

**Estudio de la variabilidad genética del
Mazama gouazoubira (Mammalia: Cervidae)
Fischer, 1814.**



Claudia Elizondo

Orientador: Dra. Susana González

Departamento de Genética. Laboratorio de Genética de la
Conservación

IIBCE-Unidad asociada Facultad de Ciencias-UdelaR

Octubre, 2010.

AGRADECIMIENTOS.

Varias personas aportaron su ayuda con el objetivo de que esta tesis se hiciera realidad de la mejor manera posible; a todos ellas mi más sincero y eterno agradecimiento:

Al Dr. Mauricio D. Barbanti por brindarme muestras, guiarme y compartir su entusiasmo y conocimientos sobre estos ciervos tan fascinantes.

Al Msc. Alejandro Márquez, la Dra. Patricia Black de Decima, Dr. Rodrigo Texeira, Dr. Eduardo Tavares, Dr. Mariano Merino, Sr. Juan Villalba y Silvia Villar, por recolectar y facilitarme sus muestras.

Al excelente grupo de laboratorio, tanto a los “Humanos” como a los de “Conservación”, por ayudarme, acompañarme y ser parte de este trabajo. En especial al Marieta’s Specialist Group, que me bancaron, me ayudaron y me dieron fuerzas durante todos estos años.

A mis hermanas y amigos, por haberme acompañado y apoyado durante tantos años. Compartieron y aguantaron mi pasión por los animales. Me enseñaron a compartir y fueron un gran sustento en mi vida.

A las chicas, que nunca dejaron de creer y siempre destacaron lo mejor de mí. Me enseñaron a estudiar en grupo, a hacer cronogramas, pero por sobre todo, que el estudio también puede ser divertido. Realmente son una de las mejores cosas que me deja esta carrera.

A mis padres que me enseñaron entre tantas cosas, que en la vida hay que pelearla y nunca bajar los brazos si se quiere salir adelante. Me inculcaron el estudio, las responsabilidades, pero por sobre todo la motivación. Me dieron un ejemplo de vida y me hicieron lo que soy.

Un muy especial a Susana, quien me inspiro durante esta carrera, confió, apoyó, creyó y me dio fuerzas un sin fin de veces. Pero por sobre todo me inculcó conocimientos tanto en lo académico como en lo personal.

ÍNDICE

I-INTRODUCCIÓN.....	1
I.I- .Origen y evolución de los cérvidos en América del Sur.....	2
I.II- El género <i>Mazama</i>	3
I.III- El <i>Mazama gouazoubira</i>	5
I.IV- El ADN mitocondrial como marcador molecular.....	8
I.V- Importancia del tema.....	11
II- OBJETIVOS.....	12
II.I- Objetivo general.....	13
II.II- Objetivos específicos.....	13
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
III.I- Otención de la muestra.....	15
III.II- Trabajo de laboratorio.....	17
III.II.I- Extracción de ADN.....	17
III.II.II- Verificación de la calidad del ADN extraído.....	19
III.II.III- Amplificación del ADN mitocondrial.....	20
III.II.IV- Secuenciación.....	21
III.III- Análisis de las secuencias.....	22
III.III.I- Análisis de los polimorfismos de las secuencias.....	22
III.III.II- Análisis filogenético.....	22
III.IV- Medidas de variación genética.....	24
IV- RESULTADOS.....	27
IV.I- Extracción, amplificación y obtención de secuencias.....	28
IV.II- Análisis de las secuencias y variación genética intrapoblacional encontrada para <i>Mazama gouazoubira</i>	29
IV.III- Variación genética interpoblacional encontrada para <i>Mazama gouazoubira</i>	34
IV.IV- Análisis taxonómico entre <i>Mazama gouazoubira</i> y <i>Mazama nemorivaga</i>	38
V- DISCUSIÓN.....	39
V.I-Variabilidad genética inter e intrapoblacional del <i>Mazama gouazoubira</i> para el citocromo b.....	40
V.II-Análisis de los patrones filogeográficos del <i>Mazama gouazoubira</i> para el citocromo b.....	42

V.III- Análisis taxonómico entre <i>Mazama gouazoubira</i> y <i>Mazama nemorivaga</i>	45
V.IV- Implicancias para el manejo y la conservación.....	47
VI- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.....	49
VII- BIBLIOGRAFÍA.....	52
VIII- ANEXO.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Mapa de la distribución de la especie <i>Mazama gouazoubira</i> . Mapa extraído de la pagina de IUCN. ...	5
FIGURA 2 Foto de ejemplares de la especie, macho y hembra respectivamente. Obtenidas de la Web.	6
FIGURA 3 Las diferentes variantes morfológicas de la especie, Obtenidas de la Web.....	6
FIGURA 4 Esquema del genoma mitocondrial, en donde se señalan sus distintas regiones. En la misma se observa en color verde, la región Región Control y adyacente a la misma se observa la región de citocromo b	9
FIGURA 5 Localidades de muestreo. Se indica con símbolos de colores las distintas localidades de donde provienen las muestras. Mapa tomado de Google Earth.....	15
FIGURA 6 Árbol filogenético construido con Método de <i>Neighbor-Joining</i> (unión de vecinos), opción " <i>pairwise deletion</i> ", tomando en cuenta el número de diferencias de nucleótidos.....	33
FIGURA 7 Árbol filogenético interpoblacional obtenido mediante el programa Network 4.5.1.6. (Bandelt <i>et al.</i> , 1999). Indicando distancias génicas y frecuencias haplotípicas correspondientes.....	36
FIGURA 8 Árbol filogenético interpoblacional, construido con Método de Máxima parsimonia, con el programa MEGA 4.0.....	37
FIGURA 9 Árbol filogenético construido con Método de Neighbor Joining, con el programa MEGA 4.0. Para el fragmento de 226pb del gen del citocromo b, entre las especies <i>Mazama gouazoubira</i> y <i>Mazama nemorivaga</i>	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Información de las muestras analizadas. Se indica en cada columna, el nombre de la muestra, el país, la localidad, departamento o provincia y el colector de las muestras analizadas.....	16
TABLA 2 Mutaciones encontradas en las diferentes secuencias de los individuos respectivamente	30
TABLA 3 Distancia nucleotídica para la especie, según el método de Tamura & Nei. En color se representan los haplotipos compartidos.....	31
TABLA 4 Haplotipos encontrados para el fragmento de estudio, con sus respectivos individuos.....	32
TABLA 5 Matriz de distancias haplotípicas, entre grupos, mediante el Programa Arlequín con el método de Diferencias de Pares. 1: Brasil, 2: Perú, 3: Argentina, 4: Uruguay.....	34
TABLA 6 Diferentes corridas del análisis de varianza molecular entre las diferentes combinaciones. En violeta se observan los resultados de F_{st} y en verde los valores de F_{ct} , con los porcentajes de variación correspondiente. Según método Eucleideano de Excoffier <i>et al.</i> , (1992).	35
TABLA 7 Análisis de varianza molecular entre individuos de <i>Mazama gouazoubira</i> , a partir de la agrupación Perú, Uruguay y Argentina-Brasil. Se construyó una matriz de diferencias pareadas entre haplotipos utilizando método Eucleideano de Excoffier <i>et al.</i> , (1992).....	35
TABLA 8 Distancia nucleotídica entre los diferentes haplotipos, según el numero de diferencias, según el método de Pairwise distances, construido con el programa MEGA 4.0.....	37

RESUMEN.

El “Guazu bira” (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) es el cévido Neotropical autóctono del Uruguay. Ocupa un amplio rango geográfico que abarca desde la región Pre-andina en Argentina extendiéndose hasta la costa este del océano Atlántico, bordeando el sur de la Amazonas en Brasil, todo Uruguay hasta la provincia de Entre Ríos, Argentina. 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 al hábitat, el cual abarca desde densos bosques hasta sabanas arboladas o bosques abiertos (Duarte & Merino, 1997). Actualmente siguen habiendo muchas controversias en cuanto a la taxonomía y el estado de conservación del Guazu bira. A fin de evaluar los patrones de la variabilidad genética dentro de esta especie y esclarecer los patrones filogeográficos en toda su área se analizó un fragmento de 226 pb del gen codificante para el citocromo b (Cyt b) del ADN mitocondrial de 44 muestras recolectadas en diferentes localidades de, Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Perú. En este fragmento se identificaron 200 sitios conservados y 11 sitios polimórficos informativos. Diecisiete haplotipos fueron diagnosticados, estando sólo cuatro reportados entre las diferentes localidades Neotropicales. Se han encontrado altos niveles de variabilidad genética, con un índice de diversidad de haplotipos de 0,386. A pesar del pequeño tamaño muestral, se observa una tendencia discreta de las poblaciones 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 génico entre las localidades, con una leve tendencia hacia la divergencia. En base a este estudio se propone el manejo de las poblaciones de Uruguay como una metapoblación. Se realizó un análisis filogenético, entre las especies crípticas *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga*, el cual demostró que el fragmento de estudio es un buen marcador para el diagnostico de especies. Esto apoya sobre la eficiencia del fragmento de estudio; el cual con su pequeño tamaño facilita la amplificación de ADN de baja calidad, obtenidos por muestreos no invasivos.

I- INTRODUCCIÓN.

I- INTRODUCCIÓN.

I.I- Origen y evolución de los cérvidos en América del Sur.

El primer registro fósil de cérvido aparece en Eurasia, en el Mioceno, hace 20 millones de años. Hasta el presente, Eurasia es considerada como el centro de dispersión de los cérvidos, a partir del cual llegaron a América del Norte al comienzo del Pleistoceno, se cree que en el límite del Plio-Pleistoceno colonizaron América del Sur. El pasaje desde América del Norte hacia América del Sur fue mediado por el Istmo de Panamá, los “ciervos del Nuevo Mundo” tuvieron una gran radiación adaptativa de diferentes nichos, ya que no existían los bóvidos en este continente en ese entonces (Eisenberg, 1987; Duarte & Merino 1997, 2008; Webb, 2000).

Las especies de la familia Cervidae en América de Sur y Centro América se agrupan en seis géneros pertenecientes a la subfamilia *Odocoileinae* (Eisenberg, 1987; Eisenberg, 2000). Estos ciervos se pueden dividir según dos formas morfológicas principales, las especies de tamaño pequeño, con una altura menor a 60 centímetros (cm.) a la cruz en los adultos, cuyos machos desarrollan cortas astas sin ramificaciones en la madurez y las especies de mayor tamaño con astas ramificadas en los machos (Eisenberg, 2000).

Dentro de los cérvidos de gran tamaño se encuentran los géneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* y *Blastocerus*, y los géneros que forman parte de los cérvidos de pequeño tamaño son *Mazama* y *Pudú* (Eisenberg, 2000).

La evolución de los cérvidos, especialmente los Neotropicales, aun es incierta, debido a que el registro fósil es incompleto y escaso. Sin embargo se han realizado estudios filogenéticos basándose en caracteres morfológicos (Merino *et al.*, 2005), isozimas (Smith *et al.*, 1986), citogenéticos (Duarte & Merino, 1997) y con marcadores moleculares (Randi *et al.*, 1998; Pitra *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2006), obteniendo resultados similares pero no del todo concretos por lo que aun existen varias incógnitas sobre la historia y la relación filogenética de éstos (Duarte *et al.*, 2008).

Groves & Grubb (1987) y Duarte & Merino (1997) propusieron una evolución cromosómica basada en fusiones céntricas en tandem con una gran disminución en el número cromosómico. Esta forma de evolución se ha visto reflejada en estudios citogenéticos de la especie *Mazama gouazoubira*, en los cuales se observó una elevada ocurrencia de fusiones céntricas y presencia de bandas C intersticiales (Duarte & Merino, 1997). Esta evolución cariotípica se debe a que la familia Cervidae presenta una alta fragilidad cromosómica (Vargas-Munar, 2003).

I.II- El género *Mazama*.

Los ciervos del género *Mazama* (orden *Artiodactyla*, suborden *Ruminantia*, Infraorden *Pecora*, familia *Cervidae*, subfamilia *Odocoileinae*, tribu *Odocoelini*) presentan una amplia distribución en la región Neotropical, desde México hasta el Sur de Argentina (Allen, 1915; Groves & Grubb, 1987; Duarte & Merino, 1997; Eisenberg, 2000; Weber & González, 2003).

Este género habita zonas de bosques, florestas y sabanas, presentando tamaños medianos a pequeños, con astas simples de aproximadamente 12cm que se renuevan todos los años en los machos adultos. Presenta una gran diversidad en cuanto a los patrones de coloración que varían dentro de la gama de los marrones entre las diferentes especies (Allen, 1915; Duarte & Merino, 1997; 1998; Eisenberg, 2000; Weber & González, 2003).

Existe una gran controversia en cuanto a la taxonomía y número de especies dentro del género *Mazama* (Groves & Grubb, 1987; Duarte & Merino, 1997; Eisenberg, 2000; Weber & González, 2003, Duarte *et al.*, 2008, 2010).

La primera gran revisión taxonómica del género *Mazama* fue realizada a través de aspectos morfológicos por Allen en 1915. Allen clasifica al género en dieciocho especies, agrupándolas en dos grupos según la coloración del pelaje, los rojizos y los marrones.

Los rojizos son representados por las especies *Mazama triniatis*, *M. americana*, *M. rufa*, *M. Sheila*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. temama*, *M. zetta*, *M.*

guallea, *M. fuscata* y *M. zamora*. Mientras que los marrones son representados por *M. simplicicornis*, *M. murelia*, *M. tschudii*, *M. nemorivagus*, *M. superciliares*, *M. cita* y *M. pandora*.

Czernay en 1987 realiza una nueva revisión del género desde América Central hasta América del Sur, llegando a considerar como válido seis especies, *Mazama americana*, *M. gouazoubira*, *M. rufina*, *M. nana*, *M. chunyi* y *M. bricencii*. Considerando a *M. temama* como una subespecie dentro de *M. americana*. En 1998, Geist, vuelve a clasificarla como especie basándose en estudios cariotípicos (Duarte & González, 2010).

En 1988, Medellín *et al.* incluyen a *Mazama Pandora*, como nueva especie, en la península de Yucatán al sur de México, basándose en caracteres morfológicos y morfométricos.

En 1996, Duarte, describe una nueva especie para Brasil, *Mazama bororo*, basándose en datos cariotípicos, para lo que realizó una guía de identificación para Brasil de cinco especies del género *Mazama*, siendo éstas *Mazama americana*, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M.rondoni* y *M. bororo*.

Finalmente Rossi (2000) describe a *Mazama nemorivaga*, con una distribución desde México hasta Colombia, basándose en caracteres morfológicos, de esta forma se apoya lo predicho por Duarte & Jorge (1998), quienes propusieron que ésta no se debería considerar como una subespecie dentro de *Mazama gouazoubira*, basándose en un análisis citogenético entre éstas.

Dentro del género *Mazama* se diferencian las especies de *Mazama americana* y *Mazama gouazoubira* por poseer un tamaño mas grande que el resto de las especies (Eisenberg, 2000).

I.II.I- El *Mazama gouazoubira*.

El “Guazu bira” (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) es el cévido autóctono del Uruguay, tiene una distribución que abarca desde la región Pre-andina en Argentina extendiéndose hasta la costa este del océano Atlántico, bordeando el sur de la Amazonas en Brasil, todo Uruguay hasta la provincia de Entre Ríos, Argentina (Grubb, 2005).



Figura 1. Mapa de la distribución de la especie *Mazama gouazoubira*. Mapa extraído de la página de IUCN (IUCN, 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 al hábitat el cual abarca, desde densos bosques hasta sabanas arboladas o bosques abiertos (Duarte & Merino, 1997).



Figura 2. Foto de ejemplares de la especie, macho y hembra respectivamente. Obtenidas de la web, tomadas por Natalia Villanova y Liana John, respectivamente.

EL Guazu bira presenta una gran variabilidad morfológica externa en tamaño y coloración en su amplio rango geográfico, principalmente en el color de su pelaje, el cual varía desde el marrón en los individuos relacionados a la sabana, hasta el grisáceo en los relacionados al bosque (Duarte & Merino, 1997).



Figura 3. Foto de las diferentes variantes morfológicas de la especie, Obtenidas de la web, tomadas por Héctor Ramírez y Santiago Santo André, respectivamente.,

La dieta de la especie es poco conocida (Chébez & Johnson, 1984; Redford & Eisenberg, 1992; Richard & Juliá, 1995) y sólo existe información fragmentaria de la composición de la misma para el Chaco Boreal Paraguayo (Stallings, 1984) y registros aislados para Surinam (Branan *et al.*, 1985), las Yungas (Richard *et al.*, 1995) y la Amazonía peruana (Bodmer, 1991). Richard & Juliá (2001) realizaron un estudio donde concluyeron que el Guazu bira es un

herbívoro altamente selectivo, en cuanto a las partes vegetales de mayor contenido energético y fácil digestibilidad, con una marcada tendencia hacia la frugivoría (Bodmer, 1991; Richard *et al.*, 1995), formando parte de su ingesta también hongos, arcillas y algunos artrópodos, de forma tal de obtener los requerimientos nutricionales, conformando una dieta variada.

Esta especie no es considerada en riesgo según la IUCN (International Union for Conservation of Nature) por el momento, sin embargo presenta una gran disminución poblacional producida por la caza deportiva y furtiva y se desconoce el porcentaje de juveniles afectados por ésta (Black, & Vogliotti, 2008).

Hasta el momento la taxonomía de la especie es incierta, dado que es un grupo muy diverso con pocos registros y estudios a nivel molecular como morfológico. Se cree que más de un morfotipo puede estar mal clasificado y que pueden faltar subespecies por describirse (Duarte & Merino, 1997.; Weber & González, 2003). En 1959, Ávila-Pires describen 10 subespecies para la especie, mientras que en 1987, Czernay reclasifica las diversas formas descritas, llegando a la conclusión de que faltan al menos dos subespecies al norte de la región Neotropical (Duarte & Merino, 1997; Weber & González, 2003).

Se creía que el *Mazama gouazoubira* estaba distribuido en toda América del Sur, abarcando desde México hasta la provincia de Entre ríos en Argentina, basándose en estudios morfológicos los cuales caracterizaban y preponderaban al menos 6 subespecies de *Mazama gouazoubira* en toda su distribución (Cabrera, 1961; Czernay, 1987; Hershkovitz, 1951; Medellín *et al.*, 1998; Pinder & Leeuwenberg, 1997; Duarte & González, 2010).

Estudios genéticos, citogenéticos y morfológicos demostraron que se trataban de especies diferentes, que provenían de un ancestro común muy cercano (Duarte, 1996; Duarte & Merino, 1997; Duarte & Jorge, 1998; Rossi, 2000). Por lo que Rossi (2000) clasificó al *Mazama nemorivaga* como una especie aparte, diferenciándolos como el *Mazama* gris que habita desde México hasta Colombia, incluyendo la selva Amazónica y a *Mazama gouazoubira* como el *Mazama* gris que se encuentra desde Colombia hasta el centro de Argentina, bordeando la selva Amazónica.

Estas especies fueron catalogadas por Duarte *et al.*, (2008) como especies monofiléticas, donde también cuestionan su clasificación dentro del genero *Mazama*, dado que se encuentran mas emparentadas genéticamente con *H. bisulcus*, *B. dichotomus*, *H. antisensis* y *O. bezoarticus*.

I.III- El ADN mitocondrial como marcador molecular.

El ADN mitocondrial es un pequeño genoma extranuclear que se encuentra en la mayoría de los mamíferos. Consiste en una molécula de ADN doble hebra circular de aproximadamente 20000 a 30000 pares de base. Cada molécula tiene aproximadamente 37 genes funcionales sin espacios intergénicos grandes, de los cuales 13 codifican para proteínas, 2 para ARN ribosómico, 22 para ARN de transferencia y un segmento no codificante de 1000 pares de bases denominado Región control, donde se inicia la replicación y la transcripción (Taberlet, 1996).

Es transmitido sin recombinación por vía materna, por lo que presenta limitaciones, dado que refleja solo una porción de la variabilidad genética de un organismo, ya que solo hace inferencia sobre la historia de las hembras, dejando de lado la historia evolutiva de los machos, por ende del total de la población (Taberlet, 1996).

Exhibe una tasa de evolución entre cinco y diez veces mayor que el ADN nuclear, esta tasa es entre cuatro y cinco veces mayor dentro de la región control con respecto a las regiones génicas (Taberlet, 1996; Avise, 2000).

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 (Avise, 1995). La ausencia de recombinación simplifica los modelos para análisis de datos, dado que en presencia de ésta, como ocurre en el ADN nuclear, se observa que los genes neutros son mas sensibles a ser arrastrados en un desequilibrio de ligamiento con genes que se encuentran bajo algún tipo de selección natural (Márquez, 2002).

El gen del citocromo b del ADN mitocondrial tiene una variabilidad a nivel intraespecífica moderada, lo cual lo hace apropiado para estudios taxonómicos y filogenéticos (Kocher *et al.*, 1989). Cada célula contiene múltiples copias de ADN mitocondrial (entre 10 y 2500 copias) y éste sería el motivo que explicaría que la amplificación resulte mas fácil o efectiva con respecto a amplificar ADN nuclear, ya que se encuentra una única copia por célula de éste (González, 2005).

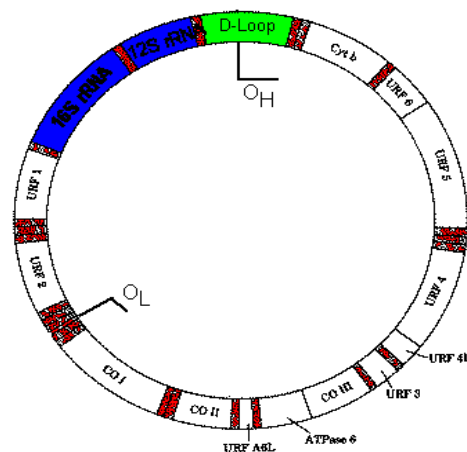


Figura 4. Esquema del genoma mitocondrial, en donde se señalan sus distintas regiones. En la misma se observa en color verde, la región Región Control y adyacente a la misma se observa la región de citocromo b-

El estudio de las secuencias de regiones del genoma mitocondrial ha sido utilizado para realizar relaciones taxonómicas a nivel interespecíficos (Wayne *et al.*, 1992; Avise, 1992; 2000; González *et al.*, 2002).

El marcador mitocondrial es una herramienta muy útil, a su vez, para detectar subdivisiones en la variación genética. Se han observado variaciones mínimas en aquellas poblaciones de especies entre las cuales el flujo génico es alto y las distancias de dispersión son grandes (Wayne *et al.*, 1992). En los casos en que las poblaciones corresponden a especies que se dispersan poco se han encontrado diferencias significativas entre ellas (Avise, 1992).

Este marcador molecular presenta ventajas para el análisis de poblaciones fragmentadas de Cérvidos por su vía de transmisión a través de

linajes maternos. En los ciervos generalmente se observa que el grado de dispersión y flujo génico es muy asimétrico entre sexos, siendo las hembras muy poco dispersas. A su vez, las hembras y sus crías están espacialmente asociadas (González *et al.*, 2002).

Una fuerte estructuración de los linajes maternos implica un grado considerable de autonomía demográfica entre poblaciones a través de una escala de tiempo ecológica (González *et al.*, 2002).

La distribución espacial de los linajes de genes se puede determinar por medio de la filogeografía, la cual se define como el ámbito que estudia los principales procesos que rigen la distribución geográfica de aquellos linajes genealógicamente cercanos, relacionando procesos históricos y filogenéticos. Esto la hace una gran herramienta para observar la divergencia y reestructuración inter e intrapoblacional así como la intra e interespecífica (Avice, 2000).

I.IV- Importancia del tema.

Hasta el momento las especies del género *Mazama* han sido clasificadas de acuerdo al concepto tipológico de especie, en el cual las especies se definen según características morfológicas que diagnostican un grupo y las diferencian de otros (García, 2000).

Debido a esta clasificación, siguen existiendo muchas controversias en cuanto a la taxonomía y el estado del “Guazu bira”, por lo que se desconoce el número exacto de subespecies que presenta (Duarte & Merino, 1997; Weber & González, 2003). Con el desarrollo de las técnicas de genética molecular se tornará posible un enfoque filogenético de especie, donde cada especie es un clado, cada clado es un taxón monofilético, constituyendo la menor unidad evolutiva (García, 2000), por lo que se podrá llegar a una clasificación más clara de la especie.

La conversión de los ambientes como consecuencia de las actividades antropogénicas, han alterado los pastizales, bosques y humedales nativos. Esto ha derivado en la fragmentación de habitats, y como consecuencia, las poblaciones de mamíferos como el caso del “Guazu bira”, se encuentran aisladas limitando el flujo génico entre las poblaciones (González *et al.*, 1998; Wemmer, 1998). Hasta el momento no existe un relevamiento completo sobre la especie, siendo necesaria una urgente evaluación que permita obtener información acerca de los patrones de distribución y estatus poblacionales.

II- OBJETIVOS.

II- OBJETIVOS.

II.I- Objetivo general.

- Estimar los patrones filogeográficos y los niveles de variabilidad genética que presenta el *Mazama gouazoubira* para el marcador mitocondrial Citocromo b.

II.II- Objetivos específicos.

- Analizar la variabilidad a nivel inter e intrapoblacional que presenta la especie para el Citocromo b.
- Determinar si existen subestructuración y flujo génico entre las poblaciones analizadas.
- Comparar y analizar si es posible detectar diferenciación filogenética en el fragmento analizado con individuos de *M nemorivaga*.

III- MATERIALES Y MÉTODOS.

III- MATERIALES Y MÉTODOS.

III.I- Obtención de la muestra.

Se utilizaron un total de 44 muestras tanto de tejidos (piel, pelos y músculo) como de fecas, de ejemplares de *M. gouazoubira* provenientes de las diferentes localidades Neotropicales (Argentina, Brasil, Paraguay, Bolivia y Uruguay), depositadas en la colección del laboratorio de Genética de la Conservación del IIBCE.

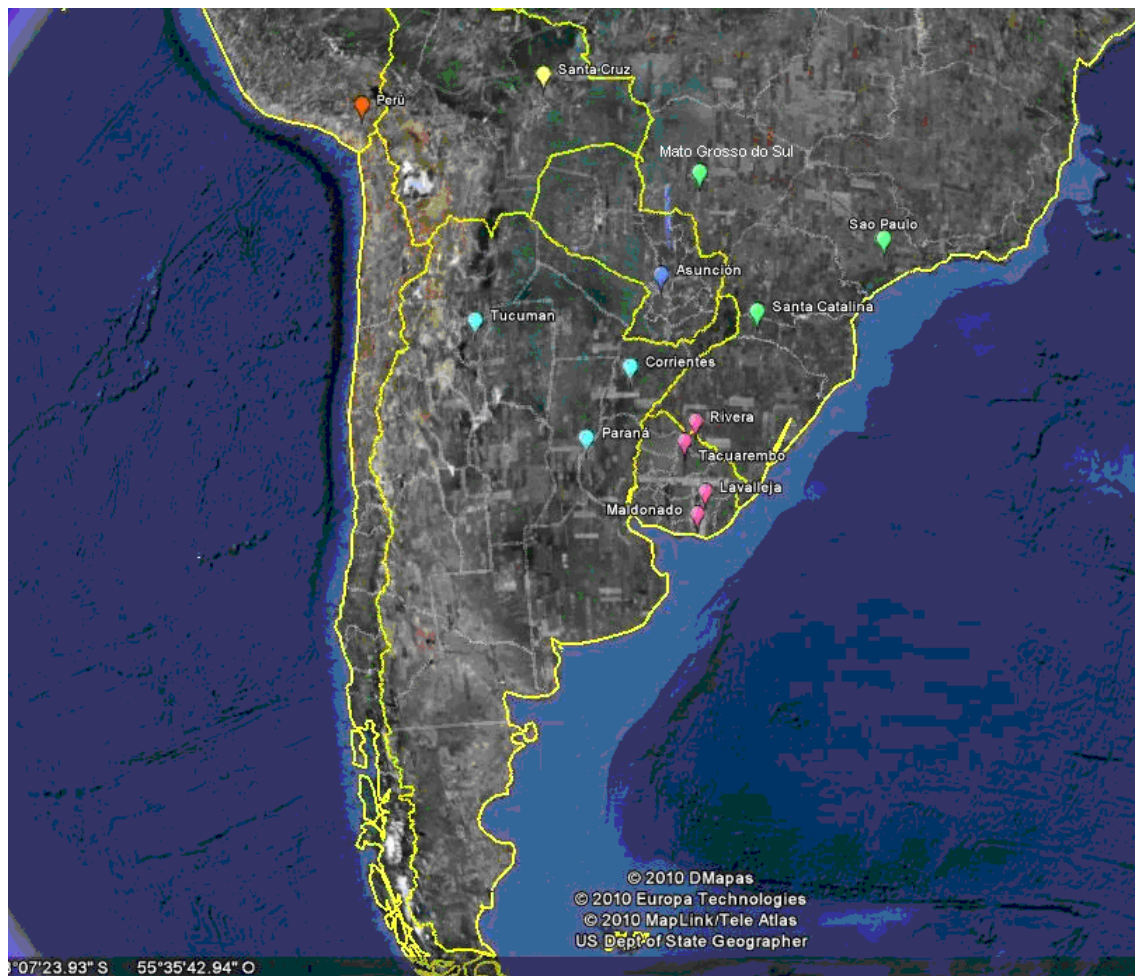


Figura 5- Localidades de muestreo. Se indica con símbolos de colores las distintas localidades de donde provienen las muestras. Mapa tomado de Google Earth.

Las muestras fueron proporcionadas por diferentes colectores a partir de animales muertos encontrados en la naturaleza, fecas, o de animales en

cautiverio de los zoológicos, de Asunción (Paraguay), Minas y Lecocq (Uruguay), Soorocaba (Brasil), Santa Cruz (Bolivia) y por la reserva de Horco Molle de Tucumán (Argentina).

Tabla 1- Información de las muestras analizadas. Se indica en cada columna, el nombre de la muestra, el país, la localidad, departamento o provincia y el colector de las muestras analizadas.

Muestras	País	Localidad	Departamento/Estado	Colector
MSG 001	Uruguay		Minas	Susana González
MSG 014	Bolivia		Sta Cruz	Mauricio Barbanti
MSG 033	Brasil		San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 034	Brasil		San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 036	Brasil		San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 040	Uruguay		Minas	Amalia Villalba
MSG 043	Brasil	Piedade	San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 044	Brasil	Piedade	San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 045	Brasil	Salto de Piriapora	San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 048	Paraguay		Asunción	Susana González
MSG 50	Uruguay	San Carlos	Maldonado	Susana González
MSG 52	Uruguay	P. Lecocq	Rocha	Susana González
MSG 053	Argentina	Hacienda Municipio de Lapa	Paraná	Fernanda Braga
MSG 055	Brasil	Ipera	San Pablo	Rodrigo Texeira
MSG 061	Brasil	Florianopolis	Sta. Catarina	Silvia Villar
MSG 064	Argentina		Tucuman	Patricia Black
MSG 66	Argentina	Este de Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 068	Argentina		Corrientes	Alejandro Marquez
MSG 70	Perú			Mariano Merino
MSG 74	Argentina	Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 75	Argentina	Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 76	Argentina	Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 77	Argentina	Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 79	Argentina	Tucuman	Tucuman	Patricia Black
MSG 85	Uruguay	Rivera	M'Bopicua	Juan Villalba
MSG 088	Uruguay	Aguas Blancas	Lavalleja	Juan Pablo
MSG 89	Uruguay	Rocha	Laguna de Rocha	Mariana Cosse
BV1 01	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
BV1 02	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
BV1 03	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
BV1 08	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
LC 02	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
LC 03	Uruguay		Tacuarembó	Susana González
MSG 325	Uruguay		San Carlos	Eduardo Tavares
MSG 330	Uruguay		Tacuarembó	Eduardo Tavares
ZVC-H 1730	Uruguay	San Carlos	Maldonado	Amalia Villalba
T69	Brasil		Rio Branco	Mauricio Duarte
T101	Brasil	Palmas	Tocantis	Mauricio Duarte
T111	Brasil	Jundiai	Sao Paulo	Mauricio Duarte
T112	Brasil	Bebedouro	Sao Paulo	Mauricio Duarte
T113	Brasil	Bebedouro	Sao Paulo	Mauricio Duarte
T155	Brasil	Faz Alegria-Ms	Mato Grosso do Sul	Mauricio Duarte
T158	Brasil	Faz Alegria-Ms	Mato Grosso do Sul	Mauricio Duarte
T209	Brasil	Intervalos	Sao Paulo	Mauricio Duarte

Las muestras fueron conservadas en etanol 95% hasta el momento de la extracción de ADN.

III.II- Trabajo de laboratorio.

III.II.I- Extracción de ADN.

Extracción de ADN de Tejidos.

La extracción de ADN a partir de tejidos conservados en etanol 95%, se realizó, según el protocolo de Medrano *et al.*, (1990).

En las extracciones de músculos y piel se uso aproximadamente 25mg de tejido, mientras que en las extracciones a partir de pelos, se utilizó un aproximado de 50 pelos con bulbo piloso. Para esto se utilizaron materiales estériles, como tijeras, pinzas y guantes, manipulando cada muestra por separado, con su respectiva pinza o tijera esterilizada, a modo de reducir al mínimo la probabilidad de contaminación.

El tejido se lavo 2 veces con buffer STE 1x, pH 8,0 frío (0,1M NaCl; 100mM Tris pH8,0; 1M EDTA pH8,0) centrifugando 1` (minuto) entre cada lavado y descartando el sobrenadante.

Se agregaron 550µl de buffer de lisis (50mM Tris, HCl; 1% SDS; 100mM NaCl; 1% beta mercaptoetanol) y 20µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó en baño a 55°C con agitación toda la noche, de modo en que se produzca la lisis celular.

El día 2 comienza con la adición de 5,5 µl de RNasa (10mg/ml), luego se deja incubar durante 1 hora, y se centrifugan las muestras a 14000rpm durante 10`.

Se transfiere el sobrenadante a un nuevo eppendorff, midiendo el volumen. Se agregó un volumen de 0,4 el volumen inicial de NaCl 5M, de forma tal de llevarlo a 2M, a los efectos de precipitar las proteínas. Luego se centrifugó durante 30`.

Del total del sobrenadante, se colocaron 400ml en un eppendorff y el resto en otro. En ambos casos se agregó el doble del volumen de etanol absoluto frío y se agitó lentamente de arriba hacia abajo, varias veces cada eppendorff para precipitar el ADN. Para que termine éste proceso se los dejó en la heladera a 4°C toda la noche.

Luego se centrifugaron las muestras por 30`, a 14000rpm, obteniendo un pellet de ADN. Se descartó el sobrenadante, y se realizaron dos lavados con 1ml de etanol al 70% con un centrifugado de 5` cada uno, descartando el sobrenadante luego de cada centrifugado. Se dejó secar en la estufa a 37°C durante 30` de forma tal que se seque el etanol remanente.

El ADN se diluyó con 100 µl de agua miliQ estéril por muestra y se dejó en la estufa hasta el otro día.

Extracción de ADN de Fecas.

Se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando el kit de extracción de ADN comercialmente disponible Dneasy Tissue Kit 250 de QIAGEN, utilizando el protocolo sugerido por los fabricantes. Siguiendo los pasos del mismo, se colocó en un eppendorff de 1.5 ml, una pequeña cantidad de la muestra de fecas a analizar, aproximadamente 25 mg, seleccionando la capa externa, ya que en esa zona se encuentran células de la mucosa intestinal. También se utilizaron materiales estériles, a modo de reducir al mínimo la probabilidad de contaminación.

Se le agregó 180ml de buffer Atl y 20ml de proteinasa K. Se mezcló dando golpecitos y se colocó en un baño a 55°C con agitación, durante toda la noche, de modo tal que la feca quede bien diluida.

Luego se agregó 200ml de buffer AL en los diferentes tubos, mezclando bien, sin vortexear, se encubó a 70°C en el baño durante 10`. Luego se agregó 200ml de etanol absoluto, con el fin de precipitar al ADN, mezclando bien nuevamente cada tubo.

Esto se colocó en una columna de 2ml en un eppendorff, y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Luego se descartó el eppendorff y se sustituyó por uno nuevo. Al mismo se le agregó 500ml de buffer AW1, para lavar el ADN y se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

Se colocó la columna en otro eppendorff de 2ml, y se agregó 500ml de buffer AW2. Se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 3 minutos y se saca el eppendorff nuevamente, finalizando la etapa de lavado.

Como último paso se debe extraer el ADN de la columna. Para esto se coloca un eppendorff de 2ml y se agregaron 50ml de buffer AE directamente en la membrana, esto se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. Se retira el eppendorff y se repite el último paso.

No se recomienda el uso de vórtex para el mezclado de las soluciones al trabajar con muestras fecales, ya que el ADN presente en los mismos se encuentra bastante degradado y es muy frágil, por lo que golpes fuertes podrían dañarlo aun más.

III.II.II- Verificación de la calidad del ADN extraído.

Se verificó la calidad y cantidad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1%, pH 8,0 y BrEt (5ug/ml).

Esta técnica se basa en el desplazamiento de macromoléculas cargadas sometidas a un campo eléctrico. Las moléculas de ADN se separan por tamaño a través de una matriz de gel. Dado que el ADN se encuentra cargado de forma negativa, la exposición del mismo a un campo eléctrico, provoca la migración de éste hacia el polo positivo del campo. Diferenciando las moléculas según su tamaño ya que la velocidad de migración es inversamente proporcional al tamaño.

La tinción con bromuro de etidio permite una fácil visualización, dado que es un agente intercalante que se introduce entre las bases del ADN y fluórese bajo la luz ultravioleta (UV) (Lewin, 2001). Esto se observa por medio de una cámara digital de luz UV, conectada a una computadora, con el programa Kodak 1D v 3.5.4.

También se cuantificó mediante una curva de absorbancia espectrofotométrica, por medio del equipo NanoDrop. Éste mide la concentración de ADN total mediante absorbancia a 260 nm; la calidad e integridad del ADN aislado se evaluó con la relación de absorbancia 260/280. Una relación 260/280 de 1,8 – 2,0, indica ADN puro, sin proteínas. Mediante las medidas de absorbancia 260/230 también se indican otras impurezas, como productos químicos orgánicos y contaminación de disolventes. (Vargas *et al.*, 2006; Thermo Fisher Scientific I. 2008).

III.II.III- Amplificación del ADN mitocondrial.

Se amplificó por medio de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), una parte de la región codificante para el gen del citocromo b (cyt b), del ADN mitocondrial, de modo de obtener una región de 460 pb aproximadamente, utilizando los cebadores L14724 (28 bases) y H15149 (34 bases) (Kocher *et al.*, 1989)

Siguiendo el protocolo descrito por González *et al.*, (2009).

Secuencia de los cebadores.

L14724 5´CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG3´

H15149 5´AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3´

Cada mezcla de PCR está compuesta por: aproximadamente 100ng de muestra de ADN, 1mM de dNTP en una reacción buffer de 50mM de KCl, 2.5mM de MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 8.8), y 1.25 U de Taq ADN polimerasa en un total de 23ul, la reacción contenía 25 pmoles de cada cebador, para un volumen final de 25µl.

Se ingresaron 35 ciclos de amplificación en el programa del termociclador (Perkin Elmer-Cetus, Model 480). Cada ciclo consistió de una desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, alineamiento a 50°C durante 120 segundos y extensión a 72°C durante 90 segundos. Con una desnaturalización inicial de 3` a 94°C y una extensión final de 7` a 72°C.

En todas las reacciones se incluyeron controles negativos para visualizar si existía contaminación, y controles positivos para cerciorar que la

región amplificada era la correcta y que los productos estaban en buenas condiciones, en caso de que no haya amplificación alguna en las distintas muestras.

Se realizaron numerosas reacciones de amplificación de la región de cyt. b. El éxito de las mismas se corroboró mediante el mismo método que para las extracciones de ADN, pero en este caso utilizando una concentración de agarosa de 2%. Los productos de PCR se colocaron en los diferentes pocillos, así como los controles negativos y positivos de los mismos, y un marcador de peso molecular de 100pb, de forma tal de corroborar que la región amplificada era la deseada.

III.II.IV- Secuenciación.

Una vez verificada la amplificación del fragmento de interés, éstos fueron secuenciados en el Instituto Pasteur de Montevideo, Unidad de Biología Molecular.

El servicio de secuenciación, cuenta con un secuenciador automático de 4 capilares ABI3130 (Applied Biosystems).

El método de secuenciación es el método enzimático de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), conocido como Método de los terminadores de cadena o dideoxi. Para este método resulta esencial disponer de un ADN molde (de cadena simple) y el cebador complementario a ésta. Éste se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I y se va a extender sobre la cadena de ADN molde copiando la forma complementaria, siendo éste el resultado obtenido, que será leído con el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

III.III- Análisis de las secuencias.

Se obtuvieron las secuencias correspondientes al fragmento de estudio para cada individuo. Con el fin de comprobar que efectivamente las secuencias de ADN obtenidas pertenecían a la especie *Mazama gouazoubira*, se realizó una búsqueda de secuencias utilizando la base de datos de el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esto se debió a que se trabajó principalmente con ADN extraído a partir de fecas recolectadas en el campo.

III.III.I- Análisis de los polimorfismos de las secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Se realizó un alineamiento con el mismo algoritmo para obtener una matriz de forma tal de observar los diferentes polimorfismos entre las secuencias. Todos los cambios (mutaciones, deleciones, inserciones) fueron confirmados de forma visual y manual, según éstos, se clasificaron las muestras en los distintos haplotipos.

III.III.III- Análisis filogenético.

Se alinearon en una matriz todas las secuencias obtenidas, con el programa MEGA 4.0. A partir de éstas se realizó una matriz de distancias genética con las 44 muestras, la cual fue calculada utilizando el método de Tamura & Nei recomendada para citocromo b en cérvidos según Randi *et al.*, 1998., de esta forma se diferenciaron los distintos haplotipos presentes en la muestras de estudio.

De forma tal de corroborar los haplotipos obtenidos por la matriz de distancias genética, se realizó un árbol filogenético, según el método de distancias pareadas entre secuencias, con el criterio de unión de vecinos

(Neighbor joining) como algoritmo de agrupamiento de los árboles (Saitou & Nei, 1987).

Los clados que no fueron confirmados por el método de Tamura & Nei (1993), fueron analizados de forma visual e independiente, por medio de la matriz de alineamiento con el programa MEGA 4.0.

Una vez confirmada la variabilidad haplotípica se prosiguió con el análisis de las diferentes poblaciones, utilizando árboles con el algoritmo de parsimonia. El algoritmo de parsimonia se basa en identificar entre todos los árboles, el que tenga menor número de pasos (menor número de mutaciones). Como algoritmos de agrupamientos de los árboles de distancias se utilizaron los mismos criterios que para el estudio de la variabilidad haplotípica, mientras que como algoritmo de los árboles de parsimonia se utilizó el criterio de búsqueda heurística con algoritmo de agrupamiento, "Unweighted parsimony".

Ambos árboles fueron construidos con el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) usando la opción "pairwise deletion" de forma tal de tener en cuenta la falta de información o dudas que se presenten.

Como otro modelo de evaluar las relaciones entre las secuencias de Guazu bira se construyó un esquema de relación entre haplotipos a partir de las diferencias pareadas de las secuencias ("Minimum Spanning Network", MSN) para poder dilucidar sobre el haplotipo basal y la evolución de éstos. Como medida de distancia se utilizaron las diferencias entre pares de secuencias. El MSN se construyó a partir de matrices realizadas con el programa DNAsp v5 (Rozas *et al.*, 2010) y el árbol de redes haplotípicas con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999).

De forma tal de observar si existe diferenciación filogenética en el fragmento analizado con individuos de *M nemorivaga*, se realizó un árbol filogenético, según el método de distancias pareadas entre secuencias, con el criterio de unión de vecinos (Neighbor joining) como algoritmo de agrupamiento de los árboles (Saitou & Nei, 1987).

III.III.III- Medidas de Variación Genética.

Para estudiar el grado de variación génica de la especie, se calculó el número de sitios polimórficos, a partir de las secuencias obtenidas.

El número de sitios polimórficos es una medida de la variabilidad genética que indica el número de loci que presentan más de un alelo por locus. Para calcularlo se utiliza la siguiente ecuación (Hartl, 2000):

$$S \text{ (Sitio Polimórfico)} = \text{sitios polimórficos} / \text{sitios totales}$$

Dentro de los sitios polimórficos se determinaron sitios informativos para parsimonia, transiciones, transversiones y presencia o ausencia de deleciones e inserciones.

A su vez, se calculó el *Número de Diferencias Pareadas (phi)*, que es el número de sitios en que difieren dos secuencias cualesquiera y se calculó el número de diferencias nucleotídicas entre los diferentes haplotipos.

Se calculó también el *índice de diversidad haplotípica (H)*, como la probabilidad de que dos haplotipos muestreados al azar sean idénticos dentro de la muestra:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Siendo n el número de copias del gen en la muestra, k el número de haplotipos y pi es la frecuencia en la muestra del i-ésimo haplotipo (Nei, 1987).

El efecto de la subdivisión de la población se midió por un parámetro denominado “índice de fijación” (F_{ST}). El cual indica la reducción promedio en la heterocigosidad de una subpoblación debido a la deriva génica en relación a lo esperado según Hardy-Weinberg. Este parámetro se utiliza como medida de

distancia genética entre las diferentes subpoblaciones (Wright, 1969; Ayala, 1982; Hartl, 1988).

$$F_{ST} = 1 - H_S / H_T$$

Los valores de diversidad haplotípica para Guazu bira, fueron calculados mediante el programa Arlequín versión 3.1, (Excoffier *et al.*, 2006), por medio de un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA), el cual permite deducir el grado de diferenciación entre poblaciones divididas geográficamente correspondiendo a resultados estadísticos análogos a los Estadísticos F (Excoffier *et al.*, 1992).

Este método estima la divergencia poblacional a partir de datos moleculares y pruebas de hipótesis sobre dicha diferenciación de forma de poder determinar la estructura de las poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992). Este programa utiliza las frecuencias haplotípicas y el número de mutaciones entre los diferentes haplotipos para evaluar la significancia de los componentes de la varianza molecular asociados con diferentes niveles jerárquicos, los cuales se caracterizan de la siguiente manera, dentro de poblaciones (Φ_{ST}), entre poblaciones dentro de los grupos (Φ_{SC}) y entre grupos (Φ_{CT}). Aquellas agrupaciones que maximizan los porcentajes de la varianza entre grupos, y minimizan los porcentajes dentro de grupos, se asumen que reflejan la subdivisión geográfica más probable (Excoffier *et al.*, 2006). Se tomó $\alpha = 0,05$ como nivel de significancia estadística, de manera que si el p-valor, es decir la probabilidad de aceptar la hipótesis nula es menor a 0,05, la misma se rechaza y si es igual o mayor a 0,05 se acepta (Sokal & Rolph, 1979).

Para construir la matriz a ser analizada mediante el programa Arlequín 3.1. Se alinearon todas las secuencias haplotípicas obtenidas de las diferentes regiones Neotropicales. En la misma cada grupo corresponde a un país sin hacer diferencia entre las distintas poblaciones presentes en los mismos. En vista de que se disponía solo una muestra de Bolivia, Paraguay y Perú, estas tres poblaciones fueron denominadas bajo el grupo “Perú”.

Se realizaron distintas corridas con el programa Arlequin 3.1 a partir de diferentes agrupaciones, tomando todas las combinaciones posibles. Esto nos permitió inferir de forma precisa la agrupación más probable dentro de las diferentes localidades analizadas.

IV- RESULTADOS.

IV- RESULTADOS.

IV.I. Extracción, amplificación y obtención de secuencias.

Se obtuvo un 100% de eficiencia sobre las extracciones de ADN de las muestras, ya que de todas se extrajo ADN, en menor o mayor concentración.

La verificación y cuantificación de la concentración de ADN, por medio de una curva de espectrofotometría, NanoDrop, indicó presencia de ADN en todas las muestras, con una pureza bastante elevada para las muestras de tejidos.

En el caso del ADN proveniente de fecas además de la banda de ADN se vio un “smear” característico de este método de extracción, producto del ADN degradado existente, por medio de la curva de espectrofotometría se observó que la pureza de estos ADN no era tan alta.

En el caso de las reacciones de amplificación, la eficiencia no fue de un 100% ya que se debió repetir la amplificación de varias muestras, principalmente de aquellas obtenidas a partir de fecas, dado que el ADN se encontraba muy degradado.

Tanto los controles positivos como los negativos, de las diferentes reacciones fueron todos exitosos, lo cual nos indicó que los reactivos y las reacciones de amplificación fueron buenos.

A partir de las amplificaciones realizadas, se escogieron para secuenciar aquellas muestras con bandas mejor definidas, de buena calidad, representativas de las distintas poblaciones de la región. Las muestras procesadas y secuenciadas se detallan en el Anexo 1.

Si bien se realizó una selección previa de las muestras a secuenciar, no se obtuvieron los resultados esperados en algunas de ellas, ya que presentaron en lugar de una región de 460pb una región de solo 260pb, con mucho “ruido” en los extremos, quedando tan solo 226pb limpios. Por este motivo fue necesario cortar todas las secuencias de forma tal de obtener fragmentos uniformes en cantidad de pares de base.

IV.II- Análisis del gen del citocromo b y variación genética intrapoblacional encontrada.

A partir de las secuencias alineadas se encontraron 26 sitios polimórficos, y 12 sitios informativos para parsimonia. Entre ellos se encontraron 11 transiciones y 1 transversión.

La proporción de sitios polimórficos es de 0.1150. No se observó ninguna inserción ni delección, lo cual era esperado dado que se trata de una región codificante y conservada, de un gen.

Tabla 2. Mutaciones encontradas en las diferentes secuencias de los individuos respectivamente.

Muestra	Posicion	Transición	Transversión	Cambio	S. Informativo
LC 02, MSG 89	1	X		C por T	SI
MSG 75	1		X	C por A	
BV1 03	5		X	T por A	
MSG 36, MSG 48, MSG 5, MSG 64	7	X		T por C	SI
LC 02	7	X		T por C	SI
T 113	8	X		A por G	
BV1 02, BV1 08	9	X		T por C	SI
MSG 52, MSG 79	16	X		C por T	SI
T 101, MSG 33, 34, 44, 45, T 111, 155, 158, 209	22	X		T por C	SI
MSG 75	29	X		A por G	
BV1 08, BV1 02	41	X		T por C	SI
BV1 03	44		X	T por A	
MSG 68	52	X		T por C	
MSG 68	59	X		C por T	
MSG 40, 77, 88, 330, 325, VC-H 1730	61	X		A por G	SI
LC 02, MSG 89	61		X	A por T	SI
MSG 68	71	X		T por C	
BV1 02	85		X	A por C	
MSG 40, 77, 88, 330, 325, VC-H 1730, BV1 08	91	X		T por C	SI
LC 03, MSG 85	118	X		T por C	SI
BV1 03	119		X	T por A	
T 101, MSG 33, 34, 44, 45, T 111, 155, 158, 209, MSG 85	151	X		T por C	SI
MSG 43, T 112	157	X		C por T	SI
BV1 08	163	X		C por T	
MSG 76	172	X		C por T	
BV1 02	187	X		T por C	
MSG 75	192	X		G por A	
MSG 36, MSG 48, MSG 5, MSG 64	223	X		T por C	SI
MSG 68	224		X	T por A	

El número de diferencias entre las secuencias varía desde 1 hasta 9.

Tabla 4. Haplotipos encontrados para el fragmento de estudio, con sus respectivos individuos

Haplotipo	Muestras	Países
A	BV1 01- MSG 50- MSG 14- MSG 61- MSG 66- MSG 53- MSG 001- T 69- MSG 74- MSG 70	Argentina, Bolivia, Brasil, Perú, Uruguay.
B	MSG 36- MSG 48- MSG 55- MSG 64	Argentina, Brasil, Paraguay
C	MSG 43- T 112	Brasil
D	MSG 52- MSG 79	Argentina, Uruguay
E	MSG 325- MSG 330- MSG 40- MSG 77- MSG 88- ZVC-H 1730	Argentina, Uruguay
F	LC 02	Uruguay
G	LC 03	Brasil
H	MSG 85	Argentina
I	MSG 89	Uruguay
J	BV1 03	Uruguay
K	BV1 08	Uruguay
L	BV1 02	Uruguay
M	MSG 75	Argentina
N	MSG 33- MSG 34- MSG 44- MSG 45- T 101- T111- T 155- T 158- T 209	Brasil
O	T 113	Brasil
P	MSG 76	Argentina
Q	MSG 68	Argentina

Se encontraron 6 haplotipos que no fueron únicos, de los cuales 4 se encuentran presente en las diferentes localidades Neotropicales.

El haplotipo A, está representado por 3 individuos de Uruguay, 3 de Argentina, 3 de Brasil y 1 de Bolivia. El haplotipo B se compone de 2 individuos de Brasil, 1 de Paraguay y 1 de Argentina. El D está compuesto por 1 individuo de Argentina y 1 de Uruguay; mientras que el E se compone de 5 individuos de Uruguay y 1 de Argentina.

A partir de las secuencias alineadas se realizó un árbol filogenético con el método de “Unión de Vecinos” de forma tal de observar la variabilidad de la especie

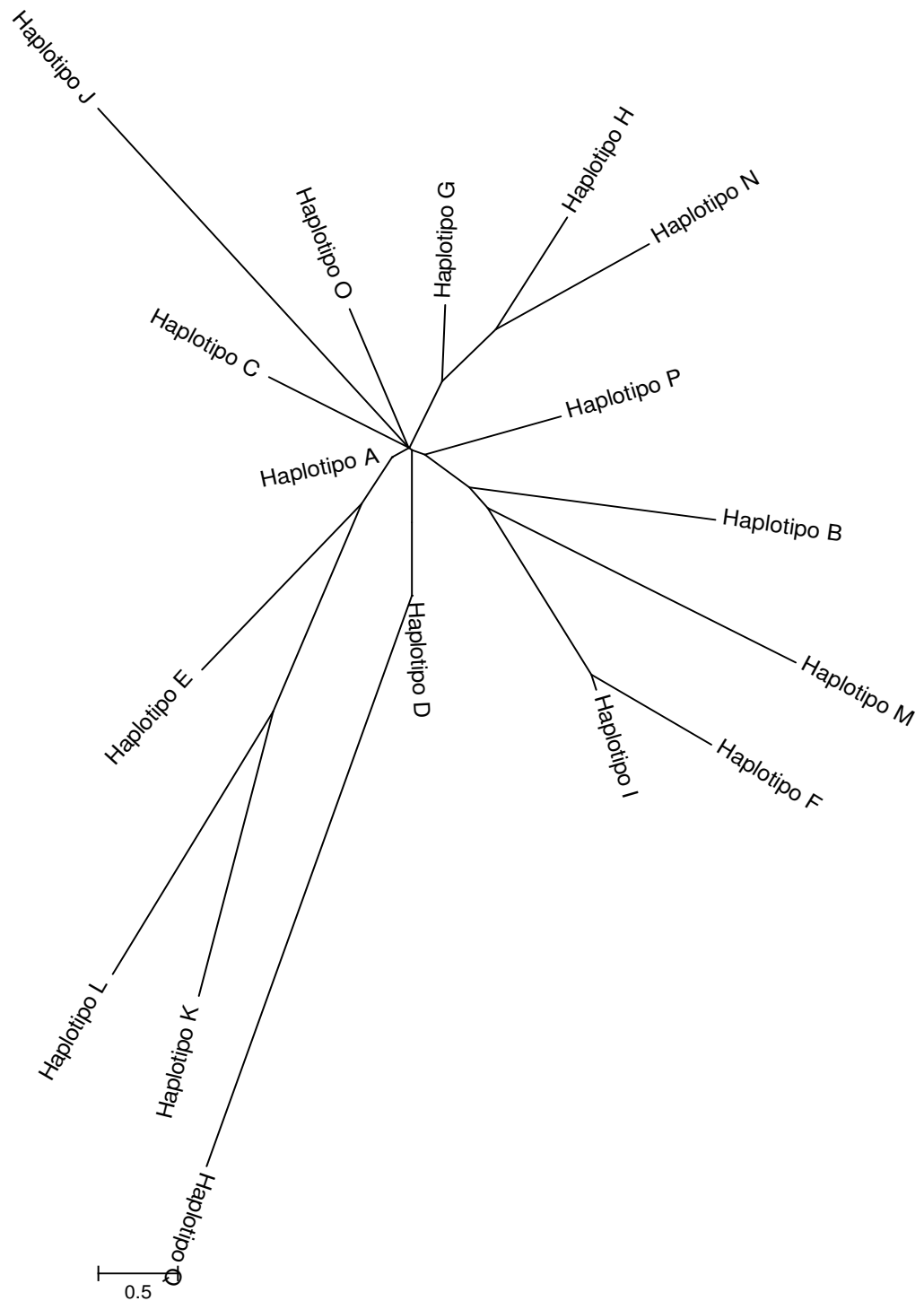


Figura 6. Árbol filogenético construido con Método de *Neighbor-Joining* (unión de vecinos), opción “*pairwise deletion*”, tomando en cuenta el número de diferencias de nucleótidos.

El índice haplotípico encontrado para la especie fue de 0,386. Las frecuencias relativas de la composición nucleotídica fueron:

C: 27.14% T: 31.71% A: 28.32% G: 12.83%

IV.III- Variación genética interpoblacional encontrada para *Mazama gouazoubira*.

A partir de las corridas realizadas mediante el programa Arlequin, se obtuvo una matriz de diferencias haplotípicas entre los diferentes grupos (países) donde se observó que el más divergente es Perú (Tabla 5).

Tabla 5. Matriz de distancias haplotípicas, entre grupos, obtenida con el programa Arlequin con el método de Diferencias de Pares. 1: Brasil, 2: Perú, 3: Argentina, 4: Uruguay.

	1	2	3	4
1	0.00000			
2	0.60207	0.00000		
3	0.03860	0.62737	0.00000	
4	0.29434	0.74203	0.29430	0.00000

Se realizó un análisis AMOVA para evaluar los niveles jerárquicos de variación genética dentro y entre las diferentes localidades. Se realizaron diferentes corridas con todas las combinaciones posibles entre las diferentes localidades, de forma tal de poder observar cual de las agrupaciones es la más probable, siendo ésta la agrupación Argentina-Brasil (Tabla 6). Ésta obtuvo una variación intrapoblacional que presentó un valor de 56,05%. El valor correspondiente al estadístico F_{ST} es de 0.43953 ($p = 0.00$), lo que podría indicar una tendencia hacia la divergencia entre las poblaciones (Tabla 7).

Tabla 6. Diferentes corridas del análisis de varianza molecular entre las diferentes combinaciones. En violeta se observan los resultados de Fst y en verde los valores de Fct, con los porcentajes de variación correspondiente. Según método Eucleideano de Excoffier *et al.*, 1992. Los resultados señalados en negrita, son los correspondientes a la agrupación Argentina-Brasil, siendo éstos los más significativos.

Argentina		0,30395 30,39	0,13998 14,0	0,02192 2,19
Brasil	0,43953 56,05		-0,5946 -5,93	- 0,13702 - 13,70
Uruguay	0,24308 75,69	0,20025 79,98		0,01355 1,36
Perú	0,21801 78,20	0,20988 79,01	0,21809 78,19	

Tabla 7. Análisis de varianza molecular entre individuos de *Mazama gouazoubira*, a partir de la agrupación Perú, Uruguay y Argentina-Brasil. Se construyó una matriz de diferencias pareadas entre haplotipos utilizando el método Eucleideano de Excoffier *et al.*, 1992.

*Indica probabilidad de los índices de fijación (F) usando la aproximación permutacional propuesta por Excoffier *et al.*, (1992) (valores significativos con $\alpha = 0.05$).

Fuente de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de la variación	Estadísticos F
Entre grupos	2	31.213	0.89501 Va	30.39	FCT: 0.30395 * (p=0.01419)
Entre pobl. dentro de grupos	1	6.025	0.39926 Vb	13.56	FSC: 0.19479 * (p=0.00098)
Dentro de poblaciones	38	62.714	1.65038 Vc	56.05	FST: 0.43953 * (p=0.00000)

A partir de la matriz fasta del programa MEGA, se realizaron diferentes matrices con el programa DNAsp v5 (Rozas *et al.*, 2010) de forma tal de obtener una matriz de redes haplotípicas con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999) para poder dilucidar sobre el haplotipo basal y la evolución de éstos (Figura 7).

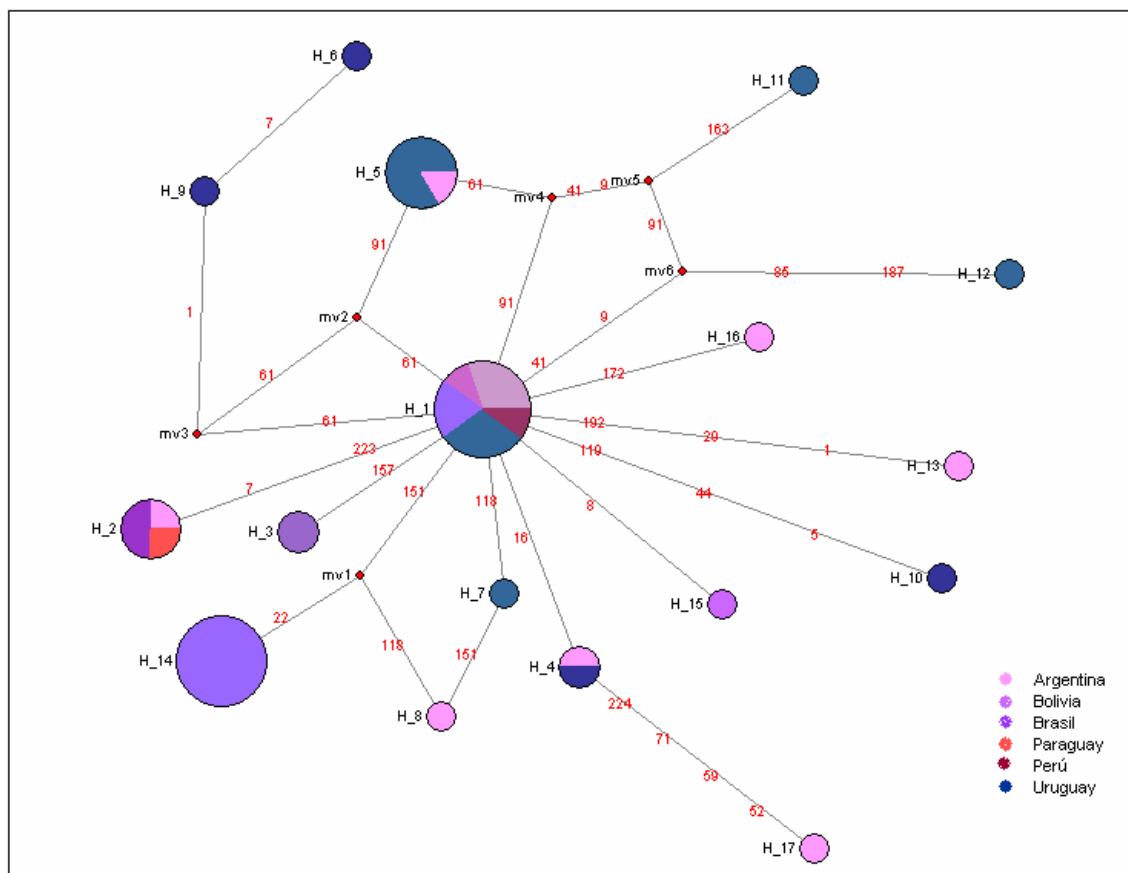


Figura 7. Red haplotípica interpoblacional obtenido mediante el programa Network 4.5.1.6. (Bandelt *et al.*, 1999). Indicando distancias génicas y frecuencias haplotípicas correspondientes.

Con el fin de verificar los resultados obtenidos con el programa Arlequín 3.1 se realizó un árbol filogenético por Máxima parsimonia con el programa MEGA 4.0 (Figura 8).

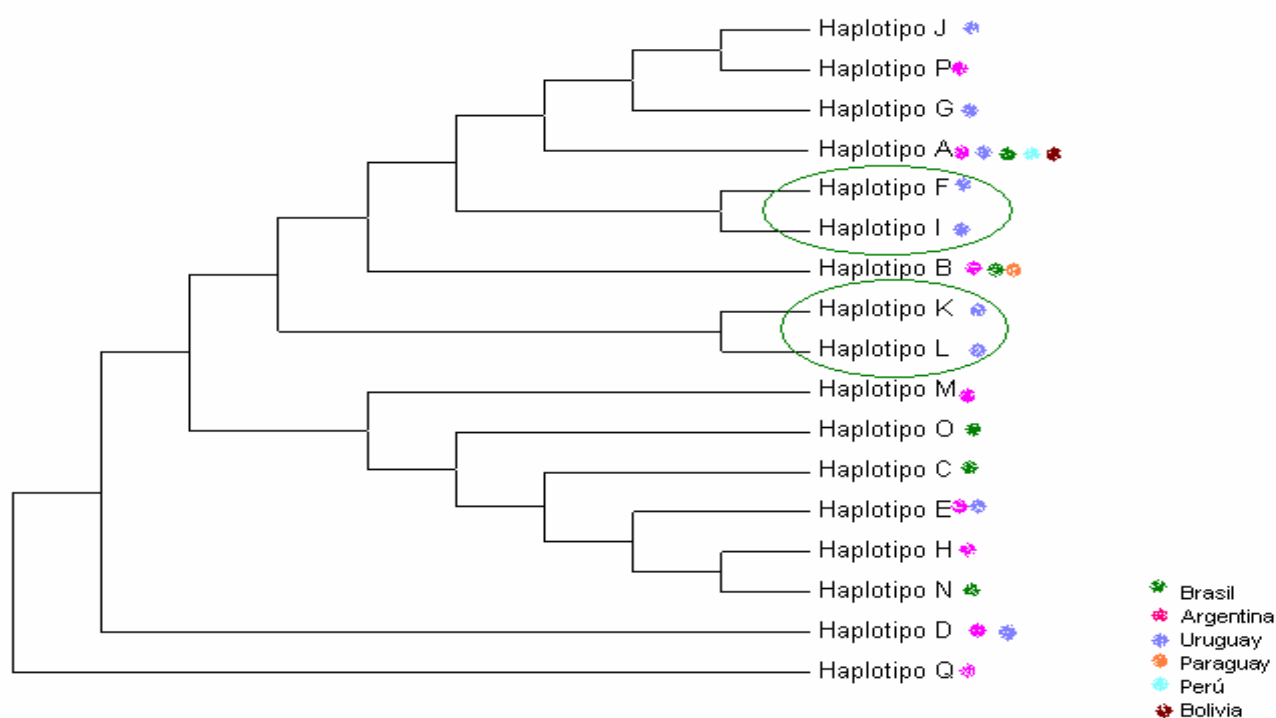


Figura 8. Árbol filogenético interpoblacional, construido con Método de Máxima parsimonia, con el programa MEGA 4.0.

Con el programa MEGA 4.0 también se realizó una matriz de distancias nucleotídicas según el número de diferencias de pares de bases entre los haplotipos (Tabla 8).

Tabla 8. Distancia nucleotídica entre los diferentes haplotipos, según el numero de diferencias, según el método de Pairwise distances, construido con el programa MEGA 4.0.

Haplotype_A																
Haplotype_B	2															
Haplotype_C	1	3														
Haplotype_D	1	3	2													
Haplotype_E	2	4	3	3												
Haplotype_F	3	3	4	4	4											
Haplotype_G	1	3	2	2	3	4										
Haplotype_H	2	4	3	3	4	5	1									
Haplotype_I	2	4	3	3	3	1	3	4								
Haplotype_J	3	5	4	4	5	6	4	5	5							
Haplotype_K	4	6	5	5	4	7	5	6	6	7						
Haplotype_L	3	6	5	5	6	7	5	6	6	7	4					
Haplotype_M	3	4	4	3	5	4	4	4	4	6	7	7				
Haplotype_N	2	4	3	3	4	5	3	2	4	5	6	6	5			
Haplotype_O	1	3	2	2	3	4	2	3	3	4	5	5	4	3		
Haplotype_P	1	3	2	2	3	4	2	3	3	4	5	5	3	3	2	
Haplotype_Q	5	7	6	4	7	8	6	7	7	8	9	9	8	7	6	6

IV.IV- Análisis taxonómico entre *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga*.

Se realizó una filogenia con los haplotipos encontrados en este trabajo y 3 secuencias de *M. nemorivaga* obtenidas del GeneBank, números de acceso: DQ789205, DQ789206, DQ789226, para esta región del gen del citocromo b (Figura 9).

A partir del análisis filogenético se observan dos clados claramente diferenciados con este pequeño fragmento del citocromo b con un alto soporte de bootstrap.

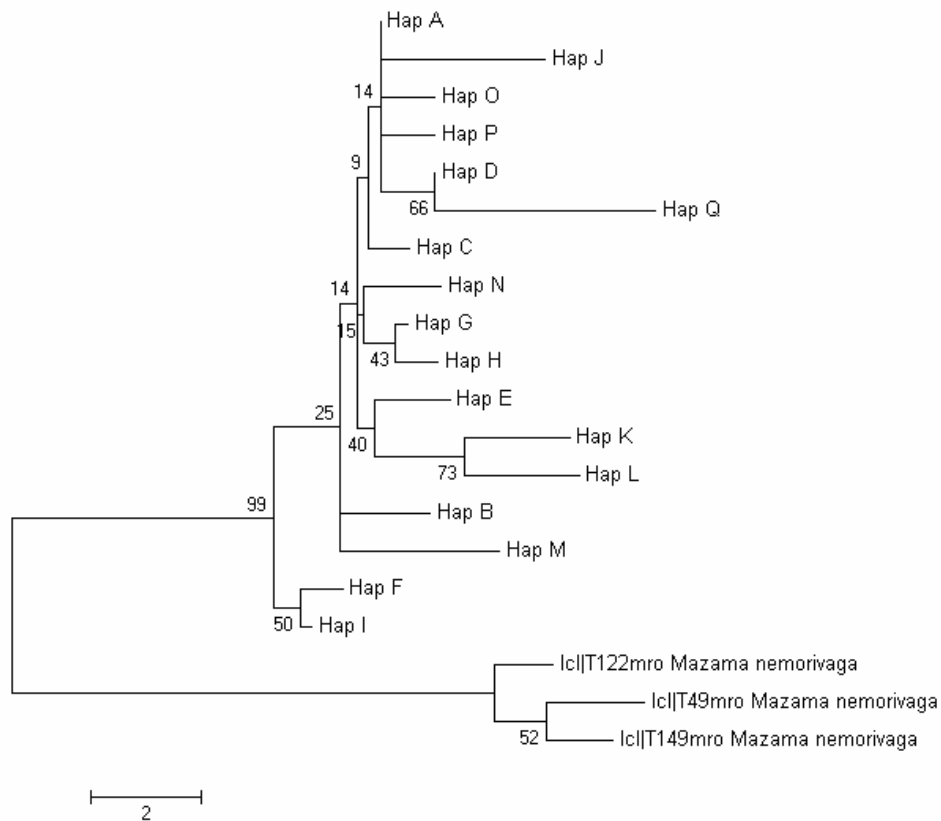


Figura 9. Árbol filogenético construido con algoritmo de Neighbor Joining, con el programa MEGA 4.0. Para el fragmento de 226pb del gen del citocromo b, entre las especies *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga*.

V- DISCUSIÓN.

V- DISCUSIÓN.

V.I- Variabilidad genética inter e intrapoblacional del *Mazama gouazoubira* para el citocromo b.

A partir de las muestras analizadas, se obtuvo una secuencia de 226pb de la región codificante para el gen del citocromo b. Se encontraron 17 haplotipos de un total de 44 individuos estudiados para esta región, con una proporción de sitios polimórficos de 0,1150 y un índice haplotípico de 0.386.

De los 17 haplotipos mencionados anteriormente se observaron 6 compartidos, de los cuales 4 lo son entre las diferentes localidades Neotropicales.

Se observó una diferencia muy marcada respecto a las frecuencias y localidades correspondientes a los distintos haplotipos. Los más frecuentes son: el haplotipo A con una frecuencia de 0.23, presente en individuos de las diferentes localidades Neotropicales de Argentina, Brasil, Bolivia y Uruguay, y el haplotipo N, con una frecuencia de 0.21, en individuos de Brasil. El resto de los haplotipos fueron observados en muy baja frecuencia. El B con una frecuencia de 0.09, presente en individuos de Argentina, Brasil y Paraguay; el C con una frecuencia de 0.05, encontrado en individuos de Brasil; y el D con igual frecuencia que el anterior se observó en individuos de Argentina y Uruguay. Los haplotipos F, G, I, J, K y L (correspondientes a Uruguay), H, P y Q (Argentina) y el O de Brasil, presentaron una frecuencia de 0.02.

Se encontró una alta variabilidad de la especie para la región de estudio, al igual que en el trabajo de Bidegaray (2003). Este autor encontró, en un fragmento de 423 pb del mismo gen, un índice haplotípico de 0.632 para una muestra de 19 individuos de diferentes localidades Neotropicales de Uruguay, Argentina, Brasil y Bolivia.

Al igual que en el presente trabajo, Abril *et al.* (2010) en su estudio realizado sobre la variabilidad del *Mazama americana* en Brasil encontraron

una variabilidad muy grande, en un fragmento de mayor tamaño del mismo gen. Podemos decir que los niveles de variabilidad encontrados para *M. americana* y *M. gouazoubira* son esperados, dado que se trata de especies con una gran variabilidad morfológica, que presentan grandes controversias en cuanto a su taxonomía y al número de subespecies descriptas.

En otras especies de ciervos Neotropicales, como el venado de campo, *Ozotoceros bezoarticus*, Repetto (2007) encontró una variabilidad muy baja para un total de 417pb de la región estudiada, observando un índice haplotípico de 0.090, para una población de 500-600 individuos en la provincia de San Luis, Argentina. En base a esto pudo indicar que la región analizada para esta especie se encuentra muy conservada, lo cual difiere con lo encontrado para *M. gouazoubira*.

En cuanto al uso del marcador seleccionado, Abril *et al.* (2010) reafirmaron la utilidad de éste para analizar y discriminar unidades evolutivas significativas. En su trabajo con *Mazama americana*, Abril *et al.* (2010) observaron 2 clados según diferentes localidades Neotropicales, para citocromo b, los cuales fueron confirmados con estudios citogenéticos.

La variabilidad observada en este trabajo, como en el de Repetto (2007) sustenta la utilidad del fragmento analizado, para el estudio de variabilidad dentro de una especie, pudiendo discriminar variantes alélicas.

V.II- Análisis de los patrones filogeográficos del *Mazama gouazoubira* para el citocromo b.

Se calculó por medio de un análisis AMOVA la variación intrapoblacional, donde se obtuvieron 6 resultados a partir de diferentes combinaciones de a 2 entre las diferentes localidades. En todos los casos se obtuvo un F_{st} mayor a 0,2, lo que indica una gran variabilidad de la especie en las diferentes localidades. Sin embargo el valor de F_{ct} obtenido varía entre 0,3 y -0,59 lo que indica que la variación entre los grupos no es homogénea.

El mejor resultado se obtuvo con la agrupación de Argentina y Brasil, con un porcentaje de variación entre poblaciones de 56.05 con un valor correspondiente de F_{st} de 0.43953 ($p= 0.00$) y un porcentaje de variación dentro de las poblaciones de 30.39 con un F_{ct} de 0.30395 ($p= 0.01419$). Estos valores indican una variabilidad dentro de las poblaciones muy grande, con una tendencia bastante marcada hacia la divergencia.

El análisis de diversidad genética realizado por medio del análisis AMOVA, análogo a los estadísticos F, se llevó a cabo con un nivel de significancia estadística $\alpha = 0,05$; por lo que todos los resultados obtenidos fueron significativos, dado que no se obtuvieron resultados de p-valor menores a 0,05 en ninguna de las corridas realizadas.

Márquez *et al.* (2006) estudiaron dos regiones del ADN mt, la región del gen del citocromo b y la región D-Loop de la región control, para *Blastoceros dichotomus* (Ciervo de los Pantanos) de diferentes localidades Neotropicales (Argentina, Brasil y Bolivia). En un fragmento más grande al analizado en este trabajo, obtuvo una variabilidad muy baja, solo 4 haplotipos en 44 individuos, mientras que en este trabajo se encontró una variabilidad muy alta para tan solo 226pb.

Esto coincide con lo descrito por Duarte & Merino (1997) y Grubb (2005) para la especie, con respecto a que el Guazu bira es una especie con una diversidad muy alta tanto a nivel geográfico como poblacional, mientras que el Ciervo de los Pantanos es una especie con muy poca diversidad.

A partir de los resultados obtenidos con el programa NETWORK, se pudo observar que el haplotipo basal es el A, siendo éste compartido entre diferentes localidades Neotropicales. Este resultado junto con la forma de estrella de la red haplotípica obtenida, corroboran lo inferido por Duarte *et al.* (2008) con respecto a la gran expansión geográfica y demográfica que sufrió esta especie, ocasionando grandes niveles de variabilidad morfológica y genética, lo cual se ve inducido por la baja dispersión de la especie (Duarte *et al.*, 2008; Pinder, 1997; Vogliotti, 2004).

Se pudo observar por medio de los resultados obtenidos con los diferentes programas, que el haplotipo más divergente es el Q, correspondiente a Argentina y lo siguen los haplotipos J y k de Uruguay. J y Q fueron los más divergentes entre ellos, mientras que F e I correspondientes a Uruguay, resultaron ser los más cercanos.

A partir de las filogenias realizadas con el programa MEGA 4.0 se observa que algunas poblaciones de Uruguay se encuentran muy cercanas entre ellas. Por otra parte con la matriz de redes haplotípicas realizada con el programa Network, se determinó un relacionamiento muy estrecho entre los haplotipos de Uruguay. A partir de estos resultados se puede concluir que existe una pequeña estructuración poblacional con una divergencia haplotípica reciente, lo cual se deberá tener en cuenta al momento de implementar unidades de manejo y conservación.

Al igual que en este trabajo, Duarte *et al.* (2008) encontraron varios haplotipos de diferentes localidades geográficas, por medio de un estudio filogenético en el cual caracterizaron 1000 pb del gen del citocromo b en *Mazama gouazoubira*. De aquí determinaron que la especie posee una amplia plasticidad ecológica, lo que le permite adaptarse fácilmente a los diferentes ambientes. Esto los llevó a concluir que la especie fue capaz de colonizar diferentes ambientes en los ciclos secos y húmedos del Pleistoceno, resultando en niveles de especiación geográfica bajos. Se puede decir que los altos niveles de variabilidad encontrados para este marcador se deberían a una gran expansión geográfica y demográfica a inicios del Pleistoceno (hace un millón de años aproximadamente) en Sudamérica (Duarte *et al.*, 2008).

Los mismos resultados fueron obtenidos en estudios realizados en otras especies de cérvidos Neotropicales, como por ejemplo en *Ozotoceros bezoarticus* para el cual se determinó que su ancestro existió durante el Pleistoceno, hace aproximadamente 2 millones de años en la formación Pampeana, dispersándose hacia el sur y participando en el intercambio de especies entre el norte y el sur de América (Marshall *et al.*, 1984; Stehli & Webb, 1985). A partir de esto los cérvidos se distribuyeron por toda Sudamérica, ocupando distintos tipos de nichos (Eisenberg 1987). González *et al.* (1998) realizaron un estudio para la región control del ADN mitocondrial, donde observó que la gran divergencia encontrada para la región correspondía con lo predicho sobre la expansión geográfica y demográfica para *Ozotoceros bezoarticus*.

Por el contrario, Márquez *et al.* (2006) encontraron una variabilidad muy baja para *Blastocerus dichotomus* mediante el análisis de la región D-loop de 127 individuos de diferentes localidades. Los autores interpretaron que los bajos niveles de diversidad genética reflejan probablemente la historia demográfica de la especie, que incluyó períodos de poblaciones pequeñas durante el Pleistoceno, afectando la dinámica de las mismas (Márquez *et al.*, 2006).

V.III- Análisis taxonómico entre *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga*.

Una de las grandes incógnitas sobre la clasificación morfológica de los mazamas grises es dilucidar si *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga* son dos especies crípticas. Las clasificaciones efectuadas que fueron basadas en el modelo tipológico de especie, no han sido eficientes para discriminar entre especies con morfotipos tan similares (Duarte & Merino, 1997; Weber & González, 2003).

La controversia surge cuando Bisbal (1991) hizo hincapié sobre la clasificación errónea del *M. nemorivaga* como subespecie del *M. gouazoubira*, dado que en su estudio observó que ellas ocupaban habitats muy diferentes. Posteriormente Duarte & Jorge (1998) encuentran en un estudio citogenético para el género *Mazama*, diferencias en el número y composición de los cromosomas de ambas especies; siendo el número cromosómico para *Mazama gouazoubira* de $2n=70$, mientras que para *Mazama nemorivaga* el número cromosómico es de $2n=67 - 69$. En base a estos datos Duarte & Jorge (1998) propusieron considerar a éstas como especies diferentes.

Finalmente Rossi (2000) en una amplia revisión morfológica del género *Mazama* diferenció también las dos especies, *Mazama nemorivaga* y *Mazama gouazoubira*, la primera con distribución en el norte y centro de Sudamérica y la otra en el sur de Sudamérica.

En roedores también se ha reportado la posibilidad de diferenciar especies crípticas por medio de marcadores genéticos. Martínez (2007) analizó dos especies crípticas de roedores, *Graomys griseoflavus* y *Graomys centralis*, que se distribuyen desde la zona central de Brasil, Bolivia, Paraguay y Argentina. Desde el punto de vista citogenético, encontraron una diferencia en el número cromosómico de $2n=34-38$, y $2n= 41$ y 42 . Se observó una distribución diferencial en cuanto al hábitat que ocupan ambas especies. Estos resultados fueron confirmados mediante estudios filogenéticos del gen del

citocromo b, donde se obtuvieron 2 clados monofiléticos muy marcados, representados, uno por los individuos 2n= 34-38 y el otro por los individuos 2n=41 y 42.

Con el propósito de corroborar la eficiencia de este pequeño fragmento del citocromo b como marcador para diagnosticar especies, se realizó una reconstrucción filogenética entre estas especies crípticas *Mazama gouazoubira* y *Mazama nemorivaga*. Los resultados obtenidos mostraron dos clados muy marcados: uno representado por individuos de Guazu bira fuertemente apoyado con un bootstrap cercano a 100, y otro con individuos de *M. nemorivaga*, indicando la divergencia de estas especies. Resultados similares habían sido obtenidos por Duarte *et al.* (2008), empleando 934 pb del gen del citocromo b. A partir de esto fueron descritos 13 haplotipos en las diferentes localidades Neotropicales de *Mazama gouazoubira* y 4 haplotipos de *Mazama nemorivaga*, obteniendo un resultado muy similar al de este trabajo, con similar apoyo de bootstrap.

Estos resultados muestran que este fragmento mucho más pequeño, de 226 pb del citocromo b, permite discriminar eficientemente entre estas dos especies crípticas; además facilita la amplificación de ADN de baja calidad obtenido mediante muestreos no invasivos, así como explorar la utilización en técnicas de mayor definición como “High Resolution Melting” en PCR Real Time.

V.IV- Implicancias para el manejo y la conservación.

La especie *Mazama gouazoubira* ha sufrido una radiación adaptativa, desde su divergencia habitando diferentes ecotonos de bosques, desde sabanas arboladas o bosques semiabiertos hasta bosques densos, según la localidad donde se encuentra (Duarte & Merino, 1997).

Actualmente se lo considera en la categoría de "Preocupación menor" por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza); sin embargo se desconoce el estado de la especie y la magnitud del efecto de las transformaciones ocurridas, así como, modificaciones del hábitat natural, caza deportiva y furtiva indiscriminada, competencia con el ganado doméstico y especies exóticas.

La muestra estudiada presentó un alto nivel de variabilidad, sin embargo sería necesario ampliar el muestreo representativo de las diferentes localidades, de forma tal de poder observar niveles de subestructuración geográfica mas claros y sólidos para poder determinar unidades de conservación para la especie.

En base a este estudio, se propone el manejo de las poblaciones de Uruguay como una metapoblación, siendo ésta descrita según Gutiérrez (2002), como un conjunto de poblaciones interconectadas por fenómenos ocasionales de emigración e inmigración. La importancia del concepto metapoblacional en conservación, radica en que puede ser posible la persistencia a largo plazo de una especie en una determinada región a pesar de que cada población individual tenga un cierto riesgo de extinción a corto plazo, debido a la pérdida de variabilidad genética, depresión endogámica o la presencia de eventos estocásticos (Gutiérrez, 2002).

La combinación de técnicas no invasivas para la recolección de muestras junto con técnicas moleculares proveen información para implantar las estrategias de conservación necesarias, así como para el manejo de las especies (González *et al.*, 2009).

Para poder implementar estrategias para la conservación de una especie, es imprescindible conocer tanto los aspectos genéticos, como los demográficos (ecología, biogeografía, evolución) y los socio-políticos (González *et al.*, 2002), ya que éstos en conjunto ayudarían a comprender el estado de la especie y de las personas que habitan con ella, de forma tal de poder disminuir el efecto antropogénico directo e indirecto.

VI- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.

VI.I- Conclusiones.

- El ciervo Neotropical, *Mazama gouazoubira* presenta una alta variabilidad inter e intrapoblacional para el fragmento analizado, lo cual concuerda con la gran variabilidad morfológica externa que éste presenta en su amplio rango de distribución geográfica.
- Los grandes niveles de variabilidad haplotípica encontrados indican que el Guazu bira presenta una importante plasticidad ecológica, lo que le permite adaptarse fácilmente a los diferentes ambientes. Esto se debería a una importante expansión geográfica y demográfica que sufrió la especie.
- EL Guazu bira presenta una leve subestructuración, con una pequeña tendencia hacia la divergencia, tanto a nivel geográfico como poblacional. Esto se debe a la baja dispersión que esta especie presenta.
- Las poblaciones de Uruguay se deberán considerar como Metapoblaciones al momento de implementar unidades de conservación, dado que presentan una pequeña estructuración poblacional con una divergencia haplotípica reciente.
- El fragmento analizado del gen de citocromo b, demostró ser un muy buen marcador para analizar variabilidad dentro de una especie, pudiendo discriminar variantes alélicas para la región, así como diferenciar entre especies crípticas. Esto reafirma la importancia de este marcador de pequeño tamaño, dado que permite la amplificación de ADN de baja calidad de muestreos no invasivos, como el proveniente de fecas.

VI.II- Perspectivas a futuro.

- Se sugiere ampliar las muestras de las diferentes localidades para realizar estudios de genética molecular que incluyan análisis de estructura poblacional, filogenéticos e historia demográfica, así como morfológicos, de forma tal de poder planificar estrategias de conservación contundentes e implementar actividades de educación ambiental sobre el impacto causado y la importancia de preservar la diversidad autóctona.

VII- BIBLIOGRAFÍA.

VII- BIBLIOGRAFÍA.

- Abril, V.V., E.A.G. 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. DOI: 10.1159/000298819
- Allen, J. A., 1915.** Notes of the American Deer of the genus *Mazama*. Bulletin American Museum of Natural History. Vol. XXXIV. 521-532p.
- Ávila-Pires, F.D., 1959.** As formas Sul-Americanas do “veado-virá”. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 31:547:556.
- Avise, J.C. 1992.** Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. Oikos, 63: 62-76.
- Avise, J. C. 1995.** Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. Conservation Biology 9:686-690.
- Avise, J. C., 2000.** Phylogeography. The History and formation of species. 1: 3
- Ayala, F. 1982.** Population and evolutionary genetics. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16:37-48
- Bidegaray, L. 2003.** Variabilidad genética en *Mazama* (Mammalia: Cervidae). Tesis de grado, Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay. Febrero 2003.
- Bisbal, F. J. 1991.** Distribución y taxonomía del venado Matacán (*Mazama* sp) en Venezuela. Acta Biológica Venezuelica 13:89-104.
- Black – Décima, P. & Vogliotti, A. 2008.** *Mazama gouazoubira*. In: IUCN 2009. Red List of Threatened Species. Version 2009.1.

- Branan, W. V.; Wekhoven, M. C. & Marchinton, R. L. 1985.** Food habits of brocket and white-tailed deer in Suriname. *J. Wild. Manage.*, Maryland, 49:972-976.
- Bodmer, R. E. 1989.** Ungulate biomas in relation to feeding strategy within Amazonian forest. *Oecologia*, Berlin, 81:547-550.
- Cabrera, A., 1961.** Catalogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, Zoología 4(2):309-732
- Chébez, C. & Johnson, A. 1984.** Las corzuelas. *CEAL Fauna Argentina*, Buenos Aires, 77:1-33.
- Czernay, S. 1987.** Spiebhirshe und Pudus. *Die Neve Bkehm Buchene*. 581: 1-84
- Duarte, J. M. B., 1992.** Aspectos taxonomicos e citogeneticos de aldumas especies do cervideos brasileiros. Jaboticaba: Faculdade de ciencias Agrarias e Veterinarias, 153p. Disertación de maestría.
- Duarte, J. M. B., 1996.** Guia de identificacao de cervideos brasileiros. FUNEP, Jaboticabal, 14p.
- Duarte J. M. B., & Merino, M. L., 1997.** Biología e concervacao de cervideos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama. Jaboticabal. FUNEP, 1997. 2-21p y 60-67p
- Duarte, J. M. B., 1998.** Analise citogenetica e taxonomia do Genero Mazama (Cervidae: Artiodactyla) no Brasil. Botucatú-UNESP. Tesis de doctorado.
- Duarte, J. M. B., González, S., & Maldonado, J. E., 2008.** The surprising evolutionary history of South American deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (2008) 17–22
- Duarte, J. M. B. & Gonález, S. (eds) (2010).** *Neotropical cervidology: Biology and medicine ok Latin American deer*. Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland: IUCN. 2-24. pp / 190-198.pp.

- Eisenberg, J. F., 1987.** The evolutionary history of the Cervidae with special reference to South America radiation. Biology and management of the Cervidae (ed. Wemmer, C.), pp. 60-64. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.
- Eisenberg, J. F., 2000.** The contemporary Cervidae of Central and South America. Antelopes, Deer and relatives. Fossil Record, behavioural Ecology. Systematics, and Conservation (eds. Vrbs, E., Schaller, G. B.), pp. 189-199. University Press, Yale.
- Excoffier, L., Smouse P.E. y Quattro J.M., 1992.** Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491
- Excoffier, L., Laval, L. G., & Schneider, S., 2006.** Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
- Fisher, G. 1814.** Zoognosia Tabulis Synopticis Illustrata. Typis Nicolai Sergeidis Vsevolozky, Mosquae 3:1-732.
- García, G., 2000.** Hacia la construcción de los conceptos de especie y de especiación desde el origen de las especies. El Prisma de la evolución a 140 años de “El origen de las especies”.
- Gilbert, C., Ropiquet, A., Hassanin, A., 2006.** Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. Mol. Phylogenetic Evol. 40, 101–117.
- González, S., Maldonado, J. E., Leonard, J. A., Vilà, C., Duarte, J. M. B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., and Wayne. R. K., 1998.** Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Molecular Ecology, 7:47-56.
- González S., Morelli E., & Simó M., 2002.** Biodiversidad: Metodologías de estudio. Montevideo, Uruguay. Unidad de Formación Permanente Facultad de Ciencias; Cap3: 73-84.

- González S., 2005.** Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. Agrociencia. Vol. IX N°1 y N°2 pàg. 545-550.
- González, S.; Maldonado J. E.; Ortega, J.; Talarico, A. C.; Bidegaray, L.; Garcia. J. E.; and Barbanti Duarte, J. M. 2009.** Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). Molecular Ecology Resources. 9, 754 – 758.
- Groves & Grubb. 1987.** Relationship of Living Deer. Biology and management of the Cervidae (ed. Wemmer, C.), pp. 21-59. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.
- Grubb, P. 2005.** Order Artiodactyla. Pp 637-722 in Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Volume 1. 3rd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Gutiérrez, D. 2002.** Metapoblaciones: un pilar básico en biología de conservación. Ecosistemas 2002/3
- Hartl, D. (1988).** A primer of population genetics. (Segunda edición. ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Hartl, D. L., 2000.** A primer of population genetics. Sinauer, Sunderland.
- Hershkovitz, P., 1951.** Mammals from British Honduras, Mexico, Jamaica and Haiti. Fieldiana Zoology 31:547-569.
- IUCN, 2010. Red List of Threatened Species.**
<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/29620/0/rangemap>
- Kocher, T.D.; Thomas. W.K.; Edwards, A.; Pääbo, S.V.; Villablanca, F.X. & A.C. Wilson. 1989.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 86: 6196-6200.
- Lewin, B., 2001.** Genes VII, Oxford University Press and Cell Press. pp 247-250.

- 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* (2006) 7:563–575.
- Márquez, A., 2002.** Filogeografía e Historia Demográfica del Ciervo de los Pantanos *Blastoceros dichotomus* Gray, 1850. Tesis de Maestría en Biología, Opción Zoología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Martínez, J. J. 2007.** Estudio Filogeográfico en dos especies crípticas del género *Graomys* (Rodentia, Muridae) mediante haplotipos de ADN mitocondrial. Mastozoología Neotropical, U. S. Department of Commerce. San Miguel de Tucumán, Argentina. 14:286-287.
- Medellin, R. A., Gradner, A. L. & Aranda, J. M., 1998.** The taxonomic status of the Yucatán brown brocket, *Mazama Pandora*. *Proc. Biol. Soc. Washington*, 111: 1-14.
- Medrano, J. F., Aasen, E., and Sharrow, L., 1990.** DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8, 43.
- 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.* 50, 91–108.
- Nei, M., 1987.** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Network 4.5.1.6.,** released 31 December 2009, expiry date 1 January 2011. Network User Guide updated 31 December 2009. www.fluxus-engineering.com
- Pinder, L. 1997.** Niche overlap among brown brocket deer, pampas deer and cattle in the Pantanal of Brazil. Ph. D. dissertation, University of Florida, Gainesville, United State of America.
- Pinder, L. & Leeuwenberg, F., 1997.** Veado Catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814). Pp. 60-68 in Biología e conservacao de cervídeos sul-americanos: *Blastoceros*, *Ozotoceros* e *Mazama* (J. M. B. Duarte, ed.) FUNEP, Jaboticabal.

- Pitra, C., Fickel, J., Meijaard, E., Groves, P.C., 2004.** Evolution and phylogeny of old world deer. *Mol. Phylogenetic Evol.* 33, 880–895.
- Randi, E., Mucci, N., Pierpaoli, M., Douzery, E.J.P., 1998.** New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 793–801.
- Redford, K. H. & Eisenberg, J. F. 1992.** Mammals of the neotropics. The southern cone. Chicago, University of Chicago. v. 2, 430 p.
- Repetto, L. 2007.** Estudio de la variabilidad genética de: *Ozotoceros bezoarticus celer* Cabrera, 1943. Tesis de grado, Sección Genética, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Richard, E., Juliá, J. P. & Aceñolaza, P. 1995.** Hábitos frugívoros de la corzuela parda (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814) (Mammalia Cervidae), en un ambiente secundario de Yungas. *Doñana Acta Vertebrata*, Sevilla, 22 (1-2):19-28.
- Richard, E., & Juliá, J. P., 1995.** La corzuela parda. Serie Monográfica y Didáctica, Tucumán, 22:1-35.
- Richard, E., & Juliá, J. P., 2001.** Dieta de *Mazama gouazubira* (Mammalia, Cervidae) en un ambiente secundario de Yungas, Argentina. *Iheringia, Sér. Zool.* No.90 Porto Alegre.
- Rossi, R. V. 2000.** Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Tesis de maestria, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R., 2010.** Universitat de Barcelona . Current Released Version: 5.10.01 (March 04, 2010). www.ub.edu/dnasp
- Saitou, N., & Nei, M., 1987.** The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406-425.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Smith, M.H., Branen, W.V., Marchinton, R.L., Johns, P.E., Wooten, M.C., 1986.** Genetic and morphologic comparisons of red brocket, brown brocket, and white-tailed deer. *J. Mammal.* 67, 103–111.
- Stallings, J. R. 1984.** Notes on feeding habits of *Mazama gouazoubira* in the Chaco Boreal of Paraguay. *Biotropica*, Washington, DC, 16:155-157.
- Taberlet, P., 1996.** The use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Smith, T., Wayne, R., 8: 129 – 136.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007)** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Molecular Biology and Evolution](#) 24: 1596-1599.
- Tamura, K. & Nei, M., 1993.** Estimation of the Number of Nucleotide substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Thermo Fisher Scientific I. 2008.** Thermo Scientific, Nanodrop 1000 Spectrophotometer. User's Manual. Wilmington, DE 19810 U.S.A., Apéndice 19-2. pp.
- Vargas, R., Rangel, L. F., Cañola, E. A., Rodríguez Jimenez, E. L., Klinger, J. C. & Bastidas Gustin, A. E. (2006).** Detección y cuantificación de niveles de ADN circulante en suero humano utilizando espectrofotometría UV-visible. *Revista colombiana de física*, vol. 38, No. 2. 2006
- Vargas-Munar, D. S. F., 2003.** Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entrecromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de Cervídeos brasileiros. Master Thesis, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.
- Vogliotti, A. 2004.** História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria. M. Sc. Thesis, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil.

- Wayne, R.K.; Lehman, N.; Allard, M.W. & R.L. Honeycutt. 1992.** Mitochondrial DNA variability of the grey wolf: genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 6: 559-569.
- Weber, M., González, S., 2003.** Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. *Ecoscience*, 10 (4): 443-454
- 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, pp. 38–64.
- Wemmer, C. 1998.** Deer Status, survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Deer Specialist group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Vi + 106pp.
- Wright, S. (1969).** The theory of gene frequencies. En *Evolution and the genetics of populations*. (Vol. 2). Chicago: University of Chicago.

VIII- ANEXO.

ANEXO 1.

Secuencias nucleotídicas de los haplotipos encontrados para el fragmento analizado en la pasantía de grado, Estudio de la variabilidad genética del *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae) Fischer, 1814.

Hap_A

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_B

CGCATTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTCTTC

Hap_C

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_D

CGCATTTATTGATCTTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_E

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_F

TGCATTTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTTCT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_G

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTACTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_H

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT

AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTACTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTCACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTA
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_I

TGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTTCT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_J

CGCAATTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGAAGAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATACATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_K

CGCATTTACTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCACGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGTCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_L

CGCATTTACTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCACGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACACATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATAC?CTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATCA
TTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_M

AGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAGATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCAATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_N

CGCATTTATTGATCTCCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTCACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTA
TTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_O

CGCATTTGTTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_P

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACT
AGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTTAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTC

Hap_Q

CGCATTTATTGATCTTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCTTTACT
AGGAATTCGCTTGATTCTACAAATCCTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGA
CACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTAT
TCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTATC

