efectivamente el ADN extraído correspondía a la región D-loop de *M. gouazoubira*. Para realizar un análisis comparativo, se utilizaron 31 secuencias correspondientes a un fragmento de 159 pb de la región d- loop de individuos de *M. gouazoubira* de distintas localidades de Uruguay, Brasil, Argentina, Paraguay y Bolivia que ya se encontraban en el acervo del Laboratorio de Genética de la Conservación, dos de las cuales se encuentran disponibles en GenBank (sg001: AF012557.1; sg1730: AF012556.1).

Las secuencias se analizaron utilizando el software MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) que permite la alineación de las

secuencias de diferentes individuos, la clasificación de los diferentes haplotipos existentes y la construcción de árboles de distancia y matrices de relaciones para el análisis de estos haplotipos. Las secuencias fueron alineadas manualmente y a partir de la alineación se computó la proporción de diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias (“pairwise distance”, utilizando el método “n° of differences”) para clasificar los diferentes haplotipos.

III.VIII. Análisis de variación genética

Se construyó un árbol filogenético utilizando el método “Maximun Parsimony” y 5000 réplicas de Bootsrap, para dar cuenta de la relaciones entre los haplotipos. Según el principio de parsimonia, el árbol que requiera la ocurrencia del menor número de eventos evolutivos es probablemente la mejor opción para explicar cómo ocurrieron las diferencias entre las secuencias. Se construyó además un árbol utilizando el método de unión de vecinos (Neighbor Joining), para reflejar el grado de similaridad entre los haplotipos, utilizando para medir las distancias genéticas entre los mismos el modelo “Kimura-2-parameter”. Este modelo considera dos tipos de sustituciones: transiciones (A <-> G, C <-> T) y transversiones (A <-> C, A <-> T, C <-> G, G<->T), asumiendo que ocurren con diferente probabilidad, y que ambas tasas de sustitución son las mismas para todos los sitios dentro la secuencia de ADN. Por su parte, el método “Neighbor Joining” consiste en generar un único “árbol genealógico” final para el cual en un principio se unen los dos “vecinos” (secuencias) que tengan la

menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al árbol (Saitou & Nei, 1987). Se utilizó como tiempo de divergencia estimado entre *M.gouazoubira* y *H.bisulcus* el calculado por Duarte *et al.* (2008) utilizando el gen citocromo b del ADN mitocondrial. A modo de evaluar la relación entre los diferentes haplotipos, se construyó una red de haplotipos “Minimum Spanning Network” a partir de las distancias pareadas entre las secuencias (número de mutaciones entre haplotipos en comparaciones de a pares), en donde los haplotipos son los nodos de la red y el largo de las ramas representa el número de sustituciones entre haplotipos. Estas redes pueden representar más eficazmente las relaciones entre haplotipos para las poblaciones en las que muchos haplotipos pueden derivar de un haplotipo ancestral. La matriz para la red se construyó utilizando el software DNAsp versión 5 (Rozas *et al.*, 2010) y la red haplotípica utilizando el software NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999).

Como medidas de variabilidad genética se calculó la proporción de sitios polimórficos, que son aquellos sitios con más de un cambio en la secuencia nucleotídica de manera que determinan más de un alelo por locus ($S = \text{sitios polimórficos} / \text{sitios totales}$). También se determinaron sitios informativos para parsimonia, número de transiciones, transversiones, deleciones e inserciones. Se usó AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) para deducir la significancia de las divisiones geográficas entre grupos de poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992) implementado en el software Arlequín versión 3.5.1.2. AMOVA es un enfoque jerárquico, en

donde las correlaciones entre distancias genotípicas son designadas como estadísticos ϕ , análogos a los estadísticos F . Así, ϕ_{ST} es la correlación entre haplotipos tomados al azar dentro de una población relativo al total, análogo a F_{ST} (Wright, 1951). El estadístico ϕ_{CT} representa la correlación de haplotipos tomados al azar entre grupos de poblaciones relativo al total, y mide la proporción de varianza genética entre grupos de poblaciones. Por último, ϕ_{SC} mide la correlación de haplotipos tomados al azar dentro de poblaciones en relación a haplotipos dentro de los grupos, y es una medida de la proporción de varianza genética entre poblaciones dentro de grupos. La significancia de estos estadísticos se evaluó con 500 permutaciones al azar de secuencias entre poblaciones. Para evaluar afinidades entre las localidades de muestreo y chequear si la diversidad molecular se distribuye acorde a la geografía, se probó con varios agrupamientos para las poblaciones. Se evaluó la significancia de separar o agrupar secuencias de acuerdo a un criterio geográfico y según los clados del árbol filogenético. Las muestras que provenían de individuos en cautiverio y de las que no se poseía información acerca de su procedencia en la naturaleza (o eran individuos nacidos en cautiverio) se agruparon junto a la población más cercana geográficamente. Se probó con varias agrupaciones para localidades de muestreo que se encontraban demasiado alejadas o para las que no existían suficientes muestras para conformar una población aparte. Aquellas agrupaciones que maximizaran los porcentajes de varianza entre grupos y minimizaran los porcentajes dentro de grupos, se asume que reflejan la subdivisión geográfica más probable (Excoffier *et al.*, 2006).

El parámetro F_{ST} resulta útil para comparar la diferenciación entre dos o más poblaciones y da una estimación relativa del grado de estructuración poblacional. El flujo génico dentro y entre grupos puede aproximarse a partir de Nm (para mtADN, el número de migrantes hembras que ocurren entre poblaciones por generación), y puede estimarse a partir del parámetro F_{ST} , donde N es el número efectivo poblacional (en hembras) y m es la tasa de migración (en hembras) (Slatkin 1987, 1993; Baker et al. 1994). Para este cálculo, se utilizó ϕ_{ST} como sustituto de F_{ST} entre grupos de poblaciones.

$$F_{ST} = 1/(1 + 2Nm) \text{ (Weir, 1996)}$$

Este cálculo se realiza bajo una serie de asunciones: **i)** una sola población ancestral se dividió en subpoblaciones en algún momento en el pasado, **ii)** estas subpoblaciones divergieron azarosamente en el tiempo, y han alcanzado el equilibrio y **iii)** “Modelo de islas” para la migración (igual probabilidad de migración entre todas las subpoblaciones). Tanto el valor de F_{ST} como m se obtuvieron en el software Arlequin versión 3.5.1.2.

Se obtuvieron además con este software, los índices de diversidad molecular Theta (θ) y Tau (τ), y a partir de éstos se estimó el número efectivo de hembras, e índices de expansión demográfica,

$$\theta = 2N \mu$$

$$\tau = 2 \mu t$$

siendo N = el número poblacional efectivo de hembras, t = tiempo en generaciones, y μ = tasa mutacional por nucleótido por generación, estimada con el software MEGA 5.0.

Se usó la aproximación “mismatch distribution” (distribución del número de sitios polimórficos o segregantes) implementada en el software DNAsp, para evaluar preliminarmente la historia demográfica de las poblaciones (Rogers & Harpending, 1992). El comportamiento de la distribución esperado es multimodal para poblaciones en equilibrio demográfico, y unimodal para poblaciones que recientemente sufrieron una expansión demográfica.

Por último, se realizó una matriz de distancias genéticas entre grupos para la agrupación más probable (obtenida en el AMOVA) utilizando el promedio de diferencias pareadas de las secuencias entre los grupos (“average number of pairwise differences”) y con esta matriz se computó un árbol de distancias genéticas entre grupos utilizando el método “Neighbor joining” (Saitou & Nei, 1987).

IV. RESULTADOS

IV.I. Extracción, amplificación y obtención de secuencias

Obtuvimos un 100% de eficacia en las extracciones de ADN, ya que logramos extraer ADN de las 26 fecas provenientes de Parque Salus, aunque en algunos casos el ADN era de baja calidad y/o se encontraba en bajas concentraciones.

En cuanto a la amplificación por PCR, luego de una serie de intentos solamente logramos amplificar 6 muestras para el fragmento de 601 pb, y de estas muestras amplificadas, sólo secuenciamos eficientemente una de ellas (MSG 107). Esto ocurrió posiblemente debido a que las fecas, además de poseer ADN degradado, también pueden contener componentes que pueden ser inhibidores de la reacción de PCR, como polisacáridos, productos de la degradación del alimento (ácidos, enzimas, lípidos y proteínas), ARN y bacterias (Kohn & Wayne, 1997).

Cuando procedimos a utilizar cebadores que amplifican un fragmento de menor tamaño (159 pb) y empleamos el método de PCR en Tiempo Real, logramos una amplificación exitosa de 25 de las 26 muestras. Tanto los controles positivos como negativos resultaron exitosos, indicando una buena calidad de los reactivos y correcta manipulación.

A partir de las reacciones de amplificación, se escogieron para secuenciar aquellas muestras que presentaban una mayor fluorescencia en la reacción de PCR (Fig. 4).

Enviamos a secuenciar a Macrogen 14 de las 25 muestras amplificadas, las secuencias se detallan en el Anexo 2. En un caso (MSG 118), a pesar de que la muestra fue re secuenciada, solo pudimos obtener un fragmento de 71 pb, por lo tanto no fue utilizada para el análisis. Dado que los picos de *melting* (correspondientes a la desnaturalización del 50% de las moléculas de ADN) en Real Time PCR se observan a diferentes temperaturas según la composición de bases del ADN de la muestra, podemos inferir la existencia de al menos dos haplotipos más, presentes en muestras que no fueron secuenciadas, ya que el pico en la curva de desnaturalización ocurre a temperaturas distintas a las de los cinco haplotipos secuenciados (Fig. 5).

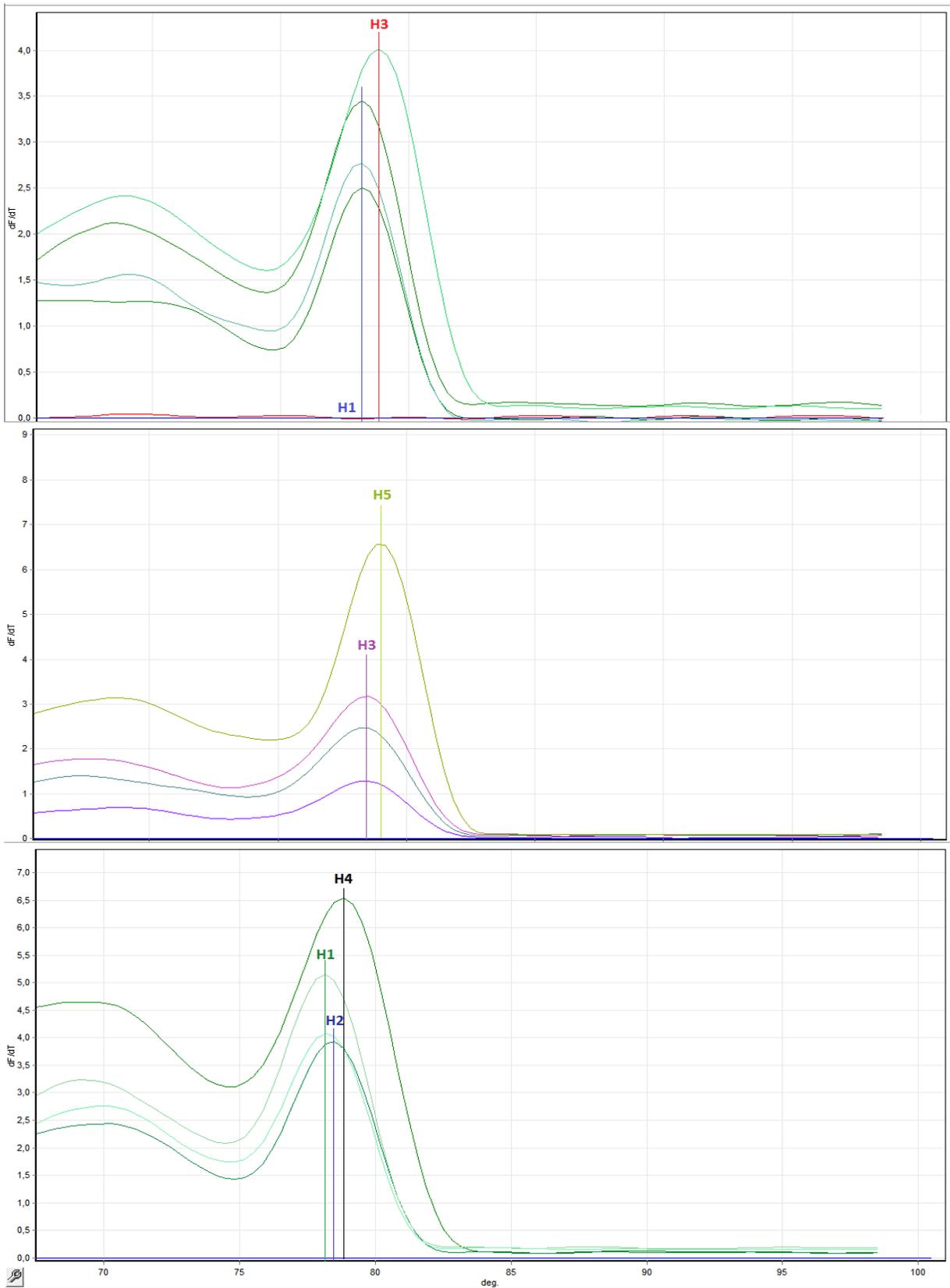


Figura 4. Representación gráfica de la curva de desnaturalización en Real Time PCR para los diferentes haplotipos encontrados en las muestras de Parque Salus. Tomado de Rotor-Gene 6000 Software ©.

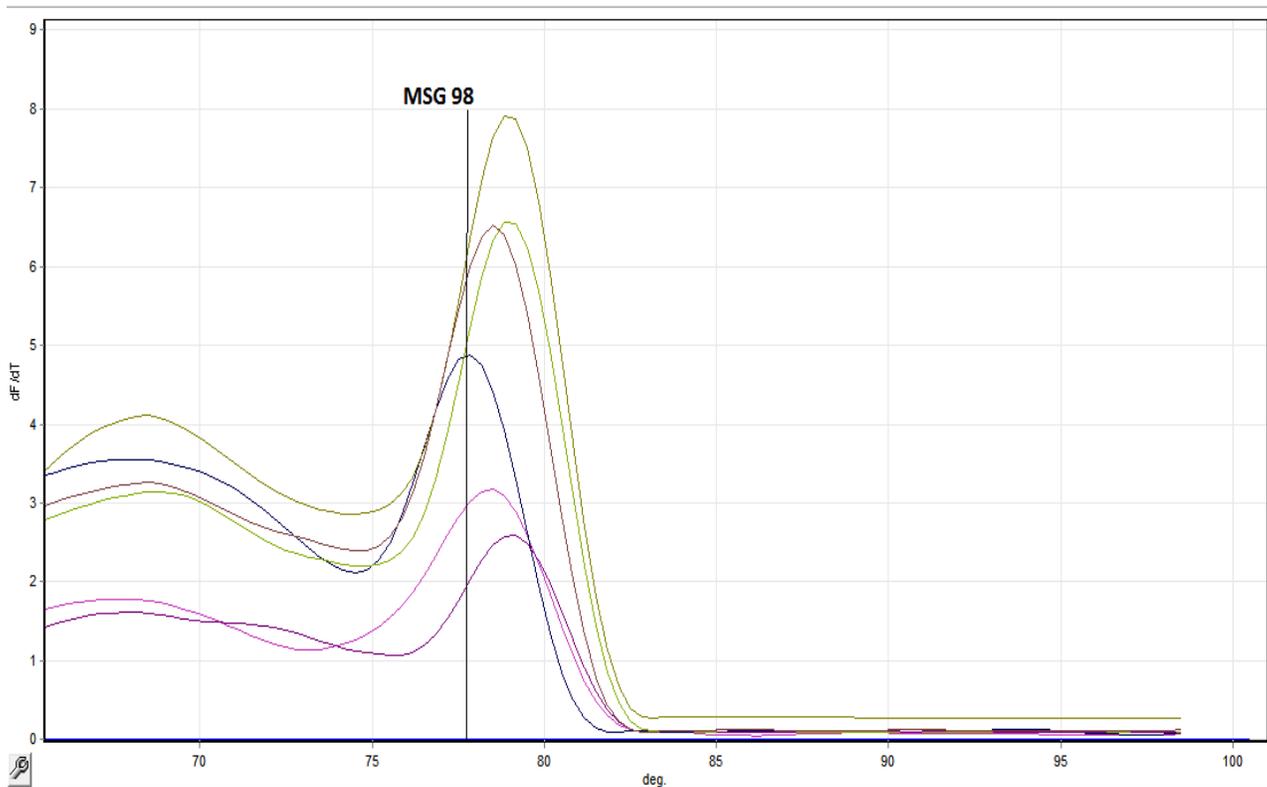


Figura 5. Curva de desnaturalización para MSG 98, que se infiere es un haplotipo distinto a los cinco haplotipos secuenciados de Parque Salus. Tomado de Rotor-Gene 6000 Software ©.

IV.II. Análisis de secuencias

A partir del alineamiento de estas 13 secuencias, sumadas a las 37 secuencias obtenidas por González (2004) clasificamos los diferentes haplotipos encontrados mediante una matriz de diferencias nucleotídicas (Tabla 1). Encontramos 5 haplotipos diferentes para los individuos secuenciados de Parque Salus, siendo uno de estos un haplotipo único, tres de ellos exclusivos de la población, y el restante es un haplotipo compartido con una

muestra proveniente del zoológico de la ciudad de Minas, Lavalleja. Entre estos haplotipos registramos un total de 13 sitios polimórficos, 11 sitios informativos para parsimonia, y un total de 11 transiciones, 1 transversión y 1 delección. La proporción de sitios polimórficos fue de 0.103.

En total para las 50 muestras procesadas, encontramos 33 haplotipos (Tabla 2), siendo 22 de ellos haplotipos únicos. Registramos un total de 39 sitios variables, siendo 29 de ellos informativos para parsimonia, con un total de 34 transiciones, 4 transversiones y 1 delección. Esta delección se encuentra presente en tres haplotipos (11 muestras) exclusivos de la población de Parque Salus. Además de esta delección, existe otro cambio nucleotídico exclusivo de la población de Parque Salus: una transversión encontrada en la última posición (159) presente en tres haplotipos (H1; H3; H4) (Tabla 3).

Tabla 1. Matriz de diferencias nucleotídicas entre las muestras de Parque Salus, Lavalleja. Se detallan en diferentes colores los diferentes haplotipos.

MSG_109													
MSG_114	0												
MSG_116	0	0											
MSG_101	0	0	0										
MSG_105	0	0	0	0									
MSG_107	1	1	1	1	1								
MSG_92	7	7	7	7	7	8							
MSG_94	7	7	7	7	7	8	0						
MSG_91	7	7	7	7	7	8	0	0					
MSG_112	6	6	6	6	6	7	9	9	9				
MSG_99	6	6	6	6	6	7	9	9	9	0			
MSG_100	6	6	6	6	6	6	9	9	9	0	0		
MSG_110	7	7	7	7	7	8	8	8	8	1	1	1	

Los haplotipos H10 y H16 son los únicos compartidos entre muestras de diferentes países, y en ambos casos entre una muestra proveniente de Uruguay y una proveniente de Brasil. De los restantes haplotipos compartidos, H12 se encuentra en dos muestras pertenecientes a Bolivia y H20, H21, H23 y H25 son haplotipos compartidos entre muestras de Brasil. El número de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos varía de 1 a 14 (Tabla 4). El índice de diversidad haplotípica fue $H_d = 0,979$ (s.d. 0,009), mientras que el índice de diversidad nucleotídica fue $P_i = 0,05254$. La proporción de sitios polimórficos para las 50 secuencias fue 0,239.

Tabla 2. Haplotipos encontrados y muestras que los presentaban.

Muestras	Haplotipo
MSG 101; MSG 105; MSG 109; MSG 114; MSG 116	H1
MSG 107; MSG 39	H2
MSG 91; MSG 92; MSG 94	H3
MSG 99; MSG 100; MSG 112	H4
MSG 110	H5
SG 1730; MSG 35	H6
SG 001	H7
MSG 51	H8
MSG 330	H9
MSG 63; MGT 83	H10
MSG 12	H11
MSG 14; MSG 15	H12
MSG 64	H13
MSG 65	H14
MSG 66	H15
MSG 48	H16
MGT 106	H17
MGT 14	H18
MSG 18	H19
MSG 19; MGT 101	H20
MSG 20; MSG 43	H21
MSG 26	H22
MSG 34; MSG 60	H23
MSG 36	H24
MSG 44; MSG 45; MGT 209	H25
MSG 61	H26
MGT 69	H27
MGT 77	H28
MGT 79	H29
MGT 111	H30
MGT 128	H31
MGT 155	H32
MGT 158	H33

Tabla 3. Cambios nucleotídicos encontrados entre los diferentes haplotipos

Haplotipo	Posición en el amplicón	Tipo de cambio			Cambio	Sitio informativo?
		Transición	Transversión	Delección		
H14; H15	10	X			A por G	SI
H1; H2; H3; H4; H5; H7; H8; H24; H28	11	X			A por G	SI
H6; H9; H18; H19; H29	28	X			G por A	SI
H6; H8; H9; H11; H12; H14; H15; H16; H17; H18; H19; H20; H21; H22; H23; H25; H26; H28; H29; H30; H31	32	X			G por A	SI
H7	41		X		G por C	NO
H7	42		X		C por G	NO
H9	49	X			A por G	NO
H12; H14	51	X			A por G	SI
H1; H3; H4	52			X	A	NO
H11; H20; H22; H24; H25; H30; H32; H33;	54	X			G por A	SI
H17; H31; H21	55	X			A por G	SI
H3; H4; H5; H6; H8; H9; H12; H14; H15; H17; H18; H19; H21; H24; H28; H29	56	X			C por T	SI
H1; H2; H4; H5; H6; H7; H8; H9; H14; H15; H18; H19; H21; H24; H28; H29; H31	57	X			G por A	SI
H6; H8; H9; H10; H11; H12; H14; H15; H16; H17; H18; H19; H20; H22; H23; H25; H26; H27; H28; H29; H31	72	X			C por T	SI
H4; H5; H6; H9; H10; H12; H14; H15; H20; H22; H23; H24; H26; H31; H32; H34; H35	73	X			G por A	SI
H6; H7; H8; H9; H10; H12; H13; H14; H15; H17; H18; H19; H20; H22; H23; H24; H25; H26; H27; H28; H29	75	X			T por C	SI
H4; H5; H6; H24	79	X			T por C	SI
H11; H21	84	X			T por C	SI
H27	85	X			C por T	NO
H12	88	X			T por C	SI
H3; H10; H15; H26; H28;	89	X			G por A	SI
H8; H14; H15; H28	91	X			T por C	NO
H4; H5; H6; H8; H9; H18;	92	X			A por G	SI
H1; H2; H4; H5; H6; H7; H9; H10; H12; H13; H16; H18; H22; H23; H24; H25	93	X			T por C	SI
H11	94	X			T por C	NO
H10; H14; H15	101	X			T por C	SI
H4; H5; H6; H9; H11; H12; H13; H16; H18; H19; H24; H31	109	X			G por A	SI
H33	112	X			A por G	NO
H8; H32	115	X			A por G	SI
H10; H12; H29	117	X			G por A	SI
H31			X		G por T	SI
H3; H4; H5; H6; H7; H8; H9; 10; 11; H12; H14; H15; H17; H19; H20; H22; H23; H26; H27; H28; H29; H30;	118	X			G por A	SI
H3	119	X			T por C	NO
H3; H26	120	X			C por T	SI
H10	124	X			G por A	SI
H12; H13; H20; H30; H32; H33	127	X			T por C	SI
H6; H9	151	X			A por G	SI
H8; H14; H15; H28	153	X			G por A	SI
H1; H3; H4	159		X		T por A	SI

Para el árbol construido utilizando el método de “Máxima Parsimonia” utilizamos como grupo externo una secuencia de Huemul (*Hippocamelus bisulcus*) con la que se contaba en el Laboratorio de Genética de la Conservación (Fig.6). El apoyo de Bootstrap para la mayoría de los nodos del árbol fue bajo, mostrando que existen varias posibilidades de cambios evolutivos que pueden haber llevado a esta conformación de haplotipos, y que la relación entre los mismos no es clara. No se puede distinguir un patrón geográfico en las relaciones entre haplotipos, ya que los más cercanos entre si no corresponden necesariamente a la misma localidad. En el árbol construido con el método Unión de Vecinos (“Neighbor Joining”) (Fig.7) se observa que gran parte de la diversificación de los haplotipos ha ocurrido en el pasado reciente (aproximadamente 0.4 MYA), y existen algunas relaciones que son consistentes entre ambos árboles.

En la red haplotípica (Fig. 8) no encontramos en general una relación entre la distancia entre los haplotipos con la localización geográfica. Se puede extraer la presencia de un haplotipo basal (H25, proveniente de Brasil) y tres grandes subdivisiones, todas ellas compuestas por haplotipos de las diferentes localidades. Una de las tres subdivisiones presenta casi exclusivamente haplotipos de Uruguay (H4, H5, H6, H9, H10) y Brasil (H6, H10, H18, H19, H20, H22, H23, H25, H30, H32, H33), más un haplotipo de Bolivia (H12). La segunda subdivisión está compuesta por haplotipos de Paraguay (H17), Brasil (H26, H27, H28, H29), Uruguay (H3, H8) y Argentina (H14 y H15), donde se observan dos grandes ramas o clados. La tercer subdivisión está compuesta por

haplotipos de todos los países, (H1, H2 y H7 de Uruguay, H11 de Bolivia, H13 de Argentina, H16 de Paraguay y H21, H24 y H31 de Brasil). Para la mayoría de los haplotipos de Brasil se observa una agrupación en la base de la red (pudiendo significar que la radiación comenzó de haplotipos comenzó en ese país) y los haplotipos de Uruguay parecen derivar de éstos. Los haplotipos de Paraguay, Argentina y Bolivia, aunque son pocos, se encuentran lejanos entre sí en la red haplotípica, indicando que poseen más relación con haplotipos de otras localidades que entre ellos.

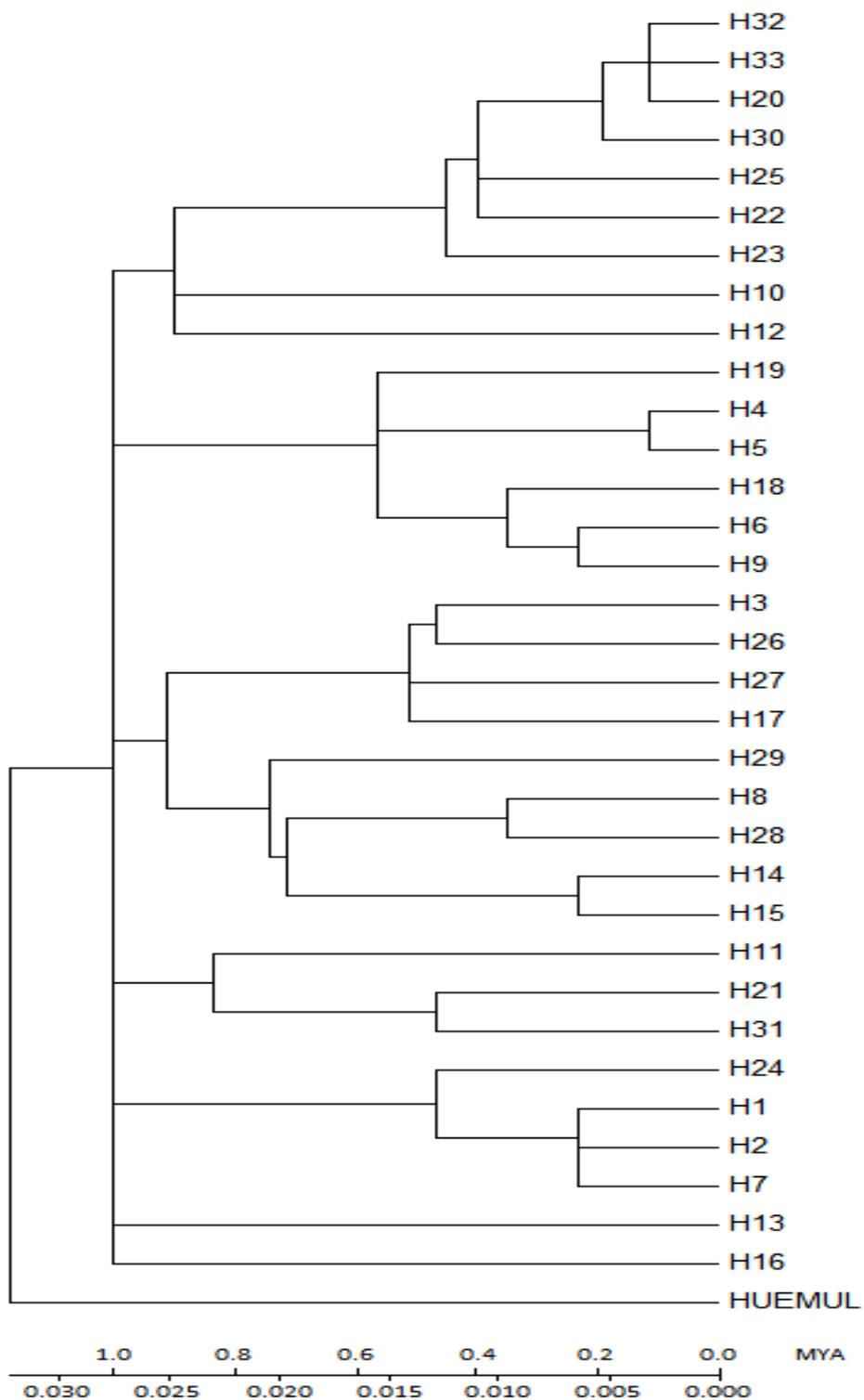


Figura 7. Árbol construido utilizando el método “Neighbor Joining”. Huemul (*H. bisulcus*) fue utilizado como grupo externo. El largo de las ramas refleja las distancias evolutivas, computadas utilizando el método Kimura-2-parameter. Se muestra el tiempo de divergencia en Millones de Años. Calculado en Mega 5.0.

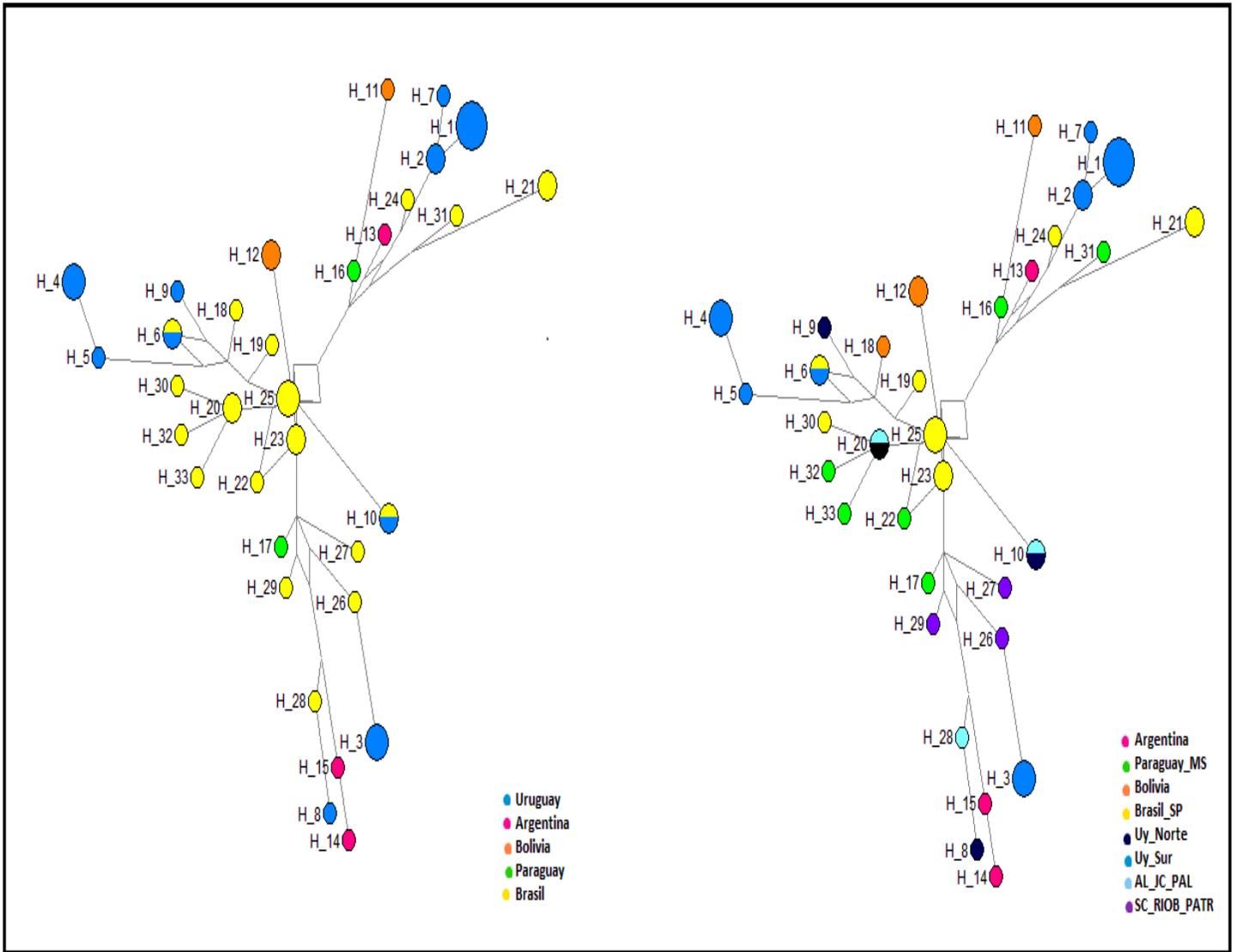


Figura 8. “Minimun Spanning Network”. Red haplotípica para todos los haplotipos muestreados. A la izquierda, marcados en diferentes colores los distintos países de muestreo. A la derecha, marcados en colores los distintos grupos utilizados en el AMOVA. Tomado de Network ©.

IV.III. Análisis poblacional

Se muestran los resultados del AMOVA para algunas de las agrupaciones probadas, donde se resaltan las cuatro agrupaciones que presentaron mejores probabilidades de agrupamiento (Tabla 5). De estas cuatro combinaciones, una de ellas se destaca por maximizar el porcentaje de varianza entre grupos. Las cuatro combinaciones comparten que la población de Tucumán, Argentina se agrupa junto a la población de Hernandárias, Paraguay; la población de Bolivia contiene a una muestra proveniente de la localidad de Rosario Oeste, Mato Grosso, Brasil; y las poblaciones del estado de San Pablo (Brasil) y del sur de Uruguay no se agrupan con ninguna otra población. La agrupación que mejor cumplió con el criterio de maximizar los porcentajes de varianza entre grupos y minimizar los porcentajes dentro de grupos se marca en negrita en la tabla. En ésta, se observa estructuración poblacional en sentido latitudinal. El único grupo existente incluye a las poblaciones de Paraguay, Argentina, norte de Uruguay (formada por las localidades de Rivera y Tacuarembó) y dos poblaciones de Brasil, ambas formadas por tres individuos pertenecientes a tres localidades de Brasil cercanas geográficamente, en un caso: Alegrete (RS), Julio de Castilho (RS) y Palmas (PR); y en el otro caso: Florianópolis (SC), Rio Branco do Sul (PR) y Santo Antonio da Patrulha (RS). El resto de las poblaciones no forman grupos, encontrándose en Uruguay una población al sur (formada por las localidades de San Carlos, Minas y Parque Salus), una población en Bolivia (la localidad de Santa Cruz) y en Brasil la población del estado de San Pablo (Tabla 6) (Fig. 9).

Tabla 5. Resultados de AMOVA. Entre paréntesis se muestran las poblaciones que se colocaron dentro del mismo grupo. En amarillo se resaltan las cuatro agrupaciones que mejor daban cuenta de la varianza. En negrita se resalta la mejor agrupación probada. AG= Entre grupos; AP/WG= Entre poblaciones dentro de grupos; WP= Dentro de poblaciones. P = P valor para estadísticos ϕ . El análisis fue realizado en Arlequin v3.5.1.3.

Nº GRUPOS	AGRUPAMIENTO	COMPONENTE DE VARIANZA	% DE VARIANZA TOTAL	ϕ ESTADÍSTICOS	P
4	Uy_Sur+(SC_RIOB_PATR+Uy_Norte+Paraguay_MS+Argentina+Al_JC_PAL)+Brasil_SP+Bolivia	AG	9.28	ϕ_{SC} : 0.03743	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.40	ϕ_{ST} : 0.12674	0.00000+-0.00000
		WP	87.33	ϕ_{CT} : 0.09278	0.01760+-0.00366
5	Uy_Sur+(Uy_Norte+Brasil_RS+Brasil_SC_PR)+Brasil_SP+Bolivia_MT+(Brasil_MS_Paraguay+Argentina)	AG	7.70	ϕ_{SC} : 0.03674	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.39	ϕ_{ST} : 0.11089	0.00000+-0.00000
		WP	88.91	ϕ_{CT} : 0.07698	0.01466+-0.00310
5	Uy_Sur+(Uy_Norte+Brasil_RS+Argentina+Brasil_SC_PR)+Brasil_SP+Bolivia_MT+Brasil_MS_Paraguay	AG	7.37	ϕ_{SC} : 0.04066	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.77	ϕ_{ST} : 0.11137	0.00000+-0.00000
		WP	88.86	ϕ_{CT} : 0.07371	0.08602+-0.00732
5	Uy_Sur+(Uy_Norte+Alegrete_Castilho_Palmas+Argentina+SC_RBranco_Patrolha)+Brasil_SP+Bolivia_MT+Paraguay_MS	AG	7.37	ϕ_{SC} : 0.04066	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.77	ϕ_{ST} : 0.11137	0.00000+-0.00000
		WP	88.86	ϕ_{CT} : 0.07371	0.07331+-0.00792
6	Uy_Sur+Uy_Norte+Brasil_SP+Bolivia+(Argentina+Paraguay_MS+Alegrete_Castilho_Palmas)+SC_RBranco_Patrolha	AG	8.73	ϕ_{SC} : 0.03502	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.20	ϕ_{ST} : 0.11930	0.00000+-0.00000
		WP	88.07	ϕ_{CT} : 0.08734	0.09971+-0.00785
6	Uy_Sur+(Uy_Norte+Alegrete_Castilho_Palmas)+Brasil_SP+Bolivia_MT+(Argentina+Paraguay_MS)+SC_RBranco_Patrolha	AG	7.73	ϕ_{SC} : 0.03505	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.23	ϕ_{ST} : 0.10962	0.00000+-0.00000
		WP	89.04	ϕ_{CT} : 0.07728	0.06549+-0.00856
7	Uy_Sur+(Uy_Norte+Brasil_RS)+Brasil_SP+Brasil_SC_PR+Argentina+Bolivia_MT+Brasil_MS_Paraguay	AG	7.05	ϕ_{SC} : 0.04066	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.78	ϕ_{ST} : 0.10829	0.00000+-0.00000
		WP	89.17	ϕ_{CT} : 0.07049	0.35679+-0.01431
7	(Uy_Sur+Uy_Norte)+Brasil_SP+Brasil_RS+SC_PR_Paraguay+Argentina+Bolivia_MT+Brasil_MS	AG	1.92	ϕ_{SC} : 0.09092	0.10166+-0.00927
		AP/WG	8.92	ϕ_{ST} : 0.10835	0.00000+-0.00000
		WP	89.17	ϕ_{CT} : 0.01917	0.56989+-0.01380
7	Uy_Sur+Brasil_SP+(Brasil_RS+Uy_Norte)+SC_PR_Paraguay+Argentina+Bolivia_MT+Brasil_MS	AG	7.03	ϕ_{SC} : 0.04066	1.00000+-0.00000
		AP/WG	3.78	ϕ_{ST} : 0.10809	0.00000+-0.00000
		WP	89.19	ϕ_{CT} : 0.07028	0.33333+-0.01608
7	Uy_Sur+(Uy_Norte+Alegrete_Castilho_Palmas)+Brasil_SP+Bolivia+Argentina+Paraguay_MS+SC_RBranco_Patrolha	AG	7.61	ϕ_{SC} : 0.04340	1.00000+-0.00000
		AP/WG	4.01	ϕ_{ST} : 0.11619	0.00000+-0.00000
		WP	88.38	ϕ_{CT} : 0.07610	0.34506+-0.01198

Tabla 6. Se detallan las muestras que componen cada población, y las poblaciones que componen cada grupo.

Grupo 1	Uy_Sur	SG 001; SG 1730; MSG 91; MSG 92; MSG 94; MSG 99; MSG 100; MSG 101;
		MSG 105; MSG 107; MSG 109; MSG 110; MSG 112; MSG 114; MSG 116; MSG 39
Grupo 2	Uy_Norte	MSG 51; MSG 63; MSG 330
	AL_JC_PAL	MGT 77; MGT 83; MGT 101
	SC_RIOB_PATR	MSG 61; MGT 69; MGT 79
	Argentina	MSG 64; MSG 65; MSG 66
	Paraguay_MS	MSG 48; MGT 106; MGT 128; MGT 155; MGT 158; MSG 26
Grupo 3	Brasil_SP	MSG 18; MSG 19; MSG 20; MSG 34; MSG 35; MSG 36; MSG 43; MSG 44;
		MSG 45; MSG 60; MGT 111; MGT 209
Grupo 4	Bolivia	MSG 12; MSG 14; MSG 15



Figura 9. Resultados de AMOVA. Grupo 1 = Rojo; Grupo 2 = Amarillo; Grupo 3 = Azul; Grupo 4 = Verde. Tomado de Google Earth ©.

En el árbol de distancia genética entre grupos para la mejor agrupación (Fig. 10), se observa que el grupo de Bolivia parte del nodo más basal del árbol, y tanto este grupo como el de San Pablo, Brasil están más distanciados genéticamente del resto. El grupo formado por el sur de Uruguay se encuentra cercano genéticamente al único grupo que contiene varias poblaciones, sin embargo, al momento de realizar el AMOVA, cuando se incluía a esta población en el grupo, la significancia de los resultados disminuía.



Figura 10. Árbol de distancias genéticas utilizando el método “Neighbor – Joining” para los grupos de poblaciones tomando en cuenta el número de diferencias pareadas entre grupos. Realizado en MEGA 5.0 ©.

Los valores para los índices de diversidad molecular Theta y Tau se observan en la Tabla 7. Los valores de F_{ST} entre grupos tomados por pares, el número medio de diferencias por pares dentro de los grupos, y los valores estimados de migrantes efectivos entre grupos se detallan en la Tabla 8. Los resultados de F_{st} entre

grupos no fueron significativos ($P < 0,3$). El número de migrantes entre grupos varía entre 1 y 6.

Tabla 7. Índices de diversidad molecular y parámetros demográficos calculados en base a cuatro grupos. S.D=desvío standard. Calculado con Arlequin v3.5.1.3.

		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Media	S.D
<i>Índices de diversidad molecular</i>	N° de transiciones	15	29	18	12	18,5	7,416
	N° de transversiones	3	1	0	0	1	1,414
	N° de sustituciones	18	30	18	12	19,5	7,55
	N° de deleciones	1	0	0	0	0,25	0,5
	Theta_pi	6,19167	8,1307	6,03636	8,00000	7,08969	1,12965
	s.d Theta_pi	3,47861	4,42631	3,51455	6,39444	4,45348	1,36626
<i>Parámetros demográficos</i>	Tau	8,51953	8,74023	8,55664	13,21875	9,75879	2,30866
	Tau qt 2.5%	2,18555	5,11914	3,13086	5,82617	4,06543	1,69488
	Tau qt 97.5%	12,48047	10,64648	13,07422	98,21875	33,60498	43,08824

Tabla 8. Arriba de la diagonal se detallan: Estimación del número de N° de migrantes efectivos entre grupos. En la diagonal: Promedio de diferencias pareadas dentro de los grupos. Debajo de la diagonal: valores de F_{ST} entre grupos. La numeración de 1 – 4 corresponde a los grupos tomados en cuenta a partir del AMOVA. Realizado en Arlequin v3.5.1.3.

	1	2	3	4
1	0,85833	6,31726	2,45629	1,98979
2	0,07334	0,99346	4,62193	3,92553
3	0,16913	0,09762	0,80000	1,56081
4	0,20082	0,11298	0,24262	0,66667

En cuanto a los parámetros demográficos, en las gráficas de “mismatch distribution” para el total de las muestras, observamos una distribución unimodal, congruente con el patrón de expansión demográfica, sin embargo cuando se observan las gráficas para los grupos por separado, el patrón no es claro para aquellos grupos formados por sólo una población. Para el grupo formado por más de una población, la distribución unimodal se mantiene (Fig.11). A partir de este resultado y tomando la hipótesis de un evento de expansión demográfica en el pasado, se calculó el tiempo en generaciones transcurrido a partir de este evento de expansión:

$$t = \tau / 2\mu = 1.106.573 \text{ generaciones}$$

y el número efectivo de hembras en el momento de la expansión:

$$N = \theta / 2\mu = 1.530.41.$$

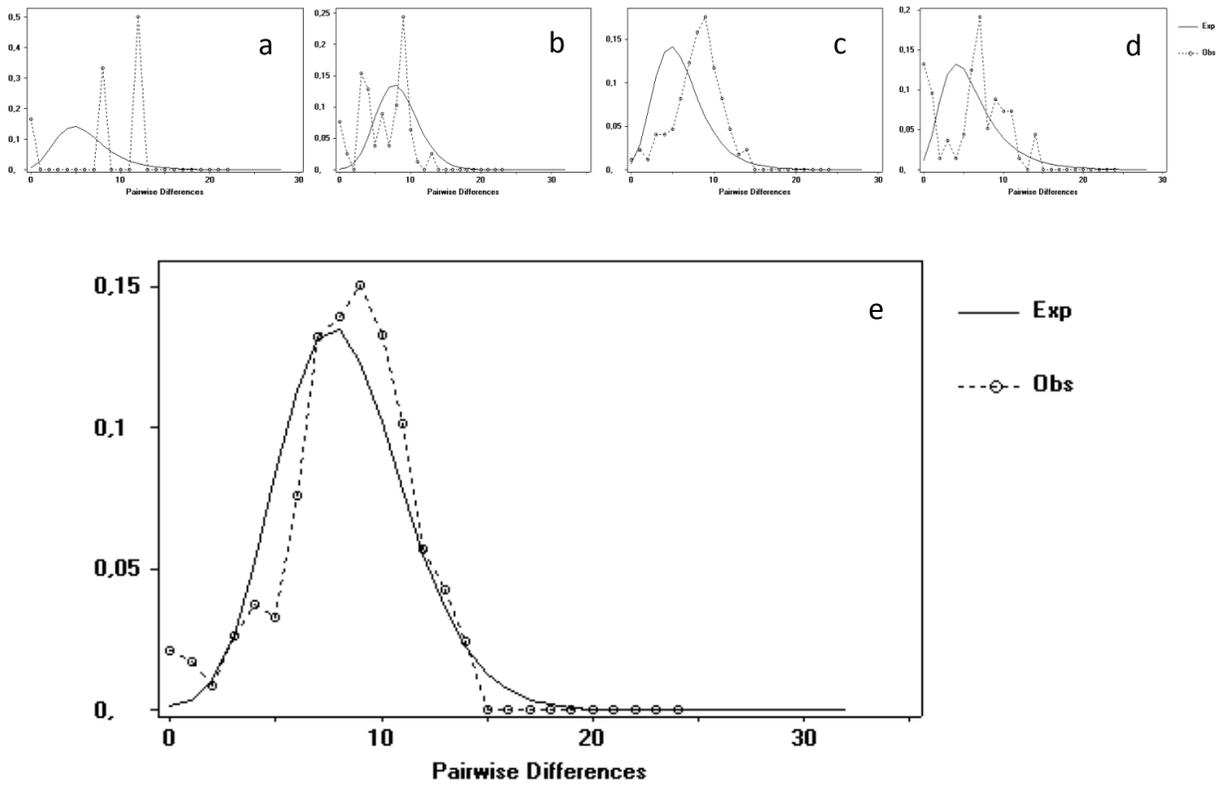


Figura.11 Mismatch distribution para: a) Grupo 4 b) Grupo 3 c) Grupo 2 d) Grupo 1 e) Total. Realizado en DNAsp versión 5.

V – DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

V. I. Análisis de secuencias

La existencia de 39 sitios variables en 159 sitios analizados, confirma que esta región es hipervariable y adecuada para estudios a nivel poblacional en esta especie, sobre todo cuando se utilizan muestras de fecas, donde la amplificación de un fragmento de mayor tamaño es por lo general muy difícil de lograr. La presencia y acumulación de sustituciones como deleciones y transversiones es esperable dado que se trata de una región no codificante del genoma y existe mayor probabilidad de que estas mutaciones sean silenciosas, de todas formas, como es habitual en todo el genoma, existió una mayor frecuencia de transiciones debido a que el mecanismo molecular por el cual se generan estos cambios implica una menor energía.

V. II. Análisis poblacional

En el análisis intrapoblacional realizado en Parque Salus, Lavalleja mediante el muestreo de fecas, se encontró gran variabilidad genética, ya que en 13 muestras secuenciadas se determinaron 5 haplotipos diferentes. Debido a que el análisis se realizó a partir de fecas, existe la posibilidad de que las muestras que poseen el mismo haplotipo correspondan a deposiciones del mismo individuo. Para poder eliminar este problema, tendríamos que emplear marcadores que brinden resolución para la identificación a nivel individual (por ej. microsatélites). Es

interesante resaltar que se encontraron 2 cambios nucleotídicos exclusivos de esta población: una transversión (A-T) y una deleción, que no se encontraron tampoco en los individuos en cautiverio del zoológico de Minas y San Carlos (que podrían proceder de la misma zona).

En cuanto al análisis interpoblacional, se puede concluir que existe gran variabilidad genética en el fragmento para las poblaciones de la región, ya que se encontraron 33 haplotipos en 50 muestras, siendo casi todos ellos haplotipos únicos. Tajima (1983) propone que un exceso de haplotipos raros puede ser evidencia de crecimiento poblacional, sin embargo, al realizar el test estadístico (Tajima's D) el valor resultante es negativo (-0,27469, $P > 0.10$), que es evidencia de expansión poblacional o selección purificadora, pero no es un valor significativo. Harpending *et al.* (1998) también postulan que un exceso de variantes de baja frecuencia es evidencia de expansión poblacional reciente o selección purificadora, pero es necesario corroborar el patrón exhibido en el mtADN con un marcador nuclear.

La gran variabilidad genética encontrada podría explicarse por: un tamaño poblacional grande, una población que recientemente pasó por un evento de cuello de botella o por la existencia de un evento de expansión demográfica. Encontramos algunos resultados que parecen indicar que esta última hipótesis podría ser correcta. En primer lugar, los resultados obtenidos en la "mismatch distribution", a partir del patrón unimodal se puede inferir la existencia de un evento expansión demográfica en el pasado. Sería necesario aumentar el número de muestras para poder cotejar estos resultados a nivel poblacional. En segundo lugar, el flujo génico

encontrado entre poblaciones donde la migración efectiva sea altamente improbable debido a las distancias geográficas y/o ocurrencia de barreras geográficas, este flujo génico puede ser resultado de un evento de expansión demográfica ocurrido en el pasado reciente (González et al., 1998). En tercer lugar, la red haplotípica obtenida en forma de estrella, que parece indicar la existencia de una radiación haplotípica a partir de los haplotipos brasileros.

El número efectivo de hembras calculado antes de la expansión fue aproximadamente 1.530.410, si asumimos proporción de sexos 1:1, se podría inferir que el número efectivo total en la población era de 3.060.820 individuos. No se tienen estimativas de tamaño poblacional actuales para cotejar estos resultados. De acuerdo al tiempo en generaciones obtenido para este evento de expansión, el mismo ocurrió hace aproximadamente 2.213.146 años (si tomamos en cuenta lo propuesto por Black-Décima *et al.* (2010), esta especie alcanza la madurez reproductiva aproximadamente al año y la gestación tiene una duración de 7 meses, por lo tanto el tiempo generacional son aproximadamente 2 años), la expansión habría ocurrido en el Pleistoceno, ya propuesto por Duarte *et al.* (2008). Estos autores determinaron que la especie fue capaz de colonizar diferentes ambientes en los ciclos secos y húmedos del Pleistoceno, resultando en niveles de diferenciación geográfica bajos. Los altos niveles de variabilidad encontrados se deberían a una gran expansión geográfica y demográfica a inicios del Pleistoceno en América del sur, lo cual es congruente con lo encontrado en este trabajo a partir de parámetros demográficos.

En relación a los resultados del AMOVA, estos pueden estar dados por un artefacto de muestreo, ya que se contaba con más muestras de la región sur de Uruguay y del estado de San Pablo, Brasil que del resto de las poblaciones, y justamente estas poblaciones aparecen como las más divergentes en el análisis. La justificación de la estructuración poblacional en sentido latitudinal, puede estar dada por la formación de corredores biológicos en los montes ribereños asociados a cursos de agua, donde esta especie habita (Black-Décima *et al.*, 2010). Los corredores biológicos, han sido descritos como las formas primarias de conectividad entre poblaciones aisladas y pueden estar dados por remanentes de bosques y florestas, bordes de cursos de aguas (Meffe & Carroll, 1994).

En Uruguay, se encontró diferenciación moderada entre la región norte y sur del país ($F_{ST} = 0,09$, $p < 0,1$), sin embargo serían necesarias más muestras del norte del país para dar cuenta de esta variación. La región norte del Uruguay está más relacionada a poblaciones del sur de Brasil, y esto debería ser tenido en cuenta al momento de generar unidades de manejo para esta especie en nuestro país. Son necesarias más muestras para poder obtener resultados significativos en este análisis.

La alta variabilidad genética de la especie para la región de estudio, es comparable a la encontrada por Bidegaray (2003), quien encontró en un fragmento de 423 pb del gen citocromo b, un índice haplotípico de 0.632 para una muestra de 19 individuos de, Argentina, Brasil y Bolivia. Elizondo *et al.* (2010), a diferencia de lo encontrado en este trabajo, describió la existencia de un haplotipo basal del gen citocromo b compartido por individuos de varias

localidades neotropicales, y también una correlación entre los haplotipos y su distribución geográfica. Además, estableció la existencia de estructuración genética moderada para las poblaciones de Argentina y Brasil. Abril *et al.* (2010) en su trabajo acerca de la variabilidad de *M. americana* en Brasil encontraron también gran variabilidad, en un fragmento de mayor tamaño del mismo gen. Sin embargo Márquez *et al.* (2006) y Gregorini (2011) analizando ADN mitocondrial en otras especies de cérvidos neotropicales como el caso del “ciervo de los pantanos” (*Blastoceros dichotomus*) y “huemul” (*H. bisulcus*) encontraron una variabilidad muy baja. La región es extremadamente conservada en estas especies, a diferencia de lo que ocurre en *M. gouazoubira* y *M. americana*.

V. III. Conclusiones finales

Los resultados obtenidos, a pesar del número limitado de muestras, indican que la especie tuvo grandes tamaños poblacionales en el pasado reciente. A partir de estos resultados, no se pueden generar unidades de manejo o estrategias para la conservación, ya que no se logró una distinción clara entre diferentes poblaciones. Los resultados podrían indicar que las poblaciones del norte del Uruguay deberían considerarse junto a las poblaciones del sur de Brasil, y tal vez, todo el conjunto de poblaciones pueda estar actuando como una única gran población.

Los resultados también parecen ser concordantes con la ocurrencia de un evento de expansión demográfica en el pasado reciente, propuesto por Duarte *et al.* (2008), quien plantea que los altos niveles de diferenciación genética en Guazubirá, son producto de una expansión demográfica ocurrida en el Pleistoceno.

V.IV. Perspectivas

En primer lugar, es necesario un muestreo más exhaustivo para conocer cuáles son los patrones genéticos y filogeográficos de la especie, tanto a nivel regional como a nivel país. Sería interesante además, evaluar la distribución exacta de esta especie para nuestro país, lo cual es necesario para la creación de planes de manejo y estrategias de conservación útiles. También, podría utilizarse un marcador molecular nuclear para poder dar cuenta de los patrones de variabilidad genética que se pierden por utilizar un marcador de herencia exclusivamente materna.

VII – BIBLIOGRAFÍA

Abril, V.V.; Carnelossi, E.A.G.; González, S.; Duarte, J. M. B. (2010) *Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer Mazama Americana Complex (Artiodactyla; Cervidae)*. Cytogenet Genome Res.

Allen, J. A. (1915) *Notes of the American Deer of the genus Mazama*. Bulletin American Museum of Natural History. v. 34. p. 521-532.

Avila–Pires, F.D. (1959) *As formas sul-americanas do “veado-virá”*. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. v. 31. p. 25-38.

Baker, C.S.; Slade, W.R.; Bannister, J.L. (1994) *Hierarchical structure of mitochondrial DNA gene flow among humpback whales, Megaptera novaeangliae, world-wide*. Molecular Ecology. v.3 p.313–327.

Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohl, A. (1999) *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. Molecular Biology & Evolution. v.16. p. 37-48.

Bianchini, J.J. & DeLupi, L.H. (1978) *El estado sistemático de los ciervos neotropicales de la tribu Odocoileini (Simpson, 1945)*. Physis. v.38. p. 83-89.

Bidegaray, L. (2003) *Variabilidad genética en Mazama (Mammalia: Cervidae)*. Tesis de grado, sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Black-Décima, P. & Vogliotti, A. (2008) *Mazama gouazoubira*. In: Red List of Threatened Species. IUCN, 2009. Version 2009.1.

Black-Décima, P.; Rossi R.V.; Vogliotti, A. et al. (2010) *Red brocket deer Mazama gouazoubira (Fischer 1814)*. In: Duarte, J.M.B. & González, S. (Eds.) Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN. p. 190-198.

Brown, W.M.; MacIntyre, R.I. (Ed.) (1985) *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press. pp. 95–130.

Cabrera, A. (1961). *Catálogo de los mamíferos de América del Sur (Sirenia, Perissodactyla, Artiodactyla, Lagomorpha, Rodentia, Cetacea)*. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales. v.4. p. 309-732.

Clayton, D.A. (1992) *Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs*. Int. Rev. Cytol. v.141. p. 217–232.

Cuéllar, R.L. (1999) *Uso de los animales silvestres por pobladores izoceños*. IV Congreso de Manejo de Fauna en la Amazonía y Latinoamérica. Asunción, Paraguay.

Czernay, S. (1987) *Die Spiesshirsche und Pudus: Die Gattungen Mazama und Pudu*. 1 Aufl. A. Ziemsen, Wittemberg, Lutherstadt.

Díaz, N. & Smith-Flueck, J. (2000) *El Huemul patagónico: Un misterioso cérvido al borde de la extinción*. Literature Of Latin America, Monografía N° 3. Buenos Aires, Argentina. pp. 170.

Douzery, E. & Randi, E. (1997) *The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content*. Molecular Biology & Evolution v.14. p. 1154-1166.

Duarte, J.M.B. (1996) *Guía de identificação de cervídeos brasileiros*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil.

Duarte, J.M.B. & Jorge, W. (1998) *Análise citotaxonomica dos Mazama cinzas do Brasil (Mazama gouazoubira e Mazama rondoni)*. In: Duarte, J.M.B. *Análise citogenética e citotaxonomica do género Mazama (Cervidae:Artiodactyla) no Brasil*. Ph.D. dissertation, Instituto de Biociencias, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

Duarte, J.M.B. & Jorge, W. (2003) *Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (Mazama bororo; Duarte, 1996) in Brazil*. Mammalia. v.67. p. 403–410.

Duarte, J.M.B.; Merino, M.L. (1997). *Taxonomia e Evolução*. In: Duarte, J.M.B. (Ed.) *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, p. 1–21.

Duarte, J.M.B.; González, S.; Maldonado, J.E. (2008) *The surprising evolutionary history of South American deer*. Molecular Phylogenetics & Evolution. v. 49. p.17–22.

Duarte, J.M.B. & González, S. (Eds.) (2010) *Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN.

Einseberg, J.F. (1987) *The evolutionary history of the Cervidae with special reference to South American Radiation*. In: Wemmer, M. (Ed) *Biology and management of the Cervidae*. Smithsonian Institute Press, Washington D.C. p.60.64.

Eisenberg, J. F. (2000). *The contemporary Cervidae of Central and South America*. In: Vrba, E.S. & Shaller, G.B. (Eds). *Antelopes, Deer, and Relatives*. Yale University Press, London, p. 189–202.

Elizondo, C. (2010) *Estudio de la variabilidad genética del Mazama gouazoubira (Mammalia: Cervidae) Fischer, 1814*. Tesis de grado, Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; & Quattro, J.M. (1992) *Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics. v.131. p. 479-491

Excoffier, L.; Laval, L.G. & Schneider, S. (2010) *Arlequin versión 3.5.1.2: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics Online. v1. p. 47-50.

Geist, V. (1998) *Deer of the World, Their Evolution, Behavior, and Ecology*. Stackpole Books, Mechanicsburg.

Gilbert, C.; Ropiquet, A. & Hassanin, A. (2006) *Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology and biogeography*. Molecular Phylogenetic & Evolution. v.40. p. 101-117.

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

González, S. (2004) *Biología y conservación de Cérvidos Neotropicales del Uruguay*. Informe Proyecto CSIC-UdelaR. pp. 57.

González, S. & Duarte, J.M.B. (2007) *Noninvasive methods for genetic analysis applied to ecological and behavioral studies in Latino-America*. Revista brasileira de Zootecnia. v.36. p. 89-92.

González, S.; Duarte, J.M.B.; Maldonado, J.E. (2010) *Molecular phylogenetics and evolution*. In: Duarte, J.M.B. & González, S. (Eds.) *Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN. p. 12-17.

González, S. & Elizondo, C. (2010) *Distribución de Mazama gouazoubira en el Uruguay*. Primer Congreso Uruguayo de Zoología, 5 al 10 Diciembre, Montevideo-Uruguay.

González, S.; Gregorini, E. & Repetto, L. (2012) *Diseño de cebadores Dloop para analizar la variabilidad genética de Cérvidos Neotropicales*. Segundo Congreso Uruguayo de Zoología, 9 al 14 Diciembre, Montevideo-Uruguay.

Gregorini, E. (2011) *Variabilidad genética en el Huemul, Hippocamelus bisulcus (Molina, 1782)*. Tesis de grado, Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Groves C.P. & Grubb. P. (1987). *Relationship of Living Deer*. In: Wemmer, M. (Ed) *Biology and management of the Cervidae* Smithsonian Institute Press, Washington, D. C. p. 21-59.

Grubb, P. (2000) *Valid and invalid nomenclature of living and fossil deer, Cervidae*. *Acta Theriol.* v.45. p.289–307

Grubb, P. (2005) *Order Artiodactyla*. In: Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (Eds). *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. v.1. (3° edición). p. 637-722.

Harpending, H.; Batzer, M. & Gurven, M. (1998) *Genetic traces of ancient demography*. Proceedings of Natural Academy of Science USA. v.95. p 1961-1967

Harrison, R.G. (1989) *Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology*. Trends in Ecology & Evolution. v.4. p 6-11.

Hassanin A.; Delsuc F.; Ropiquet A. et al. (2012) *Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes*. Comptes Rendus Biologies. v.335. p 32-50.

IUCN (2011) *Red list of Threatened Species Online*. www.iucnredlist.org

Janis, C.M. & Scott, K.M. (1987) *The phylogeny of the Ruminantia (Artiodactyla, Mammalia)*. In: Benton, M.J. (Ed.) *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods (Vol. 2: Mammals)*. p. 273–282.

Juliá, J.P. (2002) *Autoecología de la corzuela parda (Mazama gouazoubira) in the Brazilian savanna*. Deer Specialist Group News. v.15. p.14.

Kocher, T.D.; Thomas W.K. & Edwards, A. (1989) *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. v.86 p.6196-6200.

Kohn, M.H. & Wayne R.K. (1997) *Facts from feces revisited*. Trends in Ecology & Evolution. v. 12. p 223-227-

Kohn , M.H. (1999) *Estimating population size by genotyping feces*. Proceedings of the Royal Society of London Series B. v.266. p. 1–7.

Lonnberg, E. (1919) *On some mammals from the Argentine Chaco*. Arkiv fur Zoologi. v.12. p.1-20.

Márquez, A.; Maldonado, J.E.; González, S.; Beccaceci, M. D.; Garcia, J. E. & 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. v7. p.563–575.

Medellín, R. A.; Gradner, A. L. & Aranda, J. M. (1998) *The taxonomic status of the Yucatán brown brocket, *Mazama Pandora**. Proceedings of the Biological Society of Washington. v.111. p.1-14.

Meffe, G.K. & Carroll, C.R (1994) *Principies of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 600 pp.

Merino, M. L.; Milne, N.; Vizcaíno, S.F. (2005) *A cranial morphometric study of deer (*Mammalia: Cervidae*) from Argentina using three-dimensional landmarks*. Acta Theriol. v.50 p.91–108.

Merino, M.L. & Rossi R.V. (2010) *Origin, systematics and morphological radiation*. In: Duarte, J.M.B. & González, S. (Eds.)

Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN. p. 2-11.

Pinder, L. & Leeuwenberg, F. (1997) *Veado Catingueiro (Mazama gouazoubira, Fisher, 1814)*. In: Duarte, J.M.B (Ed) *Biologia e conservacao de cervídeos sul-americanos: Blastoceros, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal. p.60-68

Pitra, C.; Fickel, J. & Meijaard, E. (2004). *Evolution and phylogeny of old world deer*. *Molecular Phylogenetic & Evolution*. v.33. p.880–895.

Roger, A.R & Harpending, H. (1992) *Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences*. *Molecular Biology and Evolution*. v. 9. p. 552-569.

Rossi, R. V. (2000) *Taxonomia de Mazama (Rafinesque, 1817) do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)*. Tesis de Maestría, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

Rozas, J.; Librado, P. & Sánchez-Del Barrio, J. C. (2010). *Software DNAsp Version: 5.10.01*. Universidad de Barcelona. Current Released.

Saccone, C.; Pesole, G. & Sbisà E. (1991) *The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern*. *Journal of Molecular Evolution*. v.33. p. 83-91.

Saitou N. & Nei M. (1987) *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology & Evolution*. v.4. p. 406-425.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*. *Proceedings of Natural Academy of Science USA*. v.74. p. 5463-5467

Slatkin, M. (1987) *Gene flow and the geographic structure of natural populations*. *Science*. vol. 236. p. 736 – 792.

Slatkin, M. (1993) *Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations*. *Evolution*. v.47. p. 264-279.

Smith, M.; Branan, W.; Marchinton, L.; Johns, P. & Wooten, M. (1986) *Genetic and morphological comparisons of red brocket, brown brocket, and white tailed deer*. *Journal of mammalogy*. v.67. p. 103-111.

Spínola, M. (2009) *Noninvasive Survey Methods for Carnivores*. In: Long, R.; MacKay, P.; Ray, J. & Zielinski, W. (Eds.) *The Journal of Wildlife Management* v. 73. p. 1445.

Stehli, F.G & Webb, S.D. (1985) *The great American biotic interchange*. Plenum Press, New York.

Taberlet, P. (1996) *The use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics*. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. v. 8. p. 129 – 136.

Tajima, F. (1983) *Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations*. *Genetics*. v. 105. p. 437-460.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. (2010) *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 5.0*. *Molecular Biology and Evolution*. v.24. p. 1596-1599.

Vargas-Munar, D.S.F. (2003) *Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entrecromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de Cervídeos brasileiros*. Tesis de Maestría. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

Vogliotti, A. & Duarte, J.M.B. (2009). *Discovery of the first wild population of the small red brocket deer Mazama bororo (Artiodactyla: Cervidae)*. *Mastozoología Neotropical*. v.16

Webb, S.D. (2000) *Evolutionary history of new world deer*. In: Vrba, E.S. & Shaller, G.B. (Eds.) *Antelopes, Deer, and Relatives*. Yale University Press, London. p. 38–64.

Weber, M. & González, S. (2003) *Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution*. *Ecoscience*. v.10. p. 443-454.

Weir, B.S. (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc. Inc, Sunderland, USA.

Wemmer, C. (1998) *Deer Status, survey and Conservation Action Plan*. IUCN Deer Specialist group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK. 106pp.

Wilson, D.E.; Nichols, J.D & Rudran, R. (1996) *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. p 17.

Wright, S. (1951) *The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating*. *Evolution*. v.19. p. 395-420.

VIII – ANEXOS

VIII.I Anexo 1: Muestras

Muestra	Procedencia	Colector	Observaciones
MSG 12	Santa Cruz, Bolivia	S. González	Cautiverio
MSG 14	Santa Cruz, Bolivia	S. González	Cautiverio
MSG 15	Santa Cruz, Bolivia	S. González	Cautiverio
MSG 18	Sorocaba, SP, Brasil	R. Texeira	Nacido en cautiverio
MSG 19	Sorocaba, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 20	Municipio ITU, SP, Brasil	R. Texeira	Silvestre
MSG 26	Santa Ana do Paranaíba, MS, Brasil	R. Texeira	****
MSG 34	Aracoiaba da Serra, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 35	Piedade, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 36	Aluminio, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 39	Minas, Lavalleja, Uruguay	S. González	Cautiverio
MSG 43	Piedade, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 44	Piedade, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 45	Salto de Pirapora, SP, Brasil	R. Texeira	Cautiverio
MSG 48	Hernandárias, Paraguay	S. González	Cautiverio
MSG 51	Tacuarembó, Uruguay	E. Tavares	Cautiverio
MSG 60	Aracoiaba da Serra, SP, Brasil	R. Texeira	Nacido en cautiverio
MSG 61	Florianópolis, SC, Brasil	S. Villar	****
MSG 63	Rivera, Uruguay	E. Tavares	Cautiverio
MSG 64	Tucumán, Argentina	P. Black	****
MSG 65	Sur de Tucumán, Argentina	P. Black	****
MSG 66	Este de Tucumán, Argentina	P. Black	****
MSG 91	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 92	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 94	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 99	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 100	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 101	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 105	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 107	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 109	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 110	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 112	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 114	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 116	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 118	Parque Salus, Lavalleja, Uruguay	Antonella Brum	Silvestre
MSG 330	Tacuarembó, Uruguay	E. Tavares	Cautiverio
MGT 14	Rosario do Oeste, MT, Brasil	****	Cautiverio
MGT 69	Rio Branco do Sul, PR, Brasil	****	Cautiverio
MGT 77	Alegrete, RS, Brasil	****	Cautiverio
MGT 79	Antonio da Patrulha, RS, Brasil	****	Cautiverio
MGT 83	Julio de Castilhos, RS, Brasil	****	Cautiverio
MGT 101	Palmas, PR, Brasil	****	Cautiverio
MGT 106	Hernandárias, Paraguay	****	Cautiverio
MGT 111	Jundiaí, SP, Brasil	****	Cautiverio
MGT 128	Alegria Farm, MS, Brasil	****	Semi-cautiverio
MGT 155	Alegria Farm, MS, Brasil	****	Semi-cautiverio
MGT 158	Alegria Farm, MS, Brasil	****	Semi-cautiverio
MGT 209	Intervalos State Park, SP, Brasil	****	Silvestre
SG 001	Minas, Lavalleja, Uruguay	S. González	Cautiverio
SG 1730	San Carlos, Maldonado, Uruguay	A.Villalba	Cautiverio

VIII.II Anexo 2: Secuencias

Haplotipo1: MSG109; MSG 101; MSG 105; MSG 109; MSG 114; MSG 116

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACA-GGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGA

Haplotipo 2: MSG 107; MSG 39

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 4: MSG 99; MSG 100; MSG 112

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACA-GGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGT
ACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGA

Haplotipo 5: MSG 110

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGT
ACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 6: SG1730; MSG 35

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAATGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGT
ACTATGTAATAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAGTGTAATGT

Haplotipo 7: SG001

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACCGATGTTG
ACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGT
ACTATGTAATAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 8: MSG 51

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGT
ACTATGTAATAATTGAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATATAATGT

Haplotipo 9: MSG 330

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAATGGACGGGATACGCATGTTG
GCAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATGCTATGT
ACTATGTAATAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAGTGTAATGT

Haplotipo 10: MSG 63; MGT 83

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGGATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGATACTATGT
ACCATGTAATAATTAAGTCATGAACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 11: MSG 12

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGACCAATAATATCATGT
ACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 12: MSG 14; MSG 15

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACGAGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAACAATACTATGT
ACTATGTACTATAATTAAGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 13: MSG 64

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGGATGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 14: MSG 65

GCGGCATGGTGATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACGAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAACATTATGT
ACCATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATATAATGT

Haplotipo 15: MSG 66

GCGGCATGGTGATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGACATTATGT
ACCATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATATAATGT

Haplotipo 16: MSG 48

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGATGGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 17: MGT 106

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGGCGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 18: MGT 14

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAATGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATGCTATGT
ACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 19: MSG 18

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAATGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 20: MSG 19; MGT 101

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 21: MSG 20; MSG 43

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGACCAATAATATTATGT
ACTATGTACTIONGTAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 22: MSG 26

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTIONGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 23: MSG 34; MSG 60

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTIONGTAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 24: MSG 36

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTIONATAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 25: MSG 44; MSG 45; MGT 209

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGT
ACTATGTACTIONGTAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 26: MSG 61

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGT
ACTATGTA CTGTAATTAAGGTTATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 27: MGT 69

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATTAATAATATTATGT
ACTATGTA CTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 28: MGT 77

GCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGACATTATGT
ACTATGTA CTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATATAATGT

Haplotipo 29: MGT 79

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTA CTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 30: MGT 111

CGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAATGGACGGGATACGCATGTTGA
CAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTA
CTATGTA CTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATAT
AATGTAATGT

Haplotipo 31: MGT 128

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 32: MGT 155

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT

Haplotipo 33: MSG 158

GCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTG
ACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGT
ACTATGTACTGTAGTTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATA
TAATGTAATGT