

Universidad de la Republica – Ministerio de Educación y Cultura

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología - Sub-área Genética

“Variabilidad genética en poblaciones uruguayas de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*)”



Lic. Yanina Leone

Tesis de Maestría en Biología

Orientadora: Dra. Susana González

Co-Orientadora: Dra. Mariana Cosse

Tribunal:

Presidente: Dra. Graciela García

Vocal: Dra. Eileen Armstrong

Vocal: Dr. Alejandro Márquez

Agradecimientos

A todos los que de una forma u otra colaboraron para la realización de esta tesis.

A mi orientadora Susana González por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme realizar esta tesis, guiarme y ayudarme en las distintas etapas aportando todo lo que estuviera a su alcance. A mi co orientadora Mariana Cosse por ayudarme y enseñarme diferentes herramientas empleadas en el transcurso de la tesis. A ambas por la paciencia.

A Graciela García, Eileen Armstrong y Alejandro Márquez, por aceptar formar parte del tribunal y por las valiosas correcciones.

A CSIC y PEDECIBA por la financiación de este trabajo. A la ANII por la beca de Maestría.

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y en especial al grupo de Investigación en Genética de la Conservación del departamento de Biodiversidad y genética, donde desarrolle la Tesis.

A las autoridades de la “Reserva de Fauna Autóctona Tabaré González” por abrirme las puertas, a la directora Brenda Bon por la disposición. Al personal técnico y Veterinario por el apoyo y ayuda en la colecta de muestras.

A todas mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Biodiversidad y Genética, “Humanos” y “Conservacionistas” por el apoyo y compañerismo en el día a día. En especial a Natalia Mannise y Nadia Bou por la ayuda tanto en el laboratorio como en el análisis de los datos.

A Claudia Elizondo por ayudarme en la colecta de muestras.

A mis compañeros de la sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias.

A mis padres por incentivar me a hacer lo que me gusta, por su amor y comprensión.

A mis abuelos por su amor más puro.

A mi familia y amigos por el apoyo y el cariño. A mis primos Edu, Juan, Meia y Cristhian.

A Andre, Gabi, Pao, Silvi, Sol y Tati, amigas de la biología, por la paciencia, las risas, charlas eternas, momentos compartidos y el apoyo en cada decisión que tomo. A Caro, Fer e Ivanna amigas de la vida.

Índice

Resumen	9
1. Introducción	10
Características morfológicas del venado de campo	13
Filogenia y taxonomía	14
Distribución del venado de campo	15
Situación de la conservación de la especie en el Uruguay	16
Stock en cautiverio: origen y fundación	18
1.2 Hipótesis	21
1.3 Objetivos	21
2. Patrones de variabilidad genética con marcadores mitocondriales	22
2.1 Introducción	22
2.2 Metodología	26
2.2.1 Muestras utilizadas	26
2.2.2 Muestreo	27
2.2.3 Extracciones de ADN	27
2.2.4 Diseño experimental para la amplificación de marcadores del ADN mitocondrial	29
2.2.4.1 Marcador <i>NADH 5</i>	29
2.2.4.2 Marcador <i>D-loop</i>	29
2.2.4.3 Análisis de amplificaciones	30
2.2.5 Análisis de secuencias	30
2.2.6 Análisis de variación genética	31
2.2.7 Red de haplotipos	32
2.3 Resultados de los análisis mitocondriales	34
2.3.1 Extracción de ADN cuantificaciones y amplificaciones	34
2.3.2 Secuencias del fragmento de <i>NADH 5</i>	34
2.3.3 Secuencias del fragmento de <i>Dloop</i>	36
2.3.4 Análisis de las curvas de melting del fragmento <i>D-loop</i>	37
2.3.5 Índices de diversidad génica y haplotípica	39
2.3.6 Análisis poblacionales	41
2.3.7 Red de haplotipos	45
2.4 Discusión	49
Diversidad y estructuración genética de las poblaciones a partir de análisis de secuencias del ADN mitocondrial	48
Proceso de diferenciación de la población en cautiverio	50
Estructuración genética del venado de campo en Uruguay y la región	52
3. Microsatélites	55
3.1 Introducción	55
3.2 Metodología	58
3.2.1 Muestras utilizadas	58
3.2.2 Diseño y selección del set a utilizar	58
3.2.3 Genotipificación	62
Análisis de diversidad genética y estructuración poblacional	63

3.3 Resultados	67
Muestras analizadas	69
3.4 Discusión	77
Caracterización de un set de loci polimórfico	77
Estructura genética poblacional	77
4. Conclusiones	83
Perspectivas	84
5. Implicancias para la conservación	85
6. Bibliografía	87
7. Anexos	102

Listado de Tablas

Tabla 2.2.1. Secuencias de *D-loop* usadas por localidad para la construcción de red de haplotipos de ese fragmento —————33

Tabla 2.3.1. Sitios informativos para los haplotipos hallados en las secuencias del fragmento de *NADH 5* analizadas ————— 35

Tabla 2.3.2. Muestras analizadas con el marcador *NADH 5*, detalladas por haplotipo y por Localidad —————35

Tabla 2.5.3. Sitios informativos para los haplotipos hallados en las secuencias de *D-loop* analizadas —————36

Tabla 2.3.4. Haplotipos hallados en “ECFA” para ambos marcadores mitocondriales—37

Tabla 2.3.5. Muestras de “ECFA” en las que se amplificó el fragmento *D-loop* mediante RT PCR 39

Tabla 2.3.6. Índices estimados de diversidad génica y haplotípica para el fragmento *NADH5*, discriminado por población ————— 40

Tabla 2.3.7. Índices estimados de diversidad génica y haplotípica para el fragmento *D-loop*, discriminado por población ————— 40

Tabla 2.3.8. Valores de *FST* y *p* estimados entre poblaciones uruguayas con el fragmento *NADH 5* ————— 41

Tabla 2.3.9. Agrupamientos de poblaciones para fragmento *NADH 5* —————42

Tabla 2.3.10. Distancia genética de Slatkin y número de migrantes por generación calculadas entre poblaciones uruguayas para el fragmento de *NADH 5* —————42

Tabla 2.3.11. Agrupamientos de poblaciones Uruguayas con fragmento <i>D-loop</i>	43
Tabla 2.3.12. Análisis de AMOVA para fragmento <i>D-loop</i>	43
Tabla 2.3.13. Valores de FST y p estimados entre poblaciones de venado de campo de la región, con el fragmento <i>D-loop</i>	44
Tabla 2.3.14. Distancia genética de Slatkin y número de migrantes por generación estimados para poblaciones de venado de campo de la región para el fragmento de <i>D-loop</i>	44
Tabla 3.2.1. Lista de los 20 loci de microsatélites seleccionados de la bibliografía	59
Tabla 3.2.2. Cebadores usados para cada locus de microsatélite	62
Tabla 3.3.1. Resultados de amplificación de los loci de microsatélites testeados	68
Tabla 3.3.2. Alelos para los siete loci que mostraron patrón de amplificación polimórfico en el set de datos analizados	68
Tabla 3.3.3. Alelos hallados por loci de microsatélite y por población	70
Tabla 3.3.4. Número de alelos por locus, individuos analizados, heterocigosidad observada y esperada, y contenido de información polimórfica, para cada locus de microsatélite	72
Tabla 3.3.5 Probabilidades de estar en Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus y población	73
Tabla 3.3.6. FST'S estimado para todos los loci de microsatélites para todas las poblaciones	74

Listado de Figuras

Figura 1.1. Fotos de venado de campo tomadas en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona” (“ECFA”) _____	13
Figura 1.2. Foto de cría de venado de campo _____	14
Figura 1.3. Distribución actual del venado de campo _____	16
Figura 1.4. Distribución actual y pasada de venado de campo en Uruguay _____	17
Figura 1.5. Fotos de la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González”, Cerro Pan de Azúcar _____	19
Figura 1.6. Imagen satelital del “sector venados” de la “ECFA” donde se marcan los encierros _____	20
Figura 2.2.1. Colecta de fecas en la “ECFA” _____	27
Figura 2.2.2. Individuos por recinto en “ECFA” _____	29
Figura 2.3.1. Curvas halladas en el análisis de melting de las amplificaciones del fragmento <i>D-loop</i> en muestras de “ECFA” amplificadas por PCR RT _____	38
Figura 2.3.2. Curvas correspondientes a los dos haplotipos hallados en “ECFA” _____	38
Figura 2.3.3. Red de Haplotipos para el fragmento de <i>NADH 5</i> _____	45
Figura 2.3.4. Red de Haplotipos para el fragmento de <i>D-loop</i> _____	46
Figura 2.3.5. Red de haplotipos para el fragmento <i>D-loop</i> , poblaciones Uruguayas _____	47
Figura 3.3.1. Gráficos obtenidos con el programa “ <i>Structure Harvester</i> ” web V 0.6.94 del análisis de las corridas del programa “ <i>Structure</i> ” _____	75

Figura 3.3.2. Plot generado con el programa “*Structure*” en base a la matriz de datos de genotipo con información de loci de microsatélites para cada individuo analizado —76

Listado de Anexos

Anexo 1, Tabla 1. Lista de todas las muestras de poblaciones silvestres utilizadas——103

Anexo 1, Tabla 2. Lista de muestras colectadas en marco de este trabajo en la Estación de Cría de Fauna Autóctona “Tabaré González”, Cerro Pan de Azúcar (ECFA)——104

Anexo 1, Tabla 3. Lista de las muestras empleadas en esta tesis y los análisis que se hicieron con cada una——106

Anexo1. Tabla 4. Detalle de las muestra usadas para los análisis de *Dloop* adicionales a las muestras amplificadas y secuenciadas en este trabajo——108

Anexo 2. Secuencias de los fragmentos del ADN Mitocondrial generadas en este trabajo
109

Anexo 3, Tabla 1. Matriz construida por locus de microsatélite y muestra para ambos marcadores de referencia (GS 500-OLD y GS 600)——111

Anexo 3, Tabla 2. Matriz con datos de microsatélites de los individuos de la familia ——112

Anexo 3, Tabla 3. Matriz depurada con la que se realizaron todos los análisis——113

Anexo 3, Tabla 4. PIC, número de alelos, HObs y HEsp; para cada locus por población——114

Resumen

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758), es un cérvido neotropical. Tuvo un rango de distribución de los 5°S a 41°S en el pasado reciente, encontrándose actualmente “casi amenazado” (IUCN). En Uruguay se extendió en todo el territorio, actualmente quedan dos poblaciones silvestres remanentes de su distribución. “Los Ajos” en Rocha y “El Tapado” en Salto. En 1981 a partir de 21 individuos provenientes de “El Tapado” se formó una población que se encuentra en cautiverio en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona Tabaré González” (“ECFA”), de aproximadamente 70 individuos. Esta constituye la población en cautiverio de mayor tamaño de esta especie. El objetivo de la tesis fue analizar los patrones de diversidad genética del venado de campo en Uruguay utilizando marcadores moleculares mitocondriales (*D-loop* y *NADH 5*) y nucleares (set de microsatélites). Utilizando muestras de pelos y fecas de todos los individuos de “ECFA”. Para las poblaciones silvestres se usaron muestras del banco de ADN del laboratorio del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE. Se amplificó y secuenció un fragmento de la región del *D-loop* del ADNmt de 163 pb en 27 individuos de “ECFA”; y un fragmento de 473 pb del gen *NADH 5* en 27 individuos de las tres poblaciones Uruguayas (“El Tapado”, “Los Ajos” y “ECFA”).

Mediante amplificación cruzada se seleccionó un set de 9 loci de microsatélites, que se utilizó para realizar estudios poblacionales en poblaciones silvestres y cautiva de Uruguay (n=61).

Los resultados obtenidos con los marcadores mitocondriales muestran que existen altos niveles de polimorfismo y estructuración poblacional, (FST de 0.48 *NADH 5* y 0.22 *D-loop*). Con el set de loci de microsatélites obtuvimos un buen patrón de amplificación y hallamos altos niveles de polimorfismos para la especie (PIC=0.7). Se observaron con estos marcadores dos grupos, uno compuesto por todas las muestras de la “ECFA” y el otro por las muestras de las poblaciones silvestres. Esto indica un proceso de diferenciación que puede estar explicado por el efecto fundador y las acciones de manejo reproductivo. Los resultados sugieren que es importante realizar un manejo reproductivo de esta población considerando el parentesco de los individuos e incluyendo aquellos individuos que estén menos representados en el pool reproductor para asegurar su viabilidad a largo plazo.

1. INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El origen de la Familia Cervidae y su diversificación temprana se estima data del Mioceno en Asia (Eisenberg, 1987). Los cérvidos probablemente llegaron a América desde Asia, a través del estrecho de Bering, en el Plioceno temprano y posteriormente, algunos taxa pasaron de Norte América a Sudamérica por el estrecho de Panamá, hace aproximadamente 2.5 millones de años (Stelhi & Webb, 1985). La región Neotropical es una de las más diversas, considerada un “hostpost” de la familia Cervidae, la cual está representada por 6 géneros con 17 especies descritas (Duarte & González, 2010).

Actualmente en Uruguay habitan 4 especies de la familia Cervidae, 2 de ellas autóctonas Guazú-birá: (*Mazama gouazoubira*) y venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*), y 2 exóticas introducidas desde Eurasia: ciervo axis (*Axis axis*) y Gamo (*Dama dama*) (González, 2001). El ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*) es una especie nativa para Uruguay pero actualmente está extinto en este país (González, 2001).

La caracterización genética de las especies es importante a la hora de diseñar programas de conservación y manejo *in situ* y *ex situ* de sus poblaciones (Frankham *et al.*, 2002). En muchos casos, especies con problemas de conservación son difíciles de capturar e incluso de observar en la naturaleza, por lo que se han desarrollado métodos rápidos y confiables usando estrategias de muestreo no invasivo. El avance de las técnicas y protocolos de genética molecular en combinación con la posibilidad de realizar muestreos en forma no invasiva permite obtener información biológica valiosa evitando efectuar disturbios en los ecosistemas y tratando de minimizar el impacto humano en el proceso de obtención de información (Kohn, 1997; Taberlet *et al.*, 1997; Taberlet *et al.*, 1999; González & Duarte, 2007).

La concepción de estrategias adecuadas para la conservación de una especie en el complejo escenario actual requiere basarse en evidencia empírica, incluyendo la comprensión de requerimientos ecológicos, como su historia evolutiva y demográfica, la estructuración actual de sus poblaciones, y la caracterización de su diversidad

genética (Simonetti & Acosta, 2002; Acosta-Jamett *et al.*, 2003). La necesidad de conocer y preservar la diversidad genética de las poblaciones para su conservación, se basa en dos argumentos: 1) la evolución de las poblaciones en respuesta a cambios ambientales requiere de diversidad genética y 2) los niveles de heterocigosidad bajos están relacionados directamente con una reducida adecuación biológica debido a las consecuencias de la depresión endogámica (Reed & Frankham, 2003).

La distribución de la variabilidad genética dentro de una especie resulta de la combinación de diversos procesos a nivel molecular y a nivel poblacional, incluyendo mutación, deriva génica, flujo génico y dispersión (Avice *et al.*, 1987; Thomson *et al.*, 2010). La influencia de las características del paisaje en la dispersión y por último en la estructura genética de las poblaciones ha sido ampliamente reconocida, siendo que los patrones de cambios en el ambiente (por ejemplo, en patrones de uso del suelo, topografía, urbanización) pueden afectar o modificar la estructuración genética en las especies (Ezard & Travis, 2006; Murphy *et al.*, 2008; Landguth & Cushman, 2010). Los datos obtenidos a través de la genética de poblaciones permiten comprender como estos diferentes procesos afectan la variación genética, dentro y entre poblaciones. Esta información es útil para entender la historia evolutiva y ecología de las especies y proporciona valiosos datos para el desarrollo de políticas de gestión y conservación (Crandall *et al.*, 2000; Moritz, 2002).

En la última década se comenzaron a desarrollar técnicas para genotipar muestras con baja cantidad y calidad de ADN como son aquellas obtenidas de ADN fecal o extraído de carcasas (Broquet & Petit, 2004). Esto ha permitido efectuar estimaciones de tamaño poblacional (Ernest *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2000; Lucchini *et al.*, 2002; Eggert *et al.*, 2003;), determinación de paternidad (Constable *et al.*, 2001), y detección de sistemas de apareamiento así como dilucidar la estructura social y otros parámetros etológicos en poblaciones silvestres amenazadas (Morin *et al.*, 1994). Asimismo, han resultados adecuados para inferir la relación entre poblaciones, como para planificar y diseñar translocaciones (Beja-Pereira *et al.*, 2004).

Características morfológicas del venado de campo

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758) es un cérvido de tamaño mediano (70 cm de altura a la cruz; de 30 a 40 kg de peso). El color del pelaje es bayo claro en toda la zona dorsal y en los flancos; la parte inferior del cuello, vientre, la cara inferior de la cola, y el área que rodea los ojos y labios, es más claro (Cabrera, 1943). Los machos se diferencian de las hembras por poseer un par de astas de unos 30 cm de longitud en el adulto, compuestas generalmente por 3 puntas (aunque se han registrado individuos con puntas supernumerarias) y por ser de mayor tamaño (Figura 1.1); las hembras presentan además un mechón blanquecino en la zona frontal (Cabrera, 1943; Giménez Dixon, 1991; González, 1993).



Figura 1.1. Fotos de venado de campo *Ozotoceros bezoarticus*, tomadas en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González” (“ECFA”). A) Hembra y Macho. B) Macho. C) Hembra.

En las poblaciones silvestres se ha estimado que la edad de reproducción aproximadamente es a los dos años en hembras y a los tres años en machos, en cambio en cautiverio existen registros de que ambos sexos pueden reproducirse a partir del año de edad (Cosse, 2001).

La gestación es de aproximadamente 7 meses y medio, teniendo una sola cría por camada. Las crías al nacer pesan alrededor de 1,5 Kg, presentan el dorso y los flancos cubiertos por una “librea” (pelaje de manchas blancas) (Figura 1.2), que mantienen hasta una edad cercana a los 3 meses de vida (Cosse, 2001).



Figura 1.2. Cría de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) que se ve el pelaje con librea. Foto tomada en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González”.

Filogenia y taxonomía

La taxonomía y sistemática del venado de campo se ha basado principalmente en la información morfológica, reconociéndose 5 subespecies (IUCN) (Gonzalez & Merino, 2008):

- ❖ *O.b.bezoarticus* (Linnaeus, 1758), en la región del cerrado desde el este y el centro de Brasil, al sur del río Amazonas, entre la meseta de Mato Grosso y el alto de San Francisco (Rossetti & Toledo, 2006).
- ❖ *O. b. celer* (Cabrera, 1943), habita en la pampa Argentina, desde la costa atlántica hasta a la cordillera de los Andes y al sur hasta la cuenca del Río Negro.

- ❖ *O. b. leucogaster* (Goldfüss, 1817), habita en las praderas del sudoeste de Brasil, sudeste de Bolivia, Paraguay y norte de Argentina.
- ❖ *O. b. arerunguaensis* (González *et al.*, 2002), habita en el noroeste de Uruguay (departamento de Salto), 31°41'51"S, 56°43'31"W. población "El Tapado".
- ❖ *O. b. uruguayensis* (Gonzalez *et al.*, 2002), habita en el este de Uruguay (departamento de Rocha), 33°50'01"S; 54°01'34"W, Población "Los Ajos".

Distribución del venado de campo

El venado de campo históricamente presentaba un área de distribución geográfica desde los 5º a 41º de latitud Sur, que comprendía regiones de campo abierto de Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina y todo el Uruguay (Cabrera *et al.*, 1940; Jackson, 1987; González *et al.*, 2010). Era una especie abundante en ambientes abiertos sudamericanos como el cerrado brasileño, los pastizales inundables del Pantanal, el chaco Argentino - Paraguayo, la pampa Argentina y los pastizales Uruguayos. Siendo una especie fuertemente asociada a estos ambientes, ha sufrido una disminución drástica probablemente asociada con la alteración, fragmentación y reducción de su hábitat natural. Se estima que su distribución se redujo en un 99% en el último siglo, siendo probablemente el ciervo en mayor peligro de extinción de Latinoamérica (González *et al.*, 1998, González *et al.*, 2010).

Actualmente presenta una distribución fragmentada, habitando en Uruguay, Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay, con poblaciones remanentes en general pequeñas y altamente aisladas (Gonzalez & Merino, 2008) (Figura 1.3).



Figura 1.3. Distribución actual del venado de campo extraído de la página de IUCN.

Situación de la conservación de la especie en el Uruguay

En el siglo XIX varios naturalistas y viajeros reportaron la gran abundancia de la especie en Uruguay, considerado el ciervo más abundante del país (Cosse, 2001). En 1839 Charles Darwin en su visita a Uruguay describe al venado de campo como un cérvido muy abundante. Registros indican que entre 1870-1880 se exportaron legalmente 2.300.000 cueros de venado de campo desde los puertos de Buenos Aires y Montevideo (Cosse, 2001; Ungerfeld *et al.* 2011).

Muchos reportes de fines del siglo XX, indican como reciente el fenómeno de desaparición del venado (Jackson *et al.*, 1980). Jackson *et al.* (1980) realizaron una

revisión y actualización de la distribución del venado de campo. En la Figura 1.4 se muestra el mapa donde se puede observar la disminución de los núcleos poblacionales.

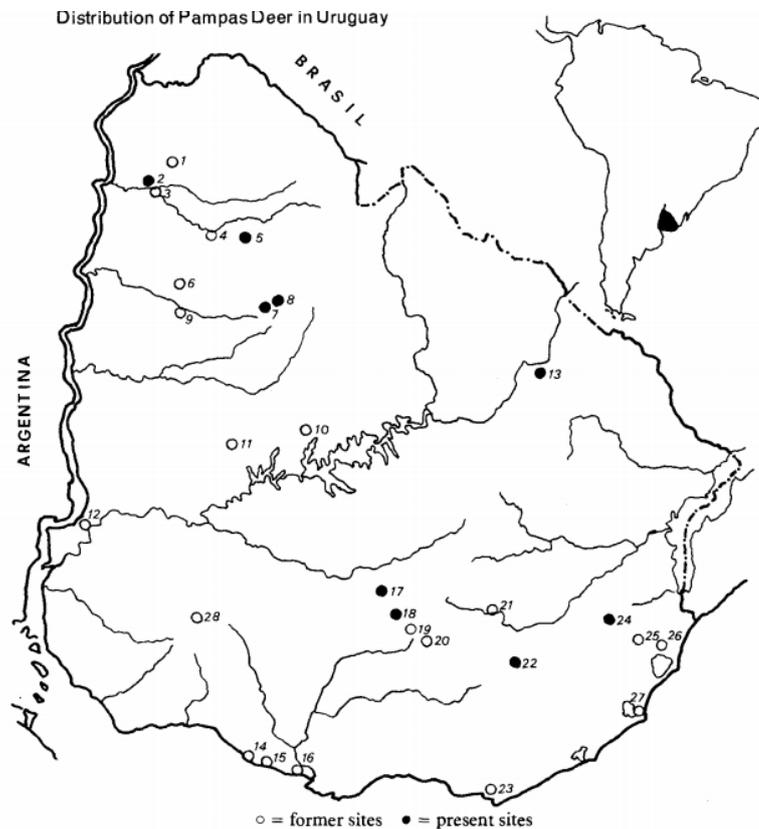


Figura 1.4. Distribución pasada y presente de las poblaciones de venado de campo en Uruguay. Círculos blancos: poblaciones antiguas, Círculo negro: poblaciones conocidas en 1980. Mapa extraído de (Jackson *et al.*, 1980)

El venado de campo está categorizado como cercano a la amenaza en las listas rojas de la UICN (Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza) (Gonzalez & Merino, 2008), y en el Apéndice 1 de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).

En 1985 el Poder Ejecutivo, considerando la crítica situación poblacional del venado de campo en Uruguay, lo declaró “Monumento Natural” (Decreto 12/985). Actualmente se la considera especie prioritaria para la conservación por el SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas) y está incluida en la lista de mamíferos amenazados para Uruguay (Soutullo *et al.*, 2013).

Actualmente, en Uruguay quedan 2 poblaciones silvestres remanentes. Estudios realizados por González *et al.* (1998) empleando marcadores moleculares del ADN mitocondrial determinaron que las dos poblaciones son dos Unidades Evolutivas Significativas (ESU), mientras que estudios morfométricos de estas dos poblaciones naturales, permitieron determinar que las mismas corresponden a dos subespecies (González *et al.*, 2002).

La subespecie, *O. b. arerunguensis*, se localiza principalmente en el departamento de Salto, constituyendo la población conocida como “El Tapado”, ubicada en 31°41’51”S, 56°43’31”W (González *et al.*, 2002). Esta población abarca un área de 120 km², y está formada por aproximadamente 800 individuos (Weber & Gonzalez, 2003).

La otra subespecie *O. b. uruguayensis* se encuentra en el departamento de Rocha, ubicada en: 33°50’01”S; 54°01’34”W (González *et al.*, 2002), en un área de aproximadamente 15 a 20 km², población conocida como “Los Ajos”, constituida por aproximadamente 300 individuos (Weber & Gonzalez, 2003).

Stock en cautiverio: origen y fundación

La población que se encuentra en cautiverio en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González” (“ECFA”) (Figura 1.5), ubicada en el Cerro Pan de Azúcar, departamento de Maldonado, Uruguay; se fundó con individuos provenientes de la población del Departamento de Salto (“El Tapado”). La población en la “ECFA” constituye la población en cautiverio de venado de campo de mayor tamaño a nivel mundial (Ungerfeld *et al.*, 2011). Comenzó en 1981 a partir de siete animales (tres machos y cuatro hembras). En 1982 se agregaron otros catorce animales (cinco machos y nueve hembras), cinco de ellos (dos machos y tres hembras) murieron antes de alcanzar la edad reproductiva. Las dos capturas se realizaron en la población “El Tapado” Salto, Uruguay y se los traslado a “ECFA”. Todos los animales tenían menos de un mes de edad en el momento en el que fueron capturados (Ungerfeld *et al.*, 2011). No existen estudios previos que evalúen la variación genética en esta población,

con el objetivo de reconocer si existe incidencia de depresión endogámica, seleccionar individuos reproductores y elaborar un plan de manejo apropiado.



Figura 1.5. Fotos tomadas en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González”, Cerro Pan de Azúcar.

Los animales se manejan en grupos alojados en encierros de 0,5-1 ha, que pueden estar formados por grupos de machos, o por harenes de un macho con siete a diez hembras y sus crías. En los encierros los animales tienen acceso a pasturas naturales, algunos árboles y arbustos de los que ramonean, y adicionalmente de lunes a sábados reciben ración para vacas lecheras en una cantidad que podría ser considerada como “ad libitum” (a libertad), ya que usualmente no toda es consumida (Ungerfeld *et al.*, 2011). En la figura 1.6 se muestra una imagen satelital del “Sector venados” de la “ECFA” donde están marcados los encierros.

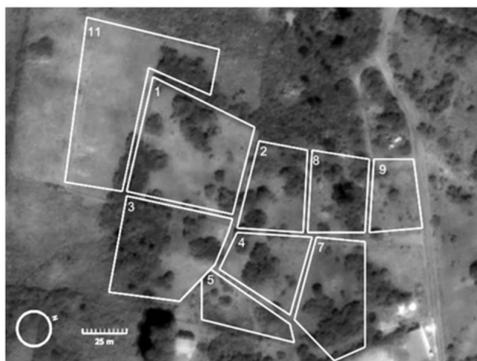


Figura 1.6. Imagen satelital del “sector venados” de la “ECFA” donde se marcan los encierros, extraído de Ungerfeld *et al*, (2011).

1.2 Hipótesis

- Las poblaciones silvestres presentan mayor diversidad genética “ECFA”. La población de “ECFA” es más cercana genéticamente a la población “El Tapado” que a “Los Ajos”.
- La población presente en “ECFA” tendrá altos niveles de endogamia y la población sufrió efecto fundador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar genéticamente a los individuos de “ECFA” y compararlos con los individuos de las dos poblaciones silvestres uruguayas.

1.3.2 Objetivo Específicos

- Estimar los valores de endogamia y de diversidad genética para las poblaciones silvestres y la población en cautiverio.
- Analizar si existe estructuración poblacional en las poblaciones Uruguayas considerando a la población “ECFA”.
- Caracterizar genéticamente a los individuos de la población presente en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González”, mediante dos marcadores mitocondriales, NADH y *D-loop*. Y a los individuos de poblaciones silvestres mediante NADH 5.
- Caracterizar las poblaciones Uruguayas de venado de campo mediante un set de loci de microsatélites.

2. PATRONES DE VARIABILIDAD GENÉTICA CON MARCADORES MITOCONDRIALES

2.1 Introducción

Los marcadores mitocondriales presentan varias ventajas que facilita el trabajo con ellos, destacándose la elevada cantidad de copias de ADN mitocondrial por mitocondrias y de mitocondrias por célula, y además se trata de un genoma haploide. Consiste en una molécula doble hebra circular de ADN de entre 15000 y 20000 pares de bases (pb) de largo aproximadamente (Taberlet, 1996). Su tamaño varía entre especies, desde 14 hasta más de 30 kilobases (Harrison, 1989), y en la mayoría de las especies tiene 16 kb (Clayton, 1992). En vertebrados el ADN mitocondrial se transmite por herencia sin recombinación predominantemente por linaje materno (Taberlet, 1996; Freeland, 2014) . El ADN mitocondrial tiene limitada la habilidad de reparación, y por tanto tiene una alta tasa de fijación de mutaciones, siendo de 5 a 10 veces más alta que la tasa de fijación nuclear (Arif *et al.*, 2011). Contiene genes que codifican para 13 proteínas, 22 genes que codifican para *tARN*, 2 genes de *rARN* y un segmento no codificante de aproximadamente 1000 pb de largo que se denomina región control de la amplificación del ADN (*D-loop*), (Taberlet, 1996). En el *ADNmt* de mamíferos no hay intrones, los exones no están separados (Arif *et al.*, 2011). Las proteínas codificadas por los genes del *ADNmt* están principalmente involucradas en la respiración celular (Freeland, 2014), aunque el ADN mitocondrial ha evolucionado más rápido que el genoma nuclear, la tasa de evolución es diferente para las diferentes regiones del ADN mitocondrial y se ha utilizado para examinar diversas relaciones filogenéticas (Arif *et al.*, 2011) . Debido a estas características se usaron diversos fragmentos del *ADNmt* se usan como marcadores moleculares debidos a las características antes descriptas (Freeland, 2014).

El ADN mitocondrial en poblaciones naturales es altamente variable porque tiene una elevada tasa de mutación, lo que puede generar algunas señales acerca de la historia de la población en marcos temporales cortos (Galtier *et al.* 2009).

Los marcadores empleados en este trabajo tienen diferente tasa de evolución y por tanto grado de variación.

Los genes mitocondriales que codifican proteínas junto a los genes ribosomales, son una buena herramienta para análisis genéticos a nivel de familias, género y especies. De los 13 genes que codifican para proteínas, 6 de ellos lo hacen para subunidades de la *NADH* deshidrogenasa, los genes son: *NAD 1*, *NAD 2*, *NAD 3*, *NAD 4*, *NAD 5* y *NAD 6*. Este fragmento también es utilizado en varios análisis genéticos (Escobedo-Morales *et al.*, 2016).

En cambio la región de control (*D-loop*) es una región no codificante del *ADNmt*, es el inicio de la replicación, transcripción y traducción (Clayton, 1992; Arif & Khan, 2009). Esta región muestra mayor tasa de variación que los genes que codifican proteínas, y por ser una región no codificante se reducen las restricciones funcionales y disminuye la presión de selección (Arif & Khan, 2009). Presenta mayor tasa de mutación que los genes que codifican para proteínas, por lo que esta región se usa para identificación a nivel de especies y sub especies (Arif & Khan, 2009). La región *D-loop* ha sido empleada en múltiples estudios de variabilidad, filo geográficos y filogenéticos (González *et al.*, 1998; Randi *et al.*, 2001; Kholodova & Prikhodko, 2006; Yamashiro *et al.*, 2015).

Previamente, González *et al.* (1998), utilizaron un fragmento de esta región como marcador para determinar los niveles de diferenciación genética entre poblaciones aisladas de venado de campo, donde hallaron segregación geográfica y no se observaron localidades que compartieran haplotipos.

Estudios con fragmentos del en *Citocromo oxidasa I (CO I)*, en 52 individuos de venado de campo de poblaciones silvestres de Brasil, Uruguay y Argentina, evidenciaron una historia evolutiva más estrecha entre las poblaciones que la que se había evidenciado con el marcador *D-loop*. Este trabajo mostró que las poblaciones más pequeñas fueron las más polimórficas (Repetto, 2010).

En los trabajos que se analizan genéticamente poblaciones de animales silvestres, es muy útil el uso de muestras colectadas de forma no invasiva (Vigilant, 2002). Estas muestras tienen el potencial para responder muchas preguntas como: tamaño poblacional, relación de sexos en la población, grado de parentesco entre individuos, comparar poblaciones diferenciadas geográficamente, niveles de diversidad genética

y relaciones filogenéticas (Luikart & England, 1999). Una de las técnicas de muestreo no invasivo es la colecta de fecas y posterior extracción de ADN de las mismas (González, 2005). Un gramo de fecas contiene células de la mucosa intestinal de las cuales se puede extraer ADN del individuo que depositó la feca (Albaugh *et al.*, 1992). En general el ADN fecal es más degradado y la pureza es menor que el extraído de muestras de tejidos. En la población de “ECFA” decidimos trabajar principalmente con muestras de fecas para no exponer a los individuos a stress de captura.

2.2 Metodología

2.2.1 Muestras utilizadas y muestreo:

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron en total 105 muestras de venado de campo provenientes de las tres poblaciones uruguayas: dos silvestres “Los Ajos” (Rocha), “El Tapado” (Salto), y una en cautiverio en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González” (“ECFA”), Pan de Azúcar, Maldonado.

Se utilizaron 30 muestras de las poblaciones silvestres: “El Tapado” (n=11) y de “Los Ajos”(n=19) (Anexo 1, Tabla 1), presentes en el banco de muestras de ADN del Laboratorio de Genética de la Conservación del Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Las muestras comprenden ADN extraído a partir de fecas y tejidos (sangre, huesos, felpa de astas, corazón, pelos, musculo, glándula) colectados en los últimos décadas. La colecta de dichas muestras se realizó bajo condiciones de esterilidad, utilizando guantes descartables y etiquetas indelebles.

En la Población presente en “ECFA” se realizaron colectas de muestras de todos los individuos presentes en ese momento, se colectaron 78 muestras correspondientes a 75 individuos. Las colectas se realizaron en Enero-Febrero del año 2017. Se colectaron muestras de fecas, pelos y tejidos.

Para la colecta de fecas en “ECFA” esperamos fuera del recinto hasta que el animal defecara, luego de identificada la muestra, se ingresaba al recinto y se tomaba la misma con guantes descartables y bolsas de nylon (Figura 2.2.1). Las muestras de pelos fueron tomadas con guantes por uno de los cuidadores de la reserva que se encarga de los venados de campo, cuando los individuos estaban comiendo. Las muestras de tejidos fueron tomadas de animales que murieron, en general se les tomo una muestra de la oreja. Todas las muestras se conservaron en alcohol 70% y a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN. Todos los animales al momento de tomar la muestra fueron fotografiados y la muestra se identificó con el número y color de caravana del individuo, anotando número de recinto en el que se encontraba el animal. La distribución de todos los animales por recinto al momento de la colecta se muestra en la Figura 2.2.2.



Figura2.2.1. Colecta de fecas en la población "ECFA".

2.2.1 Extracciones de ADN

Las extracciones de ADN de las fecas se realizó con un kit desarrollado para tal efecto: *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN de pelos y tejidos se extrajo mediante el protocolo descrito por (González *et al.*, 2015). La cantidad y calidad del ADN total extraído de las muestras fue estimado a través de la medición de la concentración de ADN utilizando un nano espectrofotómetro (Nanodrop © - 1000). El software del mismo estima concentración de ADN con la ecuación de Beer-Lambert, y la pureza de la muestra con el cociente de la absorbancia a 260 nm/280 nm (Thermo 12 Fisher Scientific, 2008).

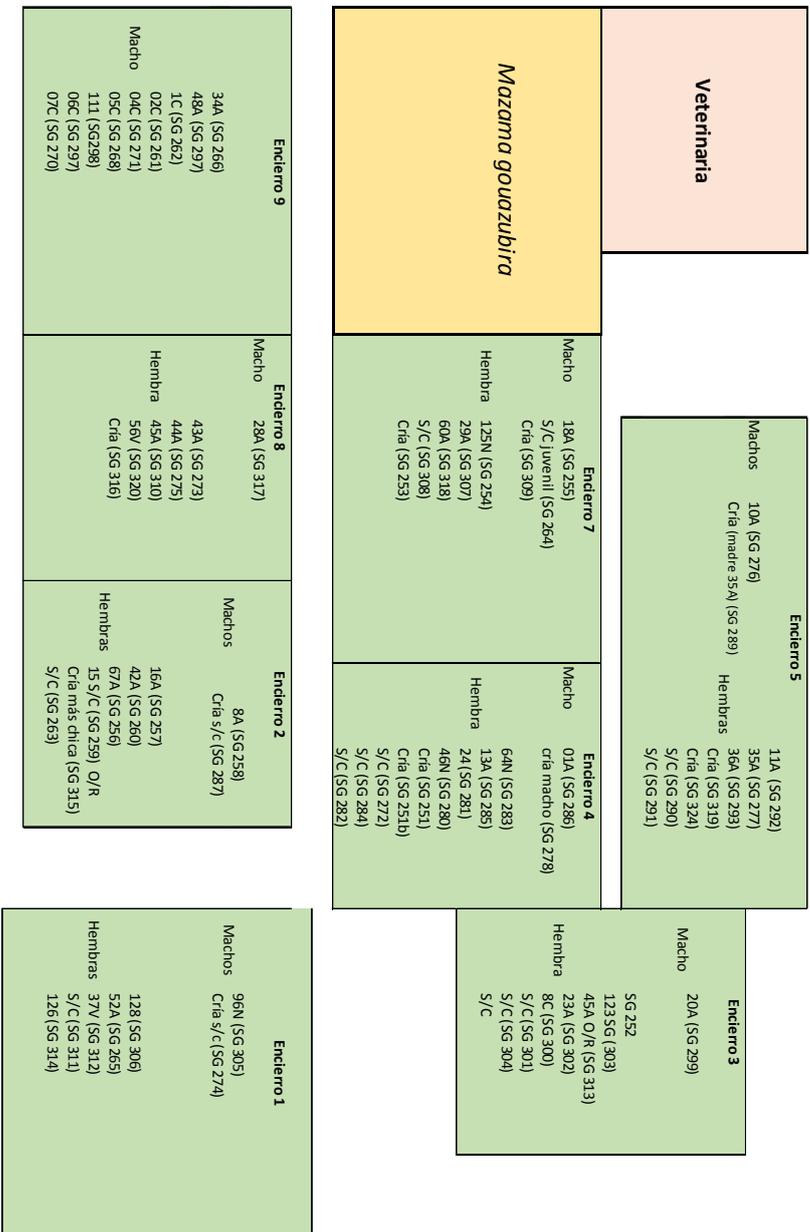


Figura 2.2.2. distribución de individuos por recinto al momento de la colecta de muestras, se detalla el número y color de caravana, así como el acrónimo asignado a la muestra.

2.2.3 Diseño experimental para la amplificación de marcadores del ADN mitocondrial.

2.2.3.1 Marcador *NADH 5*

Se amplificó una región del gen mitocondrial *NADH 5*, de aproximadamente 500 pares de bases (pb) para ello se emplearon los cebadores: *NADH F* 5'-AGG CCC TAC TCC TGT CTC AG 3' y *NADH R* 5'- TAT TAG GAG GGC TCA GGC GT 3' (González *comm.pers.*).

La reacción de PCR consistió de: 7,5 ul de Mix para PCR ImmoMix™ de Bioline, 0,75 µL de cada cebador (*NADH F* y *NADH R*), 0,45 µl de BSA, 7ng/µl de ADN y se completó con agua ultra pura hasta obtener un volumen de 15µl.

El protocolo consistió en el siguiente ciclado: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 Ciclos, cada uno con una desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto y una extensión 72°C por 1 minuto. Con una extensión final de 15 Minutos a 72°C. Se realizó PCR en tiempo final, se empleó el termociclador: *Benchmark* (modelo: TC 9639 *Thermal cycler*).

2.2.3.2 Marcador *D-loop*.

Se amplificó un fragmento de la región control del ADN mitocondrial *D-loop*, de aproximadamente 160 pb, se emplearon los cebadores: *Dloop F* 5'GCGGCATGGTAATTAAGCTC 3' y *Dloop R* 5' CATTACATTATATGCCCCATGC 3' (Moreno *et al.*, 2016).

La reacción de PCR consistió de: 10 µl Mix para PCR ImmoMix™ de Bioline, 0,80 µl de cada cebador (*DLHB F* y *DLHB R*), 0,80 µl de Syto 9, entre 0,5 a 1,5 ng/µl de ADN dependiendo la muestra. Se completó con agua ultra pura hasta obtener los 20 µl de reacción. En las muestras de baja calidad de ADN y de difícil amplificación se le adicionó 0,40 ul de BSA.

El protocolo de amplificación consistió en el siguiente ciclado: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 10 ciclos, cada uno: una desnaturalización inicial a 95°C por 20 segundos, hibridación a 57°C por 20 segundos y

una extensión a 72°C por 20 segundos; 15 ciclos: desnaturalización a 95°C por 20 segundos, hibridación a 56°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos; 20 ciclos: desnaturalización a 95°C por 20 segundos, hibridación a 55°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos. Con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Las reacciones se efectuaron en un termociclador en tiempo real *Corbet research*.

A todas las corridas se les realizó un análisis de curvas de melting, para poder determinar haplotipos en todas las muestras amplificadas.

2.2.3.3 Análisis de amplificaciones

En todos los experimento se incluyeron controles. Control positivo o de amplificación con una muestra conocida de tejido y que amplifica correctamente, y control negativo sin ADN para detectar posibles contaminaciones. Para verificar las amplificaciones y los controles se hicieron corridas electroforéticas en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 100ml de TBE), usando *GoodView™* como agente intercalante y visualizado en transiluminador.

Las purificaciones se realizaron mediante las enzimas *Fast AP* (Alkaline phosphatasa) y *Exo I* (Exonuclease I) de *Thermo Scientific*. Por 10 µl de producto de PCR se usó 2,5 µl de *Fast Ap* y 0,5 ul de *Exo I*. Se incubó a 37°C por 1 hora 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 75°C.

Las muestras fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando secuenciación de Sanger con el equipo *ABI 3500* (*Applied Biosystems*).

2.2.4 Análisis de secuencias

Los cromatogramas obtenidos para ambos fragmentos fueron analizados y corregidos con el programa *MEGA 7.0* (Kumar *et al.*, 2016), también se usó para calcular el número de sitios informativos para cada fragmento. La diversidad

nucleotídica y haplotípica fue calculada mediante el programa *DnaSP v6* (Rozas *et al.*, 2017).

2.2.5 Análisis de variación genética

Para cuantificar la diferenciación geográfica entre los haplotipos se usó un análisis jerárquico de varianza (AMOVA) implementado con el programa *Arlequin 3.5.1.3* (Excoffier *et al.*, 2005). Con el análisis AMOVA calculamos los Phi estadísticos que son un análogo de los F-estadísticos, para la correlación de los genotipos al azar entre poblaciones relacionadas calculamos el Φ_{ST} análogo al F_{ST} de Wright. El valor de Φ_{CT} , que es la correlación de los genotipos al azar entre grupos de poblaciones relacionadas de la especie y mide la proporción de variación genética entre grupos de poblaciones. El valor de Φ_{SC} , es la correlación de genotipos al azar entre poblaciones relacionadas y entre grupos regionales de poblaciones. Mide la proporción de variación entre poblaciones de una región. Se probaron varios agrupamientos de poblaciones sugeridos por la información genética previa y la geográfica, eligiendo aquellos agrupamientos con mayor valor de Φ_{SC} y significativos estadísticamente. Se registraron los valores de varianza genética F_{ST} , el número de migrantes por generación y la distancia genética de Slatkin.

Los estadísticos F son los estimadores: F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} , los que en conjunto permiten interpretar la distribución de la variación genética dentro y entre grupos poblaciones y subpoblaciones, e inferir la existencia de estructuración poblacional (Beebe & Rowe, 2008). El coeficiente de endogamia (F_{IS}) evalúa el grado de endogamia de los individuos dentro de la subpoblación, es decir exceso de homocigotas en relación a lo esperado para el equilibrio de HW. Se calcula como $F_{IS} = (H_s - H_i) / H_s$, este estimador toma valores entre 1 (endogamia total) y -1 (exogamia), valores de cero indican panmixia o apareamiento al azar. (Allendorf & Luikart, 2007). El índice de fijación (F_{ST}) estima la divergencia en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones y utilizado comúnmente como un indicador del grado de subestructuración genética de las poblaciones de una especie. Se calcula de la siguiente manera $F_{ST} = (H_t - H_s) / H_t$ varía entre 0 (no hay estructuración, son la misma población) y 1 (poblaciones totalmente

separadas). Valores de $F_{ST} > 0,2$ se considera que reflejan una fuerte estructuración, aunque valores inferiores también pueden ser significativamente distintos de cero (Beebee & Rowe, 2008).

2.2.6 Red de haplotipos

Para evaluar las relaciones entre los diferentes haplotipos se construyeron redes de haplotipos. La matriz para la red se construyó con el programa *DnaSP v6* (Rozas *et al.*, 2017) y la red se realizó con el software *NETWORK V 5.0.0.3*, utilizando el método de “Median joining” (Bandelt *et al.*, 1999).

La red de haplotipos para el fragmento del gen mitocondrial *NADH 5* se realizó con las 24 secuencias obtenidas en este trabajo para las tres poblaciones Uruguayas.

En el caso del fragmento de *D-loop* la red de haplotipos se construyó utilizando las 26 secuencias generadas en este trabajo de individuos de “ECFA”, y 78 secuencias correspondientes a individuos de varias poblaciones de la región, dos poblaciones silvestres Uruguayas: “Los Ajos” y “El Tapado”, tres poblaciones silvestres de Brasil: “Emas”, “Paraná” y “Pantanal”, tres poblaciones silvestres de Argentina: “Santa Fe”, “San Luis” y “Bahía Samborombón” y de zoológicos Uruguayos: “Zoológico de San Carlos”, “Zoológico de Durazno”, “Zoológico de Salto” y “Parque Lecoq”. Además se incluyeron dos secuencias de individuos de “ECFA”, muestras colectadas hace 20 años. Las secuencias empleadas son tomadas del trabajo de González *et al.* (1998) y depositadas en el GenBank. En la Tabla 2.2.1 se indica el número de muestras utilizadas por localidad. En la Tabla 4, del Anexo 1, se detalla que muestras se usó de cada localidad.

Tabla 2.2.1. Secuencias empleadas para la construcción de red de haplotipos para el fragmento mitocondrial *D-loop*, discriminada por localidad. 26 de las secuencias de “ECFA” fueron obtenidos en este trabajo, el resto se tomaron del Gene Bank.

Población	País	Muestras
poblaciones silvestres		
Los Ajos	Uruguay	10
El Tapado	Uruguay	7
Santa Fe	Argentina	3
San Luis	Argentina	19
Bahía Samborombón	Argentina	7
Paraná	Brasil	4
Emas	Brasil	11
Pantal	Brasil	9
Individuos en cautiverio		
Zoo. San Carlos	Uruguay	1
Zoo. Salto	Uruguay	1
Zoo. Durazno	Uruguay	1
Parque Lecoq	Uruguay	3
ECFA	Uruguay	28

2.3 Resultados de los análisis mitocondriales

2.3.1 Extracción de ADN cuantificaciones y amplificaciones

En la población “ECFA” se colectaron 78 muestras (18 de pelos, 54 de fecas y seis de tejidos), perteneciente a 75 individuos (Anexo 1, Tabla 2). Todas las extracciones se realizaron con éxito, sin embargo la calidad del ADN extraído varió mucho dependiendo de la muestra, obteniendo mejor calidad el ADN cuando fue extraído a partir de muestras de tejidos y peor el extraído de muestras de fecas. En cuanto a la cantidad de ADN obtenida también varió en gran medida dependiendo de la muestra empleada, obteniéndose entre 6,6 ng/ μ l (SG 277) y 2425 ng/ μ l (SG 251b).

Con las muestras colectadas iniciamos un banco de muestras de ADN y tejidos de individuos de la “ECFA”. Sería de interés continuar con este banco e incluir muestras de todos los individuos que vayan naciendo en “ECFA”, reconstruyendo la genealogía de la misma apoyada en la genética de los individuos. Esto nos permitirá ir monitoreando genéticamente la población a lo largo de los años, así como diagramar planes de conservación del stock cautivo con el objetivo de mantener la diversidad presente al día de hoy.

2.3.2 Secuencias del fragmento de *NADH 5*

Se amplificaron y luego secuenciaron en el Instituto Pasteur de Montevideo 24 muestras para el fragmento del gen *NADH 5*, provenientes de: “Los Ajos” (n=7), de “El Tapado” (n=7) y de “ECFA” (n=10) (Anexo 1, Tabla 3). La secuenciación se realizó a partir del cebador *Forward* (F). Se obtuvieron fragmentos de 473 pb. A pesar de ser un fragmento relativamente grande se pudieron amplificar cinco muestras de fecas. Analizando las secuencias se observaron cuatro sitios polimórficos informativos (#53, #218, #235, #280) (Tabla 2.3.1).

Tabla 2.3.1. Sitios informativos para cada uno de los cuatro haplotipos hallados que surgieron del análisis de las 24 secuencias de *NADH 5* de venado de campo de las tres poblaciones Uruguayas. LA (“Los Ajos”), ET (“El Tapado”) y ECFA (“Estación de Cría de Fauna Autóctona”).

Haplotipos	Individuos	Poblaciones	Sitios polimórficos			
			#53	#218	#235	#280
H1	2	LA	A	C	T	C
H2	9	LA, ET	T	C	T	C
H3	2	ECFA	T	T	C	T
H4	11	ECFA, ET	T	C	C	T

Se obtuvieron cuatro haplotipos para este marcador (Tabla 2.3.1). El H1 solamente se encontró en “Los Ajos” (n=2). El H2 se halló en las dos poblaciones de vida libre, “Los Ajos” (n=5) y “El Tapado” (n=4). El H3 se observó únicamente en la población cautiva “ECFA” (n=2). El H4 fue el más abundante, se halló en 11 individuos, compartido entre dos poblaciones, “ECFA” (n=8) y “El Tapado” (n= 3) (Tabla 2.3.2). Todos los haplotipos se diferencian de otros haplotipos por un cambio (Tabla 2.3.1).

La región analizada del gen *NADH 5* mostró ser variable e informativa para las poblaciones Uruguayas de venado de campo.

En el anexo 2 se muestra una secuencia por haplotipo.

Para el fragmento de *NADH 5* se analizaron 10 individuos de “ECFA” pertenecientes a seis de los nueve recintos. En los tres casos que hay más de un individuo del mismo recinto, esos individuos presentaron el mismo haplotipo. Los dos individuos con el H3 pertenecían ambos al recinto cuatro.

Tabla 2.3.2. Muestras analizadas con el marcador *NADH 5*, detalladas por haplotipo y por Localidad.

Haplotipos	Los Ajos	El Tapado	ECFA
H1	SG 34, SG 118		
H2	SG 15, SG 44, SG 91, SG 129, SG 143	SG 45, SG 95, SG 96, SG 82	
H3			SG 278, SG 283
H4		SG 10, SG 47, SG 49	SG 253, SG 268, SG 269, SG 270, SG 274, SG 304, SG 318, SG 319

2.3.3 Secuencias del fragmento de *D-loop*

Se amplificaron 69 muestras de “ECFA” mediante PCR en tiempo real (PCR RT) para un fragmento de 161 Pb del región control del ADN mitocondrial *D-loop*. Mediante un análisis de melting se diferenciaron cuatro curvas, lo que reveló la presencia de diferentes haplotipos para este marcador en esta población. Se secuenciaron 26 muestras con ambos cebadores (F y R) (Anexo 1, Tabla3). En las muestras secuenciadas hay representantes de las cuatro curvas detectadas con el análisis de melting.

Se observaron dos sitios polimórficos e informativos (#56, #77) (Tabla 2.3.3). Se hallaron dos haplotipos. El H1 el menos frecuente lo presentaron ocho individuos. El H2 fue el más abundante, observado en 18 individuos (Tabla 2.3.4). Estos haplotipos se diferencian por dos cambios (Tabla 2.3.3). No se observaron deleciones ni inserciones en este fragmento.

En el anexo 2 se muestra una secuencia representante de cada haplotipo.

Tabla 2.3.3. Detalle de los dos sitios informativos para los dos haplotipos que surgieron del análisis de 27 secuencias de un fragmento de 161 pb del *D-loop* de venado de campo presente en la población de “ECFA”.

Haplotipos	Individuos	Sitios polimórficos	
		# 56	# 77
H1	8	G	C
H2	18	A	T

Para *D-loop* en los 26 individuos secuenciados de “ECFA” están todos los recintos representados. En cuatro de los nueve recintos se hallaron ambos haplotipos. En los recintos 1, 2, 3, 5 y 9 sólo se encontraron uno de los haplotipos, pero en los dos casos solo analizamos a un individuo del recinto (Tabla 2.3.4).

Las cuatro muestras secuenciadas con ambos marcadores se encuentran en color gris en la Tabla 2.3.4. Se puede observar que hay una aparente asociación entre el H4 de *NADH 5* y el H2 de *D-loop*.

Tabla 2.3.4. Haplotipos hallados en “ECFA” para cada marcador mitocondrial por individuo y recinto. En gris se destacan los cuatro individuos de los hay información para ambos marcadores.

Individuo	Recinto	NADH 5	D- loop
SG 305	E1	H4	
SG 311	E1		H2
SG 312	E1		H2
SG 314	E1		H 2
SG 263	E2		H2
SG 252	E3		H2
SG 274	E3	H4	H 2
SG 313	E3		H2
SG 251b	E4		H1
SG 278	E4	H3	H1
SG 280	E4		H2
SG 281	E4		H1
SG 283	E4	H3	
SG 319	E5	H4	H2
SG 324			H2
SG 253	E7	H4	

Individuo	Recinto	NADH 5	D- loop
SG 307	E7		H1
SG 309	E7		H2
SG 318	E7	H4	
SG 275	E8		H2
SG 310	E8		H2
SG 316	E8		H2
SG 317	E8		H1
SG 268	E9	H4	H2
SG 269	E9	H4	
SG 270	E9	H4	
SG 271	E9		H2
SG 272	E9		H2
SG 295	E42		H2
SG 321	E42		H1
SG 322	E42		H1
SG 323	E42		H1

2.3.4 Análisis de las curvas de melting del fragmento D-loop

Se amplificaron 69 de los 75 individuos muestreados en “ECFA” mediante PCR en tiempo real (RT PCR), para un fragmento de 161 Pb del región control del ADN mitocondrial *D-loop*.

Mediante análisis de melting se identificaron cuatro curvas, las que se denominaron “A, B, D, E”. Las curvas “A, D y E”, mostraron forma uni-modal (Figuras 2.3.1 y 2.3.2). Las secuencias de las muestras con curvas “A”, “D” o “E” presentaron todas del mismo haplotipo (H 2) (Tabla 2.3.5).

La curva “B” es tipo bi-modal (Figuras 2.3.1 y 2.3.2). Las secuencias de muestras con curva “B” mostraron el haplotipo 1 (H1) (Tabla 2.3.5).

La curva “C” fue uni-modal pero presentó una temperatura de melting diferente de “A, D y E”, y solo la presentó el control de otra especie (*Mazama gouazoubirá*).

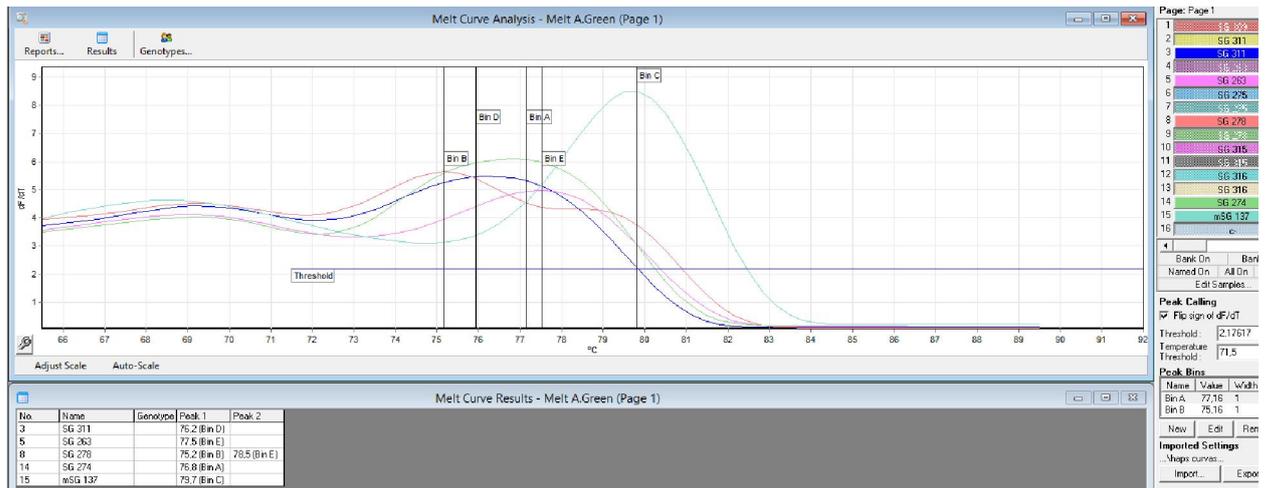


Figura 2.3.1. Curvas halladas en el análisis de melting de las amplificaciones por PCR RT del fragmento *D-loop* de muestras de “ECFA”.

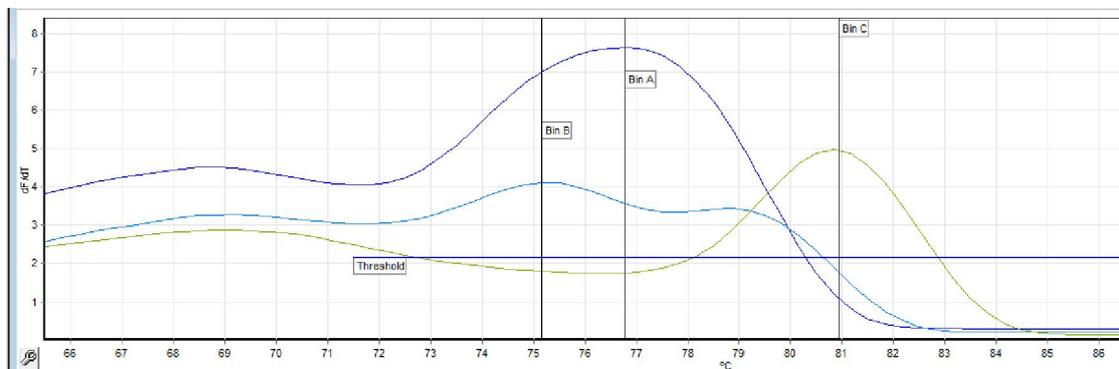


Figura 2.3.2. Muestra las curvas correspondientes a los dos haplotipos hallados (“Bin A” y “Bin B”) y la curva de otra especie (“Bin C”).

Por medio del análisis de las curvas de melting en 69 de las muestras colectadas en “ECFA”, se determinaron dos haplotipos: H1 en 26 muestras y H2 en 43 muestras. Con los haplotipos inferidos mediante el análisis de melting en la Tabla 2.3.5, para los individuos: SG 283, SG 270, SG 305 y SG 318 (de los que hay secuencias de *NADH 5*), se mantiene la posible asociación entre los haplotipos de *NADH 5* y de *D-loop*.

Tabla 2.3.5. Muestras de “ECFA” en las que se amplificó el fragmento *D-loop* mediante RT PCR. Se indica la forma que presentó la curva de melting, el haplotipo de la secuencia y en el caso de las muestras que no fueron secuenciadas el haplotipo inferido por la curva.

Muestra	Forma de la curva	Curva	Hap. de la secuencias	Hap. inferido	Muestra	Forma de la curva	Curva	Hap. de la secuencias	Hap. inferido
SG 251 b	Bi modal	B	H 1		SG 292	Uni modal	A		H 2
SG 252	uni modal		H 2		SG 292 F	Bi modal	B		H 1
SG 254	Bi modal	B		H 1	SG 293	Uni modal	D		H 2
SG 255	Bi modal	B		H 1	SG 294	Bi modal	B		H 1
SG 256	uni modal	A		H 2	SG 295	Uni modal		H 2	
SG 256	uni modal	A		H 2	SG 296	Uni modal	A		H 2
SG 257	uni modal	A		H 2	SG 297	Uni modal	D		H 2
SG 257		A		H 2	SG 298	Bi modal	B		H 1
SG 258	Uni modal	A		H 2	SG 300	Uni modal	D		H 2
SG 259		A		H 2	SG 301	Bi modal	B		H 1
SG 261 F	Bi modal	B		H 1	SG 302	uni modal	A		H 2
SG 261 P		B		H 1	SG 303	Bi modal	B		H 1
SG 262 F		B		H 1	SG 304	Bi modal	B		H 1
SG 262 P	Uni modal	B		H 1	SG 305	Uni modal	E		H 2
SG 263	Uni modal	E	H 2		SG 307	Bi modal	B	H 1	
SG 264	Bi modal	B		H 1	SG 309	Uni modal	A	H 2	
SG 265	Uni modal	A		H 2	SG 310	Uni modal	A	H 2	
SG 268	Uni modal	A	H 2		SG 310	Uni modal	A		H 2
SG 270	Uni modal	A		H 2	SG 311	Uni modal	D	H 2	
SG 271	Uni modal	E	H 2		SG 312	Uni modal		H 2	
SG 272	Uni modal	A	H 2		SG 313	Uni modal		H 2	
SG 273	Uni modal	A		H 2	SG 314	Uni modal	A	H 2	
SG 274	Uni modal	A	H 2		SG 315	Uni modal	D	H 2	
SG 275	Uni modal	D	H 2		SG 316	Uni modal	D	H 2	
SG 278	Bi modal	B	H 1		SG 317	Bi modal		H 1	
SG 280	Uni modal	A	H 2		SG 318	Uni modal	D		H 2
SG 281	Bi modal	B	H 1		SG 319	Uni modal	A	H 2	
SG 283	Bi modal	B		H 1	SG 320	Uni modal	A		H 2
SG 284	Bi modal	B		H 1	SG 321	Bi modal	B	H 1	
SG 285	Bi modal	B		H 1	SG 322	Bi modal	B	H 1	
SG 286	Uni modal	A		H 2	SG 323	Bi modal	B	H 1	
SG 287	Uni modal	A		H 2	SG 324	Uni modal	D	H 2	
SG 289	Campana	A		H 2	SG 325	Uni modal	A		H 2
SG 290	bi modal	B		H 1	SG 326	Uni modal	D		H 2
SG 291	Bi modal	B		H 1					

2.3.5 Índices de diversidad génica y haplotípica.

Se calcularon índices de diversidad génica y haplotípica para ambos fragmentos mitocondriales, utilizando el programa *DNA sp V6*.

Para el fragmento de *NADH 5* se observó una diversidad haplotípica (H_d) de: 0,663, considerando las tres poblaciones de Uruguay juntas. Sin embargo para cada población la H_d varió entre 0,356 y 0.714, siendo la población con menor índice de diversidad haplotípica “ECFA” (Tabla 2.5.5) y la de mayor diversidad “El Tapado” (Tabla

2.5.6). La diversidad nucleotídica (Pi) para Uruguay de este fragmento fue: 0,00359, varió entre 0,00099 y 0,00432 entre las tres poblaciones estudiadas (Tabla 2.3.6).

Tabla 2.3.6. Índices estimados de diversidad génica y haplotípica para el fragmento *NADH 5*, discriminado por población. Índices estimados con el programa DNA sp. Estos valores se calcularon a partir de las secuencias generadas en este trabajo. Se denominó Uruguay a los valores calculados cuando se usaron todos los individuos juntos.

Índices	Uruguay	"Los Ajos"	"El Tapado"	"ECFA"
Número de individuos analizados	24	7	7	10
Número de haplotipos	4	2	2	2
Diversidad haplotípica (Hd)	0,663	0,476	0,714	0,356
Varianza de la diversidad haplotípica	0,00359	0,02935	0,01606	0,02532
Desviación estandar de la diversidad haplotípica	0,006	0,171	0,127	0,159
Diversidad nucleotídica (Pi)	0,00359	0,00102	0,0032	0,00099

En la Tabla 2.3.7 se detallan los índices de diversidad calculados con el *DNA sp V6* para las poblaciones silvestres de Uruguay, Argentina y Brasil para el fragmento de *D-loop* la diversidad haplotípica (Hd) de las muestras de "ECFA" secuenciadas en este trabajo fue de 0,433 y la diversidad nucleotídica (pi) fue 0.00591 (Tabla 2.3.7). Si consideramos todas las muestras que incluimos en los análisis de la red de haplotipos (n=104), la Hd es 0.897 y Pi 0.03721 (Tabla 2.3.7).

En el total de 104 muestras analizadas, se observaron 34 haplotipos. La población que presentó menor número de haplotipos fue "ECFA" donde se observaron dos haplotipos, a pesar de ser la población de la cual hay mayor número de muestras (n=26). En la mayoría de las poblaciones silvestres se observaron casi tantos haplotipos como muestras. Las poblaciones con mayor diversidad haplotípica (Hd) fueron "El Tapado" y "Santa Fe", estas presentaron un haplotipo por muestra.

Tabla 2.3.7. Índices de diversidad génica y haplotípica para el fragmento *D-loop*, discriminado por población. Índices estimados con el programa DNA sp. Estos valores se calcularon a partir de las secuencias generadas en este trabajo, en adición con las secuencias que ya estaban disponibles en la base de datos.

Índices	Todas las poblaciones	Los Ajos	El Tapado	ECFA	San Luis	Santa Fe	Bahía Samborombón	Pantanal	Paraná	Emas
Número de individuos analizados	104	10	7	26	19	3	7	9	4	11
Número de haplotipos	34	7	7	2	8	3	6	7	3	10
Diversidad haplotípica (Hd)	0.897	0.911	1	0.433	0.789	1	0.952	0.944	0.833	0.982
Varianza diversidad haplotípica	0.00036	0.00598	0.00583	0.00541	0.00485	0.07407	0.00912	0.00493	0.04948	0.00215
Desviación estandar de la diversidad haplotípica	0.019	0.077	0.076	0.074	0.070	0.272	0.096	0.070	0.222	0.046
Diversidad nucleotídica (Pi)	0.03721	0.02588	0.05374	0.00591	0.01363	0.02137	0.05312	0.02546	0.01139	0.04506

2.3.6 Análisis poblacionales

Para el fragmento de NADH 5 se calculó el índice F_{ST} entre las tres poblaciones, para “ECFA” se usaron secuencias de ocho individuos de los diez que teníamos, se sacaron las dos secuencias que no estaban completas. Se usaron 22 secuencias, siete de “Los Ajos”, siete de “El Tapado” y ocho de “ECFA”. En la tabla 2.3.8 se muestran los resultados, de los F_{ST} calculados entre las tres poblaciones y sus respectivos p. Con estos análisis no se observa diferenciación entre “Los Ajos” y “El Tapado”, la probabilidad del F_{ST} no es significativa. Se ve diferenciación entre “Los Ajos” y “ECFA” $F_{ST}=0,84381$ ($p=0,00000$); también se ve diferenciación entre “El Tapado” y “ECFA” $F_{ST}=0,48481$ ($p=0,03604$). Probablemente la diferenciación detectada entre “ECFA” y “El Tapado” se deba al manejo.

Tabla 2.3.8. Datos obtenidos con el programa *Arlequin V 3.5.1.3* para el fragmento de NADH 5. En la parte inferior de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} entre las poblaciones. En la parte superior a la diagonal se muestran los valores del p.

	ET	LA	ECFA
ET		0,07207	0,03604
LA	0,28205		0,00000
ECFA	0,48481	0,84381	

Referencias: ET “El Tapado”, LA “Los Ajos”, ECFA “Estación de Cría de Fauna Autóctona”.

Se realizó un análisis de AMOVA para ver estructuración entre las poblaciones, se probaron los agrupamientos que se muestran en la Tabla 2.3.9, el primero fue basándonos en los resultados de los F_{ST} y el segundo por la historia de las poblaciones. En ninguno de los agrupamientos el F_{CT} fue significativo. Para el fragmento NADH 5 se detectó diferenciación entre las poblaciones uruguayas pero no estructuración.

Tabla 2.3.9. Agrupamientos probados entre las poblaciones para el fragmento de NADH 5, valores del índice F_{CT} y su probabilidad p , para cada agrupamiento.

Agrupamiento	Grupos	F_{CT}	p
1- (LA+ET), ("ECFA")	2	0,47688	0,38747
2- (ET+"ECFA"), (LA)	2	0,36332	0,66862

En la tabla 2.3.10 se muestran los valores de distancia genética de Slatkin entre las poblaciones y el número de migrantes entre ellas, entre las poblaciones silvestres “Los Ajos” y “El Tapado” es en las que hay mayor número de migrantes y menor distancia genética, estos resultados tienen coherencia con los datos de F_{ST} . Entre las poblaciones “Los Ajos” y “ECFA” es entre las que hay mayor distancia genética y menor número de migrantes esto coincide con que eran las poblaciones más diferenciadas, y es lógico dado que no se han realizado cruces entre individuos de esas poblaciones.

Tabla 2.3.10 Datos obtenidos con el programa *Arlequin 3.5.1.3*, se muestran los valores de la distancia genética de “Slatkin” entre las poblaciones para el fragmento de NADH 5 en la parte superior a la diagonal, y el número de migrantes entre las poblaciones en la parte inferior a la diagonal.

	ET	LA	ECFA
ET		0,39286	0,94102
LA	1,27273		5,40251
ECFA	0,53134	0,09255	

Para el fragmento de *D-loop* analizado se realizó un análisis de AMOVA solo considerando las secuencias de individuos de poblaciones de Uruguay. Se usaron las 26 secuencias generadas en esta tesis para la “ECFA”, y 25 secuencias bajadas del Genbank (diez de “Los Ajos”, siete de “el Tapado”, seis de diferentes Zoológicos de Uruguay, dos de “ECFA” tomadas hace veinte años a las que nombramos “ECFA viejas”). En la Tabla 2.3.11 se muestra los posibles agrupamientos que se probaron entre ellas. En todos los casos la probabilidad del índice F_{CT} no fue significativa.

Tabla 2.3.11. Se muestra los posibles agrupamientos para las poblaciones de Uruguay analizando con el *D-loop*. Dentro de cada paréntesis se ubican las poblaciones que se asignaron al mismo grupo.

Agrupamiento	Grupos	F _{CT}	p
(ZooUY + ECFA viejas + ECFA actuales), (ET), (LA)	3	0,29019	0,10068
(ZooUY + ECFA viejas + ECFA actuales + ET), (LA)	2	0,21519	0,20332
(ZooUY + ECFA viejas + ECFA actuales), (LA + ET)	2	0,16151	0,097775
(ZooUY + ECFA viejas), (ECFA actuales), (LA), (ET)	4	0,30009	0,09775
(ZooUY), (ECFA viejas + ECFA actuales), (LA), (ET)	4	1,982	0,39785
(ZooUY + ECFA viejas), (ECFA actuales), (LA + ET)	3	0,02674	0,59335
(ZooUY), (ECFA viejas), (ECFA actuales), (LA + ET)	4	0,08226	0,87683

No se pudo elegir un posible agrupamiento entre las poblaciones de Uruguay, por lo que se realizaron los análisis considerando las 104 secuencias correspondientes a individuos de varias poblaciones de la región (Tabla 2.2.1). En la Tabla 2.3.12 se muestran los resultados del AMOVA realizado con varias poblaciones de la región, se realizó el AMOVA para siete agrupamientos diferentes, para cada uno se varió el agrupamiento de las poblaciones de Uruguay, en todos los casos se pusieron a las poblaciones de Bahía Samborombón (BSAS) y a la de San Luis (SL) en el mismo grupo basándonos en estudios genéticos previos, y el resto de las poblaciones silvestres de Brasil y Argentina cada una en un grupo independiente, “Pantanal” (PL), “Paraná” (PA), “EMAS” y “Santa Fe” (SF).

Para los agrupamientos 3, 4, 6 y 7 obtuvimos valores de F_{CT} no significativos. Elegimos el agrupamiento 2 que es el que tuvo mayor F_{CT}.

Tabla 2.3.12. Análisis de AMOVA para varios agrupamientos posibles de poblaciones de la región, se usaron secuencias del fragmento *D-loop*.

	Agrupamiento	Grupos	Entre grupos	Entre poblaciones dentro de los grupos	Dentro de las poblaciones
			% de variación/F _{CT} /p	% de variación/F _{SC} /p	% de variación/F _{ST} /p
1	(ZooUy+ECFA+ET), (LA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	7	18,00/0,17997/0,02151	6,33/0,07714/0,02737	75,68/0,24322/0,00000
2	(ZooUy+ECFA), (ET), (LA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	8	18,21/0,18211/0,04497	5,40/0,06606/0,08504	76,39/0,23614/0,00000
3	(ZooUy), (ECFA), (ET+LA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	8	5,00/0,05001/0,34311	17,86/0,18804/0,01564	77,14/0,22864/0,00000
4	(ZooUy+LA+ET), (ECFA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	7	8,28/0,08279/0,16716	14,84/0,16178/0,01075	76,88/0,23118/0,00000
5	(ZooUy+ECFA), (LA+ET), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	7	14,15/0,14153/0,04106	9,42/0,10975/0,02542	76,42/0,23575/0,00000
6	(ZooUy), (ECFA), (ET), (LA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	9	6,21/0,06206/0,41447	16,63/0,17726/0,09482	77,17/0,22832/0,00000
7	(ZooUy+LA+ET+ECFA), (Bs+SL), (SF), (PA), (PT), (EMAS)	6	10,96/0,10960/0,06843	13,48/0,15139/0,00000	75,56/0,24440/0,00000

En la Tabla 2.3.13 se muestra los cálculos del índice F_{ST} entre las poblaciones Uruguayas para el fragmento de *D-loop* utilizado. Vemos diferenciación de la población “ECFA” con las dos poblaciones silvestres, sin embargo no vemos diferenciación con este marcador entre las dos poblaciones silvestres. Entre “ECFA” y “El Tapado” $F_{ST}=0,22884$, y entre “ECFA” y “Los Ajos” $F_{ST}=0,49232$. Se observó mayor diferenciación entre “ECFA” y “Los Ajos”. Los individuos de Zoológicos no se diferenciaron de “ECFA” ni de “El Tapado”, pero si de “Los Ajos” $F_{ST}=0,24538$.

Tabla 2.3.13. Datos obtenidos con el programa *Arlequin* V 3.5.1.3 para el fragmento de *D-loop*. En la parte inferior de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} entre las poblaciones. En la parte superior a la diagonal se muestran los valores del p.

	ZooUy	ECFA	ET	LA
ZooUy		0,3964	0,73874	0,02703
ECFA	0,00187		0,00000	0,00000
ET	-0,0216	0,22884		0,05405
LA	0,24538	0,49232	0,13536	

En la Tabla 2.3.14 se muestra el número de migrante por generación y la distancia de Slatkin entre las poblaciones Uruguayas. Las poblaciones más distantes son “Los Ajos” de “ECFA”, y las que tienen menor número de migrantes por generación.

Tabla 2.3.14 Datos obtenidos con el programa *Arlequin* 3.5.1.3, se muestran los valores de la distancia genética de “*Slatkin*” entre las poblaciones para el fragmento de *D-loop* en la parte superior a la diagonal, y el número de migrantes entre las poblaciones en la parte inferior a la diagonal.

	ZooUy	ECFA	ET	LA
ZooUy		0,00187	0,00000	0,32517
ECFA	267,336		0,29675	0,96974
ET	inf	1,6849		0,15656
LA	1,53763	0,5156	3,19375	

2.3.7 Red de haplotipos.

En la Figura 2.3.3 se muestra la red de haplotipos para el fragmento de NADH 5 construida con muestras de las tres poblaciones uruguayas. Se observa un haplotipo central (H2), compartido entre los individuos de ambas poblaciones silvestres “Los Ajos” y “El Tapado”. A un cambio del haplotipo central (H2) se encuentra el H1, que solo lo presentaron individuos de “Los Ajos”. Del central se diferencia por dos mutaciones el H4 que es compartido entre individuos de “El Tapado” y de “ECFA”, probablemente este haplotipo era uno de los que presentaban las hembras fundadoras de la población de “ECFA” de ese haplotipo, por una mutación más se diferencia el H3 que solo fue observado en individuos de “ECFA”.

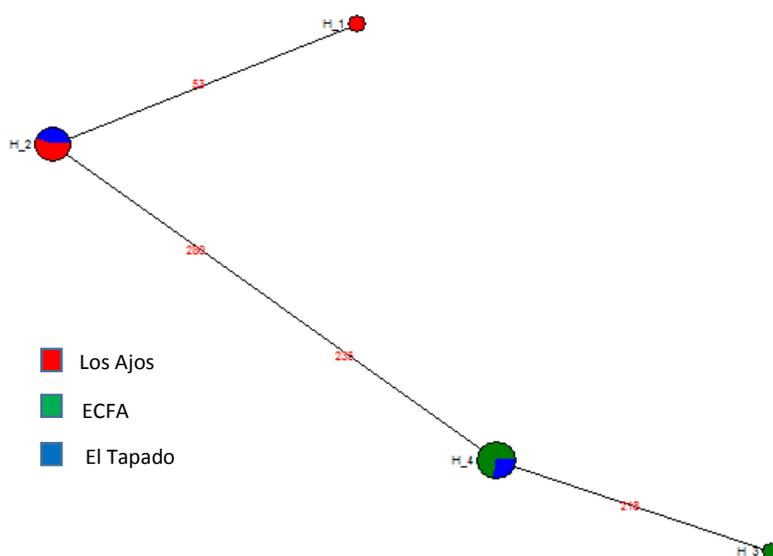


Figura 2.3.3. Red de Haplotipos para el fragmento de NADH 5 se incluyen muestras de las 3 poblaciones Uruguayas de venado de campo. Se construyó con el programa *Network V 5.0.0.3*. En Rojo se ven los individuos de “Los Ajos”, en verde de “ECFA”, y en azul de “El Tapado”.

En la figura 2.3.4 se muestra la red de haplotipos construida para el fragmento *D-loop*, con las 104 secuencias detalladas en la metodología, 26 obtenidas en este trabajo de muestras de “ECFA” y 78 muestras de la región. Se incluyeron muestras de ocho poblaciones silvestres, una población cautiva y cuatro zoológicos de Uruguay.

Las dos secuencias de “ECFA” antiguas de *D-loop* (muestras colectadas hace 20 años) corresponden a diferentes haplotipos, una de ellas presentó el H2 que es el más

abundante entre las muestras actuales de “ECFA”, y la otra el H3, el cuál compartió con muestras de ambas poblaciones silvestres Uruguayas y una muestra de una población silvestre de Brasil.

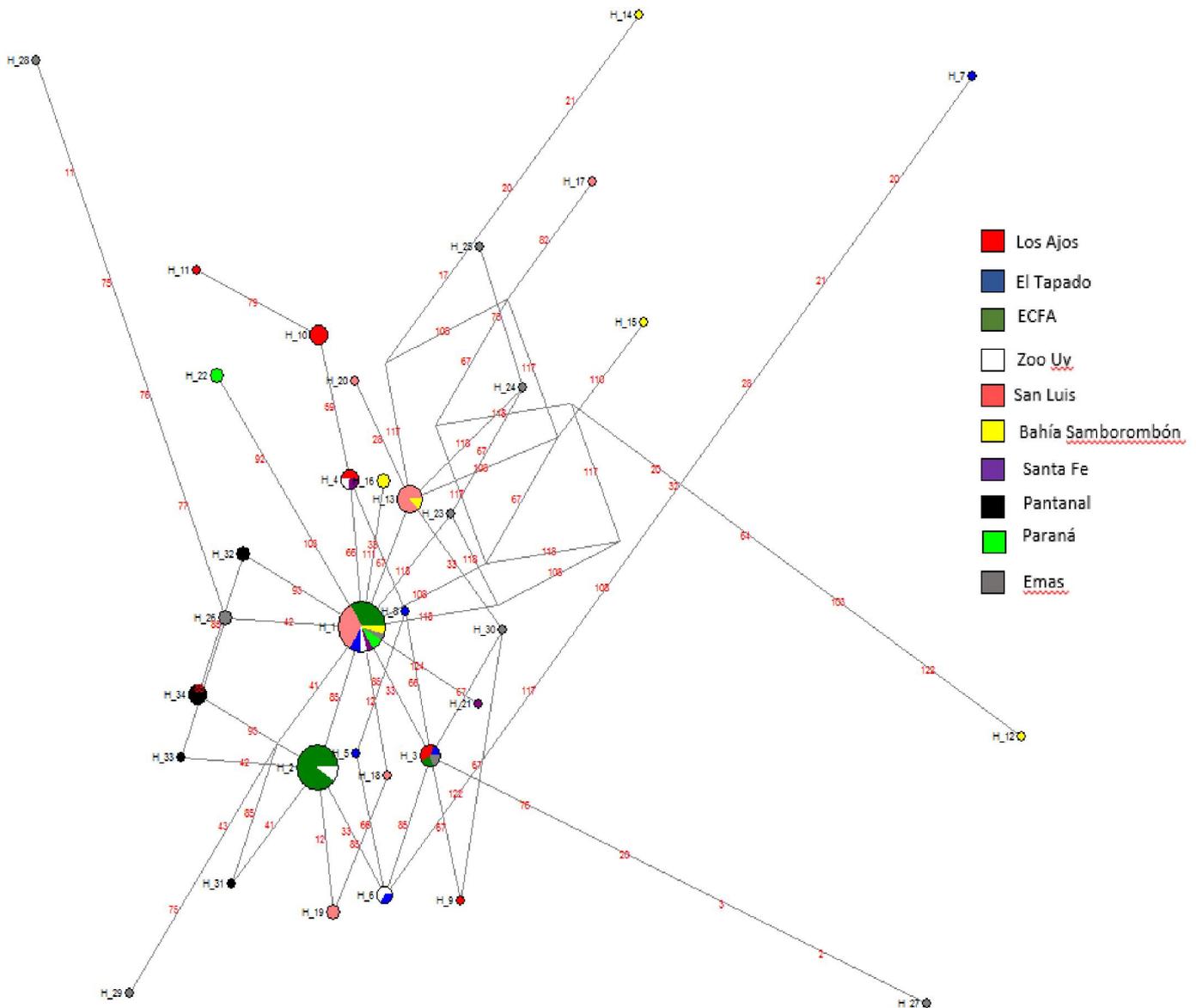


Figura 2.3.4. Red de Haplotipos para el fragmento de *D-loop* se incluyen muestras de ocho poblaciones silvestres de Uruguay, Argentina y Brasil.; de una población en cautiverio de Uruguay y cuatro zoológicos de Uruguay. Se construyó con el programa *Network V 5.0.03*.

Los dos haplotipos hallados en las muestras actuales de “ECFA” no fueron haplotipos nuevos.

Los haplotipos más abundantes son el H1 y el H2. El H1 está presente en 24 de las 104 secuencias, y es compartido por individuos de poblaciones silvestres de Uruguay (“El Tapado”), Brasil (“Paraná” y “Emas”) y Argentinas (“Santa Fe”, “Bahía Samborombón”, “San Luis”). El H2 se observó en 21 de las 104 secuencias analizadas, todas de individuos en cautiverio; 18 son muestras actuales de “ECFA”, una muestra antigua de “ECFA” (colectada hace aproximadamente 20 años) y dos del “Parque Lecoq” que son individuos provenientes de “ECFA”.

Todos los individuos provenientes de zoológicos se los representó con color blanco en la red de haplotipos. Se trata de seis individuos de cuatro zoológicos diferente de Uruguay que se sabe que originariamente pertenecían a la población “El Tapado” o a “ECFA”. El H1 estuvo presente en un individuo del “Zoológico de San Carlos”, el H2 se observó en dos individuos del “Parque Lecoq”, el H4 lo presentó un individuo del “Zoológico de Durazno”, y con el H6 se observaron dos individuos, uno del “Parque Lecoq” y el otro del “Zoológico de Salto”.

Este fragmento mostró ser variable entre individuos, pero no permite distinguir entre poblaciones.

En la Figura 2.3.5 se muestra la red de haplotipos para el mismo fragmento que la Figura 2.3.4 pero solamente con los individuos de poblaciones Uruguayas. Se hallaron 14 haplotipos en 51 individuos. Hay un solo haplotipo compartidos entre las dos poblaciones silvestres. Se incluyeron diez muestras de “Los Ajos”, siete de “El Tapado”, veinte seis de “ECFA”, dos de “ECFA” tomadas hace 20 años y seis de varios Zoológicos de Uruguay.

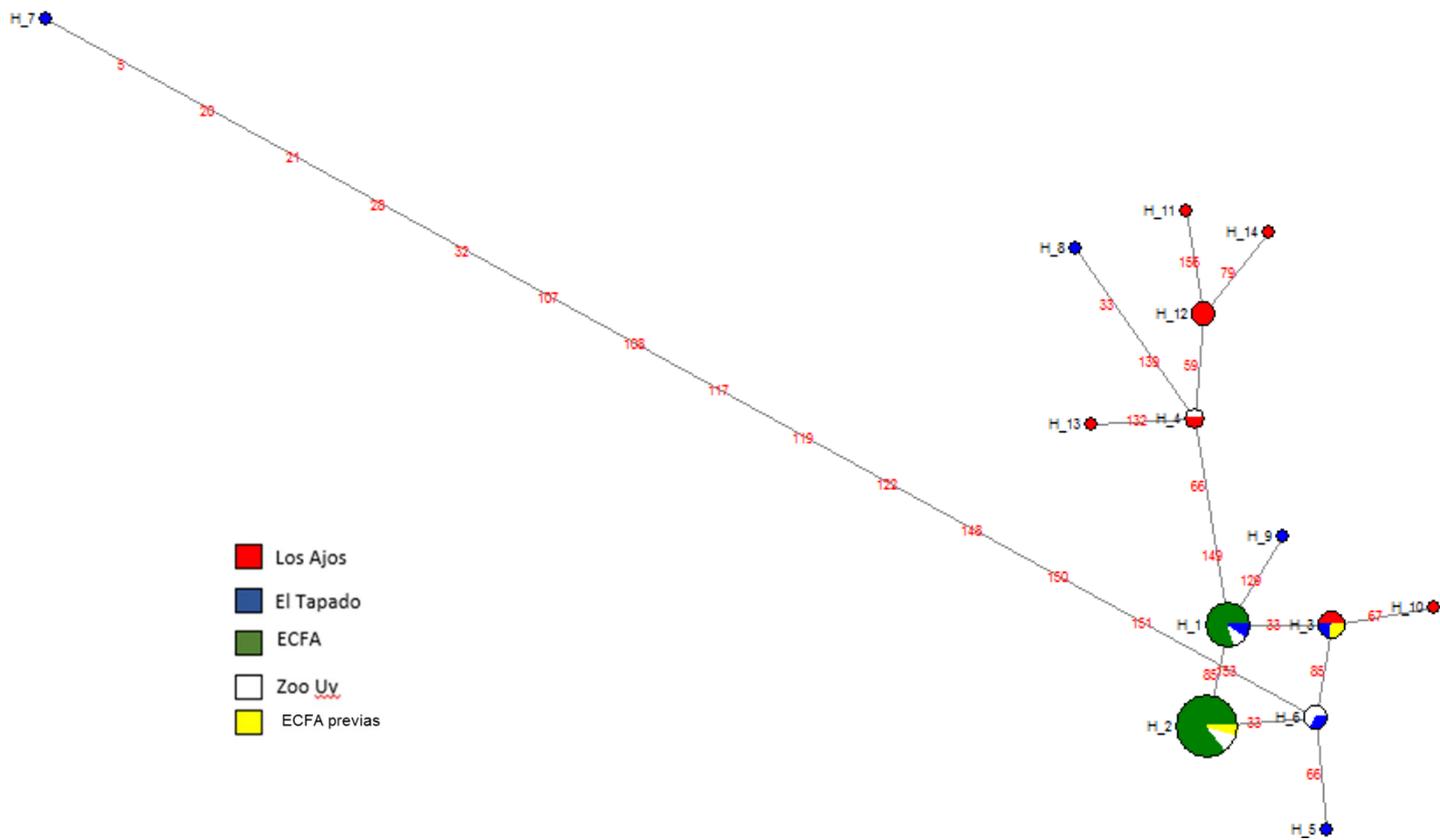


Figura 2.3.5. Red de Haplotipos para el fragmento de *D-loop* se incluyen solamente muestras de Individuos de Uruguay. Se construyó con el programa *Network V 5.0.03*.

Discusión 2.4

Diversidad y estructuración genética de las poblaciones a partir de análisis de secuencias del ADN mitocondrial

Las especies amenazadas de extinción son en general de las que menos se conoce acerca de los aspectos básicos de la biología y genética. En los estudios de caracterización genética uno de los mayores desafíos es la estrategia de muestreo, teniendo en cuenta que nos permita obtener un número de muestras representativas pero sin lesionar ni alterar, ni a los individuos ni a sus hábitats (González, 2005).

Se determinó que hace aproximadamente 2.5 a 3 millones de años durante el Pleistoceno, apareció en la formación pampeana el ancestro directo del venado de campo (Marshall *et al.*, 1984). El levantamiento del puente de tierra panameño permitió que el ancestro del venado de campo participara en el intercambio faunístico entre América del Norte y Sudamérica (Stehli & Webb, 1985). A partir de este evento, los cérvidos se distribuyeron por toda Sudamérica ocupando distintos nichos, hasta la introducción de los bóvidos que pasaron a ocupar gran parte del territorio habitado por poblaciones de venados (Eisenberg, 1987).

Estudios realizados en venado de campo para diferentes marcadores mitocondriales, detectaron niveles de variabilidad genética muy diversos. González *et al.*, (2007), analizaron un fragmento del gen mitocondrial *Cytb* (417 pb) en 63 individuos de poblaciones de Uruguay, Brasil, Argentina y Paraguay; hallaron una baja diversidad haplotípica ($Hd = 0.28$). Repetto (Repetto, 2010), analizó un fragmento del gen *COI* (548 pb), en 52 individuos de poblaciones silvestres de Uruguay, Argentina y Brasil, halló una diversidad haplotípica baja (0.35) pero mayor que la observada con *Cytb*. González (González *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2008), utilizó un fragmento de la región *D-loop* (453 pb) para análisis en las poblaciones Uruguayas, Argentinas y Brasileñas de venado de campo, ese fragmento les permitió distinguir entre subespecies. En esta tesis se usó un fragmento más pequeño de *D-loop* (de 161 pb), comprendido dentro del analizado por González *et al.* (1998), por ser este fragmento

más pequeño contiene una variabilidad mucho menor, se detectó menos cantidad de haplotipos. En la población de "ECFA" solo se detectaron 2 haplotipos con este marcador. En un futuro se debería amplificar toda la región *D-loop* o al menos el fragmento de 453 pb en todos los individuos de esa población para determinar si la baja diversidad hallada para este marcador se debe al fragmento utilizado, o a que efectivamente es una población poco diversa con ese marcador. Se utilizó un fragmento más pequeño dado que nos permitía realizar las amplificaciones mediante PCR en tiempo real, que es más rápido y sensible, una vez puesta a punto la metodología podremos genotipar a los individuos mediante el análisis de las corridas en el Real Time sin necesidad de secuenciar.

El fragmento pequeño de *D-loop*, permitió detectar variabilidad genética en ADN de baja calidad como es el extraído a partir de fecas, pero no es tan informativo para aplicar en estudios poblacionales filogeográficos, dado que individuos de diversas poblaciones geográficamente distantes y aisladas comparten haplotipos, como es el caso del H1, compartido por individuos de poblaciones silvestres de Uruguay, Argentina y Brasil, individuos que pertenecen a subespecies diferentes.

En el caso del marcador *NADH 5*, se usó un fragmento de 473 pb. Se observó un patrón similar al *D-loop* pequeño. Sin embargo no nos permitió discriminar entre poblaciones. Se hallaron haplotipos compartidos entre individuos de "Los Ajos" y de "El Tapado" que no solo se trata de poblaciones diferentes, sino que también de subespecies diferentes. Probablemente no haya pasado el tiempo suficiente como para ver la divergencia clara entre las poblaciones uruguayas con este fragmento. *NADH 5* al ser un gen es más conservado que la región *D-loop*.

Si bien el número de muestras analizadas con *NADH 5* es bajo, probablemente se trate de un marcador más conservado en la especie. El fragmento es incluso más grande que el amplificado por González *et al.* (1998) y la diversidad hallada mucho menor que para *D-loop*, seguramente pueda deberse a que este gen codifica para una proteína siendo más conservado. En un futuro deberíamos realizar análisis con este marcador en muestra de poblaciones con mayor aislamiento geográfico, para ver si en esos casos,

este marcador nos permite diferenciar entre poblaciones. También analizar mayor número de individuos de las poblaciones Uruguayas. Se podría diseñar cebadores que permiten amplificar por fragmentos toda la región hipervariable y luego ensamblarla para su análisis.

Si bien para ambos marcadores encontramos haplotipos compartidos entre las poblaciones Uruguayas, los análisis estadísticos mostraron diferenciación entre ellas.

Proceso de diferenciación de la población en cautiverio

La población presente en “ECFA” fue fundada hace 37 años. Considerando el tiempo generacional de 2 años (Collaborative Workshop, 1993) lleva 18 generaciones desde su origen, y ya se comenzó a ver proceso de diferenciación genética de su población de origen (“El Tapado”) basándonos en los valores de F_{ST} para ambos marcadores mitocondriales utilizados.

En cuanto al fragmento amplificado del gen mitocondrial *NADH 5*, el H4 se observó en 11 de los 24 individuos analizados, ocho de ellos de “ECFA” y tres de la población “El Tapado”. Probablemente este haplotipo estuviera presente en “El Tapado” al momento de la translocación y algunas de las hembras translocada lo presentaran.

El H3 lo presentaron dos individuos (SG 278, SG 283) ambos de la población “ECFA” los dos pertenecen al mismo recinto (recinto cuatro), probablemente estos individuos sean madre e hijo. El individuo SG 278 es un macho cría que no sabíamos cuál de las hembras de ese recinto era la madre, y el individuo SG 283 es una hembra adulta.

En “ECFA” se hallaron dos haplotipos con ambos marcadores, una posible explicación sería que entre las hembras fundadoras de esta población había poca variación genética al menos para marcadores mitocondriales. También podría deberse al manejo de esta población desde su fundación y que solo pocas fundadoras se vean representadas en el pool gamético.

En “ECFA” se vio una aparente asociación entre el H3 de *NADH 5* y el H1 de *D-loop*; y el H4 DE *NADH 5* y el H2 de *D-loop*. Esa “asociación” no se ve en las muestras de

poblaciones silvestres; adicionalmente ni el H2 de *D-loop* ni el H3 de *NADH 5* se hallaron en poblaciones de vida libre. Si bien deberíamos hacer más estudios con ambos marcadores en las tres poblaciones, esta “asociación” probablemente sea reflejo del genotipo de las hembras fundadoras de “ECFA”. Los haplotipos que se observaron en la población de “ECFA” pero no en la población de “El Tapado” se puede deber a dos motivos, uno que sean haplotipos únicos de “ECFA” y que ambas poblaciones se estén diferenciando genéticamente. La otra posible explicación es que sean haplotipos muy poco frecuentes en la población “El Tapado” y que por “efecto fundador” o efecto de muestreo, se vean con mucha mayor frecuencia en la población en cautiverio. De todas maneras deberíamos hacer un muestreo mayor con estos marcadores en la población “El Tapado”.

Un cuello de botella poblacional es la reducción abrupta del número poblacional de un año al otro, que puede ser el resultado de diferentes factores, incluidos desastres ambientales, caza excesiva o enfermedades. Una disminución poblacional tan marcada, puede dejar una marca genética duradera incluso si una población recupera posteriormente el tamaño poblacional previo. Un cuello de botella poblacional reducirá el tamaño efectivo de una población y por lo tanto su nivel general de diversidad genética.

Las reintroducciones o formación de poblaciones en un lugar donde no habían poblaciones de esa especie, constituyen un tipo particular de cuello de botella que es conocido como efecto fundador, conocido así porque los fundadores de una población llevarán solo una parte de la diversidad genética que estaba presente en la población original (Freeland, 2014).

De los análisis realizados se desprende que la población de “ECFA” ya se está diferenciando de la población de “El Tapado” y que aparentemente la población “ECFA” no ha conservado toda la diversidad presente en “El Tapado”. Esto se puede deber a muchas causas. Puede ser el efecto “cuello de botella”, también se puede deber a un manejo no correcto de la población de “ECFA” desde su fundación, otro factor que pudo haber influido es la selección de los individuos a traslocar.

Estructuración genética del venado de campo en Uruguay y la región.

Para *D-loop* a nivel de las poblaciones de Uruguay se probaron muchos posibles agrupamientos de las diferentes poblaciones, en todos los casos el F_{CT} no era significativo por lo que no pudimos elegir ninguno, la región del *D-loop* que amplificamos se trata de una región muy conservada diseñada para diferenciar entre 17 spp de distribución neotropical. Posteriormente se realizaron análisis agregando secuencias de individuos de otras poblaciones de la región, y se eligió el agrupamiento con mayor F_{CT} , la población “ECFA” en un grupo diferente que “El Tapado”. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones Uruguayas tanto para *D-loop* como para NADH muestran diferencias entre “ECFA” y ambas poblaciones silvestres, sin embargo no se ven diferencias entre ellas.

Para NADH no se pudo realizar análisis de AMOVA, se probaron dos agrupamientos y ninguno dió valores de F_{CT} significativos.

El mismo fragmento de *D-loop* (161 pb) usado en esta tesis para venado de campo había sido empleado en el guazú-birá (*Mazama gouazoubira*), siendo en este último más polimórfico y además permitió realizar inferencias poblacionales (Aristimuño, 2017). Ambas especies son cérvidos autóctonos y están en el mismo clado filogenético (Duarte *et al.*, 2008). Se esperaba que el venado de campo fuese tan polimórfico como el guazú-birá para esta región, sin embargo es menos polimórfico. Recientes análisis empleando un fragmento de *D-loop* como marcador (450 pb) mostraron que *Dama dama* en varias poblaciones europeas *tiene* niveles de diversidad menores a los hallados en venado de campo (Kusza *et al.*, 2018). Por el contrario análisis con el mismo marcador en cérvidos asiático *Muntiacus reevesi* (773 pb) mostró niveles de diversidad iguales a los hallado en *Mazama gouazoubira* (Sun *et al.*, 2018).

El patrón observado en la red de haplotipos para los análisis realizados con el fragmento de *D-loop* es patrón estrella (*star-shaped network*; Rogers & Harpending, 1992), que se considera una señal molecular de la ocurrencia de un evento de expansión demográfica explosiva o selección a favor de algún haplotipo. Esta red, está

compuesta por un haplotipo central de mayor frecuencia, compartido entre diferentes localidades (derivado del linaje maternal del que se originó la radiación), y varios haplotipos menos frecuentes o únicos que derivan de éste. En este caso el haplotipo central es el H1, el que es compartido por individuos de seis de las ocho poblaciones silvestres analizadas. Un patrón similar al observado con *D-loop*, fue observado para las mismas poblaciones de venado de campo con el marcador *COI* por Repetto (2010). Este patrón se ha observado en guazú-birá en Uruguay (Aristimuño, 2017) y también en otros cérvidos (Latch *et al.*, 2009; Abril *et al.*, 2010).

3. MICROSATÉLITES

3.1 Introducción

Los microsatélites son marcadores nucleares polimórficos hipervariables con una amplia distribución en los genomas eucariotas (Moore *et al.*, 1991). Consisten en repeticiones de secuencia simple en tándem. Los motivos de repetición varían entre 1-6 pares de bases y se han encontrados en todos los genomas eucariotas. Estos repetidos se localizan tanto en regiones codificantes como no, y en general se caracterizan por un alto polimorfismo de longitud determinada por pérdida o ganancia de unidades repetidas; debido a su alta variabilidad se han convertido en eficaces marcadores genéticos (Zane *et al.*, 2002). Son marcadores co-dominantes, bi-alélicos en individuos, y multi alélicos en la población. Estos marcadores pueden ser fácilmente amplificados mediante PCR (Arif & Khan, 2009).

Un marcador nuclear de este tipo es útil para estudios de escalas espaciales reducidas y permitirá detectar los efectos de eventos a escalas temporales finas (eventos recientes) (Zane *et al.*, 2002). Estos marcadores moleculares pueden brindar información adicional útil para el manejo de poblaciones en cautiverio, en especial cuando los registros de pedigrí no son exhaustivos o no están disponibles (Armstrong *et al.*, 2011).

Los microsatélites dadas sus características son muy usados como marcadores moleculares, y particularmente en el campo de genética de la conservación se los emplea en estudios de diversidad, análisis de estructura de población y para explorar las relaciones filogenéticas (Duwe *et al.*, 2017; Morillo *et al.*, 2017; Šnjegota *et al.*, 2017; Bolton *et al.*, 2018; Piggott *et al.*, 2018).

Si bien actualmente, las técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*), son las más apropiadas para desarrollar cebadores especie-específicos para microsatélites, su costo así como el esfuerzo requerido es sustancial (Galan *et al.*, 2003). Para disminuir costos y facilitar su rápida implementación, disponemos de la alternativa de emplear loci de microsatélites caracterizados para especies cercanas taxonómicamente. Esto es posible debido a que las regiones que flanquean las secuencias repetidas son en la mayoría de los casos conservadas (Rafalski *et al.*, 1996;

Ferreira & Grattapaglia, 1995; Zane *et al.*, 2002) lo que permite la reducción en trabajo y costo para el desarrollo de cebadores para cada especie de interés (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Un alto número de loci polimórficos han sido reportados y aplicados en especies filogenéticamente cercanas (Galan *et al.*, 2003; Vial *et al.*, 2003; Maudet *et al.*, 2004) y la transferencia de loci de microsatélites entre especies taxonómicamente relacionadas en mamíferos, ya ha sido demostrada en animales domésticos como vacunos, ovinos, perros (Moore *et al.*, 1991; Roy *et al.* 1994), primates, (Morin & Woodruff, 1992) y cetáceos (Schlotteröer *et al.*, 1991).

Sin embargo no siempre es posible lograr reacciones de amplificación cruzada entre especies relacionadas de manera exitosa, debido a las altas tasas de mutación en las secuencias que flanquean los microsatélites que obstaculizan seriamente el diseño de cebadores conservados para su aplicación universal (Arif *et al.*, 2011).

La amplificación cruzada de marcadores de microsatélites entre especies relacionadas no se comporta de manera uniforme a través de los taxa (Barbará *et al.*, 2007). Sin embargo se vio que se puede lograr mayor éxito de amplificación dentro y entre géneros tanto en planta como animales, lo que indicaría un gran potencial para emplear microsatélites y sus regiones de flaqueo como fuente de regiones nucleares de copia única (Barbará *et al.*, 2007).

En ciervos la utilización de loci de microsatélites diseñados en otras especies de ungulados ha sido una estrategia muy utilizada (Slate *et al.*, 1998; Galan *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2003; Mantellatto *et al.*, 2010). En venado de campo se probaron 15 juegos de cebadores inicialmente diseñados para otros ungulados, resultando cinco de ellos con un patrón de amplificación consistente y altamente polimórficos (Cosse, 2010; Cosse *et al.*, 2007).

3.2 Metodología

3.2.1 Muestras utilizadas.

Se utilizaron muestras de “El Tapado”, “Los Ajos” y de “ECFA”, tomadas del mismo set de muestras que las empleadas para los análisis con marcadores mitocondriales (Anexo 1, Tabla 3).

3.2.2 Diseño y selección del set de microsatélites

Se realizó una búsqueda bibliográfica para detectar cebadores de loci de microsatélites desarrollados en especies relacionadas, que pudieran amplificar en venado de campo. Se seleccionaron 20 pares de cebadores, algunos probados en venado de campo y otros en guazú-birá, desarrollados en *Mazama gouazoubira*, *Bos sp*, *Capras sp*, *Ovis sp* y *Rangifer tarandus*. De los loci seleccionados seis habían sido probados en venado de campo (Cosse *et al.*, 2007; Cosse, 2010), y reportados como polimórficos para la especie; 11 loci fueron desarrollados para *Mazama gouazoubira* (de Farias Peres, 2015; Caparroz *et al.*, 2015) los cuales no habían sido evaluados para venado de campo; tres loci desarrollados inicialmente en otras especies, y probados por amplificación cruzada con éxito en *M. gouazoubira* (De Farias Peres, 2015; Da Rosa, 2014) (Tabla 3.2.1).

Una vez seleccionados los pares de cebadores a emplear, se probaron en venados de campo los 14 loci que no habían sido testeados aún para esta especie (*Goua 3*, *Goua 7*, *Goua 8*, *Goua 10*, *Goua 16*, *Goua 17*, *Goua 18*, *Goua 20*, *Goua 21*, *Goua 24*, *Goua 25*, *SPS 113*, *SPS 115*, *RT 09*). Para ello se eligieron ocho Individuos, cuatro de “Los Ajos” (SG 13, SG 127, SG 143, SG 206), y cuatro de “El Tapado” (SG 49, SG 62, SG 64, SG 95).

Los protocolos de reacción de amplificación por PCR consistieron en: 6 µl de Mix para PCR *ImmoMix™* de *Bioline*, 0,36 µl de BSA (concentración 10mg/ml), 0,75 µl de cada cebador (*foward* y *reverse*, concentración 10 µM/µl), entre 5 y 10 ng/ µl de ADN y resto de agua ultra pura hasta completar los 12 µl de volumen final. Se usaron cebadores

foward marcados con un fluorocromo: *Goua 7, Goua 16, Goua 24, RT 09, SPS 113, SPS 115*.

Tabla 3.2.1. Lista de los 20 loci seleccionados de la bibliografía para probar por amplificación cruzada en venados de campo. Se detalla para qué especie fue diseñado cada par de cebadores de loci de microsatélites.

Loci	Especie en la que se desarrollo	Probado en venado de campo	Bibliografía
Goua 3	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Peres, 2015.
Goua 7	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 8	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Peres, 2015.
Goua 10	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 16	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 17	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 18	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 20	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 21	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 24	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
Goua 25	<i>Mazama gouzoubira</i>	No	Caparroz <i>etal.</i> , 2015.
SPS 113	<i>capra sp</i>	No	
SPS 115	<i>capra sp</i>	No	
BM 203	<i>Bos sp</i>	Si, Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007.	Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007
BM 757	<i>Bos sp</i>	Si, Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007.	Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007
BM 1818	<i>Bos sp</i>	Si, Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007.	Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007
RT 09	<i>Rangifer tarandus</i>	No	Wilson <i>et al</i> , 1997.
CSSM 41	<i>Bos sp</i>	Si, Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007.	Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007
INRA 40	<i>ovis sp</i>	Si, Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007.	Cosse 2010; Cosse <i>et al</i> 2007
TGLA 10	<i>Bos sp</i>	Si, Cosse 2007.	Cosse 2007

La misma se llevó a cabo mediante el siguiente ciclado: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos, cada uno: una desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 2 minutos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Con una extensión final de 10, minutos a 72°C. Se realizó PCR en tiempo final, se empleó el termociclador: *Benchmark* (modelo: TC 9639 *Thermal cycler*).

Para algunos loci de microsatélites (*Goua 3, Goua 7, Goua 8, Goua 21, Goua 25*), comenzamos utilizando el cebador *foward* con una región complementaria a la que flanquea el microsatélite a amplificar, más una cola de *M13* en el extremo 5'; un cebador *reverse* con una secuencia específica del extremo 3' del microsatélite; y el cebador universal *M13* (5'(6-FAM)TGTAACCGCCAGT-3'), incorporando así fluorescencia a los fragmentos amplificados.

En el caso de las reacciones con cebadores marcados con *M13*, las reacciones consistieron en: 0,15 µl de Taq polimerasa, 1,5 µl del Buffer de la enzima, 0,45 µl de MgCl, 0,3 µl de BSA (concentración 10 mg/ml), 0,3 µl de dNTP, 0,33 µl de *M13*, 0,75 µl de cada cebador (*reverse y foward*, concentración 10 µM/µl), y resto de agua ultra pura hasta completar los 15 µl de volumen final.

La misma se llevó a cabo mediante el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, cada uno con una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos. A continuación 9 ciclos cada uno con: una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 53°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos. Con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se realizó PCR en tiempo final, se empleó el termociclador: *Benchmark* (modelo: TC 9639 *Thermal cycler*).

Los fragmentos amplificados se verificaron mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2% usando GoodView™ como agente intercalante y visualizado en transiluminador.

Los fragmentos que amplificaron exitosamente se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo para efectuar la corrida en

microcapilar en el ABI 3500 de *Applied Biosystems*. Con el análisis de las corridas se seleccionaron siete loci que sumados a los seis ya probados en venado de campo (Cosse *et al.*, 2007; Cosse, 2010), generó un set de 13 loci de microsatélites para amplificar las muestras. De este conjunto de 13 loci se mandaron a sintetizar marcados con fluoroforo en el cebador *forward* aquellos fueron testeados con M13.

Se generaron set para reacciones en multiplex, en la cual incluimos tres o cuatro pares de cebadores. Los loci se agruparon empleando los siguientes criterios; el tipo de fluorocromo del cebador, el tamaño esperado del fragmento a amplificar y la temperatura de anidamiento de los cebadores.

Los protocolos de las reacciones de PCR consistieron en: 6 µl de MIX de PCR (en algunos caso se usó *Platinum^R Multiplex PCR Master Mix* de *Applied BiosystemsTM*, y en otros Mix para PCR *ImmoMixTM* de *Bioline*), 0,36 µl de BSA (el BSA está a una concentración de 10 mg/mL, 0,48 µl de cada cebador (de F y R de todos los pares del multiplex, los cebadores estaban en concentración de 10 µM/µ), entre 6 y 10 ng/µl de ADN, y agua ultra pura hasta completar los 12 µl de volumen final. En cada experimento adicionalmente a las muestras se incluyeron controles positivo y negativo para detectar posibles contaminaciones.

Los protocolos de amplificación de las reacciones realizadas con MIX *Platinum^R Multiplex PCR Master Mix*, se llevaron a cabo mediante el siguiente ciclado: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos, cada uno con: una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 90 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Con una extensión final de 30 minutos a 60°C. Se realizó PCR en tiempo final, se emplearon los siguientes termocicladores: *Benchmark* (modelo: *TC 9639 Thermal cycler*), *A&E (Cycler 003)* y *Biometria (T-1 thermoblock)*.

Los protocolos de las reacciones llevadas a cabo empleando en el Mix para PCR *ImmoMixTM* de *Bioline*, se llevaron a cabo mediante el siguiente ciclado: desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos, cada uno con una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 1 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto. Con una extensión final de 15 minutos a 72°C. Se realizó PCR en

tiempo final, se emplearon los siguientes termocicladores: *Benchmark* (modelo: *TC 9639 Thermal cycler*), *A&E* (*Cycler 003*) y *Biometria* (*T-1 thermoblock*).

Los fragmentos amplificados se verificaron mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2%, usando *GoodView™* como agente intercalante y visualizado en transiluminador. Los loci utilizados en cada multiplex se detallan en la Tabla 3.2.2. En los casos de que uno de los loci del multiplex no amplificara se realizó un nuevo PCR con un único par de cebadores.

Tabla 3.2.2. Se detalla para cada locus de microsatélite empleado, las secuencias de los cebadores *forward* y *reverse* el rango de tamaño esperado para los alelos, el fluorocromo anexado al cebador *forward*, la temperatura de anealing y el Multiplex en el que se usó.

Locus	Tipo de repetido	Secuencia cebadores	Tamaño esperado	Fluorocromo	Ta°C	Multiplex
Goua 7	Trinucleotido	F- GTCTGATCCAATCTGAGGGTC R- TCATAGCATCCAAGGCAAATA	159-168	JOE	55	2
Goua 16	Tetranucleotido	F- GGGACAGTGATAAACTAGGTGT R- CTAATGAGATAGCAAAGTACGC	209-241	VIC	55	2
Goua 21	Tetranucleotido	F- GAGTACAACAGCCATGCAGAGA R- CATTGGGGTTACCTAGAGAAG	164-188	FAM	52	4
Goua 24	Trinucleotido	F- AAGAAGCTCAAACCTGCCTGTC R- TCTATTTCACCTCTTTCCCA	171-186	FAM	55	2
Goua 25	Trinucleotido	F- AGGACAACCATGCACCTACTTT R- ATCCCAGCTCCTTTAACACAA	191-209	HEX	55	1
BM 203	Dinucleotido	F- GGGTGTGACATTTTGTTCCT R- CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	241-265	JOE	57	4
BM 757	Dinucleotido	F- TGGAAACAATGTAACCTGGG R- TTGAGCCACCAAGGAACC	195-227	FAM	55	3
BM 1818	Dinucleotido	F- AGCTGGGAATATAACCAAAGG R- AGTGCTTCAAGGTCCATGC	251-279	FAM	55	2
RT 09	Dinucleotido	F- TGAAGTTAATTTCCAATCT R- CAGTCACTTTCATCCACAT	~100	FAM	55	1
INRA 40	Dinucleotido	F- TCAGTCTCCAGGAGAGAAAAC R- CTCTGCCCTGGGGATGATTG	165-197	JOE	57	3
CCSM 41	Dinucleotido	F- AATTTCAAAGAACCGTTACACAGC R- AAGGGACTTGACAGGGACTAAAACA	117-203	TAMRA	63	3
SPS 113	Dinucleotido	F- CCTCCACACAGGCTTCTGACTT R- CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCC	103-133	HEX	55	4
TGLA 10	Dinucleotido	F- CTAATTTATCCCACTGGCTCTT R- CAATCTGCAGTAGCATACCTTG	~150	NED	55	1

3.2.3 Genotipificación

Los productos de PCR fueron corridos en microcapilar en un equipo *ABI 3500* de *Applied Biosystems*, en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. El tamaño de los fragmentos fue examinado con el programa *Gene Marker V 2.4* (SoftGenetics).

Por cambios en el servicio de secuenciación algunas corridas (las primeras) quedaron en base a un marcador de referencia el *GS 500 old*, y otras corridas con otro marcador de referencia el *GS 600*. Al comparar el genotipado de muestras corridas con ambos marcadores, se concluyó que no eran totalmente homólogos. Para corregir este error y poder hacer comparables las corridas con ambos marcadores, se eligieron para cada locus entre 10 y 18 muestras que habían sido corridas en microcapilar con el marcador de referencia *GS 500 old*. Se las amplificó en reacciones de PCR individuales y se los envió a correr con el nuevo marcador de referencia *GS 600*.

Una vez genotipadas las muestras corridas, se comparó para cada locus y muestra ambas corridas, y así se estableció cuantos pares de bases se necesitaban correr las matrices para que pudieran ser comparables. Ver Anexos 3, Tabla 1.

Se eligieron 20 muestras que fueron amplificadas por triplicado y en reacciones de multiplex. Se usó un nuevo protocolo de ciclado "*Touch Down*". El ciclado del "*Touch Down*" consistió en: una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95°C, seguida por 10 ciclos: 30 segundos a 94°C, 90 segundos bajando la temperatura de 58°C a 56°C (bajando medio grado cada 2 ciclos) y 60 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final a 60°C por 40 minutos. En el caso del Multiplex C el "*Touch Down*" se inició en 60°C llegando a 58°C. Para este protocolo se usaron cuatro multiplex: multiplex A: *Goua 16* y *BM 757*; multiplex B: *Goua 24* y *Goua 25*; multiplex C: *Inra 40* y *BM 203*; multiplex D: *Goua 7*, *Goua 21* y *RT 09*. Los resultados se pueden ver en Anexos 3, Tabla 2.

Análisis de diversidad genética y estructuración poblacional

Al trabajar con ADN degradado o en baja concentración (como en el caso de muestras no invasivas) se pueden generar errores en el genotipado. Se distinguen dos tipos de errores: estocásticos y sistemáticos. Los errores estocásticos son los que se generan por pérdida de alelos y errores en la asignación del genotipo, se pueden deber a muchos factores como por ejemplo como consecuencia de baja concentración de ADN en la muestra. Esto puede llevar a la no amplificación azarosa de algunos de los alelos en algunas muestras (Miller & Waits, 2003). Se puede deber también a la

amplificación preferencial de alelos de menor tamaño (Wattier *et al.*, 1998). Durante la reacción de PCR puede suceder lo conocido como “tartamudeo de la polimerasa”, al desplazarse la ADN polimerasa adicionar mayor número de repetidos en la copia que los que había en el molde (Shinde *et al.*, 2003). Los errores sistemáticos generan falsos homocigotas dado que ciertos alelos no amplifican (alelos nulos) como consecuencia de mutaciones en el sitio de unión al cebador. En esos casos se observa deficiencia en la frecuencia de heterocigotos, si lo comparamos con lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weimberg, esto puede generar un sesgo en los análisis poblacionales, esas desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg muchas veces se pueden confundir y atribuirse a las generadas por endogamia, apareamiento fuera de la panmaxia o al “Efecto Wahlund” (Van Oosterhout *et al.*, 2004). En el “Efecto Wahlund” se observa una reducción en la frecuencia de heterocigotos pero debido a la existencia de varias subpoblaciones agrupadas en una única muestra (Cosse, 2010; Selkoe & Toonen, 2006; Chapuis & Estoup, 2007). Para evaluar y detectar posibles errores de genotipado causado por alelos nulos, pérdida de alelos o tartamudeo de la polimerasa, se utilizó el programa *Micro-Checker 2.2.3* (Van Oosterhout *et al.*, 2004). En caso de identificar alelos nulos el programa estima las frecuencias de los mismos y ajustar las frecuencias observadas (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

El equilibrio de Hardy- Weinberg (E H W) establece que en una población las frecuencias alélicas y genotípicas se mantendrán constantes de generación en generación si no existen fuerzas evolutivas actuando. Este principio asume ciertos supuestos: herencia mendeliana, apareamiento al azar (panmixia) dentro de la población, ausencia de migración (la población es un sistema "cerrado"), deriva (la población es infinitamente grande), o selección natural (Beebee & Rowe, 2008; Guo & Thompson, 2003).

Un apartamiento del equilibrio de H-W de una población señala que no se están cumpliendo al menos uno de los supuestos. Por tanto el análisis del equilibrio de H W es útil como hipótesis nula, para comprender los procesos que afectan a una población real sometida a diferentes fuerzas evolutivas (Cosse, 2010).

Los marcadores utilizados para realizar estudios genéticos poblacionales, no deberían estar sometidos a presión de selección de ningún tipo, deben ser neutros desde el punto de vista evolutivo, para asegurarse que las mutaciones que se producen no son seleccionadas ni eliminadas. Es importante que los loci a utilizar como marcadores genéticos se encuentren en Eq. H-W.

Para testear que los loci utilizados estén en equilibrio de Hardy-Weinberg, sean neutros y que no estén ligados a genes que se encuentren bajo presión de selección, se los evaluó utilizando el programa *Genepop on the Web V4.2* (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008) el cual emplea algoritmos de Cadenas de Markov de Monte Carlo mediante el método descrito por Guo & Thompson (2003). Con el programa *Genepop V 4.2* se calcularon también los estimadores F_{ST} para el conjunto de datos y F_{IS} para cada población.

Para valuar cuan informativos son los loci a utilizar se calculó el PIC (contenido de información polimórfica), como forma de medir el grado de polimorfismos de un locus o del set de loci, mediante el programa *Cervus 3.0.7* (Kalinowski *et al.*, 2007). El valor de PIC se relaciona con la cantidad de alelos, así como con su frecuencia para un locus en determinada población. Se considera que el locus o el set de loci es informativo si el PIC del mismo presenta valores superiores a 0,5; mientras que valores que se ubican en el rango entre 0,25 -0,5 son medianamente informativos, y serán considerados como poco informativos aquellos cuyos PIC sean menores a 0,25 (Botstein *et al.*, 1980).

Se utilizó el programa *Structure V 2.3.4* (Pritchard *et al.*, 2000) para estimar el grado de estructuración genética en la población, con este programa se analizó la matriz de datos de genotipos obtenidos para los diferentes loci de microsatélites, para el cual no se definieron grupos a priori.

El programa *Structure V 2.3.4* utiliza el método Bayesiano y asume un modelo en donde existen K *clusters* caracterizados cada uno de ellos por un conjunto de frecuencias alélicas. Los individuos muestreados son asignados probabilísticamente a estos *clusters*, considerando que dentro de los mismos los loci se encuentran en equilibrio Hardy - Weinberg y en equilibrio de ligamiento (Pritchard *et al.*, 2009). La corrida con el programa se realizó con la siguiente configuración: “burn-in period”: 10.000, réplicas MCMC: 20.000, K : 1 a 5, réplicas: 10. Se utilizó la opción por defecto

de modelo con “*admixture*”, que admite la existencia de mezcla entre grupos (Pritchard *et al.*, 2000). El programa ajusta el modelo para un número de poblaciones (K) determinado, cada una conteniendo un conjunto de individuos de forma que presenten el mínimo desequilibrio en relación a H-W y ligamiento. El K seleccionado será aquel que minimice estos valores, entonces son los propios datos los que determinan el grado de estructuración. Para determinar el K más probable una vez realizadas las simulaciones, se utilizaron las aproximaciones implementadas en el programa *Structure Harvester Web V 0.6.9.4* (Earl & vonHoldt, 2012), donde el K más probable será aquel que presente el mayor valor de máxima verosimilitud con menor desvío estándar (Pritchard *et al.*, 2000) y mayor delta K (ΔK) (Evanno *et al.*, 2005).

Se realizaron análisis con el programa *BOTTLENECK V 1.2.02* (Cornuet & Luikart, 1996), para evaluar si ocurrieron procesos de cuello de botella recientes en la población de la “ECFA”. Una población que recientemente sufrió un cuello de botella experimenta reducción, tanto en número de loci polimórficos como en su heterocigosidad, sin embargo el número de alelos se reduce más rápidamente que la heterocigosidad (Luikart *et al.* 1998), por lo que se espera observar un exceso de la heterocigosidad en relación a lo esperado en el equilibrio de H-W, dejando vacíos en la distribución de alelos de la población (Hajji *et al.*, 2007). En el análisis incluimos dos modelos de evolución de microsatélites, de alelos infinitos (IAM) (Kimura & Crown, 1964) y el modelo de mutación de un paso (SMM) (Kimura and Ohta 1978). Para este análisis se utilizaron las muestras de la “ECFA”, para evaluar si sucedieron procesos de cuello de botella reciente en esa población.

El modelo IAM, supone que cada mutación da origen a un alelo nuevo con una tasa dada u . Este modelo no permite homoplasia. Alelos idénticos comparten el mismo ancestro y son idénticos por descendencia.

Por lo contrario el modelo de SMM, supone que cada mutación genera un alelo nuevo tanto por adición como por pérdida de una única unidad repetida simple $u/2$ para ambas direcciones. En este modelo dos alelos de tamaño muy diferentes estarán menos relacionados que dos alelos de tamaño similar.

3.3 Resultados

Se seleccionaron siete de los 14 loci de microsatélites extraídos de la bibliografía, diseñados en especies relacionadas y que no habían sido probados con anterioridad para venado de campo. Los loci: *Goua 8*, *Goua 18* y *Goua 20* no amplificaron en venado de campo. Los loci: *Goua 3* y *Goua 17* amplificaron muy tenue y en pocas muestras por lo que se los descartó. Los restantes 9 loci amplificaron en la mayoría de las muestras y se enviaron a correr en microcapilar. Los loci: *SPS 115* y *Goua 17* fueron monomórficos para la especie. Se seleccionaron a los que mostraron patrón de amplificación polimórfico (Tabla 3.3.1).

Tabla 3.3.1. Resultados de amplificación de los 14 loci testeados seleccionados de la bibliografía. En rosado están aquellos loci que amplificaron mostrando un patrón polimórfico.

Locus	Patrón de amplificación
Goua 3	Amplificó muy Tenue
Goua 7	Amplificó, polimorfico
Goua 8	No amplificó
Goua 10	Amplificaron pocas y tenúe
Goua 16	Amplificó, polimorfico
Goua 17	Amplificó, monomorfico
Goua 18	No amplificó
Goua 20	No amplificó
Goua 21	Amplificó, polimorfico
Goua 24	Amplificó, polimorfico
Goua 25	Amplificó, polimorfico
SPS 113	Amplificó, polimorfico
SPS 115	Amplificó, monomorfico
RT 09	Amplificó, polimorfico

En la Tabla 3.3.2 se muestran los alelos detectados para cada uno de los loci que mostraron un patrón de amplificación polimórfico. *Goua 7*: n alelos=3; *Goua 16*: n alelos=5; *Goua 21*: n alelos=4; *Goua 24*: n alelos =5; *Goua 25*: n alelos=5; *RT 09*: n alelos= 4; *SPS 113*: n alelos=6. (Tabla 3.5.2). Estos siete loci se sumaron a los seis que ya habían sido probados para venado de campo (Cosse *et al.*, 2007; Cosse, 2010), generando un set de 13 loci de microsatélites para amplificar las muestras. Las muestras analizadas con microsatélites se detallan en la Tabla 3 del Anexo1.

Tabla 3.3.2. Alelos para los siete loci que mostraron patrón de amplificación polimórfico en el set de datos analizados. Con rojo están lo alelos cuyas pruebas se realizaron con el cebador M 13 y en la Tabla se muestran corregidos.

Individuos	Poblaciones	Goua 7	Goua 16	Goua 21	Goua 24	Goua 25	RT 09	SPS 113
SG 13	Los Ajos			155/163				139/145
SG 127	Los Ajos	136/142		151/159		157/166	104/108	
SG 143	Los Ajos	142/142	193/201	163/163	165/168	175/178	102/104	133/137
SG 206	Los Ajos	136/142				157/169		145/145
SG 49	El Tapado		207/211	155/159	159/165		100/102	
SG 62	El Tapado	142/145		155/163		175/175	102/104	139/143
SG 64	El Tapado			155/155		157/169		
SG 95	El Tapado	136/142	201/203	151/151	156/162	166/166	104/104	129/139

Todos los productos de PCR para los que se verificó amplificación mediante corrida electroforética se enviaron a correr en microcapilar al servicio de secuenciación. En muchos casos no fue posible realizar el análisis del cromatograma y genotipado, dado que algunos tenían señal muy baja y otros poca definición.

Una vez que todas las muestras fueron genotipadas, se vio que no todos los microsatélites del set de 13 loci amplificaron de forma similar. Aquellos loci que amplificaron con señal muy baja, o en muy pocas muestras se eliminaron de la matriz final (*SPS 113, TGLA 10, BM 1818 y CSSM 41*), quedando información para nueve loci (*Goua7, Goua16, Goua21, Goua24, Goua25, RT09, BM203, BM757, INRA 40*). También se eliminaron de la matriz final aquellas muestras de las que teníamos información para menos del 50% de los loci analizados).

A muchas corridas no se les pudo asignar genotipo dado que no fue posible leer el cromatograma, esto fue una constante durante todo este trabajo, en algunos casos debido a la poca señal en otros porque las corridas tenían mucho ruido. Esto paso sobre todo en las corridas en las que se usó el MIX ImmoMIX.

Muestras analizadas

Con el set de loci de microsatélites, se analizaron en total 111 individuos de las tres poblaciones, 69 individuos de la población de "ECFA" y 42 individuos de poblaciones silvestres (n= 14 de "El Tapado" y n= 28 de "Los Ajos"). Se incluyeron cuatro individuos más provenientes del Zoológico "Villa Dolores". De la matriz de datos de 111 individuos para 13 loci, se eliminaron aquellos loci que habían amplificado en muy pocas muestras quedándonos con un set de 9 loci de microsatélites. A continuación de eliminaron los individuos de los que teníamos información para 4 o menos loci. Luego de depurada la matriz de datos quedó con información para nueve loci y para 61 individuos de poblaciones silvestres y en cautiverio, 41 de ellos de la población "ECFA", uno del zoológico "Villa Dolores" y 19 individuos provenientes de poblaciones silvestres (n= 7

de “El Tapado” y n= 12 de “Los Ajos”). Esa matriz depurada es la que se usó para realizar todos los análisis poblacionales con microsatélites (Anexo 3, Tabla 3).

Para los 61 individuos y los nueve loci se hallaron entre cinco y trece alelos, siendo *RT 09* el locus con menos alelos e *INRA 40* el locus con más alelos (Tabla 3.3.3). Sin embargo por población la cantidad de alelos hallados por locus es menor. En la población “Los Ajos” se hallaron entre cuatro y siete alelos. En “El Tapado” se obtuvieron entre tres y seis alelos. La población de “ECFA” es en la que tenemos datos para más individuos y es en la que se halló mayor diversidad alélica entre cuatro y diez alelos dependiendo del locus que miremos, y al igual que en el conjunto de las tres poblaciones, *RT 09* fue el locus con menor número de alelos y *INRA 40* el locus con mayor número de alelos (Tabla 3.3.3). Para los nueve loci se hallaron alelos compartidos por las tres poblaciones y alelos únicos para al menos una de las poblaciones analizadas, para todos los loci se hallaron alelos únicos para la población de “ECFA”.

En la Tabla 3.3.3 se muestran los alelos hallados para cada locus en total y por población.

Tabla 3.3.3. Alelos hallados por locus y en cada población.

Locus	n° de alelos	Alelos	"Los Ajos"	"El Tapado"	"ECFA"
Goua 7	n= 7	115, 127, 130, 133, 136, 139, 142	n= 5 (115, 130, 133, 136, 139)	n= 4 (130, 133, 136, 139)	n= 6 (127, 130, 133, 136, 139, 142)
Goua 16	n= 8	185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213	n= 5 (185, 189, 193, 197, 201)	n= 6 (185, 193, 197, 201, 205, 209)	n= 6 (185, 189, 197, 205, 209, 213)
Goua 21	n= 11	144, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 168	n= 4 (148, 152, 156, 160)	n= 5 (144, 148, 152, 156, 160)	n= 9 (150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 168)
Goua 24	n= 8	153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174	n= 5 (156, 162, 165, 168, 174)	n= 6 (153, 156, 159, 162, 165, 168)	n= 6 (153, 156, 159, 162, 165, 171)
Goua 25	n= 8	157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178	n= 5 (157, 160, 166, 172, 175)	n= 3 (157, 160, 172)	n= 8 (157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178)
BM 203	n= 12	212, 218, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242	n= 6 (212, 224, 230, 238, 240, 242)	n= 5 (216, 230, 234, 236, 242)	n= 8 (218, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 240)
BM 757	n= 12	177, 179, 181, 183, 187, 189, 191, 195, 197, 199, 201, 205	n= 7 (177, 179, 181, 183, 187, 189, 191)	n= 6 (177, 179, 183, 187, 195, 197)	n= 9 (177, 179, 181, 183, 189, 191, 199, 201, 205)
INRA 40	n= 13	145, 147, 149, 151, 155, 157, 161, 163, 165, 167, 169, 171,	n= 4 (145, 147, 151, 157)	n= 6 (147, 149, 155, 161, 163, 171)	n= 10 (145, 147, 149, 157, 161, 163, 165, 167, 169, 175)
RT 09	n= 5	98, 100, 102, 104, 106	n= 4 (98, 100, 102, 106)	n= 3 (98, 100, 102)	n= 4 (98, 100, 102, 104)

La matriz de datos obtenida fue analizada con el programa *Microchequer V 2.2.3* y este indicó que probablemente los locus *Goua 16* y *BM 757* tengan algún alelo nulo, no se realizaron correcciones.

El análisis de desequilibrio de ligamiento con el *Genepop V 4.2* dio para todas las combinaciones de loci en todas las poblaciones P valores mayores a 0,05 por lo que se acepta que no hay ningún par de loci ligado.

En la Tabla 3.3.5 se muestran los resultados obtenidos del análisis con el programa *Cervus V 3.0.7*, para cada locus, donde se muestre el número de alelos (k), número de individuos (N) heterocigosidad observada y esperada. Se analizaron entre 39 y 54 individuos dependiendo del locus. La heterocigosidad observada promedio fue de 0,716 y la heterocigosidad esperada promedio 0,75. En general ambas heterocigosidades son valores similares para cada locus, el locus que muestra mayor diferencia entre estos dos valores es el *Goua 16*, en el que la heterocigosidad observada es casi la mitad del valor de la esperada. El programa *Cervus V 3.0.7* también estima si cada uno de los loci está en equilibrio de Hardy-Weiberg y justamente el *Goua 16* es el único que se aleja del mismo.

Para el conjunto de loci se analizaron 61 individuos, para nueve loci y el promedio de alelos por locus es 9,444, el promedio de información polimórfica (PIC) es 0,7106, la probabilidad combinada de no exclusión (par de padres) es 0,00000206 y la probabilidad combinada de no exclusión (identidad) es de: $2,732E^{-10}$.

Para todos los loci el PIC fue mayor a 0,5 es decir que individualmente todos los loci son altamente informativos, en cada caso el PIC varió entre 0,525 y 0,901 (Tabla 3.3.4). El conjunto de loci de microsatélites utilizados presentó un PIC de 0,7106 que nos habla de un set altamente informativo. También se evaluó el set para cada población: "ECFA" PIC = 0,6626; "Los Ajos" PIC=0,6150; "El Tapado" PIC=0,6569. En Anexos 3, Tabla 4 se detalla el número de alelos, contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada y esperada, por locus para cada población.

Tabla 3.3.4. Datos obtenidos de los análisis con el programa *Cervus V 3.0.7*. K es el número de alelos hallados para ese locus, N es el número de individuos analizados para ese loci, Hobs y Hesp son la heterocigosidad observada y esperada respectivamente, PIC contenido de información polimórfica.

Locus	K	N	H obs	H esp	PIC	NE - 1P	NE - 2P
Goua 7	7	39	0.795	0.763	0.713	0.649	0.471
Goua 16	8	51	0.353	0.610	0.583	0.774	0.586
Goua 21	12	54	0.722	0.775	0.741	0.601	0.422
Goua 24	8	50	0.820	0.739	0.689	0.670	0.495
Goua 25	8	47	0.660	0.700	0.662	0.698	0.514
BM 203	12	35	0.800	0.901	0.878	0.370	0.226
BM 757	12	39	0.667	0.801	0.775	0.547	0.367
INRA 40	13	39	0.923	0.857	0.828	0.469	0.304
RT 09	5	48	0.708	0.604	0.525	0.809	0.670

En la Tabla 3.3.5, se muestran los resultados de los análisis con el *Genepop*, de la probabilidad de estar en Equilibrio de Hardy Weinberg. Teniendo en cuenta todos los locus, solamente está en equilibrio la población “El Tapado”. Todos los locus además están en equilibrio para esa población. Las poblaciones “Los Ajos” y “ECFA” no se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla 3.3.5. Se muestra por Locus y por población, la probabilidad de que estén en EHW. En la columna marcada en gris se muestran las probabilidades para cada locus de todo el conjunto de datos. En la Fila marcada en gris se muestran las probabilidades de EHW para cada población teniendo en cuenta a todo el conjunto de loci. Los valores no significativos están marcados con un *.

	ET	LA	ECFA	Todos los datos
G7	0,773	0,002*	0,118	0,044*
G16	0,773	0,000*	0,001*	0,000*
G21	0,781	0,256	0,001*	0,000*
G24	0,770	0,767	0,168	0,027*
G25	0,115	0,913	0,310	0,212
BM203	1,000	0,179	0,440	0,072
BM757	0,796	0,199	0,030*	0,026*
INRA 40	1,000	1,000	0,362	0,111
RT09	0,101	1,000	0,000*	0,010*
Todos los Loci	0,876	Hig Sig*	0,0000*	

Con el programa *Genepop V 4.2* se realizó el test de deficiencia de heterocigotas y mostró que solo la población de “Los Ajos” está fuera del equilibrio.

En la Tabla 3.3.6 se muestra los valores de F_{ST} estimados para todos los loci para todas las poblaciones y los valores de p , calculados con el programa *FreeNA*. Los F_{ST} hallados no son significativos por lo que no se ven diferencias entre las poblaciones estudiadas.

Tabla 3.3.6. F_{ST} estimado entre las poblaciones analizadas. Bajo la diagonal de muestran los F_{ST} , y sobre la diagonal los valores de p. Datos obtenidos con el programa FreeNA.

	ET	LA	ECFA
ET		0,091	0,083
LA	0,047		0,159
ECFA	0,058	0,097	

Con el programa *Genepop V 4.2* se estimó el F_{IS} , coeficiente de endogamia. Para el conjunto de datos el F_{IS} fue de 0,047. Por poblaciones el F_{IS} fue: “El Tapado” F_{IS} = 0,0201, “Los Ajos” F_{IS} = 0,2407, “ECFA” F_{IS} : -0,0573. Según los resultados en “El Tapado” y “ECFA” prácticamente hay panmixia es decir apareamiento al azar.

Una vez corrida la matriz con el *Structure V 2.3.4* se usó el *Structure Harvester web V 0.6.94* para elegir el valor de K (n° de poblaciones). El k más probable fue K=2 (Figura 3.3.1). En la Figura 3.3.2 se muestra el gráfico del *Structure* para K=2. Se pueden distinguir dos grupos, una por los individuos del 1 al 19 la cual estaría constituida por los individuos de ambas poblaciones silvestres es el clúster mayoritariamente rojo; la otra población el clúster mayoritariamente verde compuesta con los individuos del 20 al 61, se trata de todos los individuos de “ECFA” y el individuos del Zoológico “Villa Dolores”, el que se sabe es hijo de una pareja que se llevó desde “ECFA” a “Villa Dolores”.

En la Figura 3.3.2 se muestra el gráfico generado con el programa *Structure V 2.3.4*. Se usó la matriz que se muestra en Anexo 3, Tabla 3, donde están todos los individuos como una misma población, ordenados de menor a mayor por número de muestra. Cada barra representa a un individuo, el número que está debajo es el número de posición del individuo en la matriz. Del individuo 1 al 19 son de poblaciones silvestres, el número 20 es el SG 250 que es un individuo del Zoológico “Villa Dolores”, y del número 21 al 61 son individuos de “ECFA” (Tabla 3.3.7).

Si bien con el *Structure* se ven dos grupos, los valores de F_{ST} no dieron significativos, por lo que no vemos estructuración en las poblaciones Uruguayas con estos marcadores.

En el análisis de los datos de microsatélites con el programa *BOTTLENECK V 1.2.02* para la población de "ECFA", realizado bajo la hipótesis de equilibrio de mutación-deriva tanto para el modelo IAM como para SMM no se observó un exceso de heterocigotas, como el esperado bajo un proceso de cuello de botella reciente.

Se observó deficiencia de heterocigotas solo bajo el modelo SMM.

Figura 3.3.1. Gráficos obtenidos con el programa *Structure Harvester Web V 0.6.94* del análisis de las corridas del programa *Structure*. A) Gráfico del Logaritmo neperiano de máxima verosimilitud con su desvío estándar ($L(K)$ (mean+SD) para cada uno de los K grupos B) Gráfico de Delta k: B. simulación.

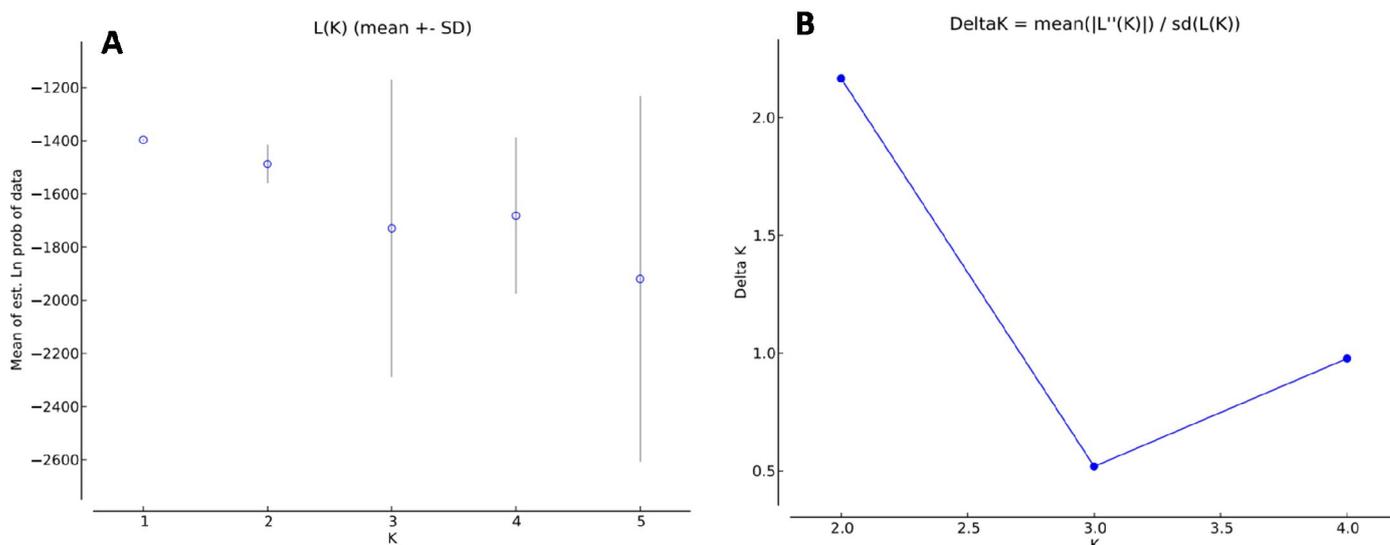
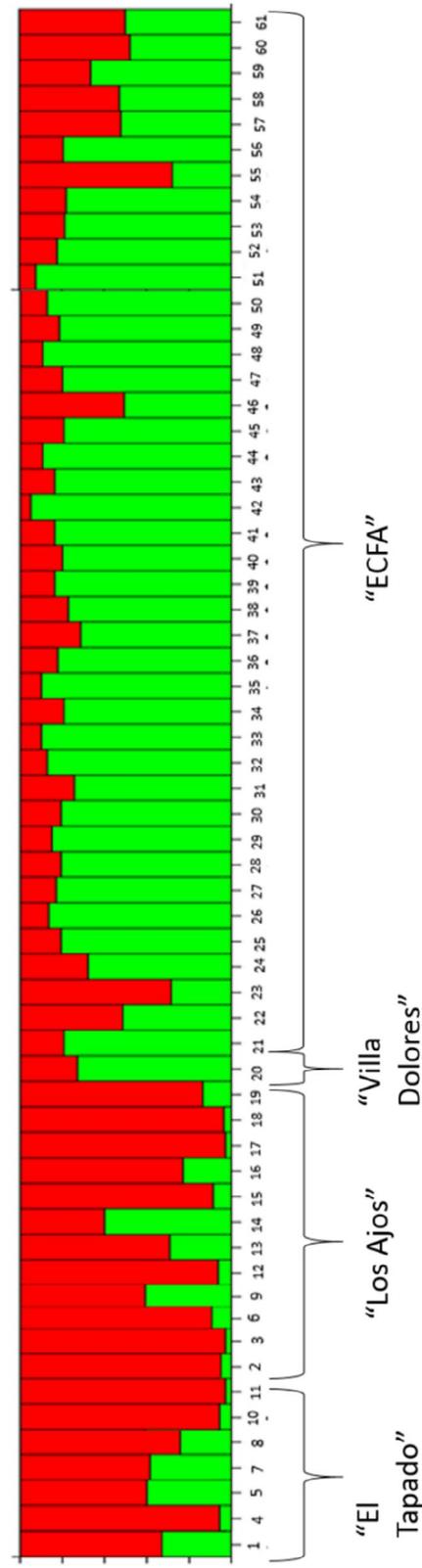


Figura 3.3.2. Plot generado con el programa “Structure” para la matriz de datos de genotipo generada con información de loci de microsátelites. El número de cada individuo se corresponde a la posición que ese individuo ocupaba en la matriz. # muestras que proceden de “Los Ajos”, * muestras que proceden de “El Tapado”. – muestras de “Villa Dolores”, * muestras de “ECFA”



3.4 Discusión

Caracterización de un set de loci polimórfico

El conjunto de nueve loci de microstélites seleccionado, es un set altamente polimórfico. Los loci no están ligados y en su mayoría se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg. Este set nos permitió evaluar parámetros poblacionales en venado de campo, como niveles de endogamia y estructuración genética. Por lo que podría ser utilizado en estudios poblacionales.

Estructura genética poblacional

Los análisis genéticos previos con marcadores mitocondriales (González *et al.*, 1998) mostraron diferencias genéticas entre los individuos de las poblaciones silvestres “Los Ajos” y “El Tapado”. Posteriormente con estudios morfométricos (González *et al.*, 2002) se determinaron que ambas poblaciones conformaban unidades de conservación distintas, considerándolas dos subespecies.

Para la población de “Los Ajos” hallamos un apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto podría ser causado por es el reducido número de muestra ($n= 12$); sin embargo estudios previos (Cosse *et al.*, 2007; Cosse, 2010) encontraron resultados similares con casi el triple de número de muestras ($n=34$). El F_{IS} para esa población muestra que hay exceso de homocigotas, esa podría ser una causa de que la población se encuentre fuera del equilibrio. Hay muestras y loci compartidos entre los estudios realizados por Cosse *et al.* (2007) y los realizados en este trabajo.

Si bien en la población de “El Tapado” se analizaron 7 muestras los resultados obtenidos indican que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y el apareamiento entre los individuos de la población es al azar.

Los marcadores mitocondriales son una herramienta muy utilizada para la reconstrucción de la historia de poblaciones y especies (por las características del ADN

mitocondrial) (González *et al.*, 2016). La región hipervariable *D-loop* en general se utilizan para identificación a bajos niveles, especies y subespecies (Arif & Khan, 2009), y por tanto esta región presenta altas tasas de mutación comparado con los genes que codifican para proteínas. Mientras que los marcadores localizados en genes mitocondriales son una buena herramienta para análisis genéticos en bajas categorías como: familias, género y especies, los loci de microsatélites han sido empleados en estudios de parentesco y en estudios clásicos de estructura genética en poblaciones y permiten una vista alternativa al ADNmt de herencia materna. Estos marcadores son típicamente caracterizados por altas tasas de mutación, altos niveles de polimorfismos y en consecuencia un nivel más fino de resolución para dinámicas poblacionales (Hardy *et al.*, 2003). Con los marcadores mitocondriales (NADH 5 y *D-loop*) se observó diferenciación entre “El Tapado” y “ECFA” (F_{ST}). Sin embargo con los microsatélites no se halló estructuración entre las poblaciones uruguayas de venado de campo, los valores de F_{ST} entre las poblaciones no fueron significativos.

En “ECFA” a pesar de ser una población en cautiverio y pequeña se halló diversidad con marcadores nucleares que con mitocondriales. Dado el manejo de la población “ECFA”, sin registros genealógicos claros, ni análisis genéticos, el número de individuos a partir de la cual se originó, las generaciones que se estiman han transcurrido y que no se han incorporado nuevos animales, una de nuestras hipótesis de trabajo fue que la población presente en “ECFA” tendría altos niveles de endogamia. Sorprendentemente, la población está en equilibrio H-W y no presenta endogamia, lo que indicaría un buen manejo. En un trabajo previo con este tipo de marcadores en una población cautivas en otra especie de ungulado (*Antilope Addax*), originada a partir de un número menor de individuos se hallaron resultados similares (Armstrong *et al.*, 2010). En el Huemul, análisis con 14 loci de microsatélites en 58 muestras de tejidos colectados en una población silvestre del Lago Cochrane en una reserva nacional en Chile, se halló una baja diversidad genética y los resultados mostraron una reducción poblacional reciente (cuello de botella). Sin embargo en esa población pequeña se observó índices de F_{IS} cercano a cero ($F_{IS}= 0.009$) lo que indica que no habría endogamia (Corti *et al.*, 2011).

Para cada locus analizado se hallaron alelos únicos en la población “ECFA”, mientras que para poblaciones silvestres algunos loci también presentaron alelos únicos (Tabla 3.3.3). Esto probablemente se deba a que “ECFA” esté en proceso de diferenciación genética de “El Tapado”, aunque el número de individuos analizados de “El Tapado” fue bajo.

No se pudo caracterizar a todos los individuos presentes en la población “ECFA”, por lo que sería muy importante en un futuro continuar con la caracterización genética de esta población en cautiverio y la información a obtenerse será de gran importancia a la hora de seleccionar individuos reproductores.

Para mantener la población de “ECFA” a largo plazo es relevante conservar la diversidad actual, para eso lo recomendable es reproducir en mayor proporción a los individuos cuyos genotipos están menos representados en la población, y en menor proporción a los que están más representados; evitar lo más posible la pérdida de la diversidad presente, así como priorizar la conservación de los genotipos presentes también en “El Tapado” (González *et al.*, 2016).

Un seguimiento más constante de cada individuo, acompañado de un sistema de marcaje más claro, permitirá tener registro de la genealogía de cada recinto y así evitar cruzar individuos relacionados.

Es muy recomendable poder implementar en Uruguay un programa de Cría en cautiverio de venado de campo, similar al llevado a cabo con éxito en Brasil en el ciervo de los pantanos (Duarte, 2003). Para ello sería necesario caracterizar genéticamente a los individuos presentes en otros zoológicos de Uruguay y realizar un plan eligiendo algunos zoológicos, en cada uno establecer stocks con individuos de “ECFA” donde en cada grupo de venados deberá estar representado la mayor variabilidad genética posible, y asegurarse de que se trate de individuos no relacionados.

Este sistema daría un respaldo en caso de que sucedan catástrofes y se pierda el stock en alguna unidad del sistema de cría. Cada cierto tiempo se pueden intercambiar individuos entre los centros participantes de este sistema de cría, de forma que los individuos que presentan genotipos menos frecuentes dejarán descendencia en más

de un centro y eso contribuirá a disminuir la posibilidad de pérdida de genotipos poco frecuentes.

Dado el stress de captura que sufren estos animales, como forma de asegurar su bienestar, una posibilidad podría ser solo mover crías, y emplear técnicas de fecundación in vitro.

El análisis genealógico (“studbook”) previene a través de cruas dirigidas, la selección artificial y la endogamia, lo que se refleja directamente en el mantenimiento de la diversidad genética (González et al., 2016). Por esta razón es importante que todo este plan sea seguido de cerca registrando la genealogía, y con control sanitario de todos los animales y lugares en donde estén.

La selección artificial, pérdida de diversidad genética y la depresión por endogamia son las principales preocupaciones que se enfrentan al diseñar un programa de conservación ex situ (González *et al.*, 2016).

Comúnmente los stocks cautivos de especies amenazadas son fundados por un pequeño número de individuos, generando un cuello de botella artificial lo que resulta en baja diversidad genética en la primera generación (efecto fundador). El pequeño stock inicial sumado a la deriva génica explica cómo la población efectiva se mantiene baja durante varias generaciones y también causa pérdida masiva de diversidad genética en los stocks cautivos (Ballou *et al.* 2010). La población “ECFA” se originó en 1981 a partir de 21 individuos de “El Tapado”. A pesar de la historia de esta población, no se observó un proceso de cuello de botella poblacional reciente. A partir de los resultados obtenidos no se acepta la hipótesis de cuello de botella reciente en “ECFA”. En poblaciones silvestres de esta especie Cosse (2010) tampoco encontró indicios de proceso de cuello de botella reciente en la población “Los Ajos”.

En la cría en cautiverio el objetivo de la genética es retener lo más intacta posible la diversidad genética de los fundadores, para que el stock actúe como reservorio genético de la especie a largo plazo (Ballou *et al.*, 2010).

Actualmente es imprescindible a la hora de establecer un programa de cría en cautividad para ciervos neotropicales seguir las siguientes consideraciones: i) Correcta identificación de taxones (especies, subespecies); ii) Selección de posibles fundadores; iii) mantener el stock cautivo identificado y marcado (microchip, tatuaje, etiquetas); iv) Mantener registros genealógicos detallados (González *et al.*, 2016).

Cuando se comenzó con la población “ECFA” no se realizó estudios genéticos a los individuos fundadores y tampoco se guardaron muestras de los mismos, por lo que no podemos evaluar la conservación de la diversidad de los individuos fundadores; pero si podemos velar por conservar la diversidad presente actualmente en “ECFA”, con especial esfuerzo en preservar los genotipos que también se encuentran en la población silvestre “El Tapado”. Para esto es necesario continuar con los análisis hasta contar con la caracterización genética de todos los individuos del stock cautivo y analizar mayor número de muestras de “El Tapado”. Si bien los individuos de “ECFA” están marcados con caravana, mejoraría mucho el manejo utilizar otras caravanas que se visualicen mejor, así como colocarles caravanas a los individuos al momento que nacen. Estos detalles ayudarían a poder mejorar el registro genealógico. El cuál es indispensable para mejorar el manejo.

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Los marcadores mitocondriales empleados en esta tesis *D-loop* (fragmento de 161 pb) y NADH 5 (fragmento de 473 pb), son útiles para analizar variación poblacional.
- Con ambos marcadores mitocondriales se detectó subestructuración entre poblaciones Uruguayas.
- Se obtuvo por amplificación cruzada un set de 9 loci de microstélites que permitiría estudios poblacionales en venado de campo.
- Con el set de microsatélites se detectó estructuración moderada. Con los marcadores mitocondriales se vio estructuración poblacional estadística significativa.
- En la población de “ECFA” que se originó con individuos de “El Tapado”, ya comenzaron a detectarse procesos de diferenciación genética entre estas poblaciones, probablemente debido al manejo de la misma. Esto se ve con los marcadores mitocondriales y los microsatélites. En caso que se hagan reintroducciones de los animales de “ECFA” a la naturaleza no sería recomendado que fuesen en “El Tapado”.
- Con los microsatélites no se detectó evidencia de que la población “ECFA” haya atravesado un proceso de cuello de botella reciente.
- Los resultados sugieren que es importante realizar un manejo reproductivo de esta población considerando el parentesco de los individuos e incluyendo aquellos individuos que estén menos representados en el pool reproductor.

Perspectivas:

- Sería de interés mediante técnicas NGS (*Next Generation Sequencing*), obtener los mitogenomas para varios individuos de todas las poblaciones silvestres conocidas para ésta especie.
- A futuro será necesario analizar a todos los individuos de la población “ECFA” con varios marcadores moleculares tanto mitocondriales como nucleares, con el fin de poder elaborar un plan de manejo y conservación para esa población que asegure su viabilidad a largo plazo, como forma de conservar y proteger el acervo genético del venado de campo que hay en la misma.
- Reconstruir la genealogía de la población teniendo en cuenta los datos obtenidos en esta investigación.
- Generar un plan de manejo y conservación del venado de campo con un sistema de metapoblaciones, en el cuál se incluyan más zoológicos, y no estén todos los individuos solo en “ECFA”, de esta forma no sólo se previene la pérdida de diversidad por causas de catástrofes, sino que aumenta las posibilidades de realizar educación ambiental con estos animales, sobre el rol del venado en los campos naturales y la importancia de la conservación de la fauna nativa.

5. IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN

Se recomienda modificar el manejo de "ECFA", de forma que se conserve la diversidad genética presente hoy en día. Sobre todo contemplar por la conservación de la diversidad compartida con "El Tapado". La población "ECFA" no está en equilibrio de H-W, no hay endogamia. Como estrategia de conservación de la diversidad de "ECFA" se recomienda: i) continuar con la caracterización genética de los individuos, ii) reconstruir la genealogía para todos los recintos, iii) elaborar plan de manejo que asegure la viabilidad en los próximos 100 años y contemple introducción de material genético, y iv) planificar reintroducciones en predios adecuados en el norte del Uruguay.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, V. V.; Carnelossi, E. A G .; González, S. and Duarte, J. M.B .** (2010). Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama Americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic and Genome Research* 128 (1–3): 177–87. <https://doi.org/10.1159/000298819>.
- Acosta-Jamett, G.; Simonetti, J. A.; Bustamante, R. O.; and Dunstone, N.** (2003). Metapopulation Approach to Assess Survival of *Oncifelis guigna* in Fragmented Forests of Central Chile: A Theoretical Model. *Mastozoología Neotropical / J. Neotrop. Mammal* 10 (2): 217–29.
- Albaugh, G.P.; Iyengar, V.; Lohani, A.; Malayeri, M.; and Nair, P.P.** (1992). Isolation of Exfoliated Colonic Epithelial Cells, a Novel, Non-Invasive Approach to the Study of Cellular Markers. *Int. Journal of Cancer* 350: 347–50.
- Allendorf, F.W. & Luikart, G.** (2007). Units of conservation. Chapter 16. In: Allendorf, F. W.; Luikart, G. & Aitken, S. N. (Eds.) Conservation and the genetics of populations. Blackwell publishing, USA, p. 380-420.
- Arif, I. A. and Khan, H. A.** (2009). Molecular Markers for Biodiversity Analysis of Wildlife Animals : A Brief Review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32 (1): 9–17. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9526-z>.
- Arif, I. A.; Khan, H. A.; Bahkali, A. H.; Al Homaidan, A.A.; Al Farhan, A.H.; Sadoon, M.A. and Shobrak, M.** (2011). DNA Marker Technology for Wildlife Conservation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18 (3): 219–25. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.03.002>.
- Aristimuño, M. P.** (2017). Análisis genético de poblaciones de guazú-birá (*Mazama gouazoubira* Fisher, 1814), Implicancias para su conservación. Tesis de Maestría En Biología, PEDECIBA Programa de Desarrollo de Las Ciencias Básicas. Laboratorio de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
- Armstrong, E.; Leizagoyen, C.; Martínez, A. M.; González, S.; Delgado, J. V. and Postiglioni, A.** (2011). Genetic Structure Analysis of a Highly Inbred Captive Population of the African Antelope Addax nasomaculatus. Conservation and Management Implications. *Zoo Biology* 30 (4): 399–411. <https://doi.org/10.1002/zoo.20341>.

- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A. and Saunders, N.C.** (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18 (1): 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>.
- Ballou, J. D.; Lees, C.; Faust, L. J.; Long, S.; Lynch, C.; Bringaman Lackey, L. and Foose, T. J.** (2010). Demographic and genetic management of captive populations. In D.G. Kleiman, K.V. Thompson, and C. Kirk Baer (eds.) *Wild mammals in captivity principles and techniques for zoo management*, 2d ed., pp. 219–269. University of Chicago Press. Chicago.
- Bandelt, H. J. and Forster, A. R. P.** (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology* 16 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Barbará, T.; Palma-Silva, C.; Paggi, G. M.; Bered, F.; FAY, M. F. and Lexer, C.** (2007). Cross-Species Transfer of Nuclear Microsatellite Markers. *Molecular Ecology* 16: 3759–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x>.
- Beebee, T. & Rowe, G.** (2008) *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 400pp.
- Beja-Pereira, A.; Zeyl, E.; Ouragh, L.; Nagash, H.; Ferrand, N.; Taberlet, P. and Luikart, G.** (2004). Twenty Polymorphic Microsatellites in Two of North Africa's Most Threatened Ungulates: *Gazella dorcas* and *Ammotragus lervia* (Bovidae; Artiodactyla). *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 452–55. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00678.x>.
- Bolton, P. E.; Rollins, L. A.; Boast, J. B.; Maute, K. L.; Legge, S.; Austin, J. J. and Griffith, S. C.** (2018). Genetic Diversity through Time and Space: Diversity and Demographic History from Natural History Specimens and Serially Sampled Contemporary Populations of the Threatened Gouldian Finch (*Erythrura gouldiae*). *Conservation Genetics* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1051-1>.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. and Davis, R. W.** (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314–31.
- Broquet, T. and Petit, E.** (2004). Quantifying Genotyping Errors in Noninvasive

Population Genetics. *Molecular Ecology* 13 (11): 3601–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02352.x>.

Cabrera, A. (1943). Sobre La Sistemática Del Venado y Su Variación Individual y Geográfica. *Rev Museo La Plata* 3: 5–41.

Cabrera, A.; Yepes, J. and Wiedner, C. C. (1940). *Historia Natural Ediar: Mamíferos Sud-Americanos (Vida, Costumbres y Descripción)*. Compañía Argentina de editores.

Caparroz, R.; Mantellatto, A. M. B.; Bertoli, D. J.; Figueiredo, M. G. and Duarte, J. M. B. (2015). Characterization of the Complete Mitochondrial Genome and a Set of Polymorphic Microsatellite Markers through Next-Generation Sequencing for the Brown Brocket Deer *Mazama gouazoubira*. *Genetics and Molecular Biology* 38 (3): 338–45. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738320140344>.

Chapuis, M. P. and Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24 (3): 621–31. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>.

Clayton, D. A. (1992). Transcription and Replication of Animal Mitochondrial DNAs. [Review]. *International Review of Cytology* 141: 217–32.

Collaborative Workshop. (1993). Population and hábitat viability assessment for the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. La Paloma, Rocha, Uruguay.

Constable, J. L.; Ashley, M. V.; Goodall, J. and Pusey, A. E. (2001). Noninvasive Paternity Assignment in Gombe Chimpanzees. *Molecular Ecology* 10 (5): 1279–1300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01262.x>.

Cornuet, J. M. and Luikart, G. (1996). The Role of Nutrition in the Management of COPD Patients. *Journal of Community Nursing* 28 (4): 50–58. <https://doi.org/10.12968/vetn.2014.5.7.372>.

Corti, P.; Shafer, A. B. A.; Coltman, A. W. and Festa-Bianchet, M. (2011). Past bottlenecks and current population fragmentation of endangered huemul deer (*Hippocamelus bisulcus*): implications for preservation of genetic diversity. *Conservation Genetic* (2011) 12:119–128.

Cosse, M.; González, S.; and Maldonado, J. E. (2007). Cross-Amplification Tests of

Ungulate Primers in the Endangered Neotropical Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genetics and Molecular Research* 6 (4): 1118–22.

Cosse, M. (2001). Factores tróficos asociados con la presencia de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus* L. 1758) en la “Sierra de Los Ajos”. Tesis de Maestría En Biología, PEDECIBA Programa de Desarrollo de Las Ciencias Básicas. Laboratorio de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Cosse, M. (2010). Uso de Hábitat y Estructura Genética de La Subespecie *Ozotoceros bezoarticus Uruguayensis*. Pautas Para Su Conservación. Tesis de Doctorado En Biología, PEDECIBA Programa de Desarrollo de Las Ciencias Básicas. Laboratorio de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Crandall, K. A.; Bininda-Emonds, O. R. R.; Mace, G. M. and Wayne, R. K. (2000). Considering Evolutionary Processes in Conservation Biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15 (7): 290–95. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01876-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01876-0).

Duarte, J. M. B. (2003). Evolução de um sistema para quarentena e adaptação ao cativeiro de cervosdo-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) capturados em vida livre. In J.M.B. Duarte, Projeto cervodo-pantanal de Porto Primavera: Relatório final. UNESP, Jaboticabal, Brazil. CD-ROM

Duarte, J. M. B. and González, S. (2010). *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Funep/IUCN.

Duarte, J. M. B; González, S. and Maldonado, J. E. (2008). The Surprising Evolutionary History of South American Deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (1): 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>.

Duwe, V. K.; Muller, L. A. H.; Reichel, K. and Zippel, E. (2017). Genetic Structure and Genetic Diversity of the Endangered Grassland Plant *Crepis mollis* (Jacq .) Asch . as a Basis for Conservation Management in Germany. *Conservation Genetics* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1025-8>.

Earl DA & vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resource*. 4: 359–361

Eggert, L. S.; Eggert, J. A. and Woodruff, D. S. (2003). Estimating Population Sizes for

Elusive Animals: The Forest Elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology* 12 (6): 1389–1402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01822.x>.

Eisenberg, J. F. (1987). The Evolutionary History of the Cervidae with Special Reference to the South American Radiation. *Biology and Management of the Cervidae (CM Wemmer, Ed.)*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 60–64.

Ernest, H. B.; Penedo, M. C. T.; May, B. P.; Syvanen, M. and Boyce, W. M. (2000). Molecular Tacking of Mountain Lions in the Yosemite Valley Region in California: Genetic Analysis Using Microsatellites and Faecal DNA. *Molecular Ecology* 9: 433–41.

Escobedo-Morales, L. A.; Mandujano, S.; Eguiarte, L. E.; Rodríguez-Rodríguez, M. A. and Maldonado, J. E. (2016). First Phylogenetic Analysis of Mesoamerican Brocket Deer *Mazama pandora* and *Mazama temama* (Cetartiodactyla: Cervidae) Based on Mitochondrial Sequences: Implications on Neotropical Deer Evolution. *Mammalian Biology* 81 (3): 303–13. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.02.003>.

Evanno, G.; Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.

Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. (2005). Arlequin (Version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 117693430500100. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>.

Ezard, T. H. G. and Travis, J. M. J. (2006). The Impact of Habitat Loss and Fragmentation on Genetic Drift and Xation Time. *Oikos* 2 (March): 367–75. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14778.x>.

Farias peres, P. H. (2015). “Uso Do Espaço Pelo Veado-Catingueiro (*Mazama gouazoubira* ; Fisher , 1814): Uma Comparação Entre Colares GPS e DNA Fecal Pedro Henrique. *Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ” Centro de Energia Nuclear Na Agricultura*.

Ferreira, M. E. and Grattapaglia, D. (1995). *Introdução Ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP Em Análise Genética*. Embrapa-Cenargen Brasília.

Frankham, R.; Briscoe, D. A. and Ballou, J. D. (2002). *Introduction to Conservation*

Genetics. Cambridge university press.

- Freeland, J. R.** (2014). *Molecular Ecology. Applied and Environmental Microbiology*.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003268.pub2>.
- Galan, M.; Cosson, S. J. F.; Teévenon, S.; Maillard, J. C. and HEWISON, A. J. M.** (2003). Application of Mitochondrial Control Region in Population Genetic Studies of the *Shrimp penaeus*. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–69.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286>.
- Galtier, N.; Nabholz, B.; GLÉMIN, S. and HURST, G. D. D.** (2009). Mitochondrial DNA as a Marker of Molecular Diversity: A Reappraisal. *Molecular Ecology* 18 (22): 4541–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>.
- Gaur, A.; Singh, A.; Arunabala, V.; Umapathy, G.; Shailaja, K. and Singh, L.** (2003). Development and Characterization of 10 Novel Microsatellite Markers from Chital Deer (*Cervus axis*) and Their Cross – Amplification in Other Related Species. *Molecular Ecology* 3: 607–9. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00528.x>.
- Giménez Dixon, M.** (1991). Estimación de Parámetros Poblacionales Del Venado de Las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*: Cabr., 1943-Cervidae-) En La Costa de La Bahía de Samborombón (Prov. Buenos Aires) a Partir de Datos Obtenidos Mediante Censos Aéreos. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- González, E. M.** (2001). *Guía de Campo de Los Mamíferos de Uruguay: Introducción Al Estudio de Los Mamíferos*.
- 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 (1): 47–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00303.x>.
- González, S.** (1993). Situación Poblacional Del Venado de Campo En El Uruguay. *Pampas Deer Population and Habitat Viability Assessment, Section 6*: 1–9.
- González, S.** (2005). Métodos De Muestreo No Invasivo Para El Diagnóstico Non-Invasive Sampling Methods To Monitor. *Agrociencia* IX: 545–50.
- González, S.; Álvarez-Valin, F. and Maldonado, J. E.** (2002). Morphometric Differentiation of Endangered Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*), With Description of New Subspecies From Uruguay. *Journal of Mammalogy* 83 (4):

- González, S.; Cosse, M.; Góss Braga, F.; Vila, A. R.; Merino, M. L.; Dellafiore, C.; Cartes, J. L.; Maffei, L. & Gimenez Dixon, M. (2010).** Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linneaus, 1758). Chapter 12. Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American deer. Duarte, J. M. B. & González, S. (Eds.).
- González, S.; Cosse, M. & Repetto, L. (2007).** Recuperación y estrategia de reintroducción del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) en Argentina. Málaga, España: Universidad de Málaga. Fundación BBVA.
- González, S. and Duarte, M. B. (2007).** Non Invasive Methods for Genetic Analysis Applied to Ecological and Behavioral Studies in Latino-America. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36: 89–92.
- González, S.; Duarte, J. M. B.; Cosse, M. & Repetto, L. (2016).** Conservation Genetics taxonomy and management applications in neotropical deer. in: **Conservation Genetics in Neotropical deer. Chapter 15, 238-254.**
- González, S.; Mannise, N.; Repetto, L. and Maldonado, J. E. (2015).** Sex Determination of Three Neotropical Canids by High Resolution Melting Analysis. *Conservation Genetics Resources* 7 (3): 643–45. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0466-y>.
- Gonzalez, S. and Merino, M. L. (2008).** *Ozotoceros bezoarticus* (Pampas Deer) .*The IUCN Red List of Threatened Species 2008: E.T15803A5183264*. 8235: 1–4.
- Guo, S. W. and Thompson, E. A. (2003).** Network Algorithm for the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrical Journal* 45 (4): 471–90. <https://doi.org/10.1002/bimj.200390026>.
- Hajji, G. M.; Zachos, F. E.; Charfi-cheikrouha, F. and Hartl, G. B. (2007).** Conservation Genetics of the Imperilled Barbary Red Deer in Tunisia. *Animal Conservation* 10 (2): 229–35. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2007.00098.x>.
- Hardy, O. J.; Charbonnel, N.; Freville, H. and Heuertz, M. (2003).** Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163:1467–82.
- Harrison, R. G. (1989).** Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4 (1): 6–11.

[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2).

- Jackson, J. E.** (1987). "Ozotoceros bezoarticus." *Mammalian Species*, no. 295: 1–5.
- Jackson, J.; Landa, P. and Langguth, A.** (1980). Pampas Deer in Uruguay. *Oryx* 15 (3): 267–72. <https://doi.org/10.1017/S0030605300024674>.
- Kalinowski, S. T.; Taper, M. L. and Marshall, T. C.** (2007). Revising How the Computer Program CERVUS Accommodates Genotyping Error Increases Success in Paternity Assignment. *Molecular Ecology* 16 (5): 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- Kholodova, M. V. and Prikhodko, V. I.** (2006). Molecular Genetic Diversity of Musk Deer *Moschus Moschiferus* L., 1758 (Ruminantia, Artiodactyla) from the Northern Subspecies Group. *Russian Journal of Genetics* 42 (7): 783–89. <https://doi.org/10.1134/S1022795406070131>.
- Kimura, M. and Ohta, T.** (1978). Stepwise Mutation Model and Distribution of Allelic Frequencies in a Finite Population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 (6): 2868–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.6.2868>.
- Kimura, M. and Crown, J. F.** (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725–38. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.1933>.
- Kohn, M. H. and Wayne, R. K.** (1997). Facts from feces revisited. *TREE*, (12) 6: 223–227.
- Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Kusza, S.; Ashrafzadeh, M. R.; Tóth, B. and Jávora, A.** (2018). "Maternal Genetic Variation in the Northeastern Hungarian Fallow Deer (*Dama dama*) Population. *Mammalian Biology* 93: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.08.005>.
- Landguth, E. L. and Cushman, S. A.** (2010). Cdpop: A Spatially Explicit Cost Distance Population Genetics Program. *Molecular Ecology Resources* 10 (1): 156–61. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02719.x>.
- Latch, E. K.; Heffelfinger, J. R.; Fike, J. A. and Rhodes, O. E.** (2009). Species-Wide Phylogeography of North American Mule Deer (*Odocoileus hemionus*): Cryptic Glacial Refugia and Postglacial Recolonization." *Molecular Ecology* 18 (8): 1730–

45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04153.x>.

Lucchini, E. F.; Marucco, F.; Ricci, S.; Boitani, L. and Randi, E. (2002). Noninvasive Molecular Tracking of Colonizing Wolf (*Canis*). *Science* 1992: 857–68.

Luikart, G.; Allendorf, F. W.; Cornuet, J. and Sherwin, W. B. (1998). Phylogenetic Tools for Comparative Biology Error in the Estimation of Species Means and Model Selection in Comparative Biology. 238–47.

Luikart, G. and England, P. R. (1999). Statistical Analysis of Microsatellite DNA Data. *Trends in Ecology and Evolution* 5347 (Mcmc): 253–56.

Marshall, L. G.; Berta, A.; Hoffstettes, R. et al. (1984). Mammals and stratigraphy: Geochronology of the Continental Mammal-bearing Quaternary of South America. *Laboratoire de paléontologie de l'École pratique des hautes, Montpellier*.

Mantelatto, A. M. B.; Carnelossi, E. A. G. and Duarte, J. M. B. (2010). Transferability of Microsatellite Loci from Exotic Cervidae to Brazilian Brocket Deer (*Mazama* Spp, Mammalia: Cervidae). *Genetics and Molecular Research* 9 (1): 277–82. <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr720>.

Maudet, C.; Luikart, G.; Dubray, D.; Von Hardenberg, A. and Taberlet, P. (2004). Low Genotyping Error Rates in Wild Ungulate Faeces Sampled in Winter. *Molecular Ecology Notes* 4 (4): 772–75. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00787.x>.

Miller, C. R., and Waits, L. P. (2003). The History of Effective Population Size and Genetic Diversity in the Yellowstone Grizzly (*Ursus arctos*): Implications for Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4334–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0735531100>.

Mills, L. S.; Citta, J. J.; Lair, K. P.; Schwartz, M. K. and Tallmon, D. A. (2000). Estimating Animal Abundance Using Noninvasive DNA Sampling: Promise and Pitfalls. *Ecological Applications* 10 (1): 283–94. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0283:EAAUND\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0283:EAAUND]2.0.CO;2).

Moore, K. J.; Moser, L. E.; Vogel, K. P.; Waller, S. S.; Johnson, B. E. and Pedersen, J. F. (1991). Describing and Quantifying Growth Stages of Perennial Forage Grasses. *Agronomy Journal* 83 (6): 1073–77. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300060027x>.

Moreno, F.; Figueiro, G.; Mannise, N.; Iriarte, A.; González, S.; Duarte, J. M: B. and

- Cosse, M.** (2016). Use of Next-Generation Molecular Tools in Archaeological Neotropical Deer Sample Analysis. *Journal of Archaeological Science: Reports* 10: 403–10. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.11.006>.
- Morillo, E.; Randers, S. and Gérard, K.** (2017). Assessment of Genetic Relationships between Cultivated Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza bancr.*) and Its Wild Close Relatives in the Area of Domestication Using Microsatellite Markers. *Conservation Genetics* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0978-y>.
- Morin, P.A. and Woodruff, D. S.** (1992). Paternity Exclusion Using Multiple Hypervariable Microsatellite Loci Amplified from Nuclear DNA of Hair Cells. *Paternity in Primates: Genetic Tests and Theories*, 63–81. <https://doi.org/10.1159/000421074>.
- Morin, P A.; Moore, J. J.; Chakraborty, R.; Jin, L.; Goodall, J. and Woodruff, D. S.** (1994). Kin Selection, Social Structure, Gene Flow, and the Evolution of Chimpanzees. *Science* 265: 1193–1201.
- Moritz, C.** (2002). Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Process That . *Systematic Biology* 51 (2): 238–54. <https://doi.org/10.1080/10635150252899752>.
- Murphy, M. A.; Evans, J. S.; Cushman, S. A. and Storfer, A.** (2008). Representing Genetic Variation as Continuous Surfaces: An Approach for Identifying Spatial Dependency in Landscape Genetic Studies. *Ecography* 31 (6): 685–97. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2008.05428.x>.
- Piggott, M. P.; Banks, S. C.; MacGregor, C. & Lindenmayer, B. D.** (2018). Population Genetic Patterns in an Irruptive Species , the Long-Nosed Bandicoot (*Perameles nasuta*). *Conservation Genetics* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1044-5>.
- Pritchard, J. K.; Wen, X. and Falush, D.** (2009). Documentation for Structure Software: Version 2 . 3." *Doc*.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M. and Donnelly, P.** (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155 (2): 945–59. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>.
- Rafalski, J. A.; Vogel, J. M.; Morgante, M.; Powell, W.; Andre, C. and Tingey, S. T.** (1996). Generating and Using DNA Markers in Plants. In *Nonmammalian Genomic*

Analysis, 75–134. Elsevier.

- Randi, E.; Mucci, N.; Claro-Hergueta, F.; Bonnet, A. and Douzery, E. J. P.** (2001). A Mitochondrial DNA Control Region Phylogeny of the Cervinae: Speciation in *Cervus* and Implications for Conservation. *Animal Conservation* 4 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1367943001001019>.
- Raymond, M.** (1995). GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248–49.
- Reed, D. H. and Frankham, R.** (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity\rCorrelación Entre Adaptabilidad y Diversidad Genética. *Conservation Biology* 17 (1): 230–37. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>.
- Repetto, L.** (2010). Genética de la conservación del venado de campo empleando el gen de Citocromo oxidasa I. Tesis de Maestría En Biología, PEDECIBA Programa de Desarrollo de Las Ciencias Básicas. Laboratorio de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
- Rogers, A.R. & Harpending, H.** (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9 (3): 552-569.
- Rosa, G.** (2014). Caracterización de Un Set de Microsatélites Para La Especie *Mazama gouazoubira* Mammalia : Cervidae ; Hay Comprender y Cuestionar. Tesis de Grado. *Laboratorio de Genética de La Conservación, Departamento de Biodiversidad y Genética, División Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.*
- Rossetti, D. F. and Toledo, P. M.** (2006). Biodiversity from a Historical Geology Perspective: A Case Study from Marajo Island, Lower Amazon. *Geobiology* 4 (3): 215–23. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00080.x>.
- Rousset, F.** (2008). “GENEPOP’007: A Complete Re-Implementation of the GENEPOP Software for Windows and Linux.” *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103–6. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>.
- Roy, M. S.; Geffen, E.; Smith, D.; Ostrander, E. A. and Wayne, R. K.** (1994). Patterns of Differentiation and Hybridization in North American Wolflike Canids, Revealed by Analysis of Microsatellite Loci. *Molecular Biology and Evolution* 11 (4): 553–70. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040137>.

- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J. C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S. E. and Sánchez-Gracia, A.** (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34 (12): 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Schlotteröer, C.; Amos, B. and Tautz, D.** (1991). Conservation of Polymorphic Simple Sequence Loci in Cetacean Species. *Nature* 354 (6348): 63–65. <https://doi.org/10.1038/354063a0>.
- Selkoe, K. A. and Toonen, R. J.** (2006). Microsatellites for Ecologists: A Practical Guide to Using and Evaluating Microsatellite Markers. *Ecology Letters* 9 (5): 615–29. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>.
- Shinde, D.; Lai, Y.; Sun, F. and Arnheim, N.** (2003). Taq DNA Polymerase Slippage Mutation Rates Measured by PCR and Quasi-Likelihood Analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research* 31 (3): 974–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>.
- Simonetti, J. and Acosta, G.** (2002). Conservando Biodiversidad En Tierras Privadas: El Ejemplo de Los Carnívoros. *Ambiente y Desarrollo* 18 (1): 51–54.
- Slate, J.; Coltman, D. W.; Goodman, S. J.; Maclean, I.; Pemberton, J. M. and Williams, J. L.** (1998). Bovine Microsatellite Loci Are Highly Conserved in Red Deer (*Cervus elaphus*), Sika Deer (*Cervus nippon*) and Soay Sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* 29 (June): 307–15.
- Stehli, F.G & Webb, S.D.** (1985) The great American biotic interchange. Plenum Press, New York.
- Šnjegota, D.; Stefanović, M.; Veličković, N.; Ćirović, D. and Djan, M.** (2017). Genetic Characterization of Grey Wolves (*Canis lupus L. 1758*) from Bosnia and Herzegovina: Implications for Conservation. *Conservation Genetics* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1042-7>.
- Soutullo, A.; Clavijo, C. and Martinez-Lanfranco, J. (Eds.).** (2013). *Especies Prioritarias Para La Conservación En Uruguay. Mvotma.*
- Sun, Z.; Wang, H.; Zhou, W.; Shi, W.; Zhu, W. and Zhang, B.** (2018). How Rivers and Historical Climate Oscillations Impact on Genetic Structure in Chinese Muntjac (*Muntiacus reevesi*) *Diversity and Distributions*, no. April: 1–13. <https://doi.org/10.1111/ddi.12833>.

- Taberlet, P.; Camarra, J. J.; Griffin, S.; Uhrès, E.; Hanotte, O.; Waits, L. P.; Dubois-Paganon, C.; Burke, T. and Bouvet, J.** (1997). Noninvasive Genetic Tracking of the Endangered Pyrenean Brown Bear Population. *Molecular Ecology* 6 (9): 869–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x>.
- Taberlet, P.; Griffin, S.; Goossens, B.; Questiau, S.; Manceau, V.; Escaravage, N.; Waits, L. and Bouvet, J.** (1996). Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR. *Nucleic Acids Research* 24 (16): 3189–94. <https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189>.
- Taberlet, P. and Luikart, G.** (1999). Non-Invasive Genetic Sampling and Individual Identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41–55. <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0329>.
- Taberlet, P.; Waits, L. P. and Luikart, G.** (1999). Noninvasive Genetic Sampling: Look before You Leap. *Trends in Ecology and Evolution*. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01637-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01637-7).
- Thomson, R. C.; Wang, I. J. and Johnson, J. R.** (2010). Genome-Enabled Development of DNA Markers for Ecology, Evolution and Conservation. *Molecular Ecology* 19 (11): 2184–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04650.x>.
- Ungerfeld, R.; González-Pensado, S.; Villagrán, M.; Bielli, A.; Rossini, C.; Morales, J.; Pérez, W. and Damián, J. P.** (2011). *Biología Reproductiva Del Venado de Campo (Ozotoceros bezoarticus)*. www.universidadur.edu.uy/bibliotecas/dpto_publicaciones.htm
- Van-Oosterhout, C. V.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M. and Shipley, P.** (2004). MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–38. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- Vial, L.; Maudet, C. and Luikart, G.** (2003). Thirty-Four Polymorphic Microsatellites for European Roe Deer. *Molecular Ecology Notes* 3 (4): 523–27. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00499.x>.
- Vigilant, L.** (2002). Technical Challenges in the Microsatellite Genotyping of a Wild Chimpanzee Population. *Genetics, Molecular Evolution, and Conservation Technical*, 162–65. <https://doi.org/10.1002/evan.10082>.

- Wattier, R.; Engel, C.R.; Saumitou-Laprade, P. and Valero, M.** (1998). Short Allele Dominance as a Source of Heterozygote Deficiency at Microsatellite Loci: Experimental Evidence at the Dinucleotide Locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7 (11): 1569–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00477.x>.
- Weber, M. and Gonzalez, S.** (2003). Latin American Deer Diversity and Conservation: A Review of Status and Distribution. *Ecoscience* 10 (4): 443–54. <https://doi.org/10.1080/11956860.2003.11682792>.
- Yamashiro, A.; Endo, A.; Kuwataka, H.; Matsumoto, Y. and Yamashiro, T.** (2015). Geographic Origin and Genetic Structure of Introduced Sika Deer, Kerama Deer (*Cervus Nippon keramae*) on Ryukyus Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Mammal Study* 40 (3): 187–92. <https://doi.org/10.3106/041.040.0306>.
- Zane, L.; Bargelloni, L. and Patarnello, T.** (2002). Strategies for Microsatellite Isolation: A Review. *Molecular Ecology* 11 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>.

7. ANEXOS

Anexo 1

Anexo 1, Tabla 1. Detalle de todas las muestras de poblaciones silvestres utilizadas en esta tesis. Para cada una se detalla el tipo de muestra y el sexo del individuo.

Población "Los Ajos"		
Acrónimo	Tipo de muestra	Sexo
SG 15	Felpa del asta	Macho
SG 34	Asta con sangre	Macho
SG 44	Hueso	Hembra
SG 56	Pelos	Hembra
SG 58	Piel y glándula	Hembra
SG 91	Tejidos y pelos	Macho
SG 118	Sangre	Hembra
SG 121	Pelos	Hembra
SG 124	Sangre	Hembra
SG 127	Sangre	Hembra
SG 129	Sangre	Macho
SG 133	Sangre	Hembra
SG 142	Fecas	Macho
SG 143	Sangre y fecas	Macho
SG 144	Fecas	Macho
SG 147		Hembra
SG 159	Tejidos	Macho
SG 207	Pelo y cuero	Hembra
SG 245	Tejido (feto)	?
Población "El Tapado"		
SG 10	Pelos y corazón	Macho
SG 45	Huesos y piel	?
SG 47	Tejido	Macho
SG 49	Huesos y piel	Macho
SG 62	Tejido	Macho
SG 63	Piel y glándula	Hembra
SG 64	Tejido	Macho
SG 82	Tejido	Macho
SG 95	Tejido	Macho
SG 96	Pelos	Macho
SG 97	Piel	?

Anexo 1, Tabla 2. Lista de las muestras colectadas en marco de este trabajo en la “Estación de Cría de Fauna Autóctona, Tabaré González”, Cerro Pan de Azúcar (“ECFA”). Para cada muestra se detalla: el tipo de muestra colectada, el recinto en que estaba el individuo al momento de la colecta, el sexo y el individuo. El número es el de la caravana que tenía cada uno y la letra hace referencia al color de la caravana. N: caravana color naranja, C: caravana color celeste, A: caravana color amarillo. s/c que no tenía caravana.

Acrónimo	Tipo de Muestra	Recinto	Individuo	Sexo
SG 251	Pelo	E 4	Cría s/c	Hembra
SG 251 b	Tejido	E 4	Cría s/c	Hembra
SG 252	Tejido	E 3	Cría s/c	?
SG 253	Feca	E 7	Cría s/c	Hembra
SG 254	Feca	E 7	125 N	Hembra
SG 255	Feca	E 7	18 A	Macho
SG 256	Feca	E 2	67 A	Hembra
SG 257	Feca	E2	16 A	Hembra
SG 258	Feca	E 2	8A	Macho
SG 259	Feca	E2	Cría s/c	Hembra
SG 260	Feca	E2	42A	Hembra
SG 261	Feca y pelo	E 9	02 C	Macho
SG 262	Feca y pelo	E 9	01C	Macho
SG 263	Pelo	E2	s/c	Hembra
SG 264	Feca	E7	s/c	Macho
SG 265	Pelo	E 1	52 A	Hembra
SG 266	Pelo	E9	34 A	Macho
SG 267	Pelo	E 9	06 C	Macho
SG 268	Pelo	E 9	05 C	Macho
SG 269	Pelo	E9	s/c	Macho
SG 270	Pelo	E 9	07 C	Macho
SG 271	Pelo	E 9	04 C	Macho
SG 272	Feca	E4	s/c	Hembra
SG 273	Feca y Tejido	E 8	43 A	Hembra
SG 274	Tejido	E 1	Cría, 52	Macho
SG 275	Feca	E 8	44 A	Hembra
SG 276	Feca	E 5	10	Macho
SG 277	Pelo	E 5	35	Hembra
SG 278	Feca	E4	Cría	Macho
SG 279	Feca		s/c	Hembra
SG 280	Feca	E 4	46A	Hembra
SG 281	Feca	E 4	24	Hembra
SG 282	Feca	E 4	s/c	Hembra
SG 283	Feca	E 4	64	Hembra
SG 284	Feca	E 4	Cría s/c	Hembra
SG 285	Feca	E 4	13	Hembra
SG 286	Feca	E 4	1	Macho

SG 287	Pelo	E 2	s/c	Macho
SG 288	Pelo	E 91	91	Macho
SG 289	Pelo	E 5	s/c	Macho
SG 290	Feca	E 5	s/c	Hembra
SG 291	Feca	E 5	s/c	Hembra
SG 292	Feca	E 5	11	Hembra
SG 293	Feca	E 5	36 A	Hembra
SG 294	Feca	E 42	40	Macho
SG 295	Pelo	E 42	47	Macho
SG 296	Feca	E 42	32	Macho
SG 297	Feca	E 9	48	Macho
SG 298	Feca	E 9	111	Macho
SG 299	Feca	E 3	20	Macho
SG 300	Feca	E 3	8C	Hembra
SG 301	Feca	E 3	s/c	Hembra
SG 302	Feca	E 3	23	Hembra
SG 303	Feca	E 3	123	Hembra
SG 304	Feca	E 3	s/c	Hembra
SG 305	Pelo	E 1	96	Macho
SG 306	Feca	E 1	128	Hembra
SG 307	Feca	E 7	29	Hembra
SG 308	Feca	E 7	s/c	Hembra
SG 309	Pelo	E 7	Cría s/c	Macho
SG 310	Feca	E 8	45	Hembra
SG 311	Feca	E 1	s/c	Hembra
SG 312	Feca	E 1	37	Hembra
SG 313	Feca	E 3	45	Hembra
SG 314	Feca	E 1	126	Hembra
SG 315	Feca	E 2	Cría s/c	Hembra
SG 316	Feca	E 8	Cría s/c	Hembra
SG 317	Feca	E 8	28	Macho
SG 318	Feca	E 7	60	Hembra
SG 319	Tejido	E 5	Cría s/c	Hembra
SG 320	Tejido	E 8	56	Hembra
SG 321	Feca	E 42	26	Macho
SG 322	Feca	E 42	6	Macho
SG 323	Feca	E 42	27	Macho
SG 324	feca	E 5	Cría s/c	Hembra

Anexo 1, Tabla 3. Lista de todas las muestras empleadas en esta tesis y los análisis que se hicieron con cada una.

Población "Los Ajos"					Población "ECFA"				
Muestra	Secuencia D-Loop	Real Time D-Loop	Secuencia NADH 5	Microsatélites	Muestra	Secuencia D-Loop	Real Time D-Loop	Secuencia NADH 5	Microsatélites
SG 13				X	SG 270		X	X	X
SG 15			X	X	SG 271	X	X		
SG 19				X	SG 272	X	X		X
SG 27				X	SG 273		X		X
SG 34			X	X	SG 274	X	X	X	X
SG 44			X	X	SG 275	X	X		X
SG 56				X	SG 276				X
SG 58				X	SG 277		X		X
SG 59				X	SG 278	X	X	X	X
SG 91			X	X	SG 279				X
SG 109				X	SG 280	X	X		X
SG 118			X	X	SG 281	X	X		X
SG 121				X	SG 282				X
SG 124				X	SG 283		X	X	X
SG 127				X	SG 284		X		X
SG 129			X	X	SG 285		X		X
SG 130				X	SG 286		X		X
SG 133				X	SG 287		X		
SG 142				X	SG 288				X
SG 143			X	X	SG 289		X		X
SG 144				X	SG 290		X		X
SG 147				X	SG 291		X		X
SG 155				X	SG 292		X		X
SG 159				X	SG 293		X		X
SG 203				X	SG 294		X		X
SG 204				X	SG 295	X	X		
SG 207				X	SG 296		X		X
SG 245				X	SG 297		X		X
Población "El Tapado"					SG 298		X		X
SG 10			X	X	SG 299				X
SG 45			X	X	SG 300		X		X
SG 47			X	X	SG 301		X		X
SG 48				X	SG 302		X		X
SG 49			X	X	SG 303		X		X
SG 61				X	SG 304		X	X	X
SG 62				X	SG 305		X		X
SG 63				X	SG 306				X
SG 64				X	SG 307	X	X		X
SG 82			X	X	SG 308				X
SG 93				X	SG 309	X	X		

SG 95			X	X	SG 310	X	X		X
SG 96			X	X	SG 311	X	X		X
SG 97				X	SG 312	X	X		X
Población "ECFA"					SG 313	X	X		X
SG 251				X	SG 314	X	X		X
SG 251 b	X	X		X	SG 315		X		X
SG 252	X	X		X	SG 316	X	X		X
SG 253		X	X	X	SG 317	X	X		X
SG 254		X		X	SG 318		X	X	X
SG 255		X		X	SG 319	X	X	X	X
SG 256		X		X	SG 320		X		X
SG 257		X		X	SG 321	X	X		X
SG 258		X		X	SG 322	X	X		X
SG 259		X		X	SG 323	X	X		X
SG 260		X		X	SG 324	X	X		
SG 261		X		X					
SG 262				X					
SG 263	X	X			SG 247				X
SG 264		X		X	SG 248				X
SG 265		X		X	SG 249				X
SG 266		X		X	SG 250				X
SG 267		X		X					
SG 268	X	X	X	X					
SG 269		X	X	X					

Anexo1. Tabla 4. Muestras usadas para los análisis de *Dloop* adicionales a las muestras amplificadas y secuenciadas en este trabajo

Muestra	Procedencia		Muestra	Procedencia			
SG 01	Zoo.san Carlos	Uruguay	SL 006	San Luis	Argentina		
SG 20	Zoo. Salto	Uruguay	SL 012				
SG 16	Zoo. Durazno	Uruguay	SL 013				
SG 60	Parque Lecoq	Uruguay	SL 015				
SG 112							
SG 113							
SG 04	ECFA antiguas	Uruguay	SL 040				
VSG 11							
SG 09	El Tapado	Uruguay	SL 049				
SG 10							
SG 17							
SG 49							
SG 76							
SG 95							
SG 1623							
SG 02	Los Ajos	Uruguay	PV 3				
SG 07							
SG 19							
SG 34							
SG 91							
SG 109							
SG 118							
SG 126							
SG 134							
SG 24			Bahía Samborobón	Argentina	PV 7		
SG 39							
SG 40							
SG 42							
SG 43							
SG 52							
SG 72							
SG 18	San Luis	Argentina	PV 11				
SG 66							
SG 67							
SG 68							
SG 83							
SG 8							
SG 86							
SG 104							
					FB 38 ve	Paraná	Brasil
					FB 39 ve		
			FB 46 ve				
			FB 51 ve	EMAS	Brasil		
			SP 13 pe				
			SP 14 pe				
			SP 15 pe				
			SP 17 pe				
			SP 19 pe				
			SP 51 pe				
			SP 52 pe				
			SP 53 pe				
			SP 54 pe				
			SP 55 pe	Pantanal	Brasil		
			SP 56 pe				
			SP 36 pt				
			SP 38 pt				
			SP 40 pt				
			SP 41 pt				
			SP 42 pt				
			SP 43 pt				
			SP 44 pt				
			SP 46 pt				
			SP 50 pt				

Anexo 2

Secuencias de los fragmentos del ADN Mitocondrial generadas en este trabajo.

D-loop

Haplotipo 1 de *D-loop*. Individuo: SG 278 (Población “ECFA”).

TGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGGGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGGTAGATTTGAC
TAAATGTGCCATGTACGATCAATAATAATATGTACTATGTACTATAAATAATATCATGGACTTGCTTAT
AAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

Haplotipo 2 de *D-loop*. Individuo: SG 252 (Población: “ECFA”).

TGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGGGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAGTAGA
TTTGACTAAATGTGCTATGTACGATCAATAATAATATGTACTATGTACTATAAATAATATCAT
GGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

NADH 5

Haplotipo 1 (H1) de *NADH 5*. Individuo: SG 118 (Población “Los Ajos”).

AGCAGGCATTTTCCTATTAATTCGTTTTTACCCACTAACAGAAAATAATAAAATTGCACAAtCT
ATCTTATTATGTCTAGGAGCTATCACCCTCTTTTCACAGCAATATGCGCTCTTACTCAAACG
ACATTAATAAAATTATTGCTTTCTCTACATCTAGTCAATTAGGCCTTATAATAGTAACAATTGG
CATCAATCAACCCTACCTAGCATTCTCCATATTTGCACTCATGCTTTTTTCAAAGCCATATTAT
TTATATGCTCCGTTCTATTATCCACAGTCTAAATGATGAACAAGACATTCGAAAAATAGGCG
GCTTATTTAAAGCCATACCATTTACCACAACAGCCCTAATTATTGGCAGCCTAGCACTAACAG
GAATGCCTTTTCTTACTGGATTTTATTCAAAGACCTAATTATCGAGACCATTAACACGTCGT
ATACCAACGCCTGAGCCCTCCTAATAA

Haplotipo 2 (H1) de *NADH 5*. Individuo: SG 143 (Población “Los Ajos”).

AGCAGGCATTTTCCTATTAATTCGTTTTTACCCACTAACAGAAAATAATAAAATTTGCACAATCT
ATCTTATTATGTCTAGGAGCTATCACCCTCTTTTCACAGCAATATGCGCTCTTACTCAAACG
ACATTAATAAAATTATTGCTTTCTCTACATCTAGTCAATTAGGCCTTATAATAGTAACAATTGG
CATCAATCAACCCTACCTAGCATTCTCCATATTTGTAICTCATGCTTTTTTCAAAGCCATATTAT
TTATATGCTCCGTTCTATTATCCACAGTCTAAATGATGAACAAGACATTCGAAAAATAGGCG
GCTTATTTAAAGCCATACCATTTACCACAACAGCCCTAATTATTGGCAGCCTAGCACTAACAG

GAATGCCTTTTCTTACTGGATTTTATTCCAAAGACCTAATTATCGAGACCATTAACACGTCGT
ATACCAACGCCTGAGCCCTCCTAATAA

Haplotipo 3 (H1) de *NADH 5*. Individuo: SG 283 (Población "ECFA").

AGCAGGCATTTTCCTATTAATTCGTTTTTACCCACTAACAGAAAATAATAAATTTGCACAATCT
ATCTTATTATGTCTAGGAGCTATCACCCTCTTTTCACAGCAATATGCGCTCTTACTCAAACG
ACATTAATAAAATTATTGCTTTCTCTACATCTAGTCAATTAGGCCTTATAATAGTAACAATTGG
CATCAATCAACCCTACCTAGCATTTCATATTTGCACTCACGCTTTTTTCAAAGCCATATTAT
TTATATGCTCCGTTCTATTATTCACAGTCTAAATGATGAACAAGACATTCGAAAAATAGGCG
GCTTATTTAAAGCCATACCATTTACCACAACAGCCCTAATTATTGGCAGCCTAGCACTAACAG
GAATGCCTTTTCTTACTGGATTTTATTCCAAAGACCTAATTATCGAAACCATTAACACGTCGTA
TACCAACGCCTGAGCCNTCCTAATAA

Haplotipo 4 (H4) de *NADH 5*. Individuo: SG 10 (Población "El Tapado").

AGCAGGCATTTTCCTATTAATTCGTTTTTACCCACTAACAGAAAATAATAAATTTGCACAATCT
ATCTTATTATGTCTAGGAGCTATCACCCTCTTTTCACAGCAATATGCGCTCTTACTCAAACG
ACATTAATAAAATTATTGCTTTCTCTACATCTAGTCAATTAGGCCTTATAATAGTAACAATTGG
CATCAATCAACCCTACCTAGCATTTCATATTTGCACTCACGCTTTTTTCAAAGCCATATTAT
TTATATGCTCCGTTCTATTATTCACAGTCTAAATGATGAACAAGACATTCGAAAAATAGGCG
GCTTATTTAAAGCCATACCATTTACCACAACAGCCCTAATTATTGGCAGCCTAGCACTAACAG
GAATGCCTTTTCTTACTGGATTTTATTCCAAAGACCTAATTATCGAAACCATTAACACGTCGTA
TACCAACGCCTGAGCCCTCCTAATAA

Anexo 3, Tabla 1. Matriz construida por locus y muestra; para ambos marcadores de referencia utilizados en corridas de microcapilar de loci microsatélites

Muestra	Goua 7		Goua 16		Goua 21		Goua 24		Goua 25		BM 203		BM 757		Intra 40		RT 09											
	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600	GS 500	GS 600										
SG 10			154.9	163.0	no se lee	no se lee	168.3	171.1	no se lee	169.9	169.9	no se lee	194.0	203.5	182.3	186.6	104.8	104.8	no se lee									
SG 15			189.4	199.0	no se lee	no se lee	154.7	162.8	no se lee	154.7	162.8	no se lee	187.5	199.8	184.3	197.1												
SG 34			154.6	154.6	no se lee	no se lee	154.6	154.6	no se lee	154.6	154.6	no se lee	238.3	238.3	no se lee	no se lee												
SG 44	119.3	119.3	189.1	189.1	no se lee	no se lee	154.8	162.7	no se lee	163.9	169.8	no se lee	230.0	242.5	229.6	242.1	183.4	191.7	179.9	188.6								
SG 47	133.6	138.6	no se lee	no se lee	188.6	200.0	185.6	197.4	146.3	154.8	no se lee	168.5	171.4	164.9	167.7	169.9	169.9	165.9	165.9	104.5	102.4							
SG 58			135.5	141.6	no se lee	no se lee	178.8	178.8	no se lee	178.8	178.8	no se lee	240.4	240.4	no se lee	no se lee	151.3	151.3	no se lee	102.8	104.6	98.0	100.1					
SG 63			154.5	154.5	no se lee	no se lee	154.5	154.5	no se lee	178.8	178.8	no se lee	185.4	197.8	no se lee	no se lee	153.5	166.1	148.4	162.6								
SG 95			199.9	204.0	no se lee	no se lee	157.0	162.5	159.1	162.1	169.9	169.9	no se lee	179.1	181.2	175.9	178.0	104.4		no se lee	no se lee							
SG 127														181.2	185.3	no se lee	no se lee	104.4		104.7	108.3							
SG 133														182.6	186.8	no se lee	no se lee											
SG 142																												
SG 143			162.7	162.7	158.8	158.8							242.4	242.4	240.8	243.0				103.0	104.8	100.5	102.4					
SG 159			203.9	203.9	no se lee	no se lee	171.3	177.1	no se lee	169.9	175.7	no se lee								104.7	108.2	no se lee	no se lee					
SG 245			155.4	159.9	no se lee	no se lee	162.5	165.3	no se lee	170.0	170.0	no se lee								104.7	104.7	102.1	102.1					
SG 251	134.5	140.8	no se lee	no se lee	162.7	162.7	no se lee	no se lee	no se lee	175.9	178.7	no se lee								100.0	100.0	no se lee	no se lee					
SG 251 b	135.6	141.9	no se lee	no se lee	154.8	158.7	no se lee	no se lee	no se lee	169.8	169.8	no se lee								99.9	101.9	no se lee	no se lee					
SG 252			189.4	198.9	no se lee	no se lee	162.4	173.7	no se lee	169.8	169.8	no se lee								102.8	104.7	no se lee	no se lee					
SG 261 P			190.4	200.0	no se lee	no se lee							224.2	233.6	224.3	233.8	185.5	202.1	182.2	199.2								
SG 262 F																												
SG 262 P			200.2	200.2	no se lee	no se lee							224.2	228.0	224.3	228.2												
SG 265	135.6	135.6	no se lee	no se lee	200.0	200.0	196.8	196.8												153.3	166.3	no se lee	no se lee	no se lee				
SG 266			200.0	207.7	no se lee	no se lee	162.6	168.4	159.1	165.0																		
SG 267	134.6	138.5	no se lee	no se lee	162.9	162.9	no se lee	no se lee	162.6	165.5	159.2	162.1								151.3	166.5	147.8	162.7	104.6	104.6	102.3	102.3	
SG 268			200.1	207.9	no se lee	no se lee	163.0	167.0	161.1	164.7	165.6	165.6	no se lee								166.4	170.5	147.5	166.5	102.8	104.7	no se lee	no se lee
SG 269			200.1	207.9	no se lee	no se lee	165.6	165.6	no se lee												203.4	208.3	no se lee	no se lee				
SG 270	135.6	138.5	no se lee	no se lee	200.1	200.1	196.8	196.8													160.0	166.3	156.2	162.5	102.8	104.7	no se lee	no se lee
SG 274			199.0	199.0	no se lee	no se lee	165.6	168.5	162.2	165.0																		
SG 280			154.9	162.9	no se lee	no se lee	162.7	162.7	159.0	159.0											153.4	166.5	149.7	162.8	102.8	104.7	99.9	102.0
SG 283	135.7	142.3	no se lee	no se lee																	166.3	179.2	162.7	175.5	102.8	106.5	no se lee	no se lee
SG 284	135.6	142.1	no se lee	no se lee						160.9	169.9	156.9	165.9	224.1	229.5	224.2	229.5	194.0	203.5	190.5	200.4							
SG 300	134.5	135.2	no se lee	no se lee																	153.4	166.4	149.8	162.7	102.8	106.5	no se lee	no se lee
SG 302			162.5	174.0	159.3	170.8				175.7	178.6	no se lee									151.3	166.4	no se lee	no se lee				

Anexo 3, Tabla 2. Matriz de genotipos para los 20 individuos que se realizaron las corridas por triplicado, y con el protocolo de Touch Down

	Goua 7	Goua 16	Goua 21	Goua 24	Goua 25	RT 09	BM 203	BM 757	INRA 40
SG 247	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	222 224	000 000	165 165
SG 248	000 000	000 000	000 000	165 171	000 000	102 104	222 224	000 000	165 167
SG 249	130 133	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
SG 250	130 139	000 000	158 158	159 165	000 000	000 000	224 226	000 000	167 167
SG 252	000 000	000 000	000 000	159 171	160 166	000 000	000 000	179 183	147 167
SG 255	000 000	209 213	000 000	000 000	000 000	100 102	000 000	000 000	147 159
SG 256	133 139	209 213	000 000	000 000	000 000	100 102	000 000	000 000	147 147
SG 257	130 133	205 209	152 162	159 162	000 000	100 102	000 000	177 183	147 163
SG 258	000 000	209 213	000 000	159 162	000 000	000 000	000 000	177 183	149 161
SG 260	000 000	209 213	152 158	159 162	166 175	100 102	000 000	183 183	147 161
SG 261	000 000	209 213	000 000	000 000	000 000	100 102	224 232	183 191	163 167
SG 267	000 000	000 000	000 000	159 162	166 178	102 102	226 228	183 205	163 175
SG 273	130 139	209 213	156 160	159 162	166 175	100 102	000 000	000 000	000 000
SG 280	000 000	000 000	000 000	159 159	166 166	100 102	000 000	177 177	149 163
SG 286	000 000	000 000	158 164	000 000	166 166	000 000	000 000	183 183	149 163
SG 293	000 000	000 000	150 158	162 162	000 000	000 000	000 000	183 183	000 000
SG 294	130 139	000 000	150 154	159 162	000 000	000 000	224 228	183 183	000 000
SG 302	133 139	000 000	000 000	159 171	000 000	100 102	226 240	183 183	149 161
SG 303	000 000	000 000	150 158	162 171	000 000	100 102	000 000	183 183	145 149
SG 306	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	240 240	183 183	149 163

Anexo 3, Tabla 3. Matriz de genotipos depurada, que se usó para realizar todos los análisis.

	Goua 7	Goua 16	Goua 21	Goua 24	Goua 25	BM 203	BM 757	INRA 40	RT 09
SG 10	130 136	000 000	152 160	000 000	166 166	230 234	183 187	000 000	102 102
SG 34	000 000	197 197	152 152	156 165	166 175	238 238	181 181	000 000	102 106
SG 44	115 115	185 185	152 160	000 000	160 166	230 242	181 189	000 000	102 102
SG 47	130 136	185 197	144 152	165 168	166 166	000 000	000 000	000 000	100 100
SG 49	130 133	205 209	152 156	156 162	000 000	230 236	000 000	147 161	098 100
SG 56	000 000	197 197	000 000	165 165	166 172	000 000	181 191	147 151	000 000
SG 63	133 139	193 137	152 152	156 159	166 172	226 236	183 195	149 163	102 102
SG 82	000 000	193 193	152 160	162 162	000 000	230 236	183 187	000 000	102 102
SG 91	000 000	000 000	152 160	000 000	166 166	212 224	179 183	147 157	000 000
SG 95	000 000	197 201	144 148	153 159	166 166	000 000	177 179	000 000	102 102
SG 96	000 000	000 000	152 156	159 165	157 157	260 242	187 179	155 171	100 102
SG 127	130 136	000 000	152 156	000 000	157 166	000 000	179 183	000 000	102 106
SG 129	133 133	193 193	160 160	000 000	000 000	138 240	177 189	000 000	000 000
SG 142	139 139	197 197	160 160	000 000	000 000	240 240	000 000	147 147	000 000
SG 143	139 139	189 197	160 160	162 165	157 157	242 242	000 000	147 151	100 102
SG 144	000 000	197 197	160 160	000 000	000 000	238 240	179 179	145 147	000 000
SG 159	000 000	201 201	152 156	168 174	157 172	240 242	179 183	000 000	102 106
SG 207	130 136	201 201	148 156	165 168	000 000	000 000	183 191	000 000	000 000
SG 245	139 139	197 197	156 160	165 165	166 166	000 000	179 187	000 000	102 102
SG 250	130 139	000 000	158 158	159 165	000 000	224 226	000 000	167 167	000 000
SG 251	000 000	189 197	160 160	159 162	172 175	000 000	000 000	149 163	098 098
SG 251 b	133 139	213 213	152 156	153 159	166 166	228 230	191 199	000 000	100 104
SG 252	000 000	185 197	152 156	159 171	160 166	228 230	183 205	147 167	000 000
SG 257	130 133	205 209	152 162	159 162	000 000	000 000	177 183	147 163	100 102
SG 258	133 139	209 213	160 164	159 162	000 000	218 218	179 183	149 161	100 102
SG 260	000 000	209 213	152 158	159 162	166 175	000 000	183 183	147 161	100 102
SG 261	136 139	209 213	158 158	159 162	166 169	224 232	183 191	163 167	100 102
SG 262	000 000	197 197	160 160	000 000	166 175	224 228	189 199	149 163	102 104
SG 264	139 142	209 209	160 164	159 162	166 175	000 000	000 000	147 147	000 000
SG 265	133 133	197 197	000 000	159 165	163 166	000 000	183 205	147 163	100 102
SG 266	000 000	197 205	160 164	159 162	000 000	230 230	000 000	000 000	102 102
SG 267	133 136	197 197	160 160	159 162	166 178	226 228	183 205	163 175	102 102
SG 268	000 000	197 205	160 164	162 162	000 000	224 228	191 205	163 167	100 102
SG 269	000 000	197 205	160 164	159 162	000 000	230 234	201 205	157 167	102 102
SG 270	133 133	197 197	160 160	162 162	166 166	226 230	000 000	157 163	100 102
SG 273	130 139	209 213	156 160	159 162	166 175	228 234	000 000	147 163	100 102
SG 274	000 000	197 197	160 164	159 162	163 166	000 000	205 205	000 000	100 102
SG 277	000 000	197 197	158 168	159 162	166 175	000 000	000 000	000 000	100 102
SG 280	000 000	197 197	152 160	159 159	166 175	000 000	177 177	149 163	100 102
SG 283	133 139	197 197	160 160	159 162	157 166	224 230	191 201	163 175	100 104
SG 284	133 139	197 197	152 160	162 165	166 175	000 000	000 000	149 163	100 104
SG 286	133 139	197 197	158 164	159 162	166 166	000 000	183 183	149 163	100 102
SG 288	000 000	000 000	160 164	000 000	172 175	228 234	000 000	149 161	102 102
SG 293	133 142	197 197	150 158	162 162	166 175	000 000	183 183	000 000	098 100
SG 294	130 139	209 209	150 154	159 162	157 175	224 228	183 183	000 000	100 104
SG 298	000 000	197 197	152 156	162 165	175 175	000 000	000 000	000 000	100 102
SG 300	130 133	197 209	152 160	159 162	178 178	000 000	000 000	147 163	100 100
SG 302	133 139	197 197	152 160	159 171	172 175	226 240	183 183	149 161	100 102
SG 303	000 000	000 000	150 158	162 171	166 175	000 000	183 183	145 149	100 102
SG 304	133 139	197 197	160 160	159 171	166 166	000 000	000 000	149 167	100 102
SG 306	133 133	197 209	152 160	159 162	000 000	240 240	183 183	149 163	000 000
SG 307	133 139	000 000	152 160	000 000	172 175	000 000	183 201	157 163	100 102
SG 308	133 139	189 197	152 160	162 162	166 166	228 240	000 000	000 000	100 102
SG 313	136 139	197 197	000 000	159 162	163 166	232 234	000 000	161 163	100 102
SG 314	136 139	197 197	000 000	162 165	157 178	000 000	000 000	000 000	102 102
SG 316	130 136	000 000	000 000	000 000	166 166	228 232	183 183	163 167	100 102
SG 317	136 139	197 197	152 154	159 171	163 166	000 000	000 000	000 000	000 000
SG 318	136 139	197 197	150 154	162 162	169 175	226 226	177 181	149 165	100 102
SG 319	000 000	000 000	160 160	156 159	000 000	226 228	183 183	167 169	000 000
SG 321	136 139	197 197	000 000	159 165	166 166	000 000	000 000	000 000	100 102
SG 322	127 130	197 197	000 000	162 171	166 172	000 000	000 000	161 167	000 000

“Variabilidad Genética en po

Anexo 3, Tabla 4. Muestra Para cada población analizada, por locus el número de alelos, Hobs, HExp y PIC

El Tapado					
Locus	K	N	Hobs	HExp	PIC
G7	4	4	1,000	0,821	0,667
G16	6	5	0,800	0,867	0,748
G21	5	7	0,857	0,736	0,647
G24	6	6	0,833	0,879	0,777
G25	3	5	0,200	0,511	0,410
BM203	5	5	1,000	0,800	0,676
BM757	6	5	1,000	0,867	0,748
INRA40	6	3	1,000	1,000	0,810
RT09	3	7	0,286	0,538	0,427
Los Ajos					
Locus	K	N	Hobs	HExp	PIC
G7	5	7	0,286	0,791	0,700
G16	5	10	0,100	0,668	0,595
G21	4	11	0,545	0,671	0,580
G24	5	6	0,667	0,667	0,577
G25	5	8	0,625	0,708	0,618
BM203	6	8	0,625	0,817	0,728
BM757	7	10	0,800	0,847	0,778
INRA40	4	5	0,800	0,644	0,535
RT09	3	6	0,667	0,530	0,424
ECFA					
Locus	K	N	Hobs	HExp	PIC
G7	6	27	0,889	0,743	0,684
G16	6	36	0,361	0,529	0,490
G21	10	35	0,771	0,776	0,740
G24	6	37	0,838	0,655	0,582
G25	8	34	0,735	0,711	0,664
BM203	8	21	0,810	0,864	0,825