



*Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas - Subárea Genética
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay
2017*

Análisis genético de poblaciones de *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814). Implicancias para su conservación.

Lic. María Pía Aristimuño

*Departamento de Biodiversidad y Genética
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)*

Orientador: Dra. Susana González (IIBCE)

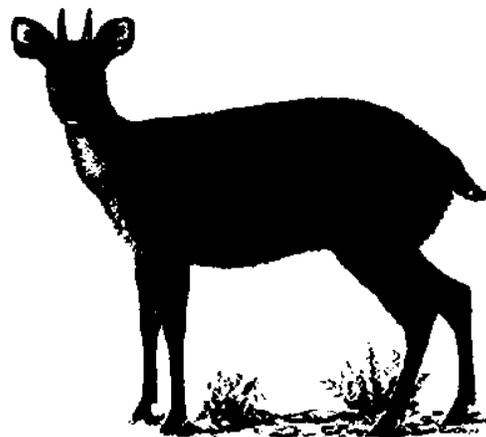
Co – orientador: Dr. José Mauricio Barbanti Duarte (UNESP, Brasil)

Tribunal:

Dra. Gabriela Bedó

Dra. Eileen Amstrong

Dra. Leticia Bidegaray



AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca de posgrado que permitió la realización de esta maestría, a la Comisión Sectorial de Investigación Científica que financió parte de este trabajo, y a la Asociación de Universidades Grupo Montevideo que me concedió la beca para la estadía en NUPECCE, Jaboticabal, Brasil.

A Susana, por enseñarme tantas cosas y guiarme en este trabajo, por su paciencia para ver su concreción (¡finalmente!), y su generosidad para compartir siempre su conocimiento conmigo. Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por el espacio para la realización de este trabajo, y por la oportunidad de formar parte de su equipo.

A Mauricio, por su co-orientación, por aceptarme en su laboratorio, por su hospitalidad durante ese periodo y su amabilidad y disposición siempre para todas las consultas.

A todas las personas que colaboraron en la recolección de muestras, o de una forma u otra facilitaron muestras para su inclusión en este trabajo. Especialmente al SNAP y sus guardaparques (particularmente a Dante Roibal), y a Enrique González y Raúl Maneyro por permitirme visitar las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural y la Facultad de Ciencias para tomar muestras y medir ejemplares.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biodiversidad y Genética del IIBCE, por su buena onda, las manos siempre dispuestas a ayudar, y por el lindo ambiente de trabajo que compartimos. Tengo un precioso recuerdo de estos años de trabajo junto a ustedes. Un “gracias” especial a todos los “conservacionistas”: por su dedicación y esfuerzo cotidiano para conocer y preservar nuestra fauna autóctona.

A todos los integrantes de NUPECCE, por su increíble hospitalidad durante mi estadía allí. Por la gran ayuda que fueron para el trabajo de laboratorio, por todos los mates compartidos, y por hacer de esa experiencia tan enriquecedora para esta tesis como para mi vida.

A mi familia, principalmente papá y mamá, por apoyarme siempre, por acompañarme con entusiasmo en las búsquedas de cacas y de huellas, y sobre todo, por todo lo suyo que reconozco en mí.

A Nico, por aguantarme el cansancio y las noches de tesis, y por sentir siempre como propia mi felicidad.

A mis amigas y amigos, que agradezco todos los días que estén, por dar siempre para adelante y ayudar con ese último empujoncito que faltaba.

A estos lindos animalitos, que me hicieron dudar, pensar y estudiar, me enseñaron a perseverar y me llevaron a conocer muchos lugares y muchas personas. Espero de corazón haber aportado un granito de arena para su conocimiento y conservación.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN	12
Cérvidos neotropicales: características e historia evolutiva.....	12
Los ciervos del género <i>Mazama</i> y <i>Mazama gouazoubira</i>	13
Genética para la conservación y aplicación de marcadores moleculares	15
ADN mitocondrial.....	17
Microsatélites.....	18
Antecedentes y justificación	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Obtención y procesamiento de muestras.....	24
Extracción y cuantificación de ADN	25
Amplificación por PCR y secuenciación de ADN mitocondrial.....	26
Amplificación de microsatélites y diseño de PCR multiplex	27
Análisis bioinformático.....	29
Análisis bioinformático de secuencias de ADN mitocondrial	29
Análisis bioinformático de loci de microsatélites	31
RESULTADOS	34
Procesamiento de muestras	34
Análisis de secuencias de ADN mitocondrial	35
Región <i>D- loop</i>	35
Desarrollo de cebadores para el gen citocromo b.....	48
Secuencias del gen citocromo b.....	49

Secuencias concatenadas de fragmentos de ADN mitocondrial	52
Amplificación de loci de microsatélites y diseño de PCR Multiplex	58
Análisis bioinformático de loci de microsatélites	60
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	63
Diversidad y estructuración genética de las poblaciones a partir de análisis de fragmentos del ADN mitocondrial	63
Filogeografía e historia demográfica de las poblaciones.....	64
Uso de microsatélites como marcador molecular: diseño de multiplex para PCR y caracterización de la diversidad genética	65
Conclusiones acerca del muestreo y distribución de la especie.....	67
Implicancias para la conservación de la especie y definición de Unidades de Manejo	68
PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS	85

TABLAS

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR para tres fragmentos de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación de loci de microsatélites de *Mazama gouazoubira*.

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de loci de microsatélites de *Mazama gouazoubira*. Se muestran los dos juegos de multiplex generados durante el transcurso de este trabajo 1º: 1-3; 2º: A-C.

Tabla 4. Matriz de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para un fragmento de 600 pb de la región *D- loop* de *Mazama gouazoubira*.

Tabla 5. Lista de individuos y haplotipos determinados para un fragmento de 600 pb de la región *D- loop* de *Mazama gouazoubira*.

Tabla 6. Lista de individuos y haplotipos identificados para un fragmento de 159 pb de la región D- loop de *Mazama gouazoubira*

Tabla 7. Resumen de resultados de análisis AMOVA implementado en software Arlequin v 5.3.2. (a), (b) y (c) representan diferentes agrupaciones probadas en diferentes corridas.

Tabla 8. Lista de haplotipos identificados para un fragmento de 225 pb del gen citocromo b de *Mazama gouazoubira*.

Tabla 9. Valores de F_{st} pareados entre poblaciones. La línea subrayada indica valores significativos con $p < 0,05$. Estimados con Arlequin v.3.5.1.3. Las poblaciones Rivera, Cer_L (Cerro Largo), Tac (Tacuarembó), T_Y_t (Treinta y Tres), Mald (Maldonado), Lav (Lavalleja) y Rocha corresponde a Uruguay, y las poblaciones RGS (Rio Grande do Sul), SC_PA (Santa Catarina y Paraná), MGS (Mato Grosso do Sul) y SP_BA_MG (Sao Paulo, Minas Gerais y Bahía) corresponden a Brasil.

Tabla 10. Lista de muestras secuenciadas y haplotipos encontrados para un fragmento de secuencias concatenadas del ADN mitocondrial (159 pb de la región D- loop y 214 pb del gen citocromo b) de *Mazama gouazoubira*.

Tabla 11. Éxito de amplificación por locus de microsatélite testado. (X) indica que el individuo fue amplificado con éxito para ese loci.

Tabla 12. Tamaños alélicos asignados para 5 loci de microsatélites testados en 4 muestras de *M. gouazoubira* (ADN control positivo y ADN extraído de materia fecal). X indica que no fue posible asignar alelos para esa muestra para ese locus.

Tabla 13. Genotipos determinados para 8 loci de microsatélites en 29 muestras de individuos de *Mazama gouazoubira* de Uruguay (continúa en la página siguiente).

Tabla 14. Valores reportados en este trabajo (columna *M. gouazoubira*) para 29 muestras analizadas, y valores reportados en bibliografía (columna Referencia) para otras especies de cérvidos en cuanto a: número de alelos (N_a), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), valores de probabilidad (p - valor) para el test del equilibrio H-W, coeficiente de endogamia (FIS) para cada locus, y número de muestras analizadas (n) para cada locus.

FIGURAS

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

Figura 2. Individuos de *M. gouazoubira*: a - Hembra adulta (fotografía tomada en Parque Nacional Santa Teresa, Rocha, Uruguay) b - Macho adulto (fotografía tomada en Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa, Rocha, Uruguay) c - Juvenil (©Ricardo Kuehn) d - Macho con astas en crecimiento (fotografía tomada con cámara trampa en Parque Nacional San Miguel, Rocha, Uruguay)

Figura 3. Mapa mostrando la distribución geográfica de la especie *Mazama gouazoubira* (contorno amarillo, tomado de UICN 2016) y las muestras analizadas en este trabajo (puntos azules). Realizado con QGIS versión 2.6.0.

Figura 4. Red haplotípica TCS construida con 22 haplotipos (obtenidos a partir de 24 individuos) de un fragmento de 600 pb de la región D- loop del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo: RGS (Rio Grande do Sul), ES (Espírito Santo), MG (Minas Gerais), RGN (Rio Grande do Norte), MGS (Mato Grosso do Sul), GO (Goias), SP (Sao Paulo), PA (Paraná), CE (Ceará), MGO (Mato Grosso). Extraído del software PopArt.

Figura 5. Mapa de haplotipos hallados por localidad de muestreo. Construido con 22 haplotipos (obtenidos a partir de 24 secuencias muestreadas en 10 localidades de Brasil) de un fragmento de 600 pb de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*.

Figura 6. Árbol filogenético consenso construido utilizando el algoritmo de Maximun Likelihood, con 10.000 réplicas de bootstrap, y tomando como modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei 93, para 25 secuencias de 600 pb de la región D- loop de *Mazama gouazoubira* de Brasil y *Ozotoceros bezoarticus* como grupo externo. MG = Minas Gerais, MS = Mato Grosso do Sul, GO = Goias, PR = Paraná, RGS= Rio Grande do Sul, SP = São Paulo, ES = Espírito Santo, MT = Mato Gross, RN = Rondonia, CE = Ceará. Extraído de MEGA 6.0

Figura 7. Red haplotípica TCS construida con 69 haplotipos (obtenidos en 121 secuencias) de un fragmento de 159 pb de la región D- loop del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo (total = 11; 7 de ellas corresponden a diferentes puntos de muestreo dentro de Uruguay). Extraído del software PopArt.

Figura 8. Gráfico "mismatch distribution" representando la distribución empírica de las frecuencias de diferencias nucleotídicas pareadas para el número total de secuencias analizadas para la región D- loop del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* sobre la línea punteada (121 secuencias), y la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica sobre la línea continua. Tomado de DnaSP v 5.0.

Figura 9. (a) Cronograma construido con BEAST v. 1.8 a partir de 69 haplotipos de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* de Uruguay, grupo externo *Ozotoceros bezoarticus*. Por debajo de los nodos se muestra la edad de nodo en millones de años, por encima se muestra la probabilidad posterior de ese nodo (sólo si $p \geq 0,9$). (b) Se muestran en colores haplotipos y/o clados pertenecientes a diferentes localidades de muestreo: Azul = Uruguay; Amarillo = Brasil; Rojo = Bolivia; Violeta = Paraguay; Rosa = Argentina

Figura 10. Representación gráfica de los grupos de poblaciones testeados en el AMOVA: (1) RIVERA+ TACUAREMBO+CERRO LARGO + RGS + SC_PA (2) ROCHA + MALDONADO + LAVALLEJA + TREINTA Y TRES (3) ARGENTINA + PARAGUAY + MGS (4) BOLIVIA_MT (5) SP_BA_MG, con un valor de $F_{st} = 0,22$.

Figura 11. Red haplotípica TCS construida con 19 haplotipos (obtenidos en 47 secuencias) de un fragmento de 225 pb del gen citocromo b del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo: Tac_Riv, Lav, RioNegro, Maldonado y Rocha corresponden a localidades de Uruguay. BRC = Brasil Centro (Sao Paulo y Minas Gerais); BRS = Brasil Sur (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná); Brasil Norte = Pernambuco y Rio Grande do Norte. Gráfico obtenido con el software PopArt.

Figura 12. Cronograma inferido con BEAST v. 1.8 a partir de 19 haplotipos del gen citocromo b de *Mazama gouazoubira*. Por encima de los nodos se muestra la probabilidad posterior del nodo.

Figura 13. Red haplotípica TCS construida con 21 haplotipos de fragmentos concatenados de la región D- loop y gen citocromo b del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Gráfico obtenido con el software PopArt.

Figura 14. Cronograma construido con BEAST 1.8 para 21 haplotipos del ADN mitocondrial (fragmento del gen citocromo b de 214 pb + fragmento de la región D – loop de 159 pb) de *Mazama gouazoubira* de Uruguay. Por debajo de los nodos se muestra la edad de nodo en MA,

por encima se muestra la probabilidad posterior del nodo. En negro se observan los individuos del norte del país y en gris los individuos del sur.

Figura 15. Distribución de la frecuencia de diferencias nucleotídicas pareadas para el número total de secuencias (en línea punteada). La línea continua muestra la distribución esperada bajo el modelo de expansión. Tomado de DnaSP v 5.0

Figura 16. Perfil demográfico Bayesiano (Bayesian Skyline Plot) para las secuencias de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* analizadas. La línea negra muestra el valor observado a partir de la mediana y las líneas grises el intervalo de confianza (95% HPD). El eje Y representa N_e *tiempo generacional, mientras que el Eje X representa el tiempo en millones de años (MA). La línea vertical indica la existencia de un cambio en la función demográfica.

Figura 17. Mapa de Uruguay representando las localidades muestreadas y los grupos analizados en el AMOVA. En la esquina superior izquierda se indica el porcentaje de varianza entre grupos (EG), entre poblaciones dentro de grupos (EP/DG) y dentro de poblaciones (DP).

ANEXOS

ANEXO I. Muestras relevadas

Anexo I.a. Listado de muestras colectadas en distintos puntos de Uruguay, relevadas en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (acrónimo MNHN), Facultad de Ciencias (acrónimo ZVCM) y Departamento de Biodiversidad y Genética (acrónimos ANI, MSG, MF, BV y LC) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Anexo I.b. Listado de muestras colectadas en Brasil, Argentina, Paraguay y Bolivia relevadas en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (acrónimo MNHN), Facultad de Ciencias (acrónimo ZVCM) y Departamento de Biodiversidad y Genética (acrónimos MSG y MGT) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Anexo I.c. Listado de muestras relevadas en NUPECCE, Jaboticabal, Brasil incorporadas en esta tesis.

ANEXO II. Muestras analizadas

Anexo II.a. Listado de muestras incorporadas en este trabajo para el análisis de secuencias de ADN mitocondrial.

Anexo II.b. Listado de muestras incorporadas en este trabajo para el análisis de loci de microsatélites.

ANEXO III. Secuencias

Anexo III.a. Secuencias de la región *D- loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* de 600 pb.

Anexo III.b. Secuencias de 159 pb de la region *D- loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*.

Anexo III.c. Secuencias de 226 pb del gen *citocromo b* de *Mazama gouazoubira*.

Anexo III.d. Secuencias concatenadas de 159 pb de la región *D- loop* y 214 pb del gen *citocromo b* de *Mazama gouazoubira*.

RESUMEN (500 palabras)

El "guazú birá" (*Mazama gouazoubira*) es un cérvido de mediano tamaño, que habita principalmente en bosques y posee una amplia distribución geográfica en la región sur de Sudamérica. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente individuos de esta especie muestreados en diferentes poblaciones, representativas del total de su área de distribución, con el fin de analizar su estructura poblacional y variabilidad genética. Para esto, se utilizaron dos regiones del ADN mitocondrial (*citocromo b* y *D- loop*) como marcadores moleculares. Además, se buscó poner a punto un set de microsatélites informativos y polimórficos para esta especie, para su uso en muestras de ADN degradado. Se diseñaron protocolos para amplificación por PCR y posterior secuenciación de fragmentos de 600 pb y 159 bp de la región *D- loop*. Se diseñaron cebadores para amplificar por PCR y secuenciar un fragmento corto e informativo del gen *citocromo b* de 214 pb. Se probaron dos posibles juegos de multiplex para amplificación por PCR de 16 loci de microsatélites. La especie posee una gran diversidad genética a nivel del ADN mitocondrial. Se encontró un alto número de haplotipos para *D- loop* y *citocromo b*. El gran número de haplotipos únicos, el análisis *mismatch distribution* para la región *D- loop* y la forma de estrella de la red haplotípica para el gen *citocromo b* son posibles señales moleculares de la radiación explosiva de la especie. Se detectó con el análisis AMOVA moderada diferenciación ($F_{st} = 0,22$), siendo la subdivisión testada más probable de 5 grupos. En cuanto a los microsatélites, se detectaron entre 8 y 22 alelos por loci para 9 loci analizados. La media del contenido de información polimórfica fue $PIC = 0,7951$. Este trabajo representa una aproximación a la utilización de microsatélites para evaluar un pequeño número de muestras de la especie, incluyendo muestras de ADN degradado. Los resultados de este trabajo apoyan la clasificación actual de la especie como de "Preocupación Menor" dada su alta variabilidad genética, aparente gran tamaño poblacional y ocurrencia dentro de áreas protegidas. Se plantea como perspectivas continuar con el desarrollo de los microsatélites como herramienta para el análisis a nivel poblacional a una escala temporal y espacial más reducida, permitiendo conocer en mayor profundidad como los cambios recientes en el paisaje han afectado a esta especie y cuál es el grado de conectividad actual de las poblaciones.

ABSTRACT

The "guazú birá" (*Mazama gouazoubira*) is a median-sized deer, which lives mainly in forests and has a wide geographic distribution in the South region of South America. The objective of this study was to genetically characterize individuals of this species sampled in different populations, representative of its total area of distribution, in order to analyze population structure and genetic variability. For this, two regions of mitochondrial DNA (cytochrome b and D-loop) were used as molecular markers. In addition, a set of informative and polymorphic microsatellites for this species were tested for use in degraded DNA samples in two possible sets of multiplex for PCR amplification. Protocols for PCR amplification and subsequent sequencing of 600 bp and 159 bp fragments of the D-loop region were designed. Primers were designed to amplify and sequence a short and informative 214 bp fragment of the cytochrome b gene. The species has a great genetic diversity at the mitochondrial DNA level. A high number of haplotypes were found for D-loop and cytochrome b. The mixture of haplotypes from different locations within such a large sampling area, the mismatch distribution analysis for the D-loop region, and the star shape of the haplotype network for cytochrome b gene are possible molecular signals of the explosive radiation suffered by the species. The AMOVA detected as most probable the existence of five moderately differentiated groups ($F_{st} = 0.22$), implying moderate genetic structure. For microsatellite loci, we detected between 8 and 22 alleles per loci for 11 loci analyzed. The mean of the polymorphic information content was $PIC = 0.7951$. This work represents an approximation to the use of microsatellites to evaluate a small number of samples of the species, including samples of degraded DNA. These results would support the current classification of the species as "Low Concern" given its high genetic variability, apparent large population size and occurrence within protected areas. As a perspective, we propose to continue with the development of microsatellites. They represent a useful tool for analysis at the population level on a smaller temporal and spatial scale than mtDNA, allowing deeper understanding of how recent changes in the landscape have affected this species and what is the degree of current connectivity of populations.

INTRODUCCIÓN

I. Cérvidos neotropicales: características e historia evolutiva

La región neotropical (región biogeográfica que incluye toda América del Sur, América Central y parte de América del Norte) es una de las regiones más biodiversas del mundo (Dinerstein *et al.*, 1995). Con respecto a la Familia *Cervidae*, es la región más biodiversa del planeta, con seis géneros (*Odocoileus*, *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Pudu* y *Ozotoceros*) y 17 especies descritas, encontrándose la mayoría de estas especies en Sudamérica.

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

Los cérvidos sudamericanos actuales se clasifican en dos grandes grupos en base a su morfología: a) las especies de pequeño tamaño (adultos de menos de 60 cm a la cruz) con astas sin ramificaciones, consideradas adaptaciones a la vida en ambientes de vegetación densa (géneros *Mazama* y *Pudu*), y b) las demás especies de mayor tamaño y astas ramificadas que habitan áreas abiertas, pastizales, praderas y humedales (*Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* y *Blastocerus*) (Eisenberg, 2000; Merino *et al.*, 2005). La sistemática de estos cérvidos neotropicales es profundamente controvertida debido a que el registro fósil es muy escaso y se ha cuestionado la utilidad de los caracteres morfológicos por su alto nivel de homoplasia (Merino & Rossi, 2010). Además, la familia *Cervidae* posee una de las tasas evolutivas más altas en sus cariotipos, debido a su fragilidad cromosómica (Vargas-Munar, 2003), y la taxonomía de algunos géneros (en particular *Mazama*) es muy problemática debido a que la diferenciación morfológica entre especies del género (en general, baja) no está correlacionada a los altos niveles de diferenciación cariotípica entre las especies (Groves & Grubb, 1987; Duarte & Merino, 1997). Por estos motivos, el esquema de clasificación taxonómica de estos cérvidos ha sufrido muchos cambios en las últimas décadas (Bianchini & Delupi, 1979; Groves & Grubb, 1987; Janis & Scott, 1987; Duarte & Merino, 1997;; Grubb, 2000; Webb, 2000; Grubb, 2005) y aún no ha sido completamente esclarecido. Duarte *et al.* (2008) a través del análisis de marcadores moleculares del ADN mitocondrial, encontró un complejo patrón evolutivo para

estas especies. Sus hallazgos muestran dos clados, que divergieron hace aproximadamente cinco millones de años (dos millones de años antes de su colonización de América del Sur). Uno de ellos incluye a: *Mazama gouazoubira*, *Blastocerus dichotomus*, *Hippocamelus bisulcus*, *H. antisensis* y *Ozotoceros bezoarticus*; y el otro clado, más basal, incluye las especies de ciervos rojos *Mazama bororo*, *M. nana*, *M. americana* y *M. temama*, y el género *Odocoileus*. Este análisis sitúa a los “ciervos rojos” más cercanos filogenéticamente al género *Odocoileus* que a otros miembros del género *Mazama*, polifilia que ya había sido descrita en estudios anteriores (Smith *et al.*, 1986; Pitra *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2006). Sugiere además, que los “ciervos rojos” presentaron una diversificación explosiva e independiente de los “ciervos grises”, muy cercana a su colonización de América del Sur. La adaptación a ambientes de vegetación densa en las especies del género *Mazama*, parece haber causado evolución morfológica convergente, existiendo en la actualidad además, varias especies crípticas en este género (González *et al.*, 2010).

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

El género *Mazama* (Rafinesque, 1817) presenta amplia distribución en la región neotropical, abarcando desde México hasta el sur de Argentina (Weber & González, 2003). La taxonomía, distribución, ecología y status de las especies dentro de este género permanecen poco claros (Wemmer, 1998). Se conoce que estas especies habitan un amplio rango de ecosistemas, desde montes y florestas hasta sabanas, encontrándose generalmente en ambientes cerrados. Son animales en general elusivos y difíciles de observar en la naturaleza (Vogliotti & Duarte, 2009). Las diferentes especies varían en tamaño desde pequeño a mediano porte, y comparten caracteres morfológicos como astas simples de aproximadamente 12 cm que presentan únicamente los machos, y que se renuevan anualmente. Existe por otro lado, gran diversidad en cuanto a los patrones de coloración entre las especies (Eisenberg, 2000; Duarte & Merino, 1997).

La primer revisión taxonómica del género, fue realizada por Allen en 1915, quién clasificó 18 especies, separándolas en dos grupos según la coloración del pelaje (rojizos y marrones). En las últimas décadas, se han realizado varias revisiones taxonómicas (Czernay, 1987; Duarte, 1996; Duarte & Jorge, 1998; Geist, 1998; Medellín, 1998; Rossi, 2000) y el descubrimiento en las últimas décadas de tres especies nuevas (Duarte, 1996; Duarte & Merino, 1997; Medellín *et al.*, 1998; Duarte & Jorge, 2003) ha aumentado considerablemente el interés en el status taxonómico y las relaciones filogenéticas de los miembros del género. De acuerdo a las últimas revisiones basadas en datos morfológicos y moleculares, se distinguen diez especies de *Mazama* (Merino & Rossi, 2010). Sin embargo, la separación de estas especies en dos clados reportada por Gilbert *et al.* (2006), Duarte *et al.* (2008) y más recientemente Hassanin *et al.* (2012) en análisis filogenéticos usando ADN mitocondrial y marcadores nucleares sugiere que este género corresponde a un clado polifilético y *M. gouazoubira* y *M. nevorivaga* deberían excluirse del género *Mazama*. Hasta el presente, esta controversia no ha sido resuelta.

Particularmente, el “guazú birá” (*Mazama gouazoubira*; Fischer, 1814) es una de las especies del clado “gris”, y se trata de una de las dos especies actuales de cérvidos autóctonos de Uruguay. Su distribución abarca la región pre andina en Argentina y Bolivia, extendiéndose hasta la costa del océano Atlántico en el este, siendo el límite norte de su distribución el sur de la región Amazónica en Brasil, y el límite sur la costa del océano Atlántico en el territorio uruguayo y la provincia de Entre Ríos en Argentina. Aunque algunos

autores reportan su presencia a lo largo de todo Brasil, evidencia más reciente indica su sustitución por *Mazama nemorivaga* en la región Amazónica (Black-Décima *et al.*, 2010) (Fig. 1). Las principales características morfológicas de la especie son su tamaño (60 cm de altura a la cruz aproximadamente) y la presencia de astas simples sin bifurcar de hasta 12 cm en los machos adultos. Es una especie generalista, y su dieta se adapta a las características del entorno, variando en el porcentaje de hojas, semillas y frutos (Black - Décima *et al.*, 2010). Esta amplitud trófica podría explicar la amplitud de su área de distribución geográfica y la diversidad de hábitats que ocupa (Pinder y Leeuwenber, 1997): principalmente bosques nativos ribereños, pero se encuentra también en bosques mixtos o exóticos (Canevari & Vaccaro, 2007; Duarte & Reis, 2012) y realizando incursiones en pastizales abiertos (Juliá & Richard, 2000; Rivero *et al.*, 2005). Presenta una gran variabilidad morfológica externa en tamaño y coloración del pelaje, relacionada a esta diversidad de ambientes que habita, variando desde el marrón en los individuos de sabana, hasta el grisáceo en los que habitan ambientes de bosque (Duarte & Merino, 1997) (Fig. 2). Por otra parte, han sido observadas variaciones de tamaño de acuerdo a un gradiente latitudinal, siendo los individuos provenientes del sur de mayor porte que aquellos originarios del norte (Duarte & Jorge, 1998; Black – Décima *et al.*, 2010). Inicialmente, seis formas morfológicas fueron descritas como subespecies (Avila-Pires, 1959; Cabrera, 1961; Czernay, 1987; Pinder & Leeuwenberg, 1997). Más adelante, en su revisión, Rossi (2000) interpretó a las subespecies de Brasil como formas de variación individual entre especímenes, no analizando la subespecie argentina. Posteriormente, Duarte & González (2010) analizaron la descripción original de esta subespecie propuesta por Lonnerberg (1919) y consideraron que no hay caracteres en el ejemplar tipo que no puedan ser explicados como variación geográfica o individual, por lo tanto, al presente no se reconocen subespecies.



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

El “guazú birá” es una especie relativamente tolerante a las modificaciones ambientales, adaptándose también a áreas parcialmente cultivadas (Ferrari, 2005; Caraballo, 2009; Rodrigues *et al.*, 2014). Entre las especies de cérvidos de Sudamérica, es la que aparentemente presenta mayor plasticidad ecológica (Black-Décima *et al.*, 2010), por este motivo y debido a que su alimentación se compone mayoritariamente de frutos y tallos jóvenes, actúa como especie clave en la estructuración de la comunidad vegetal, siendo que la alteración en su densidad poblacional puede modificar la estructura de esta comunidad, comprometiendo la disponibilidad de recursos para las demás especies de herbívoros (Feldhamer & McShea, 2012). A pesar de esta relativa tolerancia a modificaciones en el hábitat, se ha detectado en diversas localidades a lo largo de su distribución una tendencia a la declinación de los tamaños poblacionales, debido principalmente a factores antrópicos como la caza, urbanización, fragmentación del hábitat y cambios en el patrón de uso del suelo (Hurtado González & Bodmer, 2004; Mosa & Goytia, 2004; Black – Décima & Vogliotti, 2008; Black – Décima *et al.*, 2010). Además de estos factores, las enfermedades introducidas por animales domésticos, la depredación por perros y la competencia con especies de ungulados introducidas (otros ciervos y ganado) son las mayores amenazas que presentan estos cérvidos en la actualidad (Juliá & Richard, 1999).



Figura 2. Individuos de *M. gouazoubira*: a - Hembra adulta (fotografía tomada en Parque Nacional Santa Teresa, Rocha, Uruguay) b - Macho adulto (fotografía tomada en Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa, Rocha, Uruguay) c - Juvenil (©Ricardo Kuehn) d - Macho con astas en crecimiento (fotografía tomada con cámara trampa en Parque Nacional San Miguel, Rocha, Uruguay)

Actualmente, esta especie está catalogada como "Preocupación menor" por la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), sin embargo, muchos aspectos de su historia natural no han sido evaluados en profundidad. Su ya mencionada capacidad para habitar áreas secundarias o bordes de montes (muchas veces cercanas a núcleos humanos), hacen de ella una especie muy conspicua y por lo tanto pueden generar sobre estimaciones de su abundancia poblacional (Juliá & Richard, 1999). Los datos concretos obtenidos en Argentina a través de entrevistas, indican que la presión de caza tanto deportiva como de subsistencia es alta (Juliá, 2002) y en Bolivia, el "guazú birá" representa un 39% de la biomasa silvestre consumida (Cuéllar, 1999). En nuestro país, se conoce su ocurrencia en 10 departamentos a través de registros en colecciones científicas, colecta de fecas y monitoreo con cámaras remotas (González & Elizondo, 2010; González & Martínez, 2010). Sin embargo, no existen estudios acerca de su abundancia o su distribución exacta. Hasta el momento tampoco se han efectuado estudios que confirmen la existencia de poblaciones fragmentadas, pero la especie denota grandes variaciones en densidad poblacional en las zonas evaluadas (IUCN, 2011). Para realizar un manejo adecuado, es necesario conocer en mayor detalle su distribución geográfica (por ejemplo, su presencia o ausencia en otras zonas de Uruguay donde aún no ha sido citada), realizar evaluaciones de aspectos demográficos como abundancia, densidad poblacional y distribución de la variabilidad genética en los diferentes biomas, además de incluir aspectos sanitarios relativos a zoonosis (Black – Décima *et al.*, 2010).

III. Genética para la conservación y aplicación de marcadores moleculares

La disciplina denominada "Genética para la conservación" se focaliza en generar estrategias para determinar qué conservar, dónde focalizar los esfuerzos de conservación y cómo conservar la mayor cantidad de biodiversidad con los recursos y esfuerzos disponibles (Frankham *et al.*, 2002), utilizando herramientas de la sistemática molecular y genética de poblaciones. La genética de la conservación se focaliza en el estudio de la biodiversidad a nivel genético, con el objetivo de mantener el potencial evolutivo de las poblaciones y especies a largo plazo (Allendorf *et al.*, 2013). La conservación de la diversidad genética es requerida para la evolución adaptativa de las especies, y esta adaptación es la clave para su supervivencia a largo plazo. A lo largo del tiempo, el *pool* genético de una especie varía, con alelos desapareciendo por deriva génica y otros surgiendo por mutaciones *de novo*. Durante este proceso de evolución, las especies pueden prevalecer a condiciones cambiantes adaptándose, o perecer extinguiéndose en un ciclo natural de especiación – extinción (Ouborg *et al.*, 2010). Actualmente, las altas tasas de cambio ambiental impuestas por la actividad humana, sumadas a la fragmentación y modificación de los ambientes han amenazado este balance natural, llevando a una declinación global de la biodiversidad del planeta por aceleración de los procesos de extinción y llevando a algunas especies a tamaños poblacionales muy pequeños, donde la probabilidad de extinción aumenta debido a mayor influencia de procesos estocásticos como la deriva genética (Benayas *et al.*, 2009).

A los efectos de responder preguntas específicas como son la determinación de la variabilidad genética de una población, determinación del tamaño poblacional, detección y predicción de los efectos de fragmentación del hábitat, delimitación de unidades de manejo para la conservación, etc., la genética de la conservación se basa en la información obtenida a través de marcadores moleculares en el genoma. Un

marcador molecular es un segmento de ADN cuyas características pueden ser medidas y utilizadas para hacer inferencias en patrones ecológicos y evolutivos de las poblaciones y especies (Palomares *et al.*, 2000; Hewitt, 2004). La elección del marcador molecular a utilizar depende en gran medida de la pregunta a responder, y es una etapa clave en la planificación de una investigación, ya que la elección de un marcador inadecuado puede comprometer la posibilidad de alcanzar los objetivos propuestos (Arif & Kahn, 2009).

a. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial es un marcador molecular que ha sido ampliamente utilizado en las últimas 3 décadas, a partir de los trabajos realizados por Avise (1987) y Moritz (1987). Se trata de una pequeña molécula de ADN de doble hebra, circular, que se encuentra fuera de núcleo, en múltiples copias dentro de las mitocondrias de las células (Taberlet, 1996). El contenido genético en animales y el orden de los genes dentro de la molécula también es muy conservado dentro de los vertebrados (Brown, 1985). La molécula de ADN mitocondrial es compacta, con pocas secuencias intergénicas y no posee intrones, existiendo variación entre especies, desde 14 hasta más de 30 kilobases (Harrison, 1989). La región de control es una región no codificante del ADN mitocondrial dentro de la cual está el fragmento *D-loop*, donde se encuentran las secuencias que controlan el inicio de la replicación. Análisis comparativos que se han realizado entre diversos taxa han mostrado que la región de control está altamente estructurada, incluye una región conservada central (CCR) flanqueada por dos dominios periféricos altamente divergentes entre especies (Saccone *et al.*, 1991; Clayton, 1992). La CCR contiene secuencias que controlan la replicación y transcripción del ADN mitocondrial, en la cuales existen mutaciones puntuales y con bajas tasas de acumulación de deleciones (Saccone *et al.*, 1991). En contraste, los dominios periféricos acumulan rápidamente mutaciones puntuales, deleciones y números variables de repetidos en tándem. Por su alta tasa de cambios nucleotídicos en los dominios periféricos, la región de control es muy utilizada en genética de poblaciones y genética evolutiva en mamíferos (Harrison, 1989), ya que es comúnmente variable al nivel intraespecífico y por lo tanto adecuada para estudios de variabilidad genética, filogeografía y asignación de unidades de manejo (Kohn & Wayne, 1997).

El ADN mitocondrial en general, posee una serie de propiedades que lo hacen apropiado como marcador molecular para cuantificar la diversidad: experimentalmente, es relativamente fácil de aislar debido a la existencia de múltiples copias en cada célula, su contenido es muy conservado en el reino animal y es muy variable en poblaciones naturales debido a su elevada tasa de mutación. Las regiones variables están típicamente flanqueadas por regiones conservadas, lo que facilita el diseño de cebadores. Es heredado exclusivamente por vía materna (debido a que el citoplasma espermático se destruye luego de la fertilización, y por lo tanto también las mitocondrias masculinas), lo que significa que todo el genoma se hereda como un solo locus, no recombinante, y por lo tanto hay una única genealogía que representa la historia y el origen de los linajes maternos (Kohn & Wayne, 1997). Esto simplifica considerablemente la representación y el análisis de los datos. Como sólo una fracción de la población (la mitad, si la proporción de sexos es 1:1) pasa su ADN mitocondrial a la progenie, el tamaño poblacional efectivo encontrado es menor que para genes nucleares. Además debido a que no ocurre recombinación, este marcador es particularmente apropiado para rastrear eventos en la historia evolutiva (efecto fundador, cuellos de botella, expansiones demográficas).

Estudios realizados en algunos cérvidos neotropicales usando esta región como marcador molecular, han mostrado que es polimórfica e informativa (González *et al.*, 1998; Bidegaray *et al.*, 2003; Elizondo, 2010; Black-Décima, 2010, Figueiredo, 2016). Si bien evaluar la divergencia en el ADN mitocondrial puede ser útil para generar hipótesis acerca de la diversidad genética, el aislamiento o estructuración de las poblaciones, también es claro que la divergencia en el ADN mitocondrial no necesariamente equivale a la ausencia de flujo génico, ya que únicamente se evalúa el linaje materno. Esta consideración es particularmente importante en mamíferos donde existe filopatría en las hembras y el flujo génico está dado por los machos.

b. Microsatélites

Los microsatélites se han convertido en marcadores nucleares muy utilizados en genética de la conservación en las últimas décadas. Consisten en cortos repetidos en tándem de una secuencia de ADN, usualmente entre 75 y 300 pares de bases de largo. Son regiones no codificantes del genoma, y por lo tanto en general consideradas como selectivamente neutrales (Selkoe & Toonen, 2006). Debido a esto, son altamente variables, y la variabilidad entre los alelos se mide en el número de veces que aparece el repetido (típicamente de entre 2 a 6 nucleótidos). La tasa de mutación en estas regiones, varía entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por locus por generación (Bruford & Wayne, 1993). Esto, sumado a la herencia biparental, los hace especialmente valiosos para aplicar en conservación, dado que son altamente polimórficos incluso en pequeñas poblaciones de especies amenazadas. Este alto nivel de polimorfismos resulta de su alta tasa de mutación (Paetkau *et al.*, 1995; Charruau *et al.*, 2011). Entre las numerosas aplicaciones se destacan: la detección de estructura poblacional intraespecífica, estimación del tamaño poblacional efectivo, asignación de individuos a poblaciones como ocurre en casos en que se incautan animales por tráfico ilegal, o productos extraídos de animales silvestres, estimación de la tasa de migración y del flujo génico, la identificación individual y el análisis de parentesco. Por esto último, también han sido muy empleados para brindar información genética para el manejo de poblaciones en cautiverio, ya que permiten asignar paternidad y determinar coeficientes de endogamia (Zane *et al.*, 2002).

La dinámica de como se genera la alta variabilidad por mutación aún no es del todo comprendida, se han sugerido varios mecanismos, incluyendo errores durante la recombinación, *cross over* desigual, y deslizamiento de la polimerasa durante la replicación o reparación del ADN. El *cross over* desigual, ocurre debido a que en las regiones de microsatélites se forma una horquilla durante la sinapsis de los cromosomas homólogos, dando lugar a que se intercambien partes desiguales de los cromosomas, aumentando y disminuyendo el número de repetidos en cada uno. Por otro lado, durante la replicación o reparación del ADN, puede ocurrir que las hebras de ADN se disocien temporalmente y cuando se unan nuevamente, lo hagan en una posición diferente, llevando así a errores en la copia, incrementando o disminuyendo el número de repetidos en el alelo (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Es importante considerar cual modelo teórico debe ser aplicado para interpretar correctamente los parámetros genéticos obtenidos de estos marcadores (Ellegren, 2004). Los modelos de mutación planteados son cuatro:

- Modelo de alelos infinitos (*Infinite alleles (IA) model*): Cada mutación resulta en un alelo único y novedoso, de tal forma que existen un número infinito de alelos posibles. Aplicando este modelo, la proximidad en el número de repetidos entre alelos no significa mayor proximidad filogenética (Kimura & Crow, 1964).

- Modelo de mutación paso a paso (*Stepwise mutation (SM) model*): Cada mutación resulta en la ganancia o pérdida de un solo repetido. Este modelo implica que dos alelos que difieran por un motivo están más relacionados (comparten un ancestro común más reciente) que aquellos alelos que difieren en más de un motivo de repetición. Este modelo es preferido cuando se estima estructuración poblacional, excepto en la presencia de homoplasia. La homoplasia puede influenciar seriamente en los estudios poblacionales cuando la tasa de mutación es muy elevada y el tamaño poblacional muy grande (Otha & Kimura, 1973; Selkoe & Toonen, 2006).

- Modelo de dos fases (*Two phase (TP) model*): Este modelo incorpora los planteamientos del modelo por pasos, pero también permite la ocurrencia de mutaciones que cambien el largo del repetido en más de una unidad (asigna una probabilidad p a las mutaciones de largo 1, y $1 - p$ a las de mayor largo) (Di Rienzo *et al.*, 1994; Fu & Chakraborty, 1998; Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

- Modelo K - alelos (*K-alleles (KA) model*): Bajo este modelo, existen K posibles alelos para cada locus y cada alelo posee la misma probabilidad de mutación a los restantes $K - 1$ alelos: $p = u/k - 1$ (Crow & Kimura, 1970).

Un aspecto favorable de estudiar la diversidad molecular en poblaciones utilizando loci de microsatélites, es que se detectan un gran número de alelos (Lacey *et al.*, 1999), por lo tanto, hay mayor sensibilidad para detectar diversidad en comparación con otros marcadores. Este aspecto es favorable cuando las poblaciones están subdivididas y la diversidad total se encuentra dividida entre las subpoblaciones, ya que resulta en el hallazgo de un número considerable de alelos exclusivos lo que resulta muy útil para estimar el grado de aislamiento entre ellas (Wayne & Morin, 2004).

Por otra parte, debido a sus características y particularmente al ser amplificados a partir de muestras de ADN degradado, los microsatélites pueden presentar errores de genotipado. Estos errores de genotipado pueden ser estocásticos, como por ejemplo debido a una baja concentración de ADN en la muestra (Wandeler *et al.* 2003), lo que puede resultar en la no amplificación azarosa de algunos alelos (pérdida de alelos, Miller & Waits, 2003), o también pueden ocurrir debido a la amplificación preferencial de alelos de menor tamaño (Wattier *et al.*, 1998). Por otra parte, el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la amplificación puede producir "tartamudeo" y ocasionar la adición en número de repetidos de la copia respecto al ADN molde (Shinde *et al.*, 2003). Este tartamudeo es más común en loci dinucleótidos, generando una incorrecta asignación de homocigotas y heterocigotas. Por último, cuando ocurren mutaciones en el sitio de unión al cebador, algunos alelos no son amplificados (alelos nulos), resultando en falsos homocigotas. Este último, es un error de tipo sistemático (Shaw *et al.*, 1999). Los errores de genotipado pueden conducir a desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, en particular por deficiencia de heterocigotas (Shaw *et al.*, 1999), generando un sesgo potencial en los análisis de genética poblacional subsecuentes, ya que estas desviaciones pueden ser confundidas con aquellas causadas por endogamia, apartamientos de la panmixia, o efecto Wahlund (Oosterhout *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos de estos errores dejan una firma molecular reconocible (por ejemplo, deficiencias o excesos de ciertos genotipos particulares) por lo que es posible reconocerlos y corregirlos (Wang *et al.*, 2012).

Los marcadores genéticos utilizados para análisis poblacionales deben ser neutros desde el punto de vista evolutivo, no encontrándose bajo presión de selección, para asegurar que las mutaciones que ocurren no son eliminadas ni seleccionadas. El principio de Hardy-Weinberg (EHW) establece que en una población ideal las frecuencias génicas y genotípicas se mantendrán constantes de generación a generación bajo ciertas asunciones: no ocurrencia de mutación, migración, selección o deriva génica (Guo & Thomson,

1992). Si bien estas asunciones son comúnmente violadas en poblaciones naturales, se espera que los loci que no se encuentren bajo presión de selección de ningún tipo cumplan a grandes rasgos esta expectativa. Para un locus con dos alelos en equilibrio de H-W, se espera una distribución binomial de homo y heterocigotas (Beebe & Rowe, 2008) de acuerdo con la siguiente relación: $p^2+2pq+q^2=1$. Donde p y q son las frecuencias de los alelos A y a en una población. Esta relación puede ser acomodada para múltiples alelos (Guo & Thomson, 1992): $\sum_i p_i A_i A_i + \sum_{i < j} 2 p_i p_j A_i A_j$. Si las frecuencias genotípicas observadas para un locus dado no se separan significativamente de las esperadas para H-W, se estima que este locus se encuentra en equilibrio, y por lo tanto es neutral desde un punto de vista evolutivo.

La mayor desventaja de estos marcadores es probablemente que no pueden ser aplicados fácilmente con ADN de baja calidad y concentración. El desarrollo de los cebadores específicos para su amplificación por PCR puede resultar muy costoso y consumir mucho tiempo (Zane *et al.*, 2002), ya que implica la construcción de librerías genómicas u obtención de datos de secuenciación masiva para la identificación de los microsatélites en el genoma, el diseño de cebadores apropiados para amplificación por PCR y la selección de los loci polimórficos en la población a analizar. Estos pasos pueden ser evitados mediante el ensayo de cebadores diseñados en especies filogenéticamente cercanas, técnica conocida como amplificación cruzada o interespecífica (*cross-amplification*) (Moore *et al.*, 1991; Cosse *et al.*, 2007; Mantelatto *et al.*, 2010). Esto es posible gracias a la existencia de regiones conservadas entre especies cercanas, flanqueantes a la región hipervariable, donde son diseñados los cebadores (Galan *et al.*, 2003; Cosse *et al.*, 2007; Armstrong *et al.*, 2011).

IV. Antecedentes y justificación

La cuantificación de la diversidad genética es un parámetro fundamental en biología evolutiva y biología de la conservación. Es importante conocer y conservar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, ya que se espera que altos niveles de variabilidad genética incrementen el potencial evolutivo de una especie y favorezcan el mantenimiento de poblaciones saludables (Kalinowski, 2004). Un déficit en la misma puede afectar la posibilidad de respuesta de la especie frente perturbaciones ambientales (como enfermedades o catástrofes naturales), volviéndolas más vulnerables (Díaz & Smith-Flueck, 2000).

Los patrones de diversidad genética de las especies observados en la actualidad son la consecuencia de su historia evolutiva y también de las restricciones actuales a la dispersión y reproducción de los individuos. Factores paleoambientales (como las fluctuaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno) han sido responsables de los patrones actuales de diversidad genética observados en muchas especies (Lessa *et al.*, 2003), ya que llevaron a la ocurrencia de procesos demográficos (como expansiones o contracciones) que dejan firmas reconocibles en el patrón molecular de diversidad (Harpending *et al.*, 1998; Schneider & Excoffier 1999). Por ejemplo, acontecimientos que causan una disminución en tamaño pueden resultar en niveles bajos de variación genética en las poblaciones actuales (Aris-Brosou & Excoffier, 1996). La ocurrencia de estos procesos en la historia de una especie o población, puede ser inferida a través del estudio de los patrones de variación y estructuración genética de una especie en un contexto geográfico (filogeografía), contribuyendo al entendimiento de la importancia de los factores biogeográficos sobre la distribución y diversidad (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000; Knowles & Maddison, 2002), y permitiendo la comparación con otras especies que se han visto afectadas de forma similar por tener requerimientos

ambientales parecidos (Márquez *et al.*, 2006). Se espera que si una especie se encuentra estrechamente asociada con una condición ambiental particular, su distribución y su diversidad genética serán más dependientes de los cambios ambientales y como éstos afecten el paisaje.

Con el fin de diseñar estrategias adecuadas de conservación y manejo para una especie, es importante incorporar información confiable acerca de su diversidad genética e historia demográfica (Frankham *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2007). Es crucial conocer la presencia de divisiones demográficas que podrían influir en los patrones de flujo genético y resultar en una distribución jerárquica de la diversidad genética entre las poblaciones (Moritz, 1995; Crandall *et al.*, 2000). En este contexto, la definición intraespecífica de Unidades de Manejo (UM) (Moritz, 1994) cobra gran importancia, porque describe las unidades fundamentales a conservar. Las UM son reconocidas como poblaciones que poseen una diferencia significativa en sus frecuencias alélicas, sin importar su diferenciación filogenética (Fraser & Bernatchez, 2001) e identifican poblaciones de individuos entre los cuales el grado de conectividad (medido a través del flujo génico) es lo suficientemente bajo como para asumir que cada población debería ser monitoreada y manejada de forma separada (Palsbøll *et al.*, 2006). Si una UM fuera sobreexplotada o extirpada, es improbable que pudiera ser restablecida a través del reclutamiento natural de individuos de otras poblaciones (Avise, 2000). El propósito de la definición de Unidades de Manejo es asegurar que el patrimonio genético de todas las poblaciones sea reconocido y protegido, manteniendo el potencial evolutivo de la especie (Moritz, 1994).

Los marcadores moleculares pueden utilizarse para conocer las respuestas demográficas de las poblaciones a los cambios climáticos pasados y otros procesos históricos (Templeton *et al.*, 1995; Lessa *et al.*, 2003; González & Duarte, 2007), y también para analizar la variación genética intraespecífica, lo que puede permitir predecir el impacto de los futuros cambios climáticos en las poblaciones (Davis & Shaw, 2001). Éstos, combinados con un muestreo no invasivo, son una herramienta que provee información biológica valiosa previniendo disturbios ecosistémicos y tratando de minimizar el impacto humano en el proceso de obtención de información (González & Duarte, 2007). El muestreo no invasivo, cobra además gran importancia para obtener información genética en mamíferos silvestres de pequeño tamaño, hábitos nocturnos y elusivos, que resultan difíciles de observar y capturar (Kohn *et al.* 1999).

El análisis de la variabilidad genética y conectividad entre las poblaciones de una especie, y como ésta se ve afectada por cambios en el ambiente, ha cobrado particular importancia en las últimas décadas, ya que una gran porción de los ambientes naturales ha sido urbanizada o cultivada. En particular en Uruguay, la transformación de ambientes como consecuencia de las actividades antropogénicas, ha alterado pastizales, bosques y humedales nativos, lo que ha resultado en la reducción de las poblaciones de mamíferos silvestres (Soutullo *et al.*, 2013). La transformación del hábitat se asocia en general con la declinación de las poblaciones silvestres, ya que crea discontinuidades en la distribución de recursos y condiciones ambientales llevando a una reducción de la conectividad entre poblaciones y disminuyendo la probabilidad de dispersión de los individuos y la tasa de colonización de nuevos parches del ambiente (Benayas *et al.*, 2009). En particular en el caso del “guazú birá”, no se tienen datos concretos de su abundancia y estructura poblacional, y se cree que las poblaciones pueden encontrarse aisladas limitando el flujo génico entre ellas (González *et al.*, 1998; Wemmer, 1998). Es, por lo tanto, importante un relevamiento completo que permita obtener información acerca de su estatus poblacional.

Anteriormente, se han realizado aproximaciones en este sentido: Bidegaray (2003) realizó un estudio filogenético comparativo de varias especies del género *Mazama* utilizando como marcador molecular el gen de *citocromo b* del ADN mitocondrial, incluyendo individuos de *M. gouazoubira* de Uruguay. Años

después, Elizondo (2010) realizó el primer análisis de diversidad genética para la especie, empleando el gen *citocromo b*, y encontró altos niveles de polimorfismo, mostrando el análisis poblacional una tendencia discreta hacia la subestructuración. Los altos niveles de diversidad genética encontrados en ese trabajo sugieren la existencia de grandes tamaños poblacionales, aunque detectó niveles moderados de flujo de genes entre las localidades, mostrando una leve tendencia hacia la divergencia. Posteriormente otro estudio se realizó empleando secuencias de la región *D-loop* para analizar la variabilidad genética comparativamente de esta especie en el país con ejemplares de algunas localidades sudamericanas, encontró una alta variabilidad genética y una señal leve de expansión demográfica en el pasado (Aristimuño, 2013). Sin embargo, estos trabajos utilizaron un número limitado de individuos y no representativos de la amplia distribución geográfica, por lo que es importante ampliar la muestra para obtener una mayor resolución acerca de la historia evolutiva y las posibles particiones demográficas en esta especie. Recientemente, Figueiredo (2014), realizó una revisión filogenética de las especies *M. nemorivaga* y *M. gouazoubira* a partir de muestras de diferentes poblaciones de Brasil, utilizando marcadores moleculares mitocondriales y nucleares. Concluyó, a partir de estas muestras, que la especie *M. gouazoubira* se subdivide en cinco clados, con alto soporte estadístico pero no relacionados a separaciones biogeográficas, sino que ocurriendo en sempatría. Por este motivo, sugiere que análisis complementarios deben ser realizados para la determinación de un posible complejo de especies crípticas.

Por otro lado, existen dos antecedentes de puesta a punto de un set de loci de microsatélites para la especie por amplificación cruzada de loci desarrollados para bovinos y otros cérvidos (Da Rosa, 2014), y otro set de loci probados por amplificación cruzada de microsatélites desarrollados para otros cérvidos en 2 individuos de *Mazama gouazoubira* (Mantelatto *et al.*, 2010). Ambos trabajos concluyen que es posible la amplificación cruzada con cebadores inicialmente desarrollados para otras especies, pero no son concluyentes respecto a su utilidad en la especie, siendo necesario continuar el trabajo para lograr un set polimórfico y robusto que permita análisis poblacionales, que hasta el momento no han sido publicados. Recientemente, en el laboratorio de Genética Molecular del Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) se desarrollaron a partir de datos de secuenciación masiva, 10 loci de microsatélites específicos para *M. gouazoubira* (Caparroz *et al.*, 2015). Peres (2015) utilizó estos loci para la identificación individual de muestras en el marco de un análisis de área de vida para una población de Pantanal, Brasil. De ellos, únicamente 5 mostraron ser amplificables en muestras de ADN fecal (con un éxito promedio de amplificación de apenas 20%), pero no mostraron ser fiables al momento de la asignación certera de genotipos individuales a las muestras.

Teniendo en consideración los aspectos mencionados, y los antecedentes con los que se cuenta al momento, en esta tesis estaremos analizando muestras de individuos de *M. gouazoubira* representativos de su área de distribución empleando marcadores moleculares del ADN mitocondrial. Por otro lado, estaremos poniendo a punto un set de loci microsatélites para ser probados en el análisis de ADN obtenido a partir de muestras no invasivas. Esto permitirá continuar y consolidar el trabajo ya iniciado en pos de conocer y generar estrategias y herramientas para la preservación de una especie autóctona de Uruguay.

Se pretende que los resultados sirvan como insumo para elaboración de planes de manejo para la especie, permitiendo identificar sitios donde se retiene la diversidad genética y que son importantes para asegurar el flujo génico, pudiendo generar recomendaciones de zonas de conservación para la especie. Además, aportarán a la comprensión de los factores históricos y actuales que inciden en la distribución de la diversidad genética a nivel intra-específico.

HIPÓTESIS

En base a las características biológicas de la especie, la posible influencia de factores ambientales históricos sobre su diversidad genética y distribución, y lo reportado anteriormente, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- La especie sufrió una expansión demográfica en el pasado reciente, producto de la colonización de ambientes luego de periodos con tamaños poblaciones pequeños, como ya ha sido reportado para varias especies de vertebrados de América (OE 3).

Por este motivo, se espera encontrar una alta diversidad haplotípica a nivel del ADN mitocondrial, particularmente para la región *D-loop* (que posee una mayor tasa de mutación al ser una región no codificante del genoma) y un alto número de haplotipos en baja frecuencia o únicos. Se espera que la diversidad genética del gen *citocromo b* sea menor, ya que se trata de una región codificante donde hay una mayor proporción de mutaciones que son eliminadas por selección natural (OE 1).

- Al tratarse de una especie con un rango geográfico tan amplio en relación a su capacidad de dispersión, es esperable detectar poblaciones geográficamente diferenciadas, difícilmente conectadas por migración efectiva de individuos a pesar de no existir barreras geográficas (OE 2).

- Debido a la cercanía filogenética de esta especie con otras especies de artiodáctilos, y a los antecedentes ya reportados, se espera amplificar en PCR tipo multiplex un set de aproximadamente 10 loci microsatélites construido a partir de los loci ya reportados y citados en antecedentes para *Mazama gouazoubira*. De acuerdo a lo citado en la bibliografía, se espera que estos loci resulten polimórficos e informativos, y obtener un éxito de amplificación de aproximadamente 50% para las muestras de ADN degradado, proveniente de materia fecal o huesos. Debido a la alta variabilidad genética ya detectada para esta especie en el ADN mitocondrial, se espera identificar un número alto de alelos para los loci analizados y una alta proporción de individuos heterocigotas (OE 4 y 5).

OBJETIVOS

I. Objetivo general

El objetivo general es caracterizar la diversidad genética de ejemplares representativos a lo largo de la distribución geográfica de *M. gouazoubira* para analizar sus patrones de diversidad genética y estructuración espacial de las poblaciones utilizando marcadores moleculares. Relacionar esta información con el estado de conservación de la especie propuesto por organismos internacionales como la IUCN y determinar UMs.

II. Objetivos específicos

II.1. Caracterizar la diversidad genética de *M. gouazoubira* a través de su rango de distribución en un contexto filogeográfico utilizando marcadores moleculares del ADN mitocondrial y microsatélites.

II.2. Evaluar la existencia de estructuración genética entre las poblaciones. Determinar unidades genéticas de manejo para la conservación a partir del análisis de marcadores moleculares de ADN mitocondrial.

II.3. Detectar la existencia de posibles eventos demográficos históricos en el pasado reciente para las poblaciones de *M. gouazoubira*, que hayan dejado señales moleculares en las poblaciones analizadas.

II.4. Probar un juego de loci de microsatélites que sean amplificables y cumplan con los siguientes requisitos: fácilmente genotipables, polimórficos, se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg y en equilibrio de ligamiento y sean neutrales.

II.5. Diseñar multiplex para la amplificación por PCR de estos loci de microsatélites y probarlos en muestras de ADN de buena calidad y también de ADN degradado. Caracterizar la diversidad genética para este conjunto de muestras con este conjunto de marcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Obtención y procesamiento de muestras

El área estudiada abarcó diversos puntos dentro del área de distribución geográfica conocida de la especie (Fig. 3). Se utilizaron para este trabajo distintos tipos de muestras obtenidas bajo diversas condiciones:

- a) Muestras de tejido o hueso depositadas en el acervo de las colecciones naturales de Facultad de Ciencias y Museo Nacional de Historia Natural (pertenecientes a los últimos 30 años). Se realizó un relevamiento de las muestras disponibles en estas colecciones, que se detalla en el Anexo I.
- b) Muestras de tejido, hueso, sangre y fecas, y ADN previamente extraído a partir de muestras de estos tipos, depositadas en el banco de muestras biológicas del Laboratorio de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Se realizó un relevamiento de las muestras disponibles en esta colección, que se detalla en el Anexo I.
- c) Muestras de fecas, huesos y tejido obtenidas durante la realización de este trabajo. Estas muestras fueron colectadas en poblaciones silvestres conocidas de distintas localidades de Uruguay, utilizando guantes descartables y pinzas o tijeras estériles para la colecta.
- d) ADN extraído a partir de muestras de pelo de individuos muestreados en diferentes zonas de Brasil y depositadas en la colección del NUPECCE (UNESP, Jaboticabal, Brasil), estas muestras se detallan en el Anexo II.

Las muestras de músculo, órganos internos, pieles, pelos, huesos y fecas se almacenaron dentro de tubos plásticos estériles y cerrados, debidamente rotulados, conteniendo etanol 70% y se almacenaron a 4° C hasta el momento de la extracción de ADN. Posteriormente, fueron trasladadas a -20° C para su conservación a largo plazo. El número total de muestras relevadas, su procedencia, tipo y fecha de colecta se detallan en el Anexo I. Las muestras analizadas durante este trabajo se detallan en el Anexo II. La posición geográfica de cada muestra recolectada fue georreferenciada utilizando Google Earth (Versión 7.1.2.2041; Google Inc., USA), para posteriormente mapear todos los puntos de colecta a través del software Quantum GIS versión 2.6.0 (QGIS Development Team, 2014).

Se realizó un relevamiento de las muestras de la especie disponibles en las colecciones de Uruguay (Museo Nacional de Historia Natural, Colección de la Sección Zoología de Vertebrados de Facultad de Ciencias y Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable). Esto permitió la evaluación de la disponibilidad y abundancia de posibles fuentes de ADN para la realización de este trabajo, pero a su vez, permitió detectar sitios donde la especie no ha sido detectada. Con el objetivo de cubrir estas zonas del país, durante el transcurso de este trabajo, se realizó una salida de campo con el objetivo de recolectar muestras de la especie a los departamentos de Durazno, Tacuarembó y Treinta y Tres, donde se realizaron transectas por montes nativos y mixtos así como recolección de animales atropellados en las rutas, y no fueron encontradas muestras de fecas o animales muertos de *M. gouazoubira*, ni fueron visualizados individuos.

En total, se relevaron en las diferentes colecciones de Uruguay, 284 muestras correspondientes *a priori* a la especie *M. gouazoubira*, además de 26 muestras en la colección del NUPECCE en Brasil.

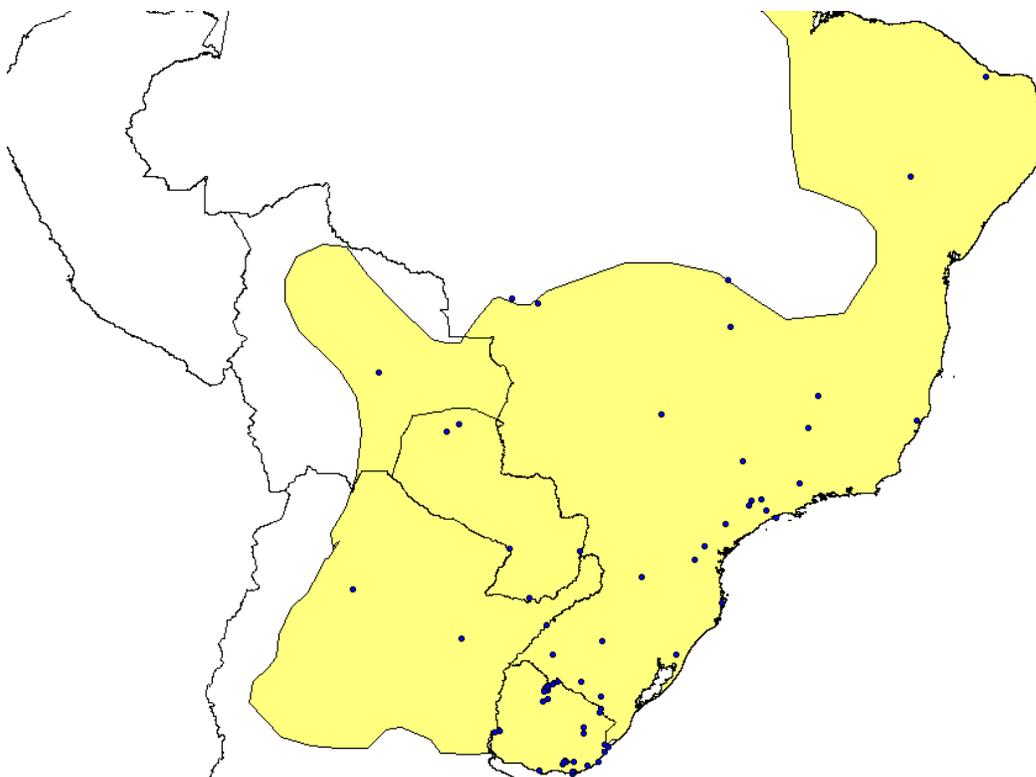


Figura 3. Mapa mostrando la distribución geográfica de la especie *Mazama gouazoubira* (contorno amarillo, tomado de UICN 2016) y las muestras analizadas en este trabajo (puntos azules). Realizado con QGIS versión 2.6.0.

II. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN a partir de una muestra biológica, con la finalidad de obtener ADN de buena calidad y cantidad adecuada para el análisis genético, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten los posteriores análisis. En general, el protocolo de extracción consiste de cinco etapas principales: homogeneización de la muestra, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN. La lisis celular se realiza utilizando un buffer de lisis que solubiliza los lípidos, compuesto por EDTA, Tris y HCl, mientras que para el paso de degradación de proteínas se utiliza la enzima proteinasa K. Para la precipitación del ADN, se utilizan sales como cloruro de sodio (NaCl), que estabiliza las moléculas de ADN y lo aísla de la solución acuosa dejándolo libre de impurezas.

Para este trabajo, la extracción de ADN fue realizada siguiendo diferentes protocolos de acuerdo al tipo de muestra biológica. Para fecas y tejidos se utilizó el Kit QIAGEN *DNeasy*® (de acuerdo a las instrucciones del fabricante); para muestras de huesos se utilizó el protocolo de González *et al.* (2015). Se utilizaron materiales estériles y guantes durante el proceso para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación. Para cuantificar y verificar la calidad del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fischer), que provee información acerca de la concentración de ADN de la muestra (ng/μl) a través de la medida de absorbancia a 260 nm, mediante la ecuación de Lambert-Beer, y además permite detectar la presencia de impurezas a través de la relación de absorbancia a 260 nm /280 nm (valores ≥ 1.80 , indican

que la muestra es ADN en alto grado de pureza, ≥ 2.00 indican que existe una mayor concentración de ARN, y valores < 1.80 demuestran presencia de proteínas). A partir de la relación de absorbancia 260 nm/230 nm, se puede además identificar otras impurezas, como productos químicos orgánicos y contaminación con disolventes. Para las extracciones de ADN a partir de fecas, también se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa, 100 mL de TBE, agente intercalante GoodView™- Sbs).

III. Amplificación por PCR y secuenciación de ADN mitocondrial

Debido a que se contaba con ADN de diferente calidad de acuerdo al tipo de muestra biológica a partir de la cual fue obtenido (el ADN obtenido a partir de fecas o huesos se encuentra por lo general muy degradado debido a la exposición a la luz UV y/o resecamiento, resultando difícil la amplificación de fragmentos de gran tamaño), se decidió optar por la amplificación de más de un fragmento del ADN mitocondrial para luego analizar las secuencias concatenadas, lo que es válido en el contexto de no recombinación del ADN mitocondrial. Además, la secuenciación de diferentes genes o porciones, permitió la evaluación de regiones con diferentes tasas de mutación. En primer lugar, para aquellas muestras con las que se contaba con ADN de alto grado de pureza, se realizó la amplificación por PCR en tiempo final de un fragmento de la región *D-loop* de aproximadamente 600 pb utilizando cebadores universales para mamíferos Thr-L15926/DL-H16340 (Vila *et al.*, 1999). Alternativamente, para aquellas muestras cuya calidad de ADN era baja y luego de un intento no se logró la amplificación de este fragmento, se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 159 pb (comprendido dentro del fragmento de mayor tamaño) utilizando los cebadores DLHBF (5' GCGGCATGGTAATTAAGCTC 3') y DLHBR (3' GCATGGGGCATATAATGTAATG 5') diseñados específicamente para ciervos (González *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2016). Adicionalmente, a partir de secuencias completas del gen *citocromo b* del ADN mitocondrial de *M. gouazoubira* ya disponibles (Duarte *et al.*, 2008), se diseñaron nuevos cebadores más pequeños y que *a priori* resultaran informativos a nivel poblacional, factibles de ser amplificados en muestras de ADN degradado o en baja cantidad. Estos cebadores fueron diseñados utilizando el software libre Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012), y amplifican una región de aproximadamente 214 pb. Para su diseño, se tuvo en cuenta que el contenido GC en ambos cebadores se encontrara entre 45-55%, que la secuencia no fuera auto-complementaria, que fuera baja la posibilidad de formación de dímeros o estructuras secundarias, y que no existieran en el gen otros posibles motivos complementarios con estas secuencias que generasen amplificación inespecífica. En la Tabla 1 se detallan las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de cada fragmento de ADN mitocondrial. En el caso de los cebadores DLHB y los cebadores del gen *citocromo b*, las amplificaciones fueron llevadas a cabo por PCR en tiempo real, utilizando un termociclador *Corbett Rotor Gene 6000* QIAGEN ©, utilizando un volumen total de 20 μ l, conteniendo 10 μ l de SensiFast 10x (Bioline), 0.4 μ M de cada primer (1 μ l), 60 ng de ADN aproximadamente (1 a 3 μ l) y agua ultra pura (c.s.p. 20 μ l). Esta técnica posee el mismo principio que la técnica de PCR en tiempo final, con el agregado en el mix de PCR de una sustancia marcada con un fluoróforo. Este fluoróforo se une inespecíficamente al ADN doble hebra, y emite una mayor señal de fluorescencia a medida que aumenta el producto de amplificación. Por lo tanto, permite monitorear el progreso de la reacción a medida que esta transcurre, evaluar la eficiencia de la misma sin necesidad de la electroforesis en gel de agarosa, y también discriminar fragmentos amplificados a partir de la curva de *melting* o desnaturalización (dependiente, entre otras

cosas, de la composición de bases de la secuencia). Para la amplificación del fragmento de 600 pb de la región *D-loop* se utilizó la técnica de PCR en tiempo final, utilizando un volumen total de 20 μ l, conteniendo 10 μ l de Immomix 10x (Bioline), 0.4 μ M de cada primer (1 μ l), 60 ng de ADN aproximadamente (1 a 3 μ l) y agua ultra pura (c.s.p. 20 μ l). En cada PCR se utilizaron controles negativos (conteniendo sólo reactivos de PCR) para monitorear una posible contaminación cruzada entre muestras y controles positivos para advertir ADN defectuoso o error de procedimiento. Los productos obtenidos en las reacciones de PCR fueron purificados utilizando el kit comercial ZYMO Research© *DNA Clean & Concentration* y secuenciados mediante el método de Sanger en un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems) en el Instituto Pasteur de Montevideo.

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR para tres fragmentos de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* utilizados en este trabajo.

Fragmento	Tamaño	Ciclado	Temperatura	Tiempo
<i>D loop</i>	600 pb	Incubación inicial	95°	10 minutos
		35 ciclos	95°	60 segundos
			51°	90 segundos
			72°	60 segundos
		Extensión final	72°	7 minutos
<i>D loop</i>	159 pb	Incubación inicial	95°	3 minutos
		35 ciclos	95°	5 segundos
			56°	10 segundos
			72°	20 segundos
<i>Cit b</i>	214 pb	Incubación inicial	95°	3 minutos
		35 ciclos	95°	5 segundos
			58°	10 segundos
			72°	20 segundos

IV. Amplificación de microsatélites y diseño de PCR Multiplex

Con el objetivo de generar un set de al menos diez loci de microsatélites a ser utilizados para análisis de genética poblacional a partir de muestras de ADN de *Mazama gouazoubira* procedentes de diferentes fuentes, se comenzó testando el set de microsatélites definido por Da Rosa, 2014, de 9 loci de microsatélites desarrollados para bovinos y otras especies de cérvidos, en las condiciones definidas en ese trabajo. Para ello se seleccionaron 24 muestras de Uruguay, de acuerdo a diferentes criterios: 1) cantidad y calidad de ADN extraído de acuerdo a evaluación por gel de agarosa y espectrofotometría, buscando utilizar aquellas muestras de calidad más alta y mayor cantidad de ADN y 2) distribución geográfica, buscando contar con muestras representativas de diferentes localidades del país. Los controles positivos fueron elegidos por tratarse de muestras con alta cantidad y calidad de ADN. Se evaluó por PCR el éxito de amplificación de los diferentes loci para 22 muestras de ADN extraído de materia fecal y 2 muestras de ADN

extraído a partir de tejido (utilizadas como control positivo). Por otra parte, se probaron cinco loci de microsatélites, cuyos cebadores fueron cedidos por el NUPECCE (Mantellatto *et al.*, 2010; Peres, 2015). De estos, cuatro fueron desarrollados específicamente para *M. gouazoubira* y uno de ellos para el cérvido *Rangifer tarandus* (RT09). Se diseñaron PCR tipo multiplex teniendo en cuenta la temperatura de hibridación (Ta), el tipo de fluoróforo y el tamaño del fragmento a amplificar de cada juego de cebadores, inicialmente utilizando únicamente los primeros 9 cebadores. La Tabla 2 resume las características de los loci y el diseño de estos multiplex.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación de loci de microsatélites de *Mazama gouazoubira*.

Cebador	Tamaño	T°	Color	Fluoróforo	Especie	Secuencia cebador	Cita
<i>goua24</i>	170-200	55	azul	FAM	<i>M. gouazoubira</i>	*AAGAAGCTCAAAGTGCCTGTC *TCTTATTCCACCTCTTCCCA	Peres, 2015
<i>goua16</i>	200-220	55	verde	JOE/VIC	<i>M. gouazoubira</i>	*GGGACAGTGATAAACTAGGTGT *CTAATGAGATAGCAAAGTACGC	Peres, 2015
<i>goua25</i>	170-210	55	negro	NED	<i>M. gouazoubira</i>	*AGGACAACCATGCACCTACTTT *ATCCCAGCTCCTTTAACACAA	Peres, 2015
<i>goua21</i>	160-195	53	azul	FAM	<i>M. gouazoubira</i>	*GAGTACAACAGCCATGCAGAGA *CATTGGGGTTACCTAGAGAAG	Peres, 2015
<i>goua07</i>	~140	55	verde	HEX	<i>M. gouazoubira</i>	*GTCTGATCCAAATCTGAGGGTC *TCATAGCATCCAAGGCAACTA	Peres, 2015
<i>goua03</i>	~106	55	azul	FAM	<i>M. gouazoubira</i>	*AGTTGGGATCCTTAGGCTG *CCTGACATCCAGGTTCTTG	Peres, 2015
<i>goua08</i>	~166	55	verde	HEX	<i>M. gouazoubira</i>	*AAAGGAGATGTCAGGATATGGG *ACTTGGTTGATTCGCTGCTAT	Peres, 2015
<i>goua10</i>	~110	55	azul	FAM	<i>M. gouazoubira</i>	*TAGTGGGACGTTTGTGTTGTT *TGGATCTTTGGAGAGGGTCTAA	Peres, 2015
<i>cssm41</i>	120-150	54	verde	JOE/VIC	<i>Bos sp.</i>	*AATTTCAAAGAACC GTTACACAGC *AAGGGACTTGCAGGGACTAAAACA	Cosse <i>et al.</i> , 2007; Da Rosa, 2014
<i>rt09</i>	~100	55	azul	FAM	<i>Rangifer tarandus</i>	*TGAAGTTTAATTTCCACTCT *CAGTCACTTTCATCCACAT	Wilson <i>et al.</i> , 1997; Mantellatto <i>et al.</i> , 2010; Peres, 2015
<i>bm757</i>	180-200	54	azul	FAM	<i>Bos sp.</i>	*TGGAAACAATGTAACCTGGG *TTGAGCCCAAGGAACC	Cosse <i>et al.</i> , 2007; Da Rosa, 2014
<i>bm203</i>	205-240	56	verde	JOE/VIC	<i>Bos sp.</i>	*GGGTGTGACATTTGTTCCC *CTGCTCGCCACTAGTCTTC	Cosse <i>et al.</i> , 2007; Da Rosa, 2014
<i>tgla10</i>	150-180	55	negro	NED	<i>Bos sp.</i>	*CTAAATTTATCCACTGTGGCTCT *CAATCTGCAGTAGCATACATCCTTG	Cosse <i>et al.</i> , 2007; Da Rosa, 2014
<i>bm1818</i>	220-250	53	azul	FAM	<i>Bos sp.</i>	*AGCTGGGAATATAACCAAAGG *AGTGCTTCAAGGTCCATGC	Cosse <i>et al.</i> , 2007; Da Rosa, 2014

Estos multiplex fueron revisados y rediseñados en función de la inclusión de los cinco loci de microsatélites cedidos por el NUPECCE, y también del bajo éxito de amplificación resultante para algunos de los considerados inicialmente (Tabla 3). Las condiciones de las reacciones de PCR en tiempo final utilizadas para cada multiplex testado se detallan en la Tabla 3. Se comprobó el éxito de la reacción de amplificación a través de la migración de 4 µl de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, utilizando GoodView TM (SbS) como agente intercalante. Se seleccionaron 2 muestras de buena calidad y concentración de ADN suficiente para probar la amplificabilidad de este set de microsatélites. Luego, se

testó la amplificación con muestras de ADN degradado, utilizando ADN extraído a partir de 25 fecas (seleccionadas a partir de sus curvas de absorbancia a 260 nm y concentración de ADN obtenido) y ADN extraído a partir de 4 muestras provenientes de museos. Los productos de PCR fueron genotipados utilizando el servicio de análisis de fragmentos del Instituto Pasteur de Montevideo.

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de loci de microsatélites de *Mazama gouazoubira*. Se muestran los dos juegos de multiplex generados durante el transcurso de este trabajo 1º: 1-3; 2º: A-C.

Multiplex	Temp.	Tiempo	Ciclos	Multiplex	Temp.	Tiempo	Ciclos	
1	95	2 min	35	A	95	2 min	35	
	95	30 sec			RT09	95		30 sec
	56	90 sec			GOUA24	55		90 sec
	72	50 sec			GOUA07	72		50 sec
	60	30 min			BM203	60		30 min
2	95	2 min	35	B	95	2 min	35	
	95	30 sec			GOUA03	95		30 sec
	55	90 sec			BM757	55		90 sec
	72	50 sec			CSSM41	72		50 sec
	60	30 min			TGLA10	60		30 min
3	95	2 min	35	C	95	2 min	35	
	95	30 sec			GOUA10	95		30 sec
	53	90 sec			GOUA08	55		90 sec
	72	50 sec			GOUA25	72		50 sec
	60	30 min				60		30 min

V. Análisis bioinformático

a. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial

Una vez obtenidos los cromatogramas de las secuencias, se utilizó la herramienta “BLAST” (*Basic Local Alignment Search Tool*) y la base de datos *Gen Bank* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para verificar que efectivamente el ADN amplificado correspondía a las regiones esperadas del genoma de *M. gouazoubira*. Estos fragmentos de ADN mitocondrial poseen sitios polimórficos diagnósticos de la especie en estudio, y esto resulta especialmente relevante para la identificación certera de la especie de origen en el caso de muestras como fecas, animales atropellados, y huesos. Las secuencias se analizaron utilizando el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) que permite la alineación de las secuencias de diferentes individuos utilizando diferentes algoritmos, la clasificación de los diferentes haplotipos existentes y la construcción de árboles de distancia y matrices de relaciones para el análisis de estos haplotipos. Las secuencias fueron alineadas manualmente y a partir de la alineación se computó la proporción de diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias (“*pairwise*”).

distance”, utilizando el algoritmo “*n° of differences*”) para clasificar los diferentes haplotipos. La diversidad haplotípica y nucleotídica así como el número de sitios polimórficos se calculó utilizando el software DnaSP v. 5.0 (Librado *et al.*, 2009).

Para examinar las relaciones entre los haplotipos se construyó una red utilizando el software PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>) implementando el algoritmo TCS (Clement *et al.*, 2002) de parsimonia estadística. Para analizar las relaciones filogenéticas entre los haplotipos, se utilizaron los métodos de Máxima Verosimilitud (implementando en el software MEGA 6.0, con 10000 réplicas de *Bootstrap*) y de inferencia Bayesiana utilizando el paquete BEAST v.1.8.1 (Drummond *et al.*, 2012), para el cual se utilizó como parámetros largo de cadena 25.000.000 y muestreo cada 2.500 pasos, generando un total de 10.000 árboles. El software TRACER v. 1.6 (Rambaut & Drummond, 2007) se usó para asegurar que las cadenas de Markov alcanzaran la estacionalidad examinando los valores de ESS (*effective sample sizes*) y también para determinar el número correcto de pasos a ser descartados como *burn-in* para el análisis (10% inicial). Los modelos de sustitución recuperados con MEGA 6.0 fueron definidos para cada partición (*citocromo b* y *D-loop*) y se utilizó como *prior* para la distribución de los nodos en el árbol el modelo “*Coalescent: constant size*”. Se utilizaron tasas de sustitución nucleotídica descritas en trabajos anteriores para *citocromo b* en cérvidos ($2,51 \times 10^{-8}$ sustituciones/sitio/año; Latch *et al.*, 2009) y para la región *D-loop* ($4,46 \times 10^{-8}$ sustituciones/sitio/año; Latch *et al.*, 2009). Se realizaron dos corridas independientes, que fueron analizadas utilizando el software TreeAnotator para obtener un árbol consenso, y ambos se unificaron utilizando el software LogCombiner v 1.8.1. Los resultados de ambas corridas combinadas fueron analizados utilizando el software FigTree v 1.4.0 para dibujar el árbol consenso. Para el análisis filogenético se usó como grupo externo una secuencia de *D-loop* y del gen *Citobromo b* de *Ozotoceros bezoarticus* (MRGOB2) (Accession: JN632681.2), obtenidas de la web Gen Bank. En el caso de las secuencias obtenidas a partir de fecas, los haplotipos iguales fueron considerados como obtenidos del mismo individuo.

El software *DnaSP* se utilizó para estimar la distribución de las frecuencias de las diferencias nucleotídicas pareadas entre secuencias (*mismatch distribution*) con el objetivo de analizar la dinámica demográfica histórica (Rogers & Harpending, 1992). La significancia estadística de la distribución de frecuencias observadas bajo el modelo de expansión, se evaluó con el estadístico SSD (*Sum of Square Deviations*), el índice *r* (*raggedness*) utilizando el software Arlequin v 3.5.1.2. (Excoffier *et al.*, 2005) y el test de Ramos-Onsins & Rozas’s (R2) que se aplica mejor a pequeños tamaños muestrales (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). En una población que sufrió una expansión reciente, se espera que SSD y R2 presenten valores bajos (Harpending, 1994). Los estadísticos F de Fu (Fu, 1997) y D de Tajima (Tajima, 1989) se estimaron mediante simulaciones coalescentes, y se utilizaron para poner a prueba la hipótesis de neutralidad y expansión poblacional reciente. En caso de no rechazar la hipótesis de expansión poblacional, el modelo de Rogers & Harpending (1992) se utiliza para calcular el tiempo transcurrido desde la expansión poblacional, a través de Tau ($\tau = 2\mu t$) y Theta ($\theta = 4N_e\mu$) extraídos del software Arlequin. Se utiliza el parámetro Tau para estimar el tiempo desde la expansión usando la ecuación: $t = \tau / 2\mu$, donde μ es la tasa de mutación por secuencia por generación (Rogers, 1995; Schneider & Excoffier, 1999). Este cálculo se realizó utilizando la herramienta de Schenekar & Weiss (2011) disponible en la web (<http://www.unigraz.at/zoowww/mismatchcalc/mmc2.php>). Para complementar esta aproximación y estimar la variación en el tamaño efectivo poblacional de hembras en el tiempo, se utilizó el modelo GMRF *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (Minin *et al.*, 2008) en BEAST. El BSP representa en un gráfico el cambio en el tamaño poblacional a través del tiempo, inferido a partir de las secuencias de ADN mitocondrial. Para la

construcción de este gráfico, se utilizaron las tasas de sustitución nucleotídica mencionadas arriba, y 2 años como tiempo generacional para la especie.

Para analizar la estructura poblacional en un contexto geográfico, se realizó un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) implementado también en el software Arlequin y se calcularon los estadísticos θ , análogos a los estadísticos F de Wright (Wright, 1978). Los estadísticos F estiman como está distribuida la variación genética dentro y entre subpoblaciones (Beebe & Rowe, 2008). El estadístico FIS, evalúa el grado de endogamia de los individuos dentro de su subpoblación, FIT mide cuánto se aleja una población global del equilibrio Hardy-Weinberg (Allendorf & Luikart, 2007); mientras que FST (el índice de fijación) es un estimador común de diferenciación genética entre subpoblaciones (Beebe & Rowe, 2008) y utilizado comúnmente como un indicador del grado de subestructuración genética de las poblaciones de una especie. Los estimadores están definidos de la siguiente manera:

$$FIS = (H_s - H_i) / H_s$$

$$FIT = (H_t - H_i) / H_t$$

$$FST = (H_t - H_s) / H_t$$

H_i es la heterocigosidad observada promedio a través de las subpoblaciones, H_s es la heterocigosidad esperada a través de las subpoblaciones y H_t es la heterocigosidad esperada para la población total. Se experimentó con diversas agrupaciones de poblaciones sugeridas por los árboles filogenéticos, y las sugeridas por la ubicación geográfica de las localidades de muestreo. Las agrupaciones que maximizan los valores de Φ_{CT} , y son significativamente diferentes de las distribuciones aleatorias de las secuencias, se supone que reflejan diferenciación entre los grupos previamente definidos. Se siguieron las guías de Wright para interpretar los valores de Φ_{CT} , donde un valor de 0 a 0,05 indica poca diferenciación, 0,05 - 0,15 diferenciación moderada, 0,15 - 0,25 diferenciación robusta, y mayor a 0,25 gran diferenciación entre grupos de poblaciones (Wright, 1978).

b. Análisis de loci de microsatélites

Luego de obtenidos los resultados de las corridas en microcapilar, se realizó la asignación de tamaño a cada alelo con el software GeneMarker 1.9® (Softgenetics, State College, PA). La correcta asignación de alelos en los individuos puede verse afectada por distintos tipos de errores al momento de la amplificación por PCR de los loci de microsatélites (Oosterhout *et al.*, 2004; Chapuis & Estoup, 2007; Cosse, 2010). Para evaluar la existencia de errores de genotipado se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004). El software implementa una distribución binomial acumulada para calcular la probabilidad observada de homocigotas para cada loci (Weir, 1996).

Se estimó la probabilidad exacta para H-W utilizando el programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995) que emplea cadenas de Markov mediante el método descrito por Guo & Thomson (1992).

El grado de información que se puede obtener a partir de un set de microsatélites depende en gran medida del número y la frecuencia de los alelos que presenta el set para la población o poblaciones analizadas. Se define como Contenido de Información Polimórfica (PIC), la probabilidad de que se pueda deducir, a partir del genotipo de la descendencia, el par parental (Botstein *et al.*, 1980). El valor de PIC se calcula según: $PIC = 1 - \sum (P_i)$, donde P_i es la proporción de las muestras que presentan el alelo i de un locus particular. Para determinar el PIC se analizaron los datos con el programa Cervus 3.0® (Kalinowski *et al.*,

2007; Marshall *et al.*, 1998). Los loci que presentan un PIC mayor 0,5 se consideran altamente informativos, aquellos cuyos valores están entre 0,25 - 0,5 son considerados medianamente informativos y aquellos que se encuentran por debajo de 0,25 débilmente informativos y por lo tanto, no apropiados para el análisis genético de las poblaciones (Botstein *et al.*, 1980).

La diversidad genética para el conjunto de muestras analizado a partir de este set de microsatélites, fue cuantificada mediante el número de alelos observado por locus (A), en conjunto con la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para cada locus (Corti *et al.*, 2009).

Asumiendo *a priori* la existencia de más de una población, el grado de estructuración genética poblacional fue estimado mediante el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa 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). En este caso, se realizaron corridas con el software para K variando de 1 a 5, con cinco réplicas cada una, 200.000 réplicas Montecarlo de cadenas de Markov (MCMC) y quemando las 10.000 iniciales como *burning period*. El modelo de ancestralidad utilizado fue *Admixture*. Finalmente, se eligió el valor de K con mayor media de $\ln P(X/K)$ y menor desvío estándar.

RESULTADOS

I. Procesamiento de muestras

La extracción de ADN fue exitosa en el 100% de los casos, mostrando que los protocolos utilizados son apropiados, como ya ha sido descrito anteriormente. Se amplificaron por PCR y secuenciaron un total de 136 muestras, de las 284 muestras relevadas al comienzo de este trabajo. De éstas, un total de 81 fueron secuenciadas para el fragmento corto de la región *D-loop* (159 pb), 26 para el fragmento de la región *D-loop* de 600 pb, y 29 para el gen *citocromo b*. Por otro lado, se utilizaron en el análisis 73 secuencias con las que se ya se contaba previamente de publicaciones anteriores, totalizando 209 secuencias de 160 individuos. Al utilizar el BLAST con estas secuencias en comparación con la base de datos de la web Gen Bank, todas ellas arrojaron como 1º resultado *Mazama gouazoubira*, con porcentajes de identidad de 96 a 99% con respecto a las secuencias de referencia de la base de datos.

El éxito de amplificación por PCR fue diferencial para los diferentes tipos de muestras, no siendo posible amplificar el fragmento de 600 pb en ninguna de las muestras de fecas, huesos, o piel de animales hallados muertos que se probaron inicialmente. Esta dificultad, producto de la degradación del ADN en este tipo de muestras, ya ha sido extensamente descrita en la bibliografía (Kohn & Wayne, 1997; Taberlet, 1999; Wei *et al.*, 2000; Herrmann & Hummel, 2012). Sin embargo, fue posible la amplificación y secuenciación de este fragmento en 85% de las muestras testadas de pelos (NUPECCE, Brasil). Para los fragmentos cortos (*D-loop*: 159 pb y *citocromo b*: 214 pb) el éxito de amplificación para las muestras de ADN de fecas, huesos y pieles fue de entre 50 a 60% para cada corrida de PCR. Esto ocurrió posiblemente debido a que las fecas, además de poseer ADN degradado, también pueden contener componentes que pueden ser inhibidores de la reacción de PCR, como polisacáridos, productos de la degradación del alimento (ácidos, enzimas, lípidos y proteínas), ARN y bacterias (Kohn & Wayne, 1997), dificultando su amplificación. Es importante destacar que durante la realización de este trabajo, el secuenciador Sanger del Instituto Pasteur de Montevideo, con el cual se contaba para la secuenciación de las muestras, sufrió averías en dos oportunidades y se encontró fuera de servicio durante algunos meses. Este imprevisto dificultó la obtención del número total de secuencias previsto inicialmente, particularmente para el gen *citocromo b*.

En cuanto al tipo de muestra, 62 de las muestras utilizadas fueron pelos, 56 fecas, 15 huesos o restos de piel de material de museo, 6 muestras de sangre, 5 fueron muestras de tejido, 2 de huesos o restos de animales encontrados muertos en el campo, y por último, 14 de las secuencias de ADN utilizadas (ya obtenidas previamente) se desconoce del tipo de muestra del que se obtuvieron.

En relación a las localidades de muestreo, se procesaron muestras correspondientes a 70 puntos de muestreo, distribuidos en 5 países: Uruguay (n= 83), Brasil (n= 58), Argentina (n= 10), Paraguay (n= 6), Bolivia (n= 3). Estas muestras fueron colectadas en un periodo de 21 años (1993 -2014). Los puntos de muestreo se corresponden en 100% con la distribución geográfica ya descrita para esta especie.

II. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial

Debido a que se contaba con secuencias de diferentes fragmentos y longitudes para el ADN mitocondrial para las diferentes muestras, estas fueron consideradas por separado para la mayoría de los

análisis realizados. En primer lugar, se analizaron las secuencias de 600 pb de la región *D- loop* del ADN mitocondrial. En segundo lugar, se analizaron las secuencias de 159 pb de la región *D- loop* del ADN mitocondrial y en tercer lugar, las secuencias del gen *citocromo b* (214 pb). Finalmente, para las muestras para las que se contaba con secuencia de la región *D- loop* (159 pb) y secuencia del gen *citocromo b*, ambas secuencias fueron concatenadas y se realizaron análisis con la concatenación.

a. Región *D- loop*

Fue posible la amplificación por PCR del fragmento de 600 pb en las 26 muestras de pelo cedidas por NUPECCE. La extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de estas muestras fue realizada en el laboratorio de NUPECCE en la Universidad Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil. Luego de la secuenciación, se procedió a descartar dos secuencias correspondientes a 2 individuos, ya que no era posible su lectura por problemas técnicos. A partir del alineamiento de las 24 secuencias restantes (las secuenciadas se detallan en el Anexo III), se clasificaron los diferentes haplotipos encontrados mediante una matriz de diferencias nucleotídicas (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para un fragmento de 600 pb de la región *D- loop* de *Mazama gouazoubira*.

T354	T355	T015	T194	T158	T323	T348	T155	T319	T075	T091	T131	T132	T273	T092	T196	T076	T139	T048	T138	T320	T137	T318	T352
T355	18																						
T015	14	12																					
T194	22	14	14																				
T158	24	14	16	14																			
T323	22	14	14	4	14																		
T348	21	7	13	19	19	19																	
T155	23	13	15	13	3	13	18																
T319	12	15	11	21	21	21	16	22															
T075	25	17	17	5	17	5	20	16	24														
T091	16	12	10	6	10	6	15	9	16	9													
T131	22	12	14	10	4	10	17	3	21	13	6												
T132	15	19	11	19	21	19	22	20	17	22	13	17											
T273	22	12	14	12	2	12	17	1	21	15	8	2	19										
T092	10	14	12	20	22	20	17	21	11	23	16	20	13	20									
T196	20	14	12	10	8	10	17	7	19	13	6	4	15	6	16								
T076	25	17	17	5	17	5	20	16	24	0	9	13	22	15	23	13							
T139	8	18	12	20	24	22	19	23	9	23	18	22	15	22	6	18	23						
T048	21	13	15	11	13	11	16	12	21	12	7	11	16	11	19	9	12	21					
T138	14	16	12	20	22	22	15	21	13	23	18	20	15	20	10	16	23	8	19				
T320	24	14	16	14	4	14	19	3	23	17	10	4	21	2	22	8	17	24	13	22			
T137	23	13	15	13	3	13	18	0	22	16	9	3	20	1	21	7	16	23	12	21	3		
T318	22	14	14	10	4	12	19	3	21	13	8	4	19	2	20	8	13	20	13	20	4	3	
T352	20	14	10	10	10	10	17	9	19	13	6	6	13	8	18	6	13	20	11	18	10	9	10

Se encontraron 22 haplotipos diferentes para los individuos secuenciados (Tabla 5). Entre estos haplotipos, se registraron un total de 58 sitios polimórficos y 59 mutaciones, 38 sitios informativos para

parsimonia, y un total de 53 transiciones y 5 transversiones. La proporción de sitios polimórficos fue 10,6%, y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias fue $k= 14$ (variando entre 0 y 27). El índice de diversidad haplotípica fue $Hd= 0,993$ (s.d. 0,0002), mientras que el índice de diversidad nucleotídica fue $Pi= 0,02639$ (s.d. 0,00195). En la construcción de la red de haplotipos (Fig. 4) se observa una estructura con un gran nivel de homoplasia en el centro (esto es, cambio evolutivo independiente que genera que dos individuos presenten un mismo carácter adquirido independientemente), que se ve reflejada por la presencia de conexiones alternativas entre los haplotipos, y una gran distancia mutacional entre algunos de los haplotipos. No existe clara relación entre la distancia mutacional entre haplotipos y su localización geográfica, además, se observa que la gran mayoría de las muestras representan haplotipos únicos, lo que es indicador de la alta variabilidad genética de la especie para este fragmento (Fig. 5).

Tabla 5. Lista de individuos y haplotipos determinados para un fragmento de 600 pb de la región *D- loop* de *Mazama gouazoubira*.

Individuo/s	Haplotipo
T354	HAP 1
T355	HAP 2
T015	HAP 3
T194	HAP 4
T158	HAP 5
T323	HAP 6
T348	HAP 7
T155; T317	HAP 8
T319	HAP 9
T075; T076	HAP 10
T091	HAP 11
T131	HAP 12
T132	HAP 13
T273	HAP 14
T092	HAP 15
T196	HAP 16
T139	HAP 17
T048	HAP 18
T138	HAP 19
T320	HAP 20
T318	HAP 21
T352	HAP 22

Se detectaron únicamente dos haplotipos compartidos entre muestras, y ambos en individuos de la misma localidad. No se encontraron haplotipos compartidos entre localidades. Es importante resaltar la relación estrecha que parece haber entre los haplotipos 5 (Minas Gerais), 8 (Mato Grosso do Sul), 20 (Goias) y 21 (Mato Grosso do Sul), donde todos parecen derivar del haplotipo 14 (T273 - Sao Paulo).

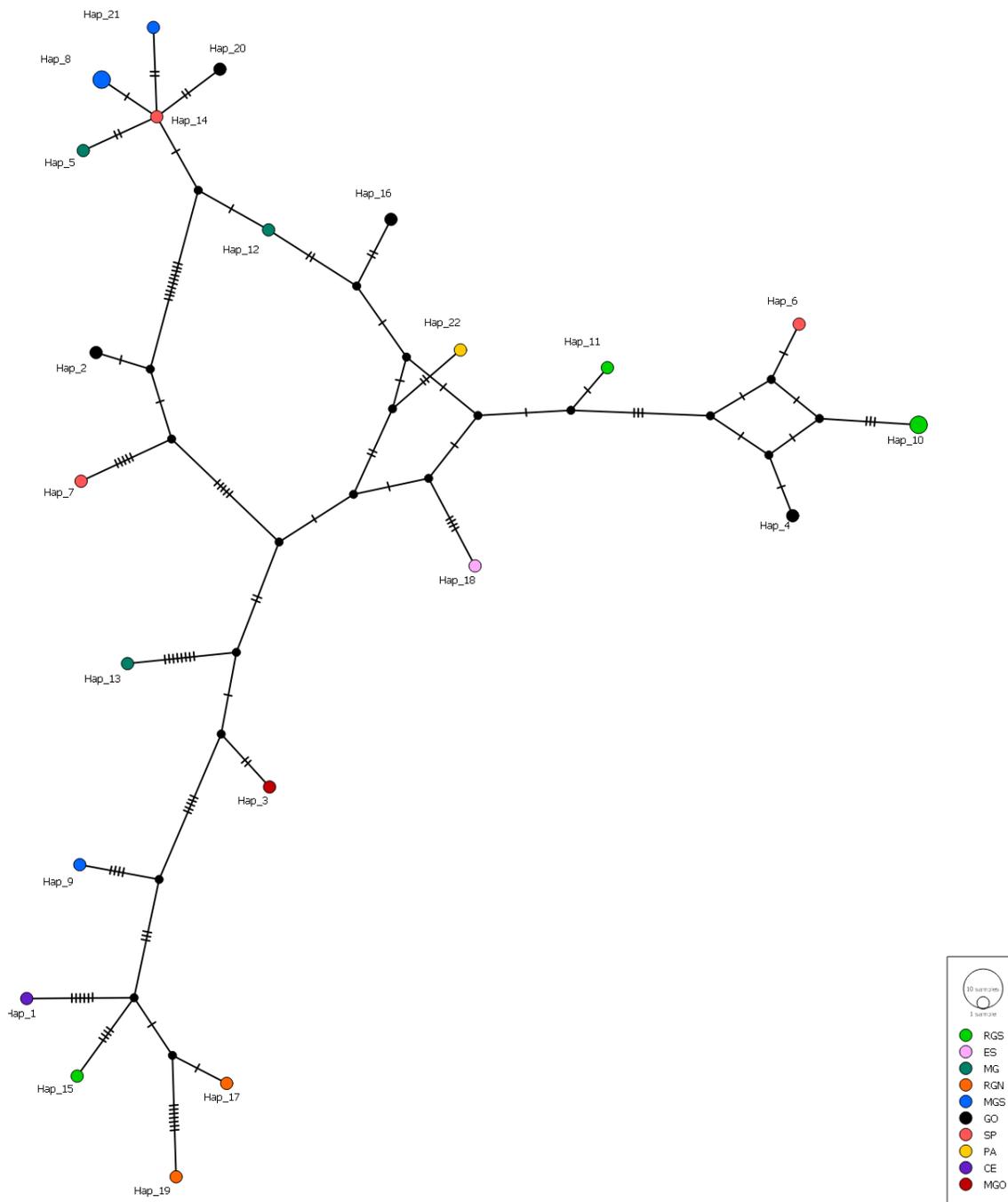


Figura 4. Red haplotípica TCS construida con 22 haplotipos (obtenidos a partir de 24 individuos) de un fragmento de 600 pb de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo: RGS (Rio Grande do Sul), ES (Espírito Santo), MG (Minas Gerais), RGN (Rio Grande do Norte), MGS (Mato Grosso do Sul), GO (Goias), SP (Sao Paulo), PA (Paraná), CE (Ceará), MGO (Mato Grosso). Extraído del software PopArt.

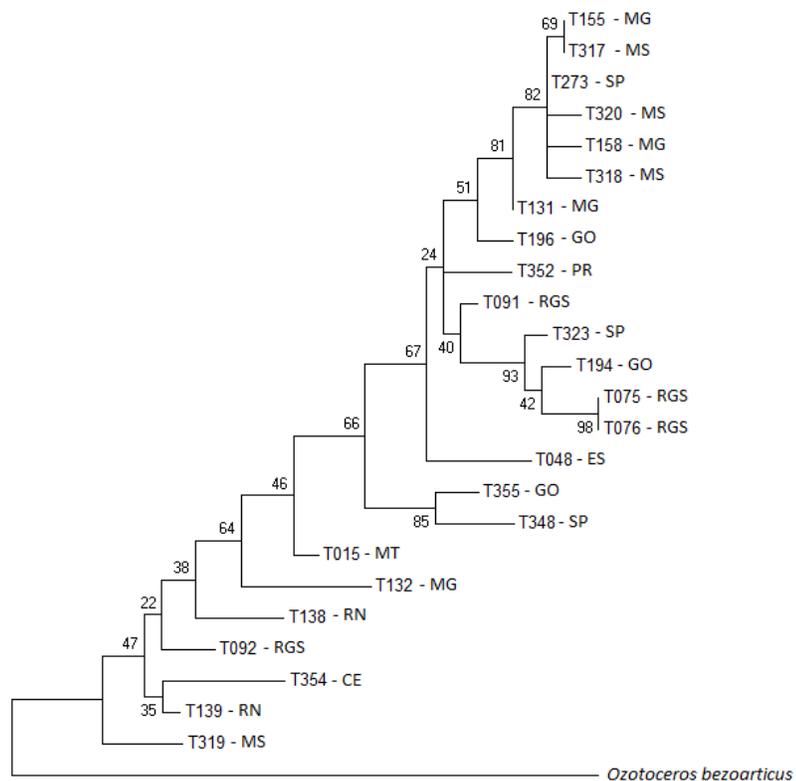


Figura 6. Árbol filogenético consenso construido utilizando el algoritmo de *Maximum Likelihood*, con 10.000 réplicas de *bootstrap*, y tomando como modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei 93, para 25 secuencias de 600 pb de la región *D-loop* de *Mazama gouazoubira* de Brasil y *Ozotoceros bezoarticus* como grupo externo. MG = Minas Gerais, MS = Mato Grosso do Sul, GO = Goiás, PR = Paraná, RGS= Rio Grande do Sul, SP = São Paulo, ES = Espírito Santo, MT = Mato Gross, RN = Rondonia, CE = Ceará. Extraído de MEGA 6.0

Por otro lado, para el fragmento de 159 pb de la región *D-loop*, se contó con un total de 121 secuencias para el análisis, las mismas se detallan en el Anexo III. Se clasificaron los diferentes haplotipos mediante una matriz de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, donde se diferenciaron un total de 69 haplotipos para los 121 individuos secuenciados (Tabla 6). Se registraron un total de 39 sitios polimórficos y 49 mutaciones entre secuencias, siendo 10 de ellas transversiones. No se encontraron deleciones o inserciones. La diversidad haplotípica fue $Hd= 0,980$ (s.d. 0,005) y la diversidad nucleotídica $Pi= 0,060$ (s.d. 0,003). El número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias fue $k= 7$ (variando entre 0 y 20).

Tabla 6. Lista de individuos y haplotipos identificados para un fragmento de 159 pb de la región *D-loop* de *Mazama gouazoubira*

Individuos	Haplotipos
LC 21; MNHN 1380	HAP 1
LC 32	HAP 2
BV011; BV012; BV013; MF15; MF16; MF17; MSG50; T79	HAP 3
BV018	HAP 4
MF1; MSG 89	HAP 5
MF2; MF3	HAP 6
MF6	HAP 7
MF7; MF8; MF13	HAP 8
MF 18	HAP 9
MF19; MF23; MF32; MSG136; MNHN2604; MNHN3127; MNHN5501; MNHN7632	HAP 10
MF31; MF36; MF76; MF77; MSG52	HAP 11
MF60	HAP 12
MF 62	HAP 13
MF 63; MF64; MF65; MF66	HAP 14
MSG01; MSG39; MSG107	HAP 15
MSG11	HAP 16
MSG12	HAP 17
MSG14; MSG15	HAP 18
MSG18	HAP 19
MSG19; T101; T111	HAP 20
MSG20; MSG43	HAP 21
MSG26	HAP 22
MSG33; MSG44; MSG45; T209	HAP 23
MSG34; MSG60	HAP 24
MSG35	HAP 25
MSG36; MSG55	HAP 26
MSG40; MSG88; MSG99; MSG100; MSG110; MSG112; MSG325	HAP 27
MSG48	HAP 28
MSG51	HAP 29
MSG61	HAP 30
MSG63	HAP 31
MSG64	HAP 32
MSG65	HAP 33
MSG66	HAP 34
MSG91	HAP 35
MSG91; MSG92; MSG94; MSG137	HAP 36
MSG101; MSG105; MSG109; MSG114; MSG116; MNHN6266	HAP 37
MSG105	HAP 38
MSG138	HAP 39
MSG139	HAP 40
MSG330	HAP 41
ZVCM1730	HAP 42
ZVCM1769	HAP 43
ZVCM5517	HAP 44
MNHN7357	HAP 45
8-26	HAP 46

Individuos	Haplotipos
14-11; 16-12	HAP 47
ANI15	HAP 48
ANI16	HAP 49
ANI17	HAP 50
ANI49	HAP 51
ANI68	HAP 52
ANI71	HAP 53
1987-273	HAP 54
39008	HAP 55
MNHNP804	HAP 56
MNHNP806; MNHNP807; T180	HAP 57
MNHNP1909	HAP 58
T14	HAP 59
T69	HAP 60
T77	HAP 61
T83	HAP 62
T106	HAP 63
T125	HAP 64
T128	HAP 65
T129	HAP 66
T134	HAP 67
T155	HAP 68
T158	HAP 69

La red haplotípica construida a partir de estos haplotipos, muestra una estructura compleja, ya que el número de haplotipos es alto y existe homoplasia (Fig. 7). Se observa, a gran escala, una relación entre la localización geográfica de los haplotipos y su grado de conexión en la red. El centro de la red parece estar ocupado por haplotipos uruguayos y brasileros, siendo que los haplotipos de Rivera (Norte de Uruguay) presentan estrecha relación con los haplotipos de Tacuarembó (Norte de Uruguay) y también de Cerro Largo (Noreste de Uruguay). Estos haplotipos de Uruguay se encuentran relacionados con haplotipos brasileros y en menor medida con haplotipos provenientes de otros países. A su vez, los haplotipos de regiones del Sur de Uruguay se encuentran más dispersos en la red. El haplotipo 10 se encuentra compartido por más individuos de diferentes localidades (cinco en total, todas de ellas en Uruguay), seguido por el haplotipo 3 (compartido por tres localidades uruguayas y un individuo de Brasil).

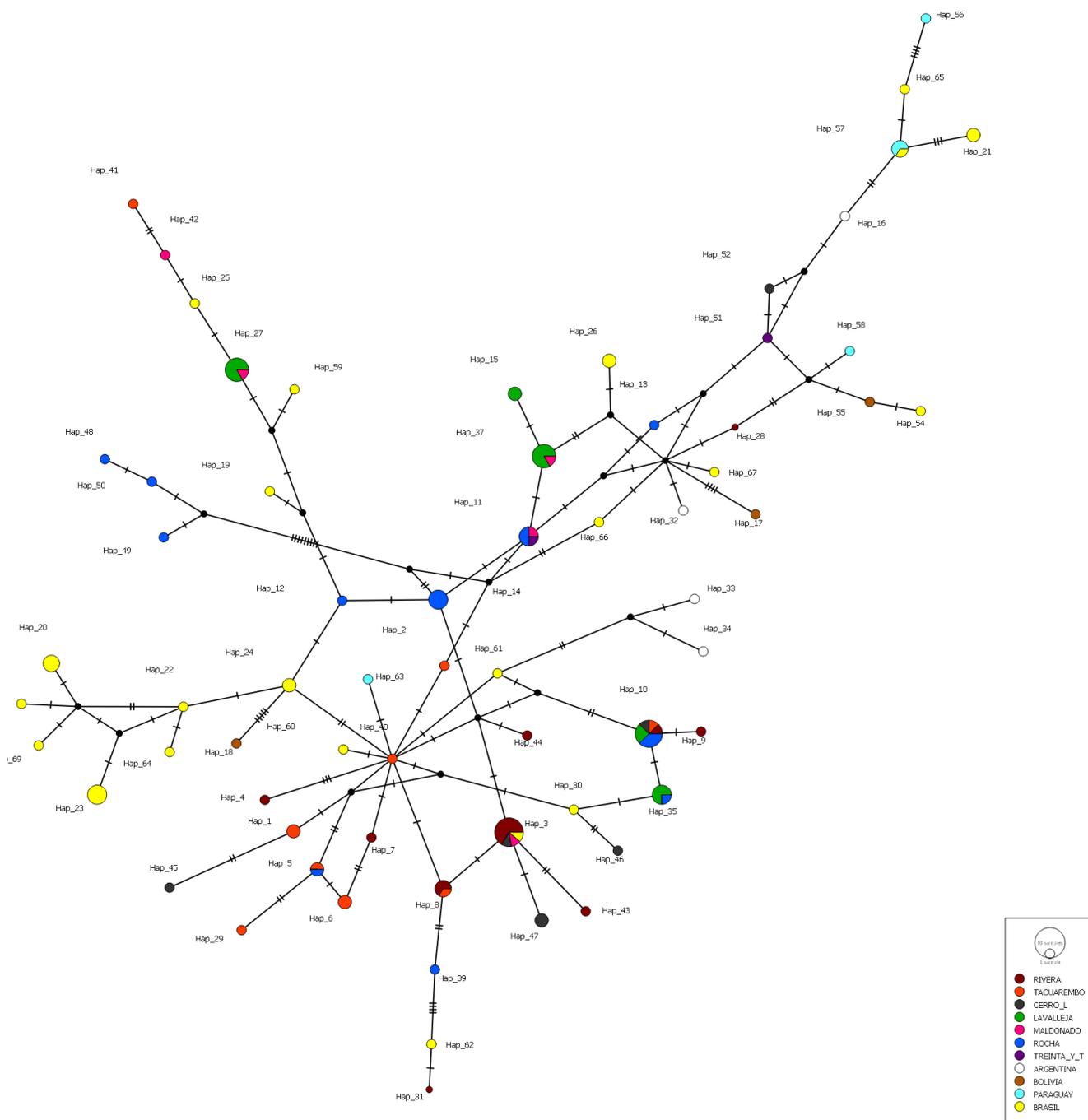


Figura 7. Red haplotípica TCS construida con 69 haplotipos (obtenidos en 121 secuencias) de un fragmento de 159 pb de la región *D-loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo (total = 11; 7 de ellas corresponden a diferentes puntos de muestreo dentro de Uruguay). Extraído del software PopArt.

Para estas secuencias, al inferir la ocurrencia de cambios históricos en el tamaño poblacional de acuerdo al modelo *mismatch distribution* (Fig. 8), se observa una gran concordancia con la distribución de frecuencias esperada para poblaciones que han sufrido una expansión demográfica explosiva. El valor observado de θ fue $\theta = 0,66$ (s.d. 1,75) y $\tau = 6,98$ (s.d. 3,07). El valor del estadístico de Ramos-Onsins y Rozas (R_2) fue 0,0860, y el valor del estadístico r (*raggedness*) fue 0,0067. A su vez, el estadístico de Tajima (D) fue negativo: -0,79, pero no significativo con un p valor $> 0,10$. Un valor negativo significativo para este estadístico, indica que podemos estar frente a poblaciones que hayan sufrido un cambio abrupto de tamaño poblacional o se encuentren bajo selección natural. Al analizar las diferentes poblaciones por separado, el estadístico de F_u resultó negativo y significativo únicamente para el grupo conteniendo los individuos muestrados en el Sur de Brasil + Norte de Uruguay, siendo un indicador de expansión poblacional en el pasado reciente ($F = -10,4418$; $p < 0,0008$).

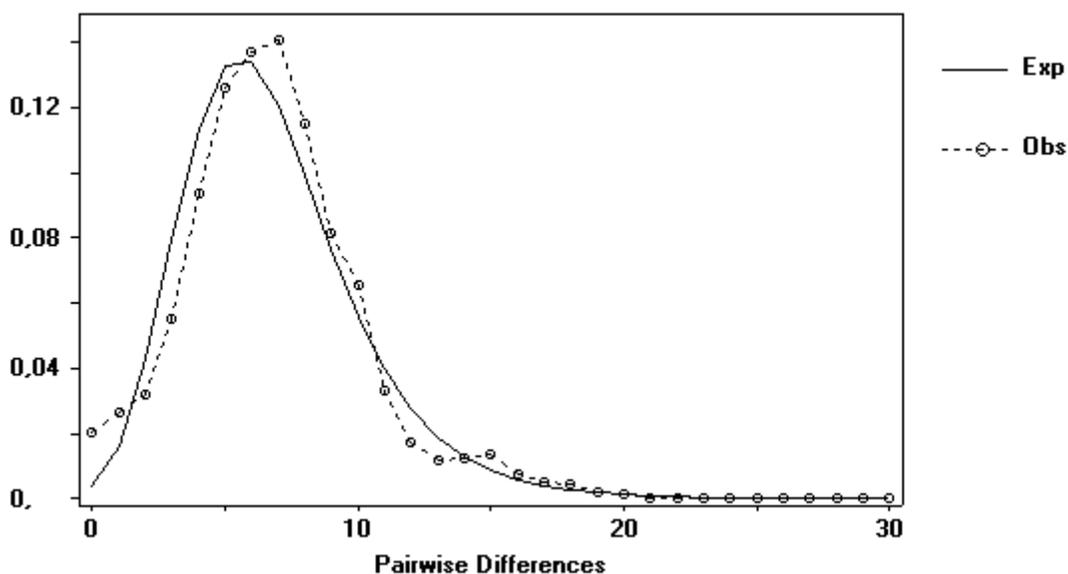


Figura 8. Gráfico "*mismatch distribution*" representando la distribución empírica de las frecuencias de diferencias nucleotídicas pareadas para el número total de secuencias analizadas para la región *D-loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* sobre la línea punteada (121 secuencias), y la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica sobre la línea continua. Tomado de DnaSP v 5.0.

En relación al análisis filogenético, se detectaron grupos de haplotipos ancestralmente diferenciados (Fig. 9a y 9b). La edad de divergencia entre *M. gouazoubira* y *O. bezoarticus*, es de aproximadamente 2 MA. El tiempo del ancestro común más reciente (MRCA) es de 1.81 MA. Se observan pocos clados con divergencia más reciente en el tiempo, formados por haplotipos pertenecientes a una misma localidad (ej. HAP48, HAP49 y HAP50), pero por otra parte, se observan clados formados por haplotipos pertenecientes a diferentes localidades, indicando que no existe diferenciación entre individuos geográficamente distanciados, sino que la gran variabilidad genética tiene un origen reciente y no se ha estructurado geográficamente a la escala analizada.

Para el AMOVA, se probaron tres formas de agrupaciones diferentes de poblaciones, teniendo las dos primeras, que agrupaban a todas las localidades de Brasil en una única población, un resultado similar en términos de nivel de estructuración genética a nivel poblacional entre grupos y dentro de grupos. Para la

tercera agrupación, generada a partir de la observación de los valores de *Fst* pareados entre poblaciones para las dos primeras corridas, se subdividió a las poblaciones brasileras y se agrupó a los individuos del Sur de Brasil con los del Norte Uruguay, y a los individuos de Argentina con los de Paraguay. En todos los casos, la mayor parte de la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones (aproximadamente 80% de la varianza), lo que es indicador de la alta diversidad intrapoblacional y poca estructuración de las poblaciones. Dado esto, la variabilidad entre poblaciones representa un pequeño porcentaje de la varianza total, lo cual puede ser una explicación de la similitud entre los resultados de diferentes agrupaciones. La Tabla 7 resume los resultados del test, que se muestran gráficamente en la Figura 10.

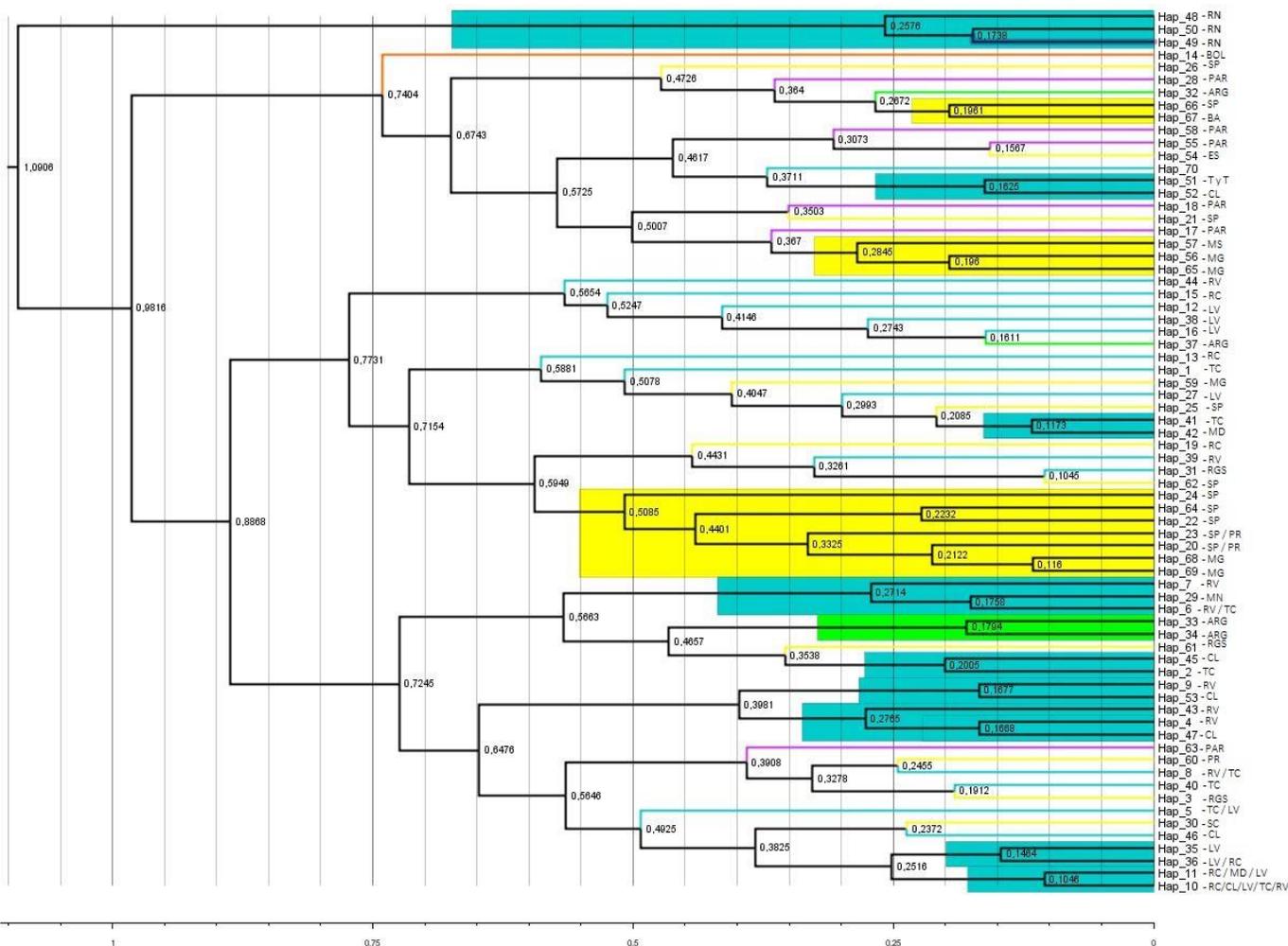


Figura 9. (a) Cronograma construido con BEAST v. 1.8 a partir de 69 haplotipos de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* de Uruguay, grupo externo *Ozotoceros bezoarticus*. Por debajo de los nodos se muestra la edad de nodo en millones de años, por encima se muestra la probabilidad posterior de ese nodo (sólo si $p \geq 0.9$). **(b)** Se muestran en colores haplotipos y/o clados pertenecientes a diferentes localidades de muestreo: Azul = Uruguay; Amarillo = Brasil; Rojo = Bolivia; Violeta = Paraguay; Rosa = Argentina

Tabla 7. Resumen de resultados de análisis AMOVA implementado en software Arlequin v 5.3.2. **(a), (b) y (c)** representan diferentes agrupaciones probadas en diferentes corridas.

(a)

(1) RIVERA+CERRO LARGO (2) TACUAREMBO (3) ROCHA + MALDONADO + LAVALLEJA + TREINTA Y TRES (4) ARGENTINA (5) BOLIVIA + PARAGUAY (6) BRASIL

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de varianza
Entre grupos	71,4	0,60	16,59%
Entre poblaciones dentro de grupos	18,7	0,11	3,00%
Dentro de poblaciones	303,5	2,81	80,40%
FSC	0,036 ($p \leq 0,11$)		
FST	0,20 ($p \leq 0,000001$)		
FCT	0,15 ($p \leq 0,0002$)		

(b)

(1) RIVERA + CERRO LARGO + TACUAREMBO (2) ROCHA + MALDONADO + LAVALLEJA + TREINTA Y TRES (3) ARGENTINA (4) BOLIVIA (5) PARAGUAY (6) BRASIL

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de varianza
Entre grupos	66,45	0,51	14,55%
Entre poblaciones dentro de grupos	23,67	0,18	5,24%
Dentro de poblaciones	303,50	2,81	80,21%
FSC	0,061 ($p \leq 0,000001$)		
FST	0,20 ($p \leq 0,000001$)		
FCT	0,15 ($p \leq 0,000001$)		

(c)

(1) RIVERA + TACUAREMBÓ + CERRO LARGO + RGS + SC_PA (2) ROCHA + MALDONADO + LAVALLEJA + TREINTA Y TRES (3) ARGENTINA + PARAGUAY + MGS (4) BOLIVIA_MT (5) SP_BA_MG

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de varianza
Entre grupos	75,6	0,63	18,09%
Entre poblaciones dentro de grupos	30,2	0,15	4,30%
Dentro de poblaciones	277,7	2,70	77,61%
FSC	0,052 ($p \leq 0,003$)		
FST	0,22 ($p \leq 0,000001$)		
FCT	0,18 ($p \leq 0,000001$)		

Tabla 8. Valores de Fst pareados entre poblaciones. La línea subrayada indica valores significativos con $p < 0,05$. Estimados con Arlequin v.3.5.1.3. Las poblaciones Rivera, Cer_L (Cerro Largo), Tac (Tacuarembó), T_Y_t (Treinta y Tres), Mald (Maldonado), Lav (Lavalleja) y Rocha corresponde a Uruguay, y las poblaciones RGS (Rio Grande do Sul), SC_PA (Santa Catarina y Paraná), MGS (Mato Grosso do Sul) y SP_BA_MG (Sao Paulo, Minas Gerais y Bahía) corresponden a Brasil.

	RIV	CER_L	RGS	SC_PA	TAC	T_Y_T	MALD	LAV	ROCHA	ARG	PAR	BOL	MGS	SP_BA_MG
RIV	0													
CER_L	<u>0.03</u>	0												
RGS	<u>0.07</u>	<u>0.04</u>	0											
SC_PA	0.29	<u>0.15</u>	<u>0.02</u>	0										
TAC	0.23	0.13	<u>0.078</u>	<u>0.14</u>	0									
T_Y_T	0.23	<u>0.08</u>	<u>0.095</u>	<u>0.21</u>	0.12	0								
MALD	0.32	0.16	<u>0.11</u>	<u>0.26</u>	0.18	<u>0.12</u>	0							
LAV	0.27	0.16	<u>0.11</u>	<u>0.17</u>	0.19	<u>0.027</u>	<u>0.038</u>	0						
ROCHA	0.16	<u>0.08</u>	<u>0.037</u>	<u>0.11</u>	0.16	<u>0.013</u>	<u>0.052</u>	<u>0.066</u>	<u>0</u>					
ARG	0.32	0.15	<u>0.041</u>	<u>0.082</u>	0.17	<u>0.16</u>	<u>0.086</u>	0.15	<u>0.12</u>	0				
PAR	0.49	0.31	<u>0.28</u>	<u>0.32</u>	0.38	0.39	0.27	0.30	0.28	<u>0.098</u>	0			
MGS_MG	0.39	0.21	<u>0.12</u>	<u>0.082</u>	0.26	0.28	<u>0.13</u>	0.20	0.22	<u>0.0030</u>	<u>0.0013</u>	0		
BOL	0.46	0.26	<u>0.14</u>	<u>0.12</u>	0.35	0.35	<u>0.15</u>	0.23	0.22	<u>0.028</u>	<u>0.0099</u>	<u>0.048</u>	0	
SP_BA	0.42	0.35	0.25	<u>0.16</u>	0.35	0.33	0.18	0.20	0.25	0.17	0.32	<u>0.088</u>	<u>0.13</u>	0

b. Desarrollo de cebadores para el gen citocromo b

La secuencia de los cebadores desarrollados es la siguiente:

Cebador L: 5' TCCTTACTGGCCTATTCTTAGCA 3' (23 bases)

Cebador R: 5' TCTCAAAAACATGAAACATTGGA 3' (23 bases)

Estos cebadores fueron inicialmente enfrentados al banco de secuencias de la especie del gen *citocromo b* completo (Duarte *et al.*, 2008), donde se corroboró que no existiesen mutaciones en el sitio de unión al cebador entre individuos, y también se analizó si el fragmento a amplificar presentaba polimorfismos entre los diferentes individuos, permitiendo la realización de análisis intrapoblacionales. Por otro lado, se corroboró que este fragmento permitía diferenciar a *M. gouazoubira* de otras especies del género *Mazama* mediante la herramienta BLAST. En total, las secuencias generadas a partir de estos cebadores poseen un largo de 214 pb y es posible su amplificación a partir de muestras de ADN degradado.

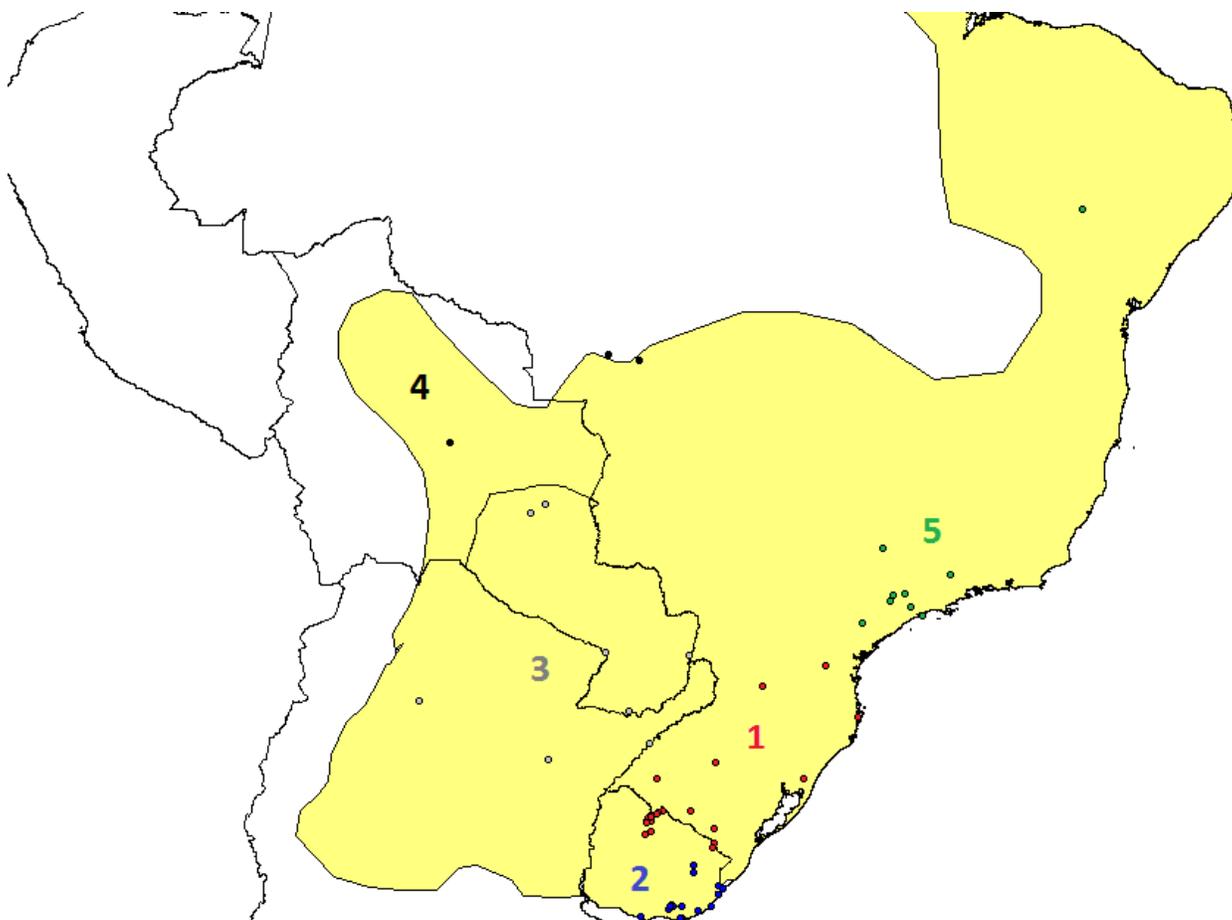


Figura 10. Representación gráfica de los grupos de poblaciones testeados en el AMOVA: (1) RIVERA+ TACUAREMBO+CERRO LARGO + RGS + SC_PA (2) ROCHA + MALDONADO + LAVALLEJA + TREINTA Y TRES (3) ARGENTINA + PARAGUAY + MGS (4) BOLIVIA_MT (5) SP_BA_MG, con un valor de $F_{st}= 0,22$.

c. Secuencias del gen citocromo b

Se analizaron 62 secuencias del gen *citocromo b* provenientes de la bibliografía (Bidegaray *et al.*, 2003; González, 2004; Elizondo *et al.*, 2010) y de individuos secuenciados durante el transcurso de esta tesis con los cebadores desarrollados a tales efectos. Por este motivo, se contaba con secuencias correspondientes a diferentes fragmentos y longitudes: 29 secuencias de 360 pb obtenidas con los cebadores FARH y FARL (Márquez *et al.*, 2006), 18 secuencias de 260 pb obtenidas con los cebadores L14724 y H15149 (Kocher *et al.*, 1989) y 15 secuencias obtenidas en el transcurso de este trabajo, correspondientes a un fragmento de 214 pb. En total, estas secuencias coincidían apenas en 89 pb, por lo que se optó por analizarlas por separado, ya que el análisis conjunto resultaría poco robusto. Las secuencias provenientes de trabajos anteriores fueron analizadas en conjunto (un total de 47 secuencias de 225 pb), y las demás fueron utilizadas para el análisis en concatenación con la región *D-loop*.

Para las 47 secuencias de 225 pb, a partir de su alineamiento, se clasificaron los diferentes haplotipos encontrados mediante una matriz de diferencias nucleotídicas. Se encontraron 19 haplotipos (Tabla 8), entre estos haplotipos, se registraron un total de 26 sitios polimórficos y 28 mutaciones, 13 sitios

informativos para parsimonia, y un total de 22 transiciones y 6 transversiones. La proporción de sitios polimórficos fue 11,5%, y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias fue $k=3$ (variando entre 0 y 8). El índice de diversidad haplotípica fue $Hd=0,898$ (s.d. 0,027), mientras que el índice de diversidad nucleotídica fue $Pi=0,0122$ (s.d. 0,001).

Tabla 9. Lista de haplotipos identificados para un fragmento de 225 pb del gen *citocromo b* de *Mazama gouazoubira*.

Individuos	Haplotipo
MSG01; MSG14; MSG53; MSG61; T69; T135; MSG50; MSG66; MSG70; MSG74; BV101	HAP 1
MSG33; MSG34; MSG44; MSG45; T111; T155; T158; T209; T101	HAP 2
MSG36; MSG55; MSG64; MSG48	HAP 3
MSG40; MSG330; MSG77; MSG88; MSG325	HAP 4
MSG43; T112	HAP 5
MSG56	HAP 6
MSG63; MSG76	HAP 7
T113	HAP 8
T138	HAP 9
BV103	HAP 10
BV108	HAP 11
LC02	HAP 12
LC03	HAP 13
MSG52; MSG79	HAP 14
MSG68	HAP 15
MSG75	HAP 16
MSG85	HAP 17
MSG89	HAP 18
BV102	HAP 19

Al analizar la red haplotípica (Fig. 11) construida a partir de estas 47 secuencias, se observa la topología típica asociada a una expansión poblacional: un haplotipo más abundante en posición central, que sería ancestral y es además compartido entre diferentes localidades. Relacionados a este haplotipo, se sitúan varios haplotipos en baja frecuencia o únicos que derivan de este. Por otra parte, no se observa correlación entre la distancia genética y la geográfica entre los haplotipos, ya que haplotipos de una misma localidad se encuentran dispersos en la red.

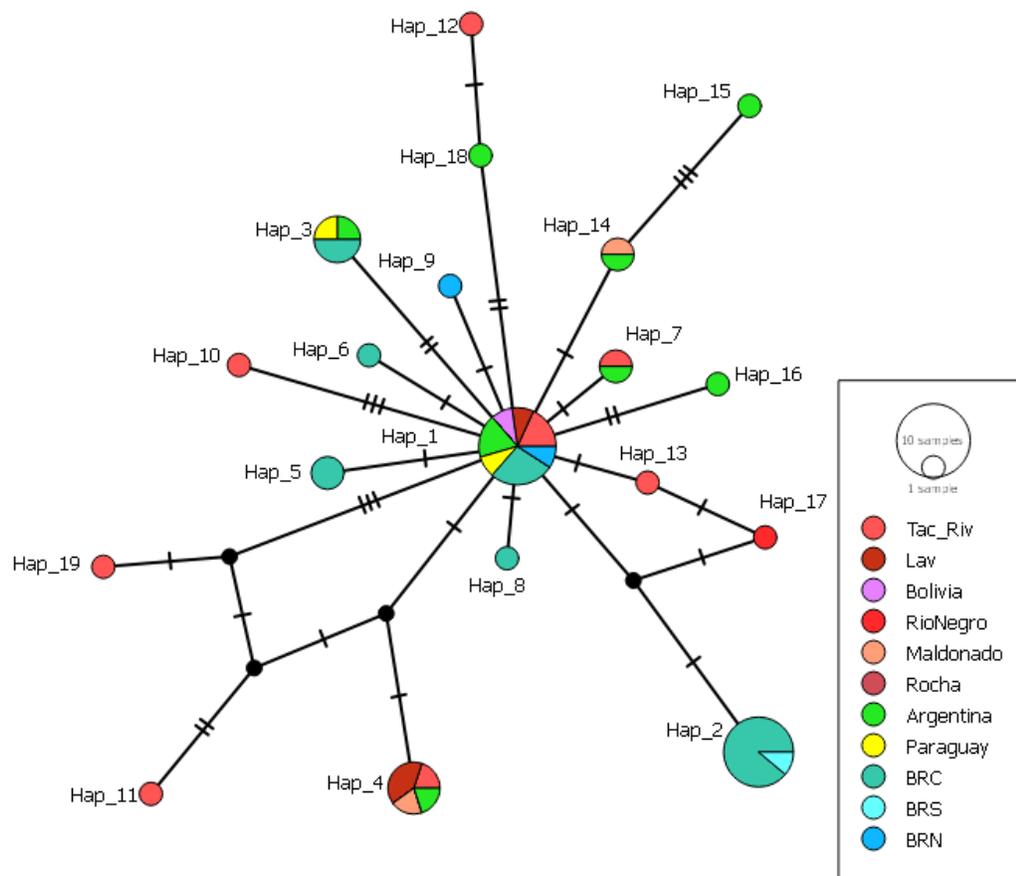


Figura 11. Rede haplotípica TCS construída com 19 haplotipos (obtidos em 47 sequências) de um fragmento de 225 pb del gen *citocromo b* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Los diferentes colores corresponden a diferentes localidades de muestreo: Tac_Riv, Lav, RioNegro, Maldonado y Rocha corresponden a localidades de Uruguay. BRC = Brasil Centro (Sao Paulo y Minas Gerais); BRS = Brasil Sur (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná); Brasil Norte = Pernambuco y Rio Grande do Norte. Gráfico obtenido con el software PopArt.

En la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre estos haplotipos (Fig. 12), podemos confirmar que no se detectan clados correspondientes a poblaciones geográficamente diferenciadas, no detectándose subdivisiones poblacionales históricas. No existe concordancia aparente entre la relación filogenética entre los haplotipos y su disposición geográfica.

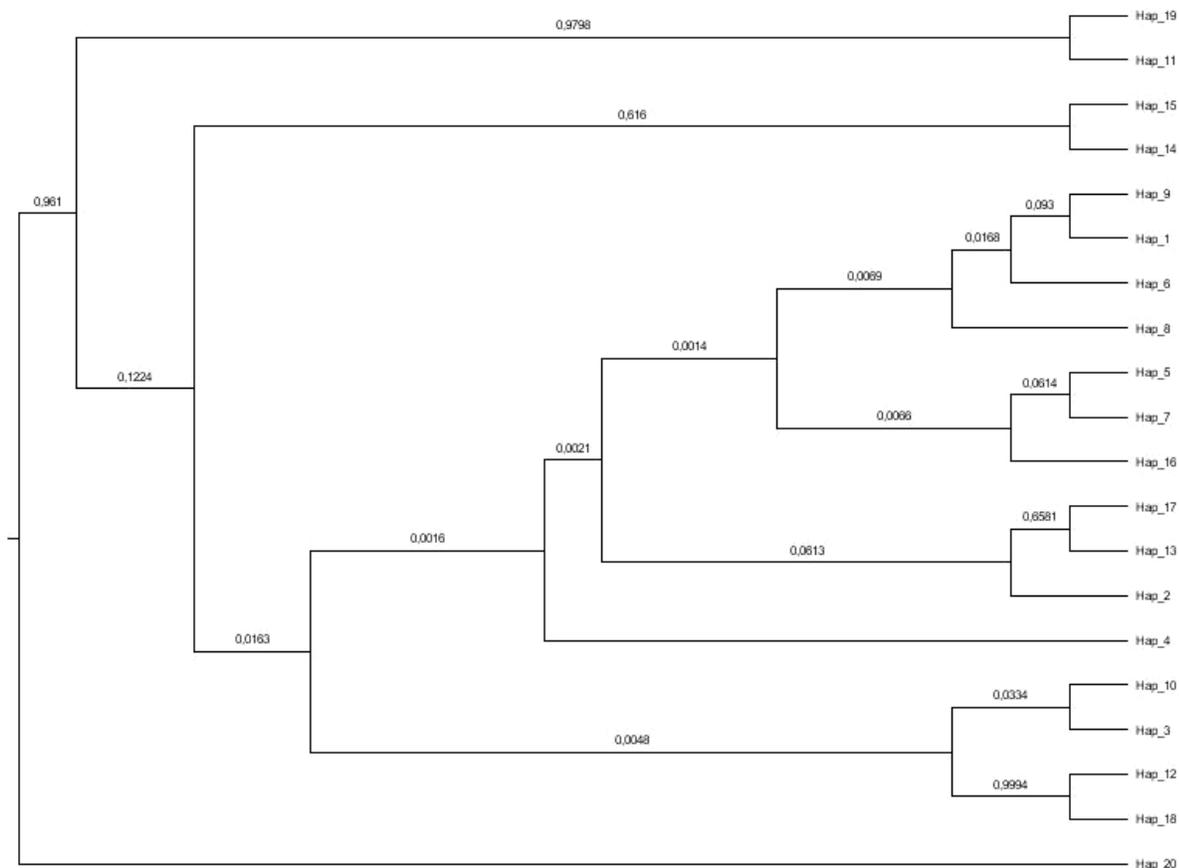


Figura 12. Cronograma inferido con BEAST v. 1.8 a partir de 19 haplotipos del gen citocromo b de *Mazama gouazoubira*. Por encima de los nodos se muestra la probabilidad posterior del nodo.

d. Secuencias concatenadas del gen citocromo b y región D- loop

Para el análisis de secuencias concatenadas se utilizaron 27 secuencias de 159 pb de la región *D- loop* y 214 pb del gen *citocromo b*. Estas secuencias corresponden a muestras colectadas en diferentes localidades de Uruguay entre los años 1993 – 2014. Se identificaron 21 haplotipos al analizar el fragmento concatenado (denominados HAP1 a HAP21) (Tabla 9). Este fragmento presentó 29 sitios polimórficos y 29 mutaciones (proporción de sitios polimórficos de 9,6%), la mayoría de éstos pertenecientes a la región *D- loop* ($S=22$). La diversidad nucleotídica promedio fue $Pi = 0,02681$, con un promedio de $k= 7$ diferencias entre pares de secuencias, y la diversidad haplotípica (Hd) fue 0,974 (s.d. 0,017).

Tabla 10. Lista de muestras secuenciadas y haplotipos encontrados para un fragmento de secuencias concatenadas del ADN mitocondrial (159 pb de la región *D-loop* y 214 pb del gen *citocromo b*) de *Mazama gouazoubira*.

Haplotipos	Muestras
HAP1	BV011
HAP2	BV012; MSG50
HAP3	BV013
HAP4	BV018
HAP5	LC21
HAP6	LC32
HAP7	MSG01
HAP8	MSG40; MSG325
HAP9	MSG52
HAP10	MSG63
HAP11	MSG88
HAP12	MSG89
HAP13	MSG91
HAP14	MSG92
HAP15	MSG99
HAP16	MSG100; MSG110; MSG112
HAP17	MSG109; MSG101; MSG116
HAP18	MSG105
HAP19	MSG107
HAP20	MSG114
HAP21	MSG330

La red haplotípica (Fig. 13) construida a partir de estos haplotipos, permite visualizar que existe un gran número de mutaciones en el total de la muestra y un alto número de haplotipos únicos, lo que indica gran diversidad genética. No se observa en la red una tipología consistente con eventos de contracción o expansión demográfica en el pasado reciente, tampoco se observa un patrón filogeográfico claro de relación entre los haplotipos, al identificarlos de acuerdo a su procedencia como Norte y Sur de Uruguay: (1) Norte de Uruguay: ocho muestras obtenidas de dos localidades (Rivera y Tacuarembó); (2) Sur de Uruguay: 19 muestras obtenidas en tres localidades (Lavalleja, Maldonado y Rocha). Se consideró la procedencia en la naturaleza de los individuos de zoológico con el objetivo de asignarlos a uno de los dos grupos. La existencia de una topología no resuelta en el centro de la red indica que existe homoplasia en estas secuencias de ADN, lo que ya ha sido descrito anteriormente para regiones no codificantes del genoma (como la región *D-loop*).

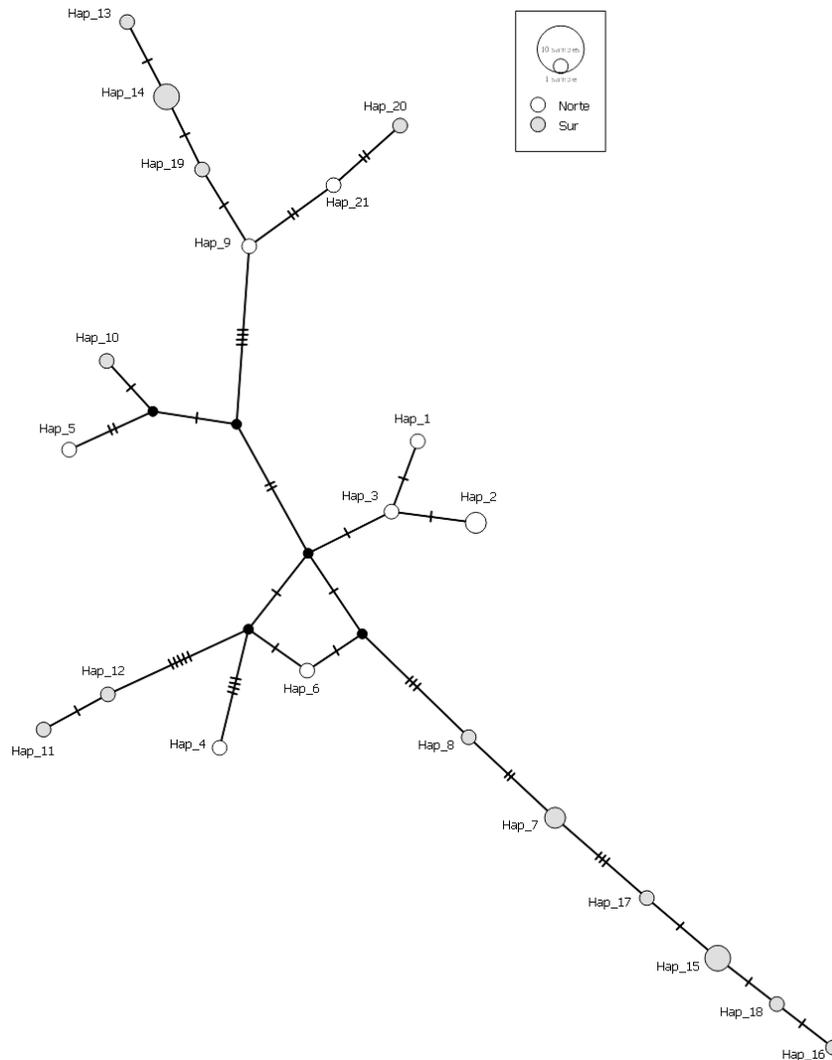


Figura 13. Red haplotípica TCS construida con 21 haplotipos de fragmentos concatenados de la región D- loop y gen citocromo b del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*. Las mutaciones se muestran como líneas sobre las ramas. Gráfico obtenido con el software PopArt.

En cuanto a los análisis filogenéticos (Fig. 14) el mejor modelo de sustitución nucleotídica para el fragmento concatenado fue TN93 (Tamura & Nei, 1993). Al observar la topología del árbol consenso, no se identifican clados de acuerdo a poblaciones geográficamente diferenciadas y los individuos representantes del Norte y Sur del país aparecen mezclados, lo que indica que no existe una estructuración filogeográfica marcada. La divergencia entre *Mazama gouazoubira* y *Ozotoceros bezoarticus* data de 2,24 MA aproximadamente, con un amplio 95% HPD (*high posterior density*) posiblemente debido al bajo número de muestras analizadas y la longitud del fragmento.

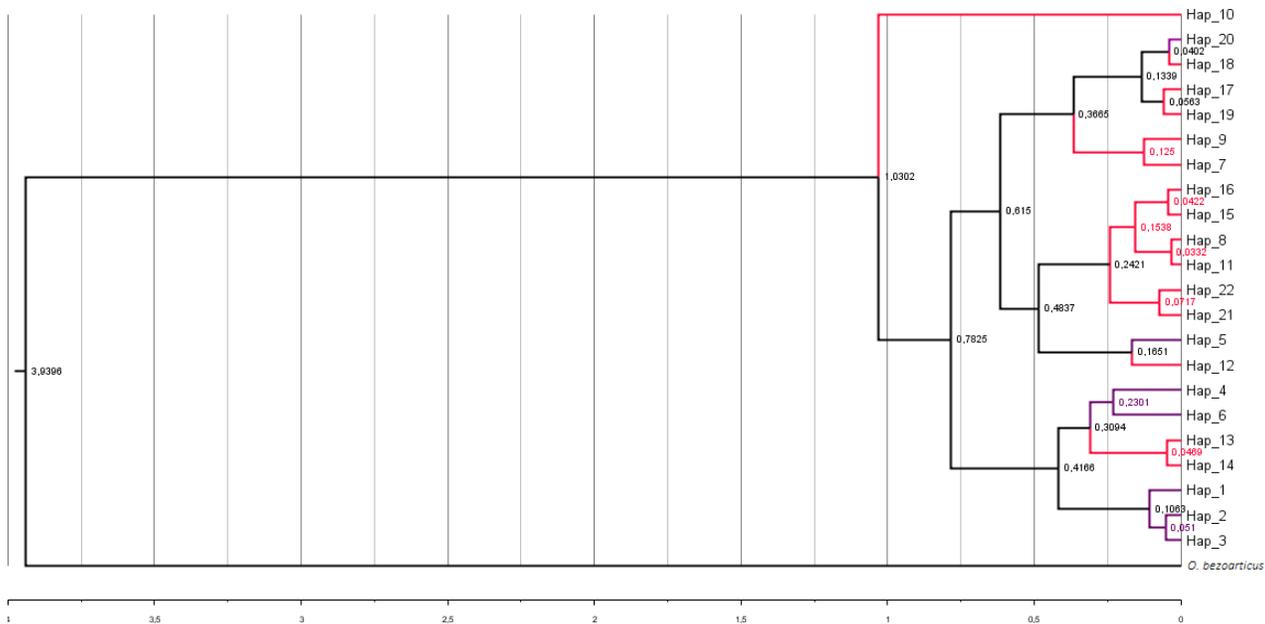


Figura 14. Cronograma construido con BEAST 1.8 para 21 haplotipos del ADN mitocondrial (fragmento del gen citocromo b de 214 pb + fragmento de la región D – loop de 159 pb) de *Mazama gouazoubira* de Uruguay. Por debajo de los nodos se muestra la edad de nodo en MA, por encima se muestra la probabilidad posterior del nodo. En negro se observan los individuos del norte del país y en gris los individuos del sur.

El estadístico de Tajima (-0,08; $p > 0,05$) resultó negativo y no significativo, mientras que el estadístico F de Fu resultó marginalmente positivo y no significativo (0,45; $p > 0,05$). Un resultado negativo de estos test indica apartamiento de la neutralidad (acción de la selección natural sobre esta parte del genoma), o se considera indicador de cambios en el tamaño poblacional en el pasado reciente, ya que estos estadísticos identifican secuencias que no se encuentran en equilibrio mutación/deriva genética, a partir de la relación entre el número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias y la proporción de sitios segregantes.

En relación a los análisis demográficos, el gráfico *mismatch distribution* (Fig. 15) muestra una distribución unimodal, indicando que un número bajo de diferencias pareadas entre secuencias es muy frecuente en la muestra analizada, lo que es esperado en el modelo de expansión demográfica. En apoyo a este resultado, los estadísticos R2 y r (*ruggedness*) fueron significativos (0,16 $p \leq 0,05$; 0,09 $p \leq 0,05$ respectivamente), mientras que SSD no lo fue (0,19 $p > 0,05$).

El gráfico *Bayesian Skyline* indica que la historia de estas poblaciones en el área estudiada comenzó hace aproximadamente 800.000 años, observándose un crecimiento poblacional hace aproximadamente 250.000 – 500.000 años (Fig. 16), luego de este período de crecimiento la población parece haberse mantenido constante, dado que no se observan otras señales de expansión o decrecimiento poblacional. El mismo resultado fue obtenido con el método de Rogers & Harpending (1992). El parámetro T fue $7,3 \pm 1,1$ y el tiempo transcurrido desde la expansión fue 464.181 años ± 60.785 , coincidente con el cambio en el tamaño poblacional reflejado en gráfico BSP.

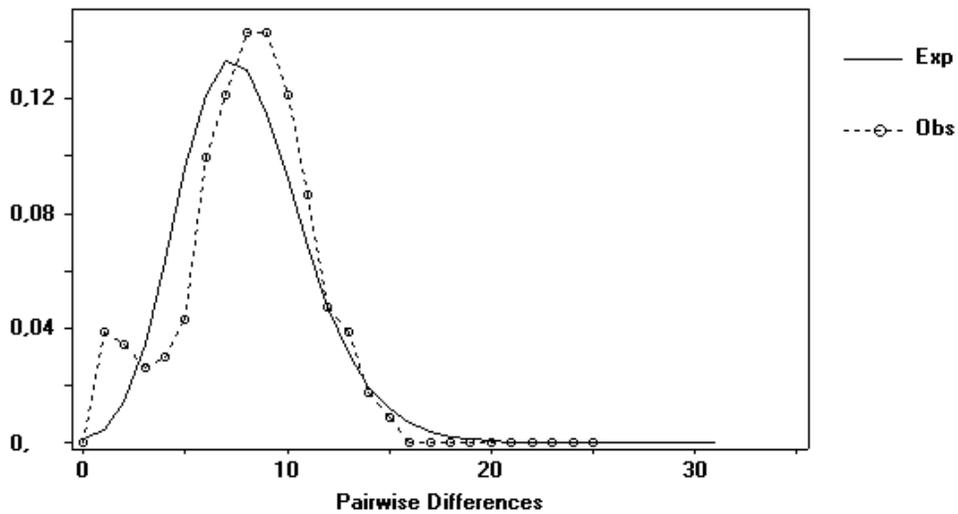


Figura 15. Distribución de la frecuencia de diferencias nucleotídicas pareadas para el número total de secuencias (en línea punteada). La línea continua muestra la distribución esperada bajo el modelo de expansión. Tomado de DnaSP v 5.0

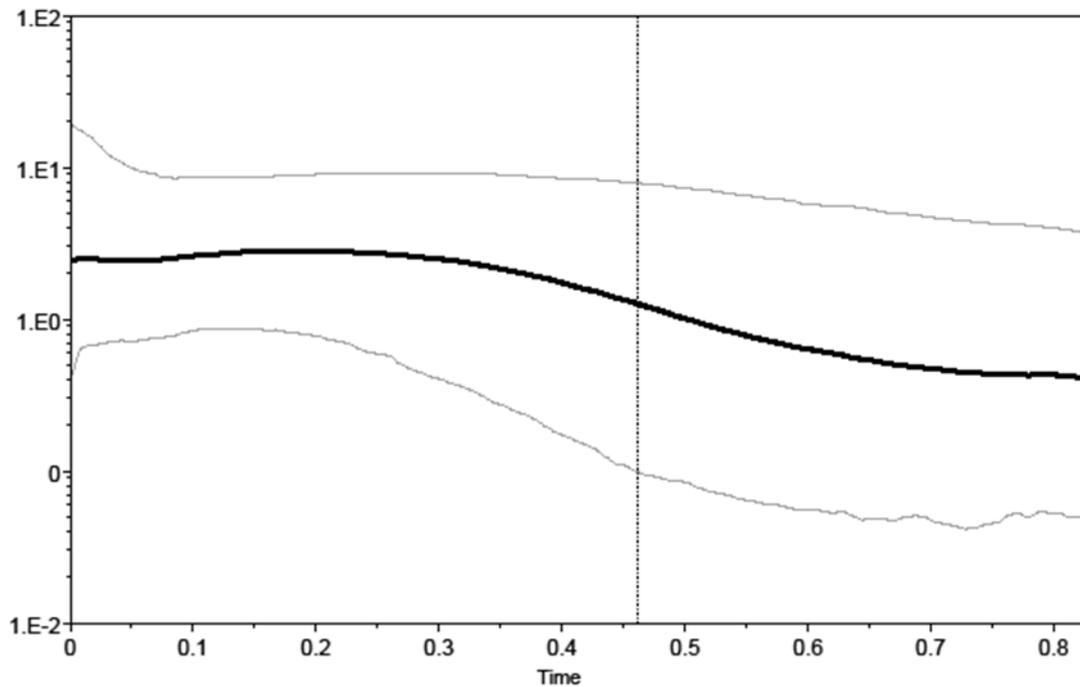


Figura 16. Perfil demográfico Bayesiano (Bayesian Skyline Plot) para las secuencias de ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira* analizadas. La línea negra muestra el valor observado a partir de la mediana y las líneas grises el intervalo de confianza (95% HPD). El eje Y representa N_e *tiempo generacional, mientras que el Eje X representa el tiempo en millones de años (MA). La línea vertical indica la existencia de un cambio en la función demográfica.

En relación al AMOVA (Fig. 17), se encontró una estructuración poblacional moderada y significativa entre el Norte y el Sur del país (analizando a los individuos de Rivera y Tacuarembó vs. individuos de Lavalleja, Maldonado y Rocha). Esta agrupación se realizó en base a que las poblaciones del Norte del país, se encuentran en ambientes de bosque ribereño, mientras que las poblaciones del Sur, se encuentran mayoritariamente en montes de tipo serrano, con interfaz de campo abierto. El valor de F_{st} fue 0,18 (p valor $\leq 0,05$). De todas formas, la mayor fuente de varianza (81%) fue encontrada dentro de las poblaciones y no entre grupos de poblaciones, lo cual puede estar influenciado por el alto número de haplotipos encontrados dentro de una misma localidad de muestreo.

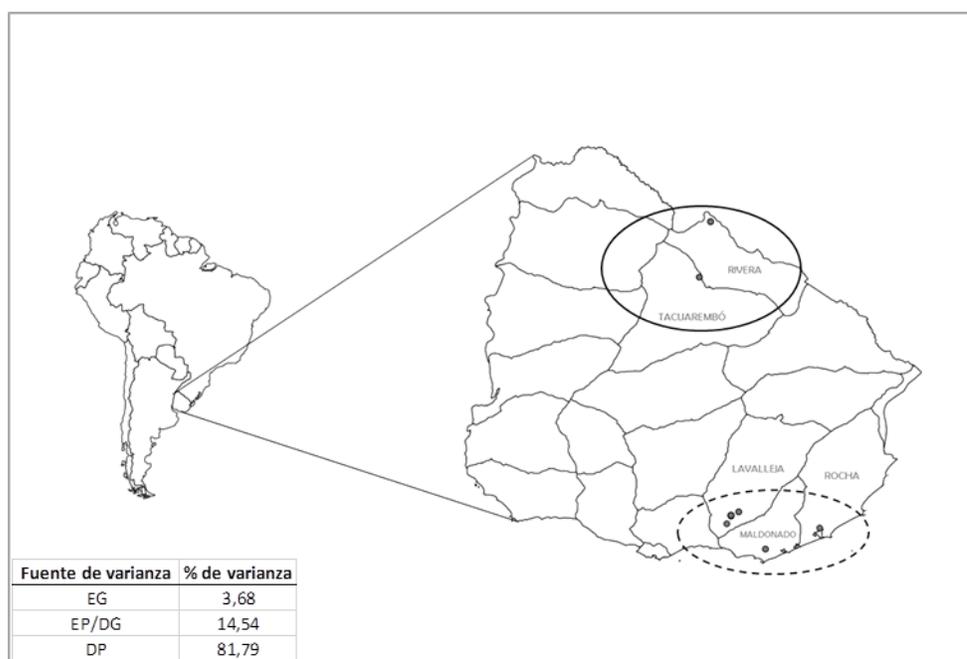


Figura 17. Mapa de Uruguay representando las localidades muestreadas y los grupos analizados en el AMOVA. En la esquina superior izquierda se indica el porcentaje de varianza entre grupos (EG), entre poblaciones dentro de grupos (EP/DG) y dentro de poblaciones (DP).

II. Amplificación de loci de microsatélites y diseño de PCR Multiplex

La Tabla 10 resume el éxito de amplificación por locus para las 24 muestras testadas (las muestras utilizadas se detallan en el Anexo II.b). El éxito de amplificación fue determinado como presencia de una o más bandas del tamaño esperado para el locus en gel de agarosa al 3%, luego de 3 intentos de amplificación por muestra por multiplex. El éxito de amplificación para las 24 muestras para 9 loci fue de 64,5 %. Los loci con mayor éxito de amplificación fueron: GOUA16, GOUA24 y GOUA25, lo cual es esperado dado que se trata de microsatélites desarrollados específicamente para *Mazama gouazoubira*, mientras que los loci con menor éxito de amplificación fueron BM1818 y CSSM41, ambos desarrollados para ganado bovino y ya usados previamente en cérvidos (Cosse *et al.*, 2007). En las dos muestras utilizadas como control positivo fue posible amplificar los 10 loci testados, lo que también fue posible en cuatro muestras

de ADN extraído a partir de fecas. Se llevaron a cabo corridas en microcapilar de todos los productos de PCR para la determinación de alelos para cada locus. A partir de la genotipificación de las muestras, el loci BM1818 fue descartado del pool por no ser posible la asignación de alelos en más del 50% de las corridas (6/11). Por lo tanto, el análisis genético de las muestras se realizó con 8 loci. A continuación, se seleccionaron y genotiparon otras 5 muestras provenientes de ADN extraído de materia fecal, con el objetivo de contar con un número más representativo de muestras en relación a sus localidades de procedencia, siendo un total de 29 muestras genotipadas para 8 loci.

Tabla 11. Éxito de amplificación por locus de microsatélite testado. (X) indica que el individuo fue amplificado con éxito para ese loci.

	BM 203	TGLA 10	BM 757	BM 1818	CSSM 41	GOUA 21	GOUA 25	GOUA 24	GOUA 16	LOCI AMPLIFICADOS POR MUESTRA
MSG88				X			X			2
MSG124	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MSG63				X						1
MF57	X	X	X	X	X	X	X		X	8
MSG52										0
MF59	X	X			X		X	X		5
MSG137 (C+)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MSG91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MF51	X	X	X			X	X	X	X	8
MSG109	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MSG145 (C+)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MF10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
MSG92	X	X	X			X	X	X	X	7
MSG111	X	X	X				X	X	X	6
MSG125							X	X	X	3
MF13	X	X	X		X	X	X	X	X	8
MF34	X	X	X				X	X	X	6
MF19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
BV101	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
ANI12	X	X	X							3
MF76	X	X	X							3
MF78	X	X	X				X	X	X	6
MF60							X	X	X	3
MF64							X	X	X	3
MUESTRAS TOTALES PARA C/LOCUS	18	18	17	11	11	12	20	18	18	143

Por último, se recibieron 5 loci de microsatélites desarrollados en el NUPECCE, los cuales fueron testados en 4 muestras: 2 controles positivos (mismas muestras que las utilizadas anteriormente) y 2 muestras de ADN extraído de materia fecal. El objetivo de este análisis fue poner a prueba la posibilidad de incluir estos loci junto a los 8 iniciales en los multiplex diseñados, permitiendo así la posibilidad de realizar a futuro un análisis genético más robusto. Los resultados para esta prueba se detallan en la Tabla 11, a partir de ellos, se sugiere la incorporación de 4 de estos microsatélites en los multiplex, de acuerdo al esquema planteado en la sección Materiales y Métodos.

Tabla 12. Tamaños alélicos asignados para 5 loci de microsatélites testados en 4 muestras de *M. gouazoubira* (ADN control positivo y ADN extraído de materia fecal). X indica que no fue posible asignar alelos para esa muestra para ese locus.

MUESTRA	TAMAÑO				
	GOUA 10	GOUA 08	RT09	GOUA07	GOUA03
MSG 137 (C+)	123 - 130	166 - 168	X	142 - 145	112 - 112
MSG 145 (C+)	114 - 120	162 - 168	131 - 131	142 - 142	108 - 112
MF 32 (FECA)	114 - 120	158 - 158	111 - 135	145 - 145	90 - 92
MF 31 (FECA)	114 - 114	162 - 162	X	X	90 - 90
C -	X	X	X	X	X

III. Análisis bioinformático de loci de microsatélites

Los genotipos determinados para cada muestra para cada uno de los 8 loci se detallan en la Tabla 12. Se detectaron entre 8 y 22 alelos por loci, siendo GOUA21 el más polimórfico y GOUA25 el menos polimórfico (ambos diseñados específicamente para *M. gouazoubira*). La media del contenido de información polimórfica (PIC) fue de 0,7951. En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos por locus en cuanto a número de alelos, heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada. Se encontraron errores de genotipado para cuatro de los loci: CSSM41, TGLA10, GOUA21 y GOUA24; por presencia de alelos nulos. Se determinó la probabilidad de equilibrio de H-W, detectándose que únicamente GOUA24, BM203 y BM757 ($p \geq 0,05$) se encuentran en equilibrio en la población (Tabla 13). El nivel de endogamia resultó marginalmente positivo $F_{is} = 0,15$, representando un exceso de homocigotas en la población analizada (Tabla 13). En relación al desequilibrio de ligamiento, se detectaron 2 comparaciones con valores de $p < 0,05$ (GOUA16 – GOUA21 y GOUA25 – GOUA24), de un total de 28 realizadas.

Tabla 13. Genotipos determinados para 8 loci de microsatélites en 29 muestras de individuos de *Mazama gouazoubira* de Uruguay (continúa en la página siguiente).

	GOUA 21	CSSM41	BM 203	TGLA 10	BM 757	GOUA25	GOUA 24	GOUA 16
ANI 12	124124	123131	219221	142158	178194	160160	162174	192228
ANI 15	000000	129133	000000	162162	000000	000184	162165	226226
ANI 16	158158	131131	223223	160162	182192	000160	162162	000226
ANI 68	182182	131131	000000	162196	000000	145223	162231	150150
BV 01 1	150166	131131	215221	136156	168204	160181	162174	148154
LC 1	000000	000000	000000	158158	000000	181181	162162	192226
MF 10	152152	113127	219219	192224	188222	175181	162174	000000
MF 12	162174	000000	221227	136170	192196	178178	168231	000000
MF 13	162162	131133	219221	136152	188196	160175	162165	208226
MF 16	162168	131131	000000	136158	194196	160178	162168	196218
MF 19	136166	127131	219221	136148	230240	160175	162162	000000
MF 34	000000	000000	219219	128148	188194	160175	162162	208228
MF 51	164196	000000	219221	136162	206206	160160	153165	000000
MF 57	154166	129131	000000	000000	000000	181181	162162	208208
MF 60	142168	131133	221239	136144	192192	178181	162174	192200
MF 64	122136	131183	221221	134162	162166	000000	165174	000000
MF 76	158158	000000	211219	000000	198220	157157	159171	212212
MF 78	134180	181181	219221	170176	182194	175184	159162	000000
MSG 109	134198	129151	207221	192192	190242	160178	165195	194204
MSG 111	142166	131131	221233	136136	194220	160175	162165	192216
MSG 124	154158	129131	221223	176180	196206	175181	165174	192196
MSG 137	128132	127127	229235	136136	220220	175181	162162	192208
MSG 145	154158	129133	219221	128136	216220	160175	162174	192196
MSG 146	000000	000000	221221	000000	000000	160160	162165	000000
MSG 148	134198	127153	000000	124124	000000	000000	162165	000000
MSG 156	146158	143143	000000	126164	000000	175175	138138	192192
MSG 86	122122	000000	221221	164164	000000	160175	162162	196196
MSG 91	142158	129131	221235	138154	230242	160175	162162	204218
MSG 92	142158	129131	219235	136136	196220	160175	162165	204218

El análisis preliminar de estructuración genética poblacional mediante el método de asignación bayesiano implementado en el software Structure indicó que el número de *clusters* que presenta mayor valor medio para el Ln de máxima verosimilitud y menor desvío estándar fue K=1, siendo el valor del Ln (P) = - 874,20 (s.d. 39). El valor de distancia promedio entre los individuos dentro del mismo *cluster* (correspondiente a toda la muestra analizada, ya que K=1) fue He= 0,8582.

Tabla 14. Valores reportados en este trabajo (columna *M. gouazoubira*) para 29 muestras analizadas, y valores reportados en bibliografía (columna *Referencia*) para otras especies de cérvidos en cuanto a: número de alelos (Na), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho), valores de probabilidad (p-valor) para el test del equilibrio H-W, coeficiente de endogamia (FIS) para cada locus, y número de muestras analizadas (n) para cada locus.

Locus	<i>M. gouazoubira</i>					<i>Referencia</i>				
	Na	He	Ho	P-valor	Fis	Na	He	Ho	Cita	n
GOUA 21	22	0,95	0,72	0	0,20	8	0,77	0,73	Peres, 2015	15
GOUA25	8	0,78	0,58	0,01	0,24	6	0,71	0,6	Peres, 2015	15
GOUA 24	10	0,69	0,69	<u>0,8</u>	0,056	6	0,85	0,93	Peres, 2015	15
GOUA 16	14	0,91	0,70	0	0,15	9	0,81	0,8	Peres, 2015	15
CSSM41	12	0,45	0,55	<u>0,5</u>	0,054	20	0,87	0,60	Cosse <i>et al.</i> , 2007	53
BM 203	11	0,73	0,74	0,01	0,022	13	0,87	0,89	Cosse <i>et al.</i> , 2007	61
BM 757	19	0,94	0,86	<u>0,06</u>	0,078	15	0,90	0,88	Cosse <i>et al.</i> , 2007	57
TGLA 10	21	0,88	0,69	0,04	0,23	6	*	*	Slate <i>et al.</i> , 1998	*

* No se presentan estos datos en el artículo de referencia

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

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

El ADN mitocondrial han sido ampliamente utilizado para análisis de variabilidad genética intraespecífica y determinación de especie a partir de muestras de ADN de origen no invasivo o ambiental (Kohn & Wayne, 1997; Parson *et al.*, 2000; Pawlowski *et al.*, 2003). En este caso, el fragmento de 159 pb de la región *D-loop* probó ser muy útil para análisis poblacionales en esta especie, especialmente cuando el ADN de partida se encuentra degradado o en baja cantidad, ya que fue posible y confiable su amplificación, particularmente en aquellas muestras en las que la amplificación del fragmento de mayor tamaño (600 pb) no había sido lograda. Si bien su robustez estadística en algunos análisis no es alta, posiblemente debido a que el número de sitios informativos es bajo, y además, la región mostró ser homoplásica, se trata de un pequeño fragmento altamente variable en la especie estudiada, lo que lo hace muy interesante para análisis a nivel poblacional a partir de ADN degradado. Además, posibilita la utilización de ejemplares de museos o muestras arqueológicas para el estudio de ADN antiguo, posibilitando investigar la historia de la especie en un contexto filogenético.

La especie posee una gran diversidad genética a nivel del ADN mitocondrial. Se encontró, para toda la muestra, un alto número de haplotipos para las dos regiones analizadas (*D-loop* y *citocromo b*). A nivel de la región *D-loop*, la diversidad genética del fragmento de 600 pb fue similar a la del de 159 pb ($Hd = 0,998$ vs $0,993$; nº de mutaciones = 59 vs 49), indicando que este fragmento de pequeño tamaño es representativo para estimaciones de diversidad genética. Parece ser que el fragmento de 159 pb involucra la parte más variable de la región *D-loop*. Se detectó un gran número de mutaciones entre haplotipos, mostrando que las distancias genéticas entre individuos de la misma especie son en algunos casos muy grandes.

Para el análisis poblacional efectuado con el fragmento de 600 pb, a partir de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias, no se detectó relación entre esta distancia mutacional y la localización geográfica de los individuos, siendo que, por ejemplo, los haplotipos con mayor número de diferencias entre sí ($n = 25$) se encuentran distanciados geográficamente (Ceará y Rio Grande do Sul), pero dos haplotipos muestreados en Rio Grande do Sul poseen una distancia mutacional similar (23 diferencias nucleotídicas), indicando que no existe correlación. De todas formas, el número de muestras por localidad fue muy bajo (en la mayoría de los casos, sólo una muestra por sitio de muestreo) y por lo tanto es muy difícil realizar inferencias acertadamente sin aumentar el número de muestras utilizado.

En cuanto al fragmento de 159 pb, al analizar mayor número de individuos y tener un muestreo más completo de localidades (particularmente en Brasil y Uruguay), fue posible realizar más inferencias acerca de la distribución de la diversidad genética para la especie. En la red haplotípica, se observa que los haplotipos del Norte y Noroeste de Uruguay (Rivera, Tacuarembó y Cerro Largo) se encuentran muy relacionados entre sí, siendo que particularmente los haplotipos de Rocha son aquellos que más se diferencian del resto. Los individuos muestreados en Rocha corresponden mayoritariamente a una

población que se encuentra dentro de un área protegida en la zona conocida como “Baños del Este”, cercana a la frontera con Brasil, pudiendo ocurrir que estos individuos se encuentren más relacionados a poblaciones brasileras que a poblaciones del norte de Uruguay, de las cuales se encuentran más distantes geográficamente. Los haplotipos brasileros que observamos mezclados con este clado de haplotipos uruguayos (particularmente los individuos T083 y MSG61), ambos corresponden a localidades de la zona sur de Brasil. En otra parte de la red encontramos, más dispersos entre sí, a los haplotipos de la zona Sureste del país (Lavallega y Maldonado), también estrechamente relacionados a haplotipos brasileros. Por otro lado, los haplotipos paraguayos aparecen muy relacionados a haplotipos de la zona centro – oeste de Brasil (Minas Gerais y Sao Paulo), pero no a los haplotipos bolivianos o argentinos. De todas formas, para evaluar relaciones filogeográficas en estas áreas, es necesario un mejor muestreo de individuos de Bolivia, Paraguay y Argentina. La mezcla de haplotipos de diferentes localidades, sin correlación geográfica marcada, dentro de un área de muestreo tan extensa, es posiblemente un efecto de la radiación explosiva sufrida por esta especie. Por otro lado, debido a que los haplotipos no muestran asociación con uno o más haplotipos centrales, es probable que el origen de la diversidad genética de estas poblaciones haya sido resultado de la explosión demográfica a partir de más de un linaje maternal (Korsten *et al.*, 2009).

La región *D-loop* de *M. gouazoubira* mostró ser más diversa que en otras especies de cérvidos de la región para los que existen trabajos publicados, tanto en Sudamérica como en Norteamérica (Gonzalez *et al.*, 1998; Latch *et al.*, 2009; Abril *et al.*, 2010), reafirmando el concepto de que se trata de una especie con alta diversidad intraespecífica, tanto morfológicamente, como a nivel cariotípico y en su ADN. González *et al.* (1998) detectaron alta diversidad genética para esta región del ADN mitocondrial al analizar 54 individuos de *Ozotoceros bezoarticus* pertenecientes a 6 localidades sudamericanas. El "venado de campo" es una de las especies de cérvidos sudamericanos más estrechamente relacionada al "guazú birá", estimándose su ancestro común en aproximadamente 2,5 millones de años atrás y con una divergencia entre secuencias de ambas especies de 10,1% en el ADN mitocondrial. La diversidad genética detectada a nivel del *D-loop* es comparable entre ambas especies, indicando que pueden haber sufrido eventos poblacionales históricos recientes de similares características (al momento de la colonización de América del Sur), a pesar de no compartir el mismo hábitat. Por el contrario, en el "venado de campo" se detectó fuerte estructuración genética entre las poblaciones analizadas, a diferencia de lo encontrado en este trabajo para "guazú - birá". Esto podría indicar que *M. gouazoubira* posee una mayor capacidad de dispersión que *O. bezoarticus*, o bien que, dadas sus características ecológicas, las barreras geográficas a la dispersión de individuos no son las mismas para ambas especies (por ejemplo, los bosques ribereños podrían actuar como corredores biológicos para *M. gouazoubira*, pero posiblemente no para *O. bezoarticus*). Estas diferencias podrían explicar las disimilitudes encontradas entre ambas especies en términos de estructuración genética, a pesar de compartir similar diversidad genética para la misma región del genoma.

Por otra parte, la diversidad genética encontrada para *M. gouazoubira* es también mayor a la reportada para *Hippocamelus bisulcus* ("Huemul Patagónico"), otra de las especies de cérvidos sudamericanos más emparentada filogenéticamente. El huemul, a pesar de tratarse de una especie categorizada en peligro de extinción por su bajo tamaño poblacional, posee una alta diversidad genética tanto a nivel haplotípico como nucleotídico a lo largo de su distribución geográfica (Marín *et al.*, 2013). Sin embargo, esta diversidad se encuentra fragmentada en pequeñas poblaciones no interconectadas entre sí con alto grado de estructuración genética. El hábitat del huemul y sus características biológicas son diferentes a los de *M.*

gouazoubira, sin embargo, al igual que éste y que el venado de campo, es una especie que presenta alta diversidad genética. Para el huemul, también se detectó una señal molecular de una expansión demográfica ocurrida en el pasado reciente, indicando que este tipo de eventos pueden haber tenido lugar en varias especies, generando una radiación molecular explosiva que provocó patrones de alta diversidad genética retenidos al presente.

En cuanto al fragmento del gen *citocromo b*, la diversidad genética encontrada fue alta, pero menor a la de la región *D-loop* (en concordancia con lo esperado, ya que se trata de una región codificante) y fue similar a lo reportado para otros cérvidos anteriormente (Marquez *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2008; Latch *et al.*, 2009; Abril *et al.*, 2010). El patrón observado en la red haplotípica para este fragmento, es completamente diferente al encontrado para la región *D-loop*, a pesar de que se trata de dos fragmentos del ADN mitocondrial (donde no existe recombinación y por lo tanto todo el genoma se hereda como un único locus con la misma historia evolutiva). Posiblemente, esto se debe a la tasa diferencial de mutación entre ambos fragmentos, sumado a que el conjunto de muestras analizado no fue el mismo. El patrón reportado es un típico patrón de estrella (*star-shaped network*; Rogers & Harpending, 1992), que se considera una señal molecular de la ocurrencia de un evento de expansión demográfica explosiva. 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. Este mismo patrón ha sido observado para otros cérvidos (Latch *et al.*, 2009; Abril *et al.*, 2010), pero en este caso, no es posible la detección de haplogrupos relacionados a localidades geográficas, debido a la falta de estructuración geográfica marcada entre las poblaciones. Esto puede ocurrir debido a múltiples causas, las cuales no pueden ser discriminadas a partir de este trabajo: que la radiación explosiva ocurrió muy recientemente en el tiempo y las poblaciones no han llegado a diferenciarse a pesar de no estar actualmente conectadas por migración efectiva de individuos, o que las poblaciones mantienen su conectividad a través del flujo génico en la actualidad (mediante una estructura de tipo metapoblación) (Taylor *et al.*, 1993; Hanski *et al.*, 1995; Hanski & Simberloff, 1997).

II. Filogeografía e historia demográfica de las poblaciones

El análisis de estructuración genética poblacional a través de AMOVA, se realizó para el fragmento corto de la región *D-loop*, y también para las secuencias concatenadas de *citocromo b* y *D-loop* (únicamente con muestras de Uruguay), por lo que se analizan dos escalas espaciales diferentes. En el primer caso, se detectó como más probable la existencia de cinco grupos diferenciados, entre diversas agrupaciones probadas. El valor de F_{st} para esta agrupación (0,22) implica moderada estructuración genética. Dado el patrón observado en la red haplotípica, es de esperar que Argentina y Paraguay puedan tratarse de grupos diferenciados entre sí, y que esta estructuración no haya sido detectable en el AMOVA dado el bajo número de muestras de ambos países. El gran porcentaje de varianza atribuible a la variación dentro de las poblaciones está dado por la alta diversidad genética y la alta cantidad de haplotipos únicos en la muestra, generando una gran variabilidad inclusive dentro de cada localidad de muestreo.

Por otro lado, el patrón encontrado en Uruguay para el análisis efectuado con las secuencias concatenadas, coincide con el encontrado sólo para la región *D-loop*, mostrando un nivel moderado de estructuración entre grupos pero también alta varianza entre poblaciones dentro de los grupos, y dentro de

las poblaciones. Además, como se mencionó anteriormente, este patrón de estructuración no fue detectado en la red haplotípica, ni tampoco en el árbol filogenético, por lo que podría tratarse de un artefacto influenciado por el tipo y cantidad de muestras y por la alta variabilidad genética del fragmento *D-loop*, generando una gran presencia de haplotipos únicos.

Existe una señal clara de la ocurrencia de un evento de expansión demográfica en el pasado reciente a partir de los análisis *mismatch distribution* y *BSP*, y también en la forma de estrella de la red haplotípica para el gen *citocromo b*. Este evento, posiblemente ocurrió luego del advenimiento de condiciones ambientales favorables a la especie y propició una expansión geográfica junto a un crecimiento demográfico (Rogers & Harpending, 1992). Si nos guiamos por la inferencia realizada en este trabajo, la expansión habría sucedido durante el Pleistoceno medio o Ioniense, y los cambios climáticos ocurridos hacia el final de ese periodo (hace aproximadamente 20.000 años – último máximo glacial) no habrían afectado considerablemente a esta especie, como se conoce que afectaron a otras especies de mamíferos de Sudamérica: señales similares de expansión demográfica (aproximadamente 25.000 mil años atrás) se detectaron para el "ciervo de los pantanos" (Márquez *et al.*, 2006) y el cánido "aguará guazú" (González *et al.*, 2015). Como *M. gouazoubira* se trata de una especie plástica, capaz de adaptarse a ambientes modificados (Rodrigues *et al.*, 2014), es posible que cambios climáticos como el último máximo glacial durante el Pleistoceno tardío, no la hayan afectado de la misma forma que a otras especies mayormente asociadas a ambientes específicos (Klicka, 1997), como es el caso del "ciervo de los pantanos". Pero por otro lado, es posible que la estimación del rango temporal no sea precisa y estemos frente a un artefacto dado por el bajo número de muestras y/o longitud de los fragmentos utilizados para realizar esta inferencia. Durante el Pleistoceno, ocurrieron ciclos de glaciación y entre estos periodos glaciares hubo intervalos de clima más cálido, denominados «interglaciares». Durante estos periodos interglaciares, se conoce que ocurrieron aumentos de humedad en el noreste de Argentina y el sur de Paraguay y Uruguay que probablemente permitieron la extensión hacia el sur de organismos de hábitats más cálidos, agregando así el factor de una ruta migratoria más tolerable hacia el este para plantas y animales. Por otro lado, a lo largo del Pleistoceno, los depósitos de *loess* (material geológico sedimentario de origen eólico) se construyeron en el norte de la Argentina y el sur de Uruguay, probablemente más fuertemente en periodos fríos y secos (final de los episodios glaciales), cuando se redujo la cubierta vegetal y se redujo la fuerza de la vegetación y los vientos de los Andes fueron más fuertes. Los fragmentos de madera fósil encontrados en las pampas indican que, a veces durante el Pleistoceno, esta región era más húmeda que ahora, permitiendo que los bosques del norte se extendieran más al sur y facilitando la expansión de especies animales asociadas a ambientes de bosque (Vuilleumier, 1971).

Observando los árboles filogenéticos, vemos que la mayoría de los nodos se diversifican en un punto, hace 600.000 – 500.000 años aproximadamente, siendo esto concordante con la inferencia de la ocurrencia de un evento de expansión demográfica. No se observaron grupos de haplotipos con monofilia recíproca en concordancia con localidades geográficas, esto indica que todas las poblaciones analizadas corresponden a una única unidad evolutiva o ESU (*Evolutionary Significant Units*; Moritz, 1994). Se ha reportado que el ADN mitocondrial requiere de $1,8 \times Ne$ (Hudson & Coyne, 2002) o de $2 \times Ne$ (Avice, 2000) generaciones para que haya una probabilidad del 95% de identificar a una población aislada como recíprocamente monofilética (progresión de polifilia a parafilia, y luego a monofilia). Procesos históricos como la introgresión o la separación incompleta de linajes puede dar lugar a incoherencias entre la divergencia real entre poblaciones y el árbol filogenético obtenido (Funk & Omland, 2003) y además, si las poblaciones se

encuentran en una etapa temprana de diferenciación (anterior a la monofilia recíproca) o han divergido recientemente, la posibilidad de encontrar monofilia recíproca es reducida (Zink, 2004; Phillimore & Owens, 2006). En este caso, al tratarse de una divergencia reciente y explosiva, el patrón observado es esperable.

Sería interesante correlacionar la diversidad genética encontrada a la variación morfológica que se ha reportado para esta especie en los diferentes ambientes que habita (Rossi, 2000; Duarte *et al.*, 2008; Duarte & González, 2010). El guazú birá posee un área de distribución muy grande y dentro de ella, muy alta variabilidad, por lo que tal vez sea posible sino la detección de subespecies, la detección de "ecotipos" relacionados a diferentes ambientes (Courtois *et al.*, 2003).

III. *Uso de microsatélites como marcador molecular: diseño de multiplex para PCR y caracterización de la diversidad genética*

El resultado obtenido del análisis de *clusters* realizado con el software *Structure* (obteniendo como resultado más probable que toda la muestra analizada pertenece a una única población, $k=1$) puede llevar a interpretar que en Uruguay no existe estructuración genética actual entre las diferentes poblaciones, o puede tratarse de un artefacto generado por las pocas muestras utilizadas por cada localidad de muestreo, que no permiten suficiente robustez estadística al análisis (dada por el $\ln(P)$ y su alto desvío estándar). Este mismo patrón de conectividad entre poblaciones fue detectado también para otras especies de mamíferos del país, que poseen distintas tasas de dispersión y áreas de vida, como el "Zorro perro" (*Cerdocyon thous*) y el "Gato montés" (*Leopardus geoffroyi*) (Cosse, 2015), indicando que es posible que en Uruguay no existan barreras geográficas actuales que generen el aislamiento reproductivo de poblaciones de mamíferos de mediano porte.

El apartamiento de algunos loci del equilibrio H-W, así como el exceso de homocigotas, puede ser explicado por errores no detectados en el genotipado, o por el efecto Wahlund. Este efecto, ocurre cuando se analizan en conjunto poblaciones que en la naturaleza se encuentran aisladas reproductivamente entre ellas, provocando en apariencia un déficit de heterocigotas (o exceso de homocigotas) (Allendorf & Luikart, 2007). Es importante destacar que sólo algunas corridas fueron realizadas por duplicado (aquellas en las que no era posible la asignación de alelos luego de la primer corrida), mientras que lo recomendable para muestras no invasivas es realizar corridas por triplicado para la obtención de un genotipo consenso (Peres, 2015).

En conjunto, los loci analizados tienen un alto contenido de información polimórfica, esto sugiere que pueden ser utilizados para análisis de estructura genética poblacional. El alto número de alelos encontrado en comparación con los mismos loci utilizados en otras especies, concide con la información preliminar obtenida del ADN mitocondrial, de que se trata de una especie con alta diversidad genética. Aunque comparaciones de resultados entre especies pueden resultar sesgadas, son útiles para obtener un pantallazo de la diversidad genética de una especie en relación a otras especies cercanas. El "Venado de Campo" (*Ozotoceros bezoarticus*), el "Ciervo de los Pantanos" (*Blastocerus dichotomus*), y el "Huemul Patagónico" (*Hippocamelus bisulcus*) han sido evaluados utilizando loci de microsatélites (Gilbert *et al.*, 2006; Cosse *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2007; Corti *et al.*, 2009). El "Venado de Campo" mostró una diversidad alta (N_a promedio = 15; H_o = 0,703), mientras que el "Ciervo de los Pantanos" presenta menor diversidad

(N_a promedio = 3; H_o = 0,413). En el caso del "Huemul" por otra parte mostró muy baja diversidad (N_a por locus promedio = 2; H_o = 0,28), lo que es esperable debido a que se trata de una especie en peligro de extinción, con un tamaño poblacional pequeño.

Este trabajo presenta una aproximación a la caracterización y utilización de un set de microsatélites para evaluar un pequeño número de muestras de la especie, incluyendo muestras de ADN degradado (proveniente de materia fecal o huesos), para probar su amplificabilidad, polimorfismo y su utilidad para análisis de diversidad. Queda mucho trabajo por hacer en este aspecto: ajustar protocolos de amplificación (particularmente para muestras no invasivas), determinar la utilidad de los multiplex diseñados incluyendo los 5 marcadores cedidos por NUPECCE, y utilizar este último set para el análisis en poblaciones silvestres.

En general, es esperable encontrar diferencias entre los resultados obtenidos a partir del ADN mitocondrial y loci nucleares. Por un lado, porque poseen diferentes tipos de herencia (biparental para los microsatélites y materna para el ADN mitocondrial). Esto permite inferir la historia evolutiva exclusivamente de los linajes maternos o de ambos sexos, y particularmente en especies filopátricas, donde las hembras tienen menor dispersión y flujo génico que los machos, puede generar la observación de diferentes tipos de estructura genética para un mismo set de muestras (Napolitano, 2012). En este último escenario, la estructura es mayoritariamente detectada mediante estudios con marcadores que se heredan por vía materna (Avice, 1995; Cosse, 2010) como el ADN mitocondrial, pero en menor medida con loci nucleares, que es el caso de este trabajo. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de marcadores nucleares y mitocondriales reflejan distintas escalas temporales. El alto grado de polimorfismo de los microsatélites los hace adecuados para realizar inferencias sobre eventos genéticos poblacionales más recientes en el tiempo (Fredsted *et al.*, 2005), mientras que el uso de secuencias del ADN mitocondrial nos permite obtener información acerca del pasado reciente (Prates, 2008) a una escala macroevolutiva.

Contando con un set robusto de marcadores, sería muy interesante el análisis de poblaciones de Uruguay, para las que ya se cuenta con un banco de muestras, permitiendo conocer más y mejor la estructura actual de las poblaciones y el flujo génico entre ellas, dado el conocimiento que se tiene a partir del ADN mitocondrial.

Si bien el estudio aquí presentado representa una primer evaluación genética en el país de la cuál no es posible extraer muchas conclusiones acerca de la estructura poblacional de la especie en Uruguay, estos marcadores podrían brindar mayor información acerca del efecto de distintos factores de origen antrópico (como cambios en patrones de uso del suelo, construcción de carreteras y urbanización) en las poblaciones de la especie en el país.

IV. Conclusiones acerca del muestreo y distribución de la especie

La información acerca de las localidades de ocurrencia para la especie relevada en las colecciones científicas del país, combinada con el muestreo realizado en el marco de este trabajo y con la información publicada en guías de campo (González & Martínez, 2010) y artículos científicos (González & Elizondo, 2010), nos permiten concluir que la especie no ha sido detectada en la región central y suroeste del Uruguay. Sin embargo, es referida como una especie que habita todo el país. Es importante la realización de un muestreo extensivo particularmente en esa zona, para establecer su distribución en el país. Es importante resaltar que la zonas suroeste y litoral del país coinciden con algunas de las zonas más

modificadas del territorio, en cuanto a uso de suelo para agricultura, ganadería y forestación (Montes Narbono, 2013), por lo que podría ser posible que la especie no se encuentre presente o sea muy poco abundante en estas áreas. Se detectó la presencia de la especie (incluso siendo observada durante el día) en todos los muestreos realizados en el marco de este trabajo dentro de áreas protegidas del país: Laureles (Tacuarembó), Parque Potrerillo de Santa Teresa (Rocha), Parque Nacional San Miguel (Rocha) y Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres). Esto podría indicar que la especie es más abundante o conspicua en ambientes naturales donde la presión de caza o amenaza percibida es menor (como áreas protegidas).

La existencia de muestras ya colectadas y depositadas previamente, tiene un valor muy grande para este trabajo, ya que permitió la inclusión de un número mucho mayor de individuos, y resalta la importancia de la trazabilidad de una muestra y su correlación con un número de colección científica, para asegurar su utilidad posterior en proyectos de investigación. En este trabajo fueron evaluadas el 48% de las muestras disponibles de la especie en las colecciones científicas del país. Esto, sumado a las secuencias que ya se encontraban disponibles de publicaciones o trabajos anteriores, totaliza un número de muestras que permitió una cobertura general del área de distribución geográfica de la especie. Sin embargo, se trata de un muestreo heterogéneo, ya que se contó con pocas muestras de algunas localidades y países (Argentina, Bolivia y Paraguay) en comparación con otros (Uruguay y Brasil). El número diferencial de muestras colectado en Uruguay y Brasil corresponde a un mayor esfuerzo de obtención de muestras en estos países y no necesariamente está relacionado a una mayor abundancia de la especie. Además, las muestras analizadas presentaban un rango temporal muy amplio (20 años), y provenían de diferentes tipos de muestras así como diferentes métodos de colecta. Por estos motivos, se trata de un muestreo mixto, de acuerdo a los escenarios planteados por Schwart & McKelvey (2009). Este tipo de muestreo puede influir en la correcta identificación de la estructura genética de una especie, generando artefactos muestrales al contar con localidades con mayor esfuerzo de colecta. Desafortunadamente, la mayoría de las investigaciones de genética de la conservación en mamíferos silvestres, se encuentran restringidas en gran medida por el esfuerzo de muestreo (debido a escasez de fondos y tiempo y/o debido a restricciones logísticas). Como resultado, muchos de los estudios realizados se encuentran limitados en su habilidad de evaluar y discriminar diferentes hipótesis de trabajo. En el caso de *M. gouazoubira*, su amplio rango de distribución y su gran variación fenotípica y genética acrecentan este problema. Por este motivo, sería importante ampliar el muestreo (principalmente sumando localidades en Bolivia, Paraguay y Argentina) y reducir el espectro temporal de las muestras, permitiendo así análisis más robustos y estimativas más confiables en cuanto a la estructuración genética, historia demográfica de la especie y definición de UMs.

V. Implicancias para la conservación de la especie y definición de Unidades de Manejo

De acuerdo a los resultados que surgen de este trabajo, es posible inferir para esta especie un gran tamaño poblacional en el pasado reciente, tanto en el país como en general en su área de distribución. La especie se encuentra presente en varias áreas protegidas de Uruguay, Brasil y Argentina, por lo que algunas de sus poblaciones se encuentran bajo protección, y es posible sugerir que su alta diversidad genética le posibilitaría la adaptación o supervivencia a cambios drásticos en el ambiente. Estos resultados apoyarían la

clasificación actual de esta especie como de “Preocupación Menor” (IUCN, 2016), dada su alta variabilidad genética, aparente gran tamaño poblacional y ocurrencia dentro de áreas protegidas. De todas formas, evaluaciones más detalladas y periódicas son necesarias, para detectar la influencia de los cambios recientes en el paisaje sobre la especie, aspecto que no es posible detectar con el análisis del ADN mitocondrial, pero sí con marcadores hipervariables (como microsatélites), y también optando por una evaluación de poblaciones que ocupen diferentes biomas, incluyendo individuos con marcadas diferencias fenotípicas, lo que posibilitaría la detección de grupos genéticamente dísimiles, de relevancia para la conservación completa del potencial evolutivo de esta especie.

No fue posible la definición estadísticamente significativa de UM (Unidades de Manejo), ya que no se detectaron poblaciones particulares altamente diferenciadas, pero sí, podemos saber que existe una gran diferenciación entre poblaciones distantes geográficamente, por lo que, *a priori*, es prioritaria la conservación de la especie en toda su área de distribución. La identificación de UMs en una especie es fundamental para ayudar a guiar esfuerzos de conservación, y facilitar la aplicación de leyes que propicien la conservación de toda la diversidad poblacional intraespecífica existente y los hábitats asociados a ella. En general pueden ocurrir dos errores en el diagnóstico de UM o Unidades de Conservación: la identificación de muy pocas o demasiadas unidades. El reconocimiento de muy pocas unidades (subdivisión) podría deberse a la falta de poder estadístico para detectar una diferenciación genética cuando esta es biológicamente significativa (e.g., debido a muy pocos datos) o a la identificación errónea de los límites de la población (e.g., debido a una subestructura críptica de la población), y podría conducir a subprotección de toda la diversidad existente, y por lo tanto a la reducción o pérdida de poblaciones locales. El reconocimiento de demasiadas unidades (sobredivisión) podría dar lugar a un despilfarro innecesario de recursos para monitoreo, conservación y manejo de las poblaciones, porque las poblaciones no serían demográficamente independientes como para merecer la condición de UM distintos (Allendorf & Luikart, 2007). Considerando estos posibles escenarios, la no identificación de unidades sería la situación de mayor riesgo en términos de conservación debido a posible extinción de poblaciones únicas. En este caso, el principal problema es que algunos sitios de muestreo poseen tamaños muestrales muy pequeños ($n = 3$). De todas formas, el tamaño muestral de los distintos grupos geográficos analizados es siempre mayor a $n = 10$ (con la excepción de Bolivia), y es sobre estos grupos geográficos sobre los que se basa el AMOVA que nos llevan a las conclusiones planteadas. Se ha planteado que tamaños muestrales de entre 20 y 50 individuos (para niveles de diversidad genética altos y bajos) serían capaces de muestrear 95% o más de los haplotipos existentes en una población (Crandall & Templeton, 1993), por lo que un aumento del número de muestras por población sería necesario en algunos casos.

Dentro de Uruguay, considerando que se trata de un área pequeña y sin la presencia de grandes barreras geográficas aparentes, la estructuración genética moderada podría representar la existencia de poblaciones fragmentadas recientemente debido a causas antropogénicas (como cambios en el patrón de uso de suelo, urbanización, fragmentación de montes nativos, etc.). La conectividad entre estos grupos de poblaciones que habitan paisajes fragmentados a través de corredores de hábitat adecuados para la migración es un tema crítico para asegurar la mantención de poblaciones viables a largo plazo. Esta conectividad favorecería una dinámica metapoblacional, actuando como un modelo de migración paso a paso para favorecer el intercambio demográfico y genético entre las poblaciones (Taylor *et al.*, 1993, Hanski *et al.*, 1995, Hanski & Simberloff, 1997), particularmente aquellas más cercanas entre sí, acercándose a un patrón de aislamiento por distancia. Los patrones de conectividad dependen en gran

medida de la capacidad intrínseca de dispersión de la especie y los contextos ambientales particulares a los que están expuestos.

PERSPECTIVAS

En función de los resultados de este trabajo y las conclusiones obtenidas, se considera que como principales perspectivas a futuro, sería muy interesante la incorporación de datos morfológicos al análisis como medidas corporales e información fenotípica de los individuos como tamaño y coloración del pelaje. Esto último permitiría la evaluación de la existencia de ecotipos y la correlación de datos de genética molecular con datos morfológicos, pudiendo evaluar la presencia de grupos genéticamente diferenciados en función de aspectos morfológicos, permitiendo reconocer la existencia de patrones reproductivos diferenciales dentro de la especie.

Por otro lado, se plantea como otra perspectiva a futuro continuar con el desarrollo de los microsatélites como herramienta para el análisis a nivel poblacional a una escala temporal y espacial más reducida que el ADN mitocondrial, permitiendo conocer en mayor profundidad como los cambios recientes en el paisaje han afectado a esta especie y cuál es el grado de conectividad actual de las poblaciones.

Otra estrategia potencial a implementar es la utilización de la genómica, que implica un tamaño muestral menor brindando información de alto valor y poder resolutivo. Los datos genómicos tienen el potencial de permitir la detección de variación adaptativa y permiten el uso combinado de marcadores moleculares neutrales y sujetos a presiones de selección. Esto provee diferentes tipos de información que en conjunto permiten optimizar las decisiones de manejo, como la definición de UMs. En situaciones donde se espera variación adaptativa significativa entre poblaciones (por ejemplo, cuando el tamaño poblacional es muy grande o cuando existe gran variación ambiental dentro del área de distribución de la especie, como es el caso de *M. gouazoubira*) es cuando la genómica tiene mayor potencial resolutivo (Funk *et al.*, 2012). Además, los datos genómicos tienen mayor resolución que los microsatélites ya que incrementan en gran medida el número de loci y por lo tanto la robustez estadística (Der Sarkissian *et al.*, 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, V.V.; Carnelossi, E.A.G.; González, S.; Duarte, J. M. B.** (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama Americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic Genome Research*, 128(1-3): 177-187.
- Allen, J. A.** (1915) Notes of the American Deer of the genus *Mazama*. *Bulletin American Museum of Natural History*, 34: 521-532.
- 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.
- Allendorf, F. W.; Luikart, G. & Aitken, S. N.** (2013) *Conservation and the Genetics of Populations* Blackwell Publications, Malden, MA, United States.
- Arif, I. A. & Khan, H. A.** (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 9–17.
- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L.** (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology Evolution*, 13: 494–504.
- Aristimuño, M.P.** (2013) Variabilidad genética en poblaciones de *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae; Fischer, 1814) de Uruguay y la región. Tesis de grado, Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo-Uruguay.
- Aristimuño, M.P.; González, S. & Duarte, J.M.B.** (2015) Population structure and genetic variability of the gray-brocket deer (*Mazama gouazoubira*; Mammalia: Cervidae) in Uruguayan populations. *Deer Specialist Group newsletter N° 27*, IUCN Publications.
- Armstrong, E.; Leizagoyen, C.; Martínez, A.M.; González, S.; Delgado, J.V. & 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.
- Avila-Pires, F.D.** (1959) As formas sul americanas do “veado-virá”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 31: 25-38.
- Avise, J.C.** (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Publications, United States.

Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.

Beebee, T. & Rowe, G. (2008) *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 400pp.

Benayas, J.M.R.; Newton, A.C.; Diaz, A. & Bullock, J. (2009) Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science*, 325:1121-1124.

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

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

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

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

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. & Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.

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

Bruford, M.W. & Wayne, R.K. (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:939-943.

Caparroz, R.; Mantellatto, A.M.B.; Bertoli, D.J.; Figueiredo, M.G. & 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): 338-345.

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

Canevari, M. & Vaccaro, O. (2007) Guía de mamíferos del sur de América del Sur. Literature of Latin América, Buenos Aires, 424pp.

Caraballo, C.F. (2009) Patrón de uso de hábitat del guazuncho (*M. gouazoupira*, Artiodactyla, Cervidae) durante un ciclo anual, en bosques nativos y exóticos del Centro-Oeste de Entre Ríos. APRONA, Boletín Científico, 41:1-15.

Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3):621- 631.

Charruau, P.; Fernandes, C.; Orozco- TerWengel, P.; Peters, J.,; Hunter, L.; Ziaie, H. & Vercammen, P. (2011) Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. *Molecular Ecology*, 20(4): 706-724.

Clayton, D.A. (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Internal Review Cytology*, 141: 217–232.

Clement, M.; Snell, Q.; Walker, P.; Posada, D. & Crandall, K. (2002) TCS: estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International, IEEE Computer Society*, 2: 184.

Corti, P.; Shafer, A.B.A.; Coltman, D.W. & Festa-Bianchet, M. (2009) Past bottlenecks and current population fragmentation of endangered huemul deer (*Hippocamelus bisulcus*): implications for preservation of genetic diversity. *Conservation Genetics*, 12(1): 119-128.

Cosse, M.; González, S. & Maldonado, J.E. (2007). Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genetic and Molecular Research*, 6(4): 1118-1122.

Cosse, M. (2010) Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus* uruguayensis: Pautas para su conservación. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo-Uruguay, 202 pp.

Cosse, M. (2015) Informe final Proyectos I+D, Fondos Clemente Estable Convocatoria 2013, Modalidad II. Financiado por Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Montevideo, Uruguay, 23 pp.

Courtois, R.; Bernatchez, L.; Ouellet, J. P. & Breton, L. (2003). Significance of caribou (*Rangifer tarandus*) ecotypes from a molecular genetics viewpoint. *Conservation Genetics*, 4(3): 393-404.

Crandall, K.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M. & Wayne, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 290–229.

Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (1993) Empirical tests of some predictions from Coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959-969.

Crow, J.F. & Kimura, M. (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory*. Ed Harper Row, Ne York, USA, 591 pp.

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

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

Davis, M.B. & Shaw, R.G. (2001) Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, 292 (5517): 673-679.

Der Sarkissian, C.; Ermini, L.; Schubert, M.; Yang, M. A.; Librado, P.; Fumagalli, M. & Petersen, B. (2015). Evolutionary genomics and conservation of the endangered Przewalski's horse. *Current Biology*, 25(19), 2577-2583.

Di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdés, A.M.; Slatkin, M. & Freimer, N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.

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

Dinerstein, E.; Olson, D.; Graham, M.; Webster, D.J.; Primm, A.L.; Bookbinder, M.A. & Young, K. R. (1995). *A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean*. Washington, DC: World Bank.

Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8): 1969-1973.

Duarte, J. M. B. & Reis, M. L. (2012) Espécies de cervídeos brasileiros não ameaçados de extinção. In: Duarte, J. M. B. & Reis, M. L. (Eds). *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção*. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasil, p. 20- 26.

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

Duarte, J.M.B. & Jorge, W. (1998) Análise citotaxonómica dos *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). In: Duarte, J.M.B. *Análise citogenética e citotaxonómica do género*

Mazama (Cervidae:Artiodactyla) no Brasil. Ph.D. dissertation, Instituto de Biociencias, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

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

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

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

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

Einseberg, J.F. (1987) The evolutionary history of the Cervidae with special reference to South American Radiation. In: Wemmer, M. (Ed) *Biology and management of the Cervidae*. Smithsonian Institute Press, Washington D.C., p. 60-64.

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

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

Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.

Excoffier, L.; Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47.

Feldhamer, G. A. & Mcshea, W. J. (2012) *Deer: the animal answer guide*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 200 pp.

Ferrari, C.A. (2005) Abundancia, uso del hábitat y horarios de actividad de la corzuela roja (*Mazama americana*) y la corzuela enana (*M. nana*) en la Selva Paranaense. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata- Argentina.

Figueiredo, M.G. (2014) Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). 2014. xii, 57 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/11449/115676>>.

Frankham, R.; Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 617 pp.

Fraser, D.J. & Bernatchez, L. (2001) Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-2752.

Fredsted, T.; Pertoldi, C.; Schierup, M.H. & Kappeler, P.M. (2005) Microsatellite analyses Reveal fine-scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Molecular Ecology*, 14 (8): 2363-2372.

Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915-925.

Fu, Y. & Chakraborty, R. (1998) Simultaneous estimation of all the parameters of a step-wise mutation model. *Genetics*, 150: 487-497.

Funk, D.J.; Omland, K.E. (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, Causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial dna. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 397-423.

Funk, W. C.; McKay, J. K.; Hohenlohe, P. A. & Allendorf, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in ecology & evolution*, 27(9), 489-496.

Galan, M.; Cosson, J.F.; Aulagnier, S. & Maillard, J.C. (2003). Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3: 142-146.

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

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

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

González, E. & Martínez-Lanfranco, J. (2011) *Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación*. Banda Oriental, MNHN y Vida Silvestre, Montevideo, Uruguay, 464 pp.

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

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

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

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

González, S.; Mannise, N.; Repetto, L. & Maldonado, J.E. (2015) Sex determination of three Neotropical canids by high resolution melting analysis. *Conservation Genetic Resources*, 7(3):643- 645.

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

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

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

Guo, S.W. & Thompson, E.A. (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, 48:361-372.

Hanski, I.; Pöyry, J.; Pakkala, T. & Kuussaari, M. (1995) Multiple equilibria in Metapopulation dynamics. *Nature*, 377: 618-621.

Hanski, I. & Simberloff, D. (1997) The metapopulation approach, its history, conceptual Domain, and application to conservation. In: *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics and Evolution*. In: Hanski, I.A. & Gilpin, M.E. (eds) Academic Press, San Diego, California, USA, p. 5-26.

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

Harpending, H.C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.

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

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

Hedrick, P.W. (1994) Purging inbreeding depression and the probability of extinction: full-sib mating. *Heredity*, 73:363–372.

Herrmann, B., & Hummel, S. (Eds.) (2012) Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. Springer Science & Business Media.

Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in zoology*, 1(1): 1.

Hudson, R.R. & Coyne, I.A. (2002) Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, 56: 1557-1565.

Hurtado Gonzales, J.L. & Bodmer, R.E. (2004) Assessing the sustainability of brocket deer hunting in the Tamshiyacu-Tahuayo Communal reserve, northeastern Peru. *Biological Conservation*, 116: 1-7.

IUCN (2016) Red list of Threatened Species Online. www.iucnredlist.org

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

Juliá, J. P. & Richard, E. (1999). Estado de Conservación de las Corzuelas (*Mazama* sp.) en el Noroeste Argentino. Manejo y Conservación de Fauna Silvestre en América Latina. Museo Noel K Mercado, Universidad Autónoma GR Moreno, University of Florida, Instituto de Ecología & Wildlife Conservation Society.

Julia, J. P. & Richard, E. (2000). Uso de hábitat, durante el forrajeo, por parte de la corzuela parda (*Mazama gouazoubira*), en ambientes secundarios de las Yungas y en condiciones controladas. *Acta Zoológica Lilloana*, 45, 247-256.

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

Kalinowski, S. T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation genetics*, 5(4): 539-543.

- Kalinowski, S.T.; Taper, M.L. & Marshall, T.C.** (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
- Kimura, M. & Crow, J.F.** (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725–738.
- Klicka, J., & Zink, R. M.** (1997). The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science*, 277(5332), 1666-1669.
- Knowles, L. L. & Maddison, W. P.** (2002). Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11(12): 2623-2635.
- Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Edwards, A.; Pääbo, S.V.; Villablanca, F.X. & Wilson, A.C.** (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6196-6200.
- Kohn, M.H. & Wayne R.K.** (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 12: 223-227.
- Kohn, M.H.** (1999) Estimating population size by genotyping feces. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266: 1–7.
- Korsten, M.; Ho, S. Y.; Davison, J.; PÄHN, B.; Vulla, E.; Roht, M. & Pilot, M.** (2009). Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals?. *Molecular Ecology*, 18(9): 1963-1979.
- Lacey, E.A.; Maldonado, J.E.; Clabaugh, J.P. & Matocq, M.D.** (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology*, 8(10):1754-1756.
- Latch, E.; Heffelfinger, J.; Fike, J. & Rhodes, J.** 2009. Species-wide phylogeography of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*): cryptic glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology*, 18(8): 1730-1745.
- Lessa, E.P.; Cook, A.C. & Patton, J.L.** (2003) Genetic footprints of expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 19: 3031-3037.
- Leite, K.C.E.; Collevatti, R.G.; Menegasso, T.R.; Tomas, W.M. & Duarte, J.M.B.** (2007) Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus*. *Genetic & Molecular Research*, 6:325–330.
- Librado, P.; Rozas, J. & Sánchez-Del Barrio, J.C.** (2010) Software DNAsp version: 5.10.01. Universidad de Barcelona, España.

- Lonnberg, E.** (1919) On some mammals from the Argentine Chaco. *Arkiv fur Zoologic*, 12: 1-20.
- Mantelatto, A.M.B.; Carnelossi, E.A.G. & Duarte, J.M.B.** (2010) Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama* spp, Mammalia: Cervidae) *Genetic and Molecular Research*, 9 (1): 277-282.
- Maldonado, J.E.; Davila, F.O.; Stewart, B.S.; Geffen, E. & Wayne, R.K.** (1995) Intraspecific Genetic Differentiation in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from Southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*, 11 (1): 46-58.
- Márquez, A.; Maldonado, J.E.; González, S.; Beccaceci, M. D.; Garcia, J. E. & Duarte, J. M. B.** (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics*, 7: 563–575.
- Marín, J. C.; Varas, V.; Vila, A. R.; López, R.; Orozco-terWengel, P. & Corti, P.** (2013). Refugia in Patagonian fjords and the eastern Andes during the Last Glacial Maximum revealed by huemul (*Hippocamelus bisulcus*) phylogeographical patterns and genetic diversity. *Journal of Biogeography*, 40(12): 2285-2298.
- Marshall, T.** (2007) *Cervus 3.0*. Field Genetics Ltd. (c) Tristan Marshall.
- Medellín, R. A.; Gradner, A. L. & Aranda, J. M.** (1998) The taxonomic status of the Yucatán brown brocket, *Mazama Pandora*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 111: 1-14.
- Merino, M. L.; Milne, N.; Vizcaíno, S.F.** (2005) A cranial morphometric study of deer (Mammalia: Cervidae) from Argentina using three-dimensional landmarks. *Acta Theriologica*, 50: 91–108.
- Merino, M.L. & Rossi R.V.** (2010) Origin, systematics and morphological radiation. In: Duarte, J.M.B. & González, S. (Eds.) *Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN, p. 2-11.
- Miller, C.R. & 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 USA*, 100: 4334–4339.
- Minin, V.; Bloomquist, E. & Suchard, M.** (2008) Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1459- 1471.
- Montes Narbondo, E.** (2013) Cambios en el uso de uso en Uruguay 2003-2012. Parte 1. *Revista del Plan Agropecuario*, 147: 38 - 43.

Moore, S.S.; Sargeant, L.L.; King, T.J.; Mattick, J.S.; Georges, M. & Hetzel, D.J. (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10:654-660.

Moreno, F.; Figueiro, G.; Mannise, N.; Iriarte, A.; González, S.; Duarte, J.M.B. & Cosse, M. (2016) Use of next-generation molecular tools in archaeological neotropical deer sample analysis. *Journal of Archaeological Science: Reports* 10, 403–410.

Moritz, C. (1994) Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.

Moritz, C.; Dowling, T. E. & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, 269-292.

Moritz, C.; Lavery, S. & Slade, R. (1995) Using information from allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. In: Nielsen, J.L. (Ed.) *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining unique units in population conservation*, American Fisheries Society, Bethesda, MD, p. 249-262.

Mosa, S. & Goytia, M. (2004) Evaluación de la caza recreativa sobre la fauna silvestre en las provincias de Salta y Jujuy, Argentina. Congreso Internacional sobre manejo de fauna silvestre en la Amazonia y Latinoamérica, Iquitos-Perú.

Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R. K., & Hedrick, P. W. (2010) Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in genetics*, 26(4): 177-187.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I. & Strobeck, C. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347–354.

Palomares, F.; Delibes, M.; Ferreras, P.; Fedriani, J.M.; Calzada, J. & Revilla, E. (2000) Iberian Lynx in a fragmented landscape: predispersal, dispersal and postdispersal habitats. *Conservation Biology*, 14: 809-818.

Palsbøll, P.J.; Bérubé, M. & Allendorf, F.W. (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:11-16.

Parson, W.; Pegoraro, K.; Niederstätter, H.; Föger, M. & Steinlechner, M. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International journal of legal medicine*, 114(1-2): 23-28.

Pawlowski, R.; Kupiec, T. & Branicki, W. (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Science*, 48(1): 1-5.

Peres, P. (2015) Uso do espaço pelo veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*; Fisher, 1814): uma comparação entre colares GPS e DNA fecal. Tesis de Maestría, UNESP, Piracicaba-Brasil.

Phillimore, A.B. & Owens, I.P.F. (2006) Are subspecies useful in evolutionary and Conservation biology? *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 1049-1053.

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

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

Pompanon, F.; Bonin, A.; Bellemain, E. & Taberlet, P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6: 847-859.

Prates, P. (2008) Diversidade genética e historia evolutiva do lobo guará. Tesis de Doctorado en Biociencias. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil, 66 pp.

Pritchard, J.K.; Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

Pritchard, J.K.; Wena, X. & Falushb, D. (2009) Documentation for Structure software: Version 2.3.

QGIS Development Team (2014) QGIS Geographic Information System (version 2.6.0-Brighton). Open Source Geospatial Foundation Project. URL: <<http://qgis.osgeo.org>>.

Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092-2100.

Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249.

Reed, D.H. & Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17:230-237.

Rivero, K.; Rumiz, D.I. & Taber, A.B. (2005) Differential habitat use by two sympatric brocket deer species (*Mazama americana* and *M. gouazoubira*) in a seasonal Chiquitano forest of Bolivia. *Mammalia mamm*, 69(2): 169-183.

Rodrigues, T.F.; Cerveira, J.F. & Duarte, J.M.B. (2014) Uso de áreas agrícolas por *Mazama gouazoubira* (Mammalia, Cervidae) no Estado de São Paulo. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 104(4):439-445.

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.

Rogers, A.R. (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 608-615.

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

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

Schenekar, T. & Weiss, S. (2011) High rate of calculation errors in mismatch distribution analysis results in numerous false inferences of biological importance. *Heredity*, 107(6): 511.

Schneider, S. & Excoffier, L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3): 1079-1089.

Schwartz, M.K.; Luikart, G. & Waples, R.S. (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (1): 25-33.

Schwartz, M.K. & Mckelvey, K. (2009) Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation genetics*, 10(2):441-452.

Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5):615-629.

Shaw, P.W.; Pierce, G.J. & Boyle, P.R. (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8: 407-417.

Shinde, D.; Lai, Y.L.; Sun, F.Z. & 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 Acid Research*, 31: 974-980.

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

Stanton, D. W.; Helsen, P.; Shephard, J.; Leus, K.; Penfold, L.; Hart, J. & Bruford, M. W. (2015). Genetic structure of captive and free-ranging okapi (*Okapia johnstoni*) with implications for management. *Conservation Genetics*, 16(5): 1115-1126.

- Stehli, F.G & Webb, S.D.** (1985) The great American biotic interchange. Plenum Press, New York.
- Soutullo, A.; Clavijo, C. & Martinez-Lanfranco, J. A.** (2013) Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo, 222 pp.
- Taberlet, P.** (1996) The use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, 8: 129 – 136.
- Taberlet, P.; Waits, L.P. & Luikart, G.** (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8): 323-327.
- Tajima, F.** (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585-595.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. & Kumar, S.** (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
- Taylor, P.D.; Fahrig, L.; Henein, K. & Merriam, G.** (1993) Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, 68: 571-573.
- Templeton, A.R.; Routman, E. & Philips, C.A.** (1995) Separating population structure from population history - a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial haplotypes in the Tiger Salamander *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782.
- Untergrasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M. & Rozen, S.G.** (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Willis, D.P.M. & Shipley, P.** (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.
- Vargas-Munar, D.S.** (2003) Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entrecromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de Cervídeos brasileiros. Tesis de Maestría. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-Brasil.
- Vila, C.; Amorim, I.R.; Leonard, J.A.; Posada, D.; Castroviejo, J.; Petrucci- Fonseca, F.; Crandall, K.A.; Ellegren, H. & Wayne, R.K.** (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8: 2089 –2103.
- Vogliotti, A. & Duarte, J.M.B.** (2009). Discovery of the first wild population of the small red brocket deer *Mazama bororo* (Artiodactyla: Cervidae). *Mastozoología Neotropical*, 16.

- Vuilleumier, B. S.** (1971). Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173(3999): 771-780.
- Wandeler, P.; Smith, S.; Morin, P.A.; Pettifor, R.A. & Funk, S.M.** (2003) Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12, 1087–1093.
- Wang, C.; Schroeder, K.B. & Rosenberg, N.A.** (2012) A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, 192: 651-669.
- Wattier, R.; Engel, C.R.; Saumitou-Laprade, P. & 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: 1569–1573.
- Wayne, R.K. & Morin, P.A.** (2004) Conservation genetics in the new molecular age. *Frontiers in Ecology and The Environment*, 2(2):89- 97.
- Webb, S.D.** (2000) Evolutionary history of new world deer. In: Vrba, E.S. & Shaller, G.B. (Eds.) *Antelopes, Deer, and Relatives*. Yale University Press, London. p 38–64.
- Weber, M. & Gonzalez, S.** (2003). Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. *Ecoscience*, 10(4): 443-454.
- Wei, F.; Rao, G.; Li, M.; Fang, S. & Feng, Z.** (2000). Molecular scatology and its application: Reliability, limitation and prospect. *Acta theriologica sinica*, 21(2):143-152.
- Weir, B.S.** (1996) *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates. Sunderland, Mass.
- Wemmer, C.** (1998) *Deer Status, survey and Conservation Action Plan*. IUCN Deer Specialist group. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK, 106 pp.
- Wilson, G.A.; Strobeck, C.; Wu, L. & Coffin, J.W.** (1997). Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*, 6: 697-699.
- Wright, S.** (1978) *Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise in Four Volumes: Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, USA, 580 pp.
- Zane, L.; Bargelloni, L. & Patarnello, T.** (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1):1-16.
- Zink, R.M.** (2004) The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London b*, 271: 561-564.

ANEXOS

ANEXO I. Muestras relevadas

Anexo I.a. Listado de muestras colectadas en distintos puntos de Uruguay, relevadas en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (acrónimo MNHN), Facultad de Ciencias (acrónimo ZVCM) y Departamento de Biodiversidad y Genética (acrónimos ANI, MSG, MF, BV y LC) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Nº	ID IIBCE	ID COLECCIÓN ORIGEN	ESPECIE	COLECTA_Lug	DEPARTAMENTO	AÑO	Tipo de muestra
1	ANI_07		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
2	ANI_08		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
3	ANI_09		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
4	ANI_12		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
5	ANI_13		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
6	ANI_15		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
7	ANI_16		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
8	ANI_17		Posible M. gouazoubira	BOTNIA_Fray_Bentos	Río Negro	2003	FECA
9	ANI_20		Posible M. gouazoubira	***	Maldonado	2004	FECA
10	ANI_46		Posible M. gouazoubira	Paso_Centurion	Cerro Largo	2011	FECA
11	ANI_49		Posible M. gouazoubira	Quebrada_de_los_Cuervos	Treinta y Tres	2012	FECA
12	ANI_68		Posible M. gouazoubira	Paso_Centurion	Cerro Largo	2012	FECA
13	ANI_71		Posible M. gouazoubira	Paso_Centurion	Cerro Largo	2012	FECA
14	ANI_82		Posible M. gouazoubira	Polanco_del_Yi	Durazno	2013	FECA
15	ANI_99		Posible M. gouazoubira	Paso_Centurion	Cerro Largo	2013	FECA
16	BV1_01		M. gouazoubira	Predio_Buena_Vista_COLONVADE	Rivera	2008	FECA
17	BV1_02		M. gouazoubira	Predio_Buena_Vista_COLONVADE	Rivera	2008	FECA
18	BV1_03		M. gouazoubira	Predio_Buena_Vista_COLONVADE	Rivera	2008	FECA
19	BV1_08		M. gouazoubira	Predio_Buena_Vista_COLONVADE	Rivera	2008	FECA
20	BV1_13		Posible M. gouazoubira	Predio_Buena_Vista_COLONVADE	Rivera	2008	FECA
21	LC_1		M. gouazoubira	Predio_La_Corona_COLONVADE	Tacuarembó	2008	FECA
22	LC_2		M. gouazoubira	Predio_La_Corona_COLONVADE	Tacuarembó	2008	FECA

23	LC_3		M. gouazoubira	Predio_La_Corona_COLONVADE	Tacuarembó	2008	FECA
24	MF_01		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	FECA
25	MF_02		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	FECA
26	MF_03		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	FECA
27	MF_04		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	FECA
28	MF_05		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	FECA
29	MF_06		M. gouazoubira	FYMSA	Rivera	2003	FECA
30	MF_07		M. gouazoubira	FYMSA	Rivera	2003	FECA
31	MF_08		M. gouazoubira	FYMSA	Rivera	2003	FECA
32	MF_09		M. gouazoubira	***	***	2004	FECA
33	MF_10		M. gouazoubira	Cerro_Boquerón_Lunarejo	Rivera	2013	FECA
34	MF_11		M. gouazoubira	Laureles	Tacuarembó	2013	FECA
35	MF_12		M. gouazoubira	Gruta_de_los_Helechos	Tacuarembó	2013	FECA
36	MF_13		M. gouazoubira	Cascada_de_Sonia_Laureles	Tacuarembó	2013	FECA
37	MF_14		M. gouazoubira	Cuchilla_Negra	Rivera	2013	FECA
38	MF_15		M. gouazoubira	Cuchilla_Negra	Rivera	2013	FECA
39	MF_16		M. gouazoubira	Cuchilla_Negra	Rivera	2013	FECA
40	MF_17		M. gouazoubira	Cuchilla_Negra	Rivera	2013	FECA
41	MF_18		M. gouazoubira	Cuchilla_Negra	Rivera	2013	FECA
42	MF_19		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
43	MF_20		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
44	MF_21		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
45	MF_22		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
46	MF_23		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
47	MF_24		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
48	MF_25		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
49	MF_26		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
50	MF_27		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
51	MF_28		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
52	MF_29		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
53	MF_30		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
54	MF_31		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
55	MF_32		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
56	MF_33		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
57	MF_34		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
58	MF_35		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
59	MF_36		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
60	MF_37		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
61	MF_38		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
62	MF_39		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
63	MF_40		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA

64	MF_41		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
65	MF_42		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
66	MF_43		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
67	MF_44		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
68	MF_45		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
69	MF_46		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
70	MF_47		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
71	MF_48		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
72	MF_49		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
73	MF_50		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
74	MF_51		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
75	MF_52		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
76	MF_53		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
77	MF_54		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
78	MF_55		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
79	MF_56		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
80	MF_57		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
81	MF_58		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
82	MF_59		M. gouazoubira	Parque_Nacional_San_Miguel	Rocha	2013	FECA
83	MF_60		M. gouazoubira	Parque_Potrерillo de Santa_Teresa	Rocha	2013	FECA
84	MF_61		M. gouazoubira	Parque_Potrерillo de Santa_Teresa	Rocha	2013	FECA
85	MF_62		M. gouazoubira	Parque_Potrерillo de Santa_Teresa	Rocha	2013	FECA
86	MF_63		M. gouazoubira	Cabo_Polonio	Rocha	2014	FECA
87	MF_64		M. gouazoubira	Cabo_Polonio	Rocha	2014	FECA
88	MF_65		M. gouazoubira	Cabo_Polonio	Rocha	2014	FECA
89	MF_66		M. gouazoubira	Cabo_Polonio	Rocha	2014	FECA
90	MF_76		M. gouazoubira	Sierra_del_Caracol	Maldonado	2014	FECA
91	MF_77		M. gouazoubira	Quebrada_de_los_Cuervos	Treinta y Tres	2014	FECA
92	MF_78		M. gouazoubira	Quebrada_de_los_Cuervos	Treinta y Tres	2014	FECA
93	MSG_001		M. gouazoubira	Minas	Lavalleja	1994	SANGRE
94	MSG_002		M. gouazoubira	Estación_de_cría_Pan_de_Azúcar	Maldonado	1994	PELOS
95	MSG_004		M. gouazoubira	Pan_de_Azúcar	Maldonado	1994	PELOS
96	MSG_006		M. gouazoubira	Villa_Dolores	Montevideo	1995	PELOS
97	MSG_007		M. gouazoubira	Zoo_de_Salto	Salto	1995	PELOS
98	MSG_008		M. gouazoubira	Zoo_San_Carlos	Maldonado	1995	PELOS
99	MSG_009		M. gouazoubira	Zoo_San_Carlos	Maldonado	1995	PELOS
100	MSG_010		M. gouazoubira	Zoo_San_Carlos	Maldonado	1995	PELOS
101	MSG_037		M. gouazoubira	Zoo_Minias	Lavalleja	1998	PELOS
102	MSG_038		M. gouazoubira	Zoo_Minias	Lavalleja	1998	PELOS
103	MSG_039		M. gouazoubira	Zoo_Minias	Lavalleja	1997	PELOS
104	MSG_040		M. gouazoubira	Zoo_Minias	Lavalleja	1998	PELOS

105	MSG_046		M. gouazoubira	Don_Bosco	Rocha	1999	FECA
106	MSG_047		M. gouazoubira	Don_Bosco	Rocha	1999	FECA
107	MSG_050		M. gouazoubira	San_Carlos	Maldonado	1999	SANGRE
108	MSG_051	N°2 P. Lecocq/chip: 021091295	M. gouazoubira	Parque_Lecocq	Tacuarembó	1999	SANGRE
109	MSG_052		M. gouazoubira	Parque_Lecocq	Montevideo	1999	SANGRE
110	MSG_062	18	M. gouazoubira	Parque_Lecocq	Montevideo	2000	?
111	MSG_063		M. gouazoubira	Parque_Lecocq	Rivera	2000	SANGRE
112	MSG_069		M. gouazoubira	Valle_Eden	Tacuarembó	2004	TEJIDO
113	MSG_084		M. gouazoubira	Artigas	Artigas	2006	PELOS
114	MSG_085		M. gouazoubira	M`Bopicua	Río Negro	2006	PELOS
115	MSG_086		M. gouazoubira	Arroyo_Quebracho	Paysandú	2010	FECA
116	MSG_088		M. gouazoubira	Aguas_Blancas	Lavalleja	2007	PELOS
117	MSG_089		M. gouazoubira	Laguna_de_Rocha	Rocha	2009	PELOS
118	MSG_090		M. gouazoubira	Arroyo_Quebracho	Paysandú	2010	FECA
119	MSG_091		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
120	MSG_092		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
121	MSG_093		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
122	MSG_094		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
123	MSG_095		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
124	MSG_096		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2013	FECA
125	MSG_097		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
126	MSG_098		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
127	MSG_099		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2011	FECA
128	MSG_100		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
129	MSG_101		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
130	MSG_102		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
131	MSG_103		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
132	MSG_104		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
133	MSG_105		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
134	MSG_106		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
135	MSG_107		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
136	MSG_108		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
137	MSG_109		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
138	MSG_110		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
139	MSG_111		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
140	MSG_112		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
141	MSG_113		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
142	MSG_114		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
143	MSG_115		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
144	MSG_116		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA

145	MSG_117		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
146	MSG_118		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2012	FECA
147	MSG_119	MNHN1380	M. gouazoubira	Sierra_del_Infiernillo	Tacuarembó	1961	HUESO
148	MSG_120	MNHN6266	M. gouazoubira	SD	Maldonado	2004	HUESO
149	MSG_121	MNHN 7357	M. gouazoubira	Paso_del_Arroyo_Sarandí	Cerro Largo	1999	HUESO
150	MSG_122		M. gouazoubira	A°_Laureles	Tacuarembó	2013	TEJIDO
151	MSG_123	MNHN 1383	M. gouazoubira	Proximidades_Cerro_Lunarejo	Rivera	1957	HUESO
152	MSG_124	MNHN2604	M. gouazoubira	Parque_de_vacaciones_de_UTE	Lavalleja	1972	HUESO
153	MSG_125	MNHN3127	M. gouazoubira	Rincón_da_Vassoura	Tacuarembó	1962	HUESO
154	MSG_126	MNHN 3339	M. gouazoubira	Km_110_R.64	Lavalleja	1991	HUESO
155	MSG_127	MNHN5501	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2004	HUESO
156	MSG_128	MNHN5503	M. gouazoubira	Cascada_sobre_el_Solís	SD	2004	HUESO
157	MSG_129	MNHN 5504	M. gouazoubira	Parque_Salus_Camino_a_la_fuente	Lavalleja	2004	HUESO
158	MSG_130	MNHN 5507	M. gouazoubira	Zona_Suroeste_del_embalse_en_Parque_Salus	Lavalleja	2004	HUESO
159	MSG_131	MNHN6265	M. gouazoubira	Cerro_de_Ánimas	Maldonado	2004	HUESO
160	MSG_132	MNHN 7291	M. gouazoubira	Valle_del_Lunarejo	Rivera	2011	HUESO
161	MSG_133	MNHN 7630	M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2013	HUESO
162	MSG_134	MNHN 7631	M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2013	HUESO
163	MSG_135	MNHN 7632	M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2013	HUESO
164	MSG_136		M. gouazoubira	***	Cerro Largo	2013	HUESO
165	MSG_137		M. gouazoubira	Barra_del_Chuy	Rocha	2013	TEJIDO
166	MSG_138		M. gouazoubira	Parque_Santa_Teresa	Rocha	2014	PELOS Y FECA
167	MSG_139		M. gouazoubira	Laureles	Tacuarembó	2014	HUESO
168	MSG_140	ZVCM 1769	M. gouazoubira	Gajo_Lunarejo_Campo_Abelenda	Rivera	1995	HUESO
169	MSG_141	ZVCM 1330	M. gouazoubira	Cerro_Pan_de_Azúcar	Maldonado	1956	HUESO
170	MSG_142	ZVCM 50	M. gouazoubira	Quebrada_de_los_Cuervos	Treinta y Tres	1953	HUESO
171	MSG_143	ZVCM 5517	M. gouazoubira	Valle_del_Lunarejo	Rivera	2005	HUESO
172	MSG_144	ZVCM 5546	M. gouazoubira	Potrerillo_de_Santa_Teresa	Rocha	2000	HUESO
173	MSG_145		M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2014	PELOS Y TEJIDO
174	MSG_325		M. gouazoubira	San_Carlos	Maldonado	1998	SANGRE
175	MSG_330		M. gouazoubira	SD	Tacuarembó	1998	SANGRE
176	ZVCM_1730	ZVCM 1730	M. gouazoubira	Zoo_San_Carlos	Maldonado	1993	HUESO
177		MNHN 0694	M. gouazoubira	Estancia_Mascarenhas,_A°_Laureles_(gajo_norte_del_arroyo_Laureles,_en_la_estancia_Maskarenhas,_departamento_de_Rivera)	Tacuarembó	SD	HUESO
178		MNHN 0695	M. gouazoubira	Laureles	Tacuarembó	1956	HUESO
179	MSG_146	MNHN 0696	M. gouazoubira	Cerro_de_Ánimas	Maldonado	1958	HUESO
180	MSG_147	MNHN 0895	M. gouazoubira	Cerro_de_Ánimas	Maldonado	1958	HUESO
181		MNHN 1244	M. gouazoubira	Cañada_Los_Ombúes_del_Plata,_Cerro_d_e_Ánimas	Maldonado	1962	HUESO
182		MNHN 1329	M. gouazoubira	Estancia_la_Querencia,_Cerro_Travieso,_	Tacuarembó	SD	HUESO

				Sierra_del_Infiernillo			
183		MNHN 1381	M. gouazoubira	Sierra_del_Infiernillo	Tacuarembó	1963	HUESO
184		MNHN 2581	M. gouazoubira	Arroyo_La_Invernada	Artigas	1972	HUESO
185	MSG_148	MNHN 2585	M. gouazoubira	Arroyo_La_Invernada	Artigas	1972	HUESO
186	MSG_149	MNHN 3067	M. gouazoubira	R.12_a_28km_de_minas_4°_seccional	Maldonado	1985	HUESO
187		MNHN 3068	M. gouazoubira	Km_23_R.60	Lavalleja	1986	HUESO
189		MNHN 3167	M. gouazoubira	Aguas_Blancas,_R.8_km_92	Lavalleja	1989	HUESO
190	MSG_150	MNHN 3336	M. gouazoubira	Las_Delicias	Maldonado	1987	HUESO
191		MNHN 3338	M. gouazoubira	10km_Minas	Lavalleja	1991	HUESO
192		MNHN 3368	M. gouazoubira	Gregorio_Aznaves	Maldonado	SD	HUESO
193		MNHN 3839	M. gouazoubira	Sierra_de_Ríos	Cerro Largo	1907	HUESO
194		MNHN 5502	M. gouazoubira	Parque_Salus	Lavalleja	2004	HUESO
195		MNHN 5505	M. gouazoubira	SD	Rivera	2004	HUESO
196		MNHN 5506	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
197		MNHN 6409	M. gouazoubira	Dunas_Cabo_Polonio_Km264_R.10	Rocha	2007	HUESO
198	MSG_153	MNHN 6425	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
199		MNHN 6426	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
200	MSG_154	MNHN 6434	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
201		MNHN 6435	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
202	MSG_155	MNHN 6436	M. gouazoubira	Estancia_Los_Abuelos_"FYMSA"	Rivera	2003	HUESO
203	MSG_156	MNHN 7292	M. gouazoubira	Valle_del_Lunarejo	Rivera	2011	HUESO
204		MNHN 7293	M. gouazoubira	Valle_del_Lunarejo	Rivera	2011	HUESO
205		ZVCM 1776	M. gouazoubira	Gajo_Lunarejo_Campo_Abelenda	Rivera	1995	HUESO
206		ZVCM 5524	M. gouazoubira	Gajo_Lunarejo_Campo_Abelenda	Rivera	1995	HUESO

Anexo I.b. Listado de muestras colectadas en Brasil, Argentina, Paraguay y Bolivia relevadas en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (acrónimo MNHN), Facultad de Ciencias (acrónimo ZVCM) y Departamento de Biodiversidad y Genética (acrónimos MSG y MGT) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Nº	ID IIBCE	ID COLECCIÓN ORIGIN	ESPECIE	PAÍS	LOCALIDAD	Punto de colecta	AÑO
1	MSG 03		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1994
2	MSG 05		M. gouazoubira	Argentina	Corrientes	Laguna_Ibera	1995
3	MSG 11		M. gouazoubira	Argentina	Santa Fe	Reconquista	S/ fecha
4	MSG 12		M. gouazoubira	Bolivia	Santa Cruz	Santa_Cruz_ZOO	1997
5	MSG 14		M. gouazoubira	Bolivia	Santa Cruz	Santa_Cruz_ZOO	1997
6	MSG 15		M. gouazoubira	Bolivia	Santa Cruz	Santa_Cruz_ZOO	1997
7	MSG 17		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997
8	MSG 18		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997
9	MSG 19		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997

10	MSG 20		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Municipio_ITU	1997
11	MSG 21		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997
12	MSG 22		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Municipio_ITU	1997
13	MSG 23		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997
14	MSG 24		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Votorantim	1997
15	MSG 25		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1997
16	MSG 26		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Santa_Ana_do_Paranaiba	1998
17	MSG 27		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sao_Roque	1998
18	MSG 28		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
19	MSG 30		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
20	MSG 31		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
21	MSG 32		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
22	MSG 33		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
23	MSG 34		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
24	MSG 35		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
25	MSG 36		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1998
26	MSG 41		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1999
27	MSG 42		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1999
28	MSG 43		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO_(Piedade,_Sao_Paulo)	1999
29	MSG 44		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1999
30	MSG 45		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO_(Salto_de_Pirapora)	1999
31	MSG 48		M. gouazoubira	Paraguay	Asunción	Asunción_ZOO	1999
32	MSG 49		M. gouazoubira	Paraguay	Asunción	Asunción_ZOO	1999
33	MSG 53		M. gouazoubira	Brasil	Paraná	Hacienda_Municipio_de_Lapa	2000
34	MSG 55		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Iperó_Flona	1999
35	MSG 56		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Jundiáí	1999
36	MSG 57		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Jundiáí	1999
37	MSG 58		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Iperó_Flona	1999
38	MSG 59		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1999
39	MSG 60		M. gouazoubira	Brasil	San Pablo	Aracoiaba_da_Serra	2000
40	MSG 61		M. gouazoubira	Brasil	Santa Catarina	Florianópolis	2000
41	MSG 64		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2001
42	MSG 65		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Sur_Tucumán	2002
43	MSG 66		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Este_Tucumán_Límite_Santiago_del_Estero	2002
44	MSG 68		M. gouazoubira	Argentina	Corrientes	Santo_Tomé	2004
45	MSG 71		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2001
46	MSG 72		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2002
47	MSG 73		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2002
48	MSG 74		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2003
49	MSG 75		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2002

50	MSG 76		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2004
51	MSG 77		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2004
52	MSG 78		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	2005
53	MSG 79		M. gouazoubira	Argentina	Tucumán	Tucumán	S/ fecha
54	MSG 81		M. gouazoubira	Argentina	Santa Fé	Don_Cristobal	2006
55	MSG 87		M. gouazoubira	Argentina	Corrientes	Mburucuya	2008
56		MNHN 697	M. gouazoubira	Venezuela	Bolívar	Río_Erebato_Orinoco	1957
57	MSG 151	MNHN 3099	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso	Pantanal_del_Tacuari_próximo_Río_Negro_Estancia_Campo_CyrS/ fecha a	
58	NA	MNHNP 804	M. gouazoubira	Paraguay	Alto Paraguay	Parque_Nacional_Defensores_d el_Chaco	
59	NA	MNHNP 805	M. gouazoubira	Paraguay	Alto Paraguay	Parque_Nacional_Defensores_d el_Chaco	
60	NA	MNHNP 806	M. gouazoubira	Paraguay	Boquerón	Agua_Dulce	
61	NA	MNHNP 807	M. gouazoubira	Paraguay	Boquerón	Agua_Dulce	
62	NA	MNHNP 1902	M. gouazoubira	Paraguay	Itapúa	Isla_Yacyretá	
63	NA	MNHNP 1909	M. gouazoubira	Paraguay	Itapúa	Isla_Yacyretá	
64	NA	MNHNP 3269	M. gouazoubira	Paraguay	Naranhaty	UTM_21H_467435_7376494	
65	NA	ND 2	Posible guazubirá	Paraguay	***	***	
66	MGT 14	T 014	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso	Rosario_do_Oeste	
67	MGT 15	T 015	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso	Tangará_da_Serra	
68	MGT 69	T069	M. gouazoubira	Brasil	Paraná	Rio_Branco_do_Sul	
69	MGT 77	T 077	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Alegrete	
70	MGT 79	T 079	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Santo_Antonio_da_Patrolha	
71	MGT 83	T 083	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Julio_de_Castilho	
72	MGT 101	T 101	M. gouazoubira	Brasil	Paraná	Palmas	
73	MGT 106	T 106	M. gouazoubira	Paraguay	Alto Paraná	Hernandarias	
74	MGT 111	T 111	M. gouazoubira	Brasil	Sao Paulo	Jundaí	
75	MGT 128	T 128	M. gouazoubira	Brasil	Minas Gerais	Fazenda_Alegria	
76	MGT 155	T 155	M. gouazoubira	Brasil	Minas Gerais	Fazenda_Alegria	
77	MGT 158	T 158	M. gouazoubira	Brasil	Minas Gerais	Fazenda_Alegria	
78	MT 209	T 209	M. gouazoubira	Brasil	Sao Paulo	Intervales_State_Park	

Anexo I.c. Listado de muestras relevadas en NUPECCE, Jaboticabal, Brasil incorporadas en esta tesis.

Nº	ID COLECCIÓN ORIGEN	ESPECIE	PAÍS	LOCALIDAD	Punto de colecta
1	T 048	M. gouazoubira	Brasil	Espirito Santo	Aracruz
2	T 075	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Gramado
3	T 076	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Gramado
4	T 091	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Candiota
5	T 092	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Sul	Candiota
6	T 131	M. gouazoubira	Brasil	Minas Gerais	Divinopolis

7	T 132	M. gouazoubira	Brasil	Minas Gerais	Curvelo
8	T 134	M. gouazoubira	Brasil	Bahia	Juazeiro
9	T 135	M. gouazoubira	Brasil	Pernambuco	Petrolina
10	T 138	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Norte	Mossoró
11	T 139	M. gouazoubira	Brasil	Rio Grande do Norte	***
12	T 180	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso do Sul	Fazenda_Alegria
13	T 193	M. gouazoubira	Brasil	Goias	Serra_de_Mesa
14	T 194	M. gouazoubira	Brasil	Goias	Serra_de_Mesa
15	T 195	M. gouazoubira	Brasil	Goias	Serra_de_Mesa
16	T 196	M. gouazoubira	Brasil	Goias	Serra_de_Mesa
17	T273	M. gouazoubira	Brasil	Sao Paulo	***
18	T317	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso do Sul	Pantanal
19	T318	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso do Sul	Pantanal
20	T319	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso do Sul	Pantanal
21	T320	M. gouazoubira	Brasil	Mato Grosso do Sul	Pantanal
22	T323	M. gouazoubira	Brasil	Sao Paulo	***
23	T348	M. gouazoubira	Brasil	Sao Paulo	***
24	T352	M. gouazoubira	Brasil	Parana	***
25	T354	M. gouazoubira	Brasil	Ceara	***
26	T355	M. gouazoubira	Brasil	Goias	***

ANEXO II. Muestras analizadas

Anexo II.a. Listado de muestras incorporadas en este trabajo para el análisis de secuencias de ADN mitocondrial.

ID	Nombre	Secuencia disponible	Tamaño	Cita
1	8-26	D LOOP	159 pb	Grattarola et al., 2015
2	14-11	D LOOP	159 pb	Grattarola et al., 2015
3	16-12	D LOOP	159 pb	Grattarola et al., 2015
4	ANI 015	D LOOP	159 pb	***
5	ANI 016	D LOOP	159 pb	***
6	ANI 017	D LOOP	159 pb	***
7	ANI 049	D LOOP	159 pb	***
8	ANI 068	D LOOP	159 pb	***
9	ANI 071	D LOOP	159 pb	***
10	BV 1 01	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
11	BV 1 02	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
12	BV 1 03	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
13	BV 1 08	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
14	LC 003	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
15	LC 2	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	***
16	MF 001	D LOOP	159 pb	***
17	MF 002	D LOOP	159 pb	***
18	MF 003	D LOOP	159 pb	***
19	MF 006	D LOOP	159 pb	***
20	MF 007	D LOOP	159 pb	***
21	MF 008	D LOOP	159 pb	***
22	MF 013	D LOOP	159 pb	***
23	MF 015	D LOOP	159 pb	***
24	MF 016	D LOOP	159 pb	***
25	MF 017	D LOOP	159 pb	***
26	MF 018	D LOOP	159 pb	***
27	MF 019	D LOOP	159 pb	***
28	MF 020	CIT B PIA	200 pb	***
29	MF 023	D LOOP	159 pb	***

30	MF 031	D LOOP	159 pb	***
31	MF 032	D LOOP	159 pb	***
32	MF 036	D LOOP	159 pb	***
33	MF 044	CIT B PIA	200 pb	***
34	MF 059	CIT B PIA	200 pb	***
35	MF 060	D LOOP	159 pb	***
36	MF 062	D LOOP	159 pb	***
37	MF 063	D LOOP	159 pb	***
38	MF 064	D LOOP	159 pb	***
39	MF 065	D LOOP	159 pb	***
40	MF 066	D LOOP	159 pb	***
41	MF 076	D LOOP	159 pb	***
42	MF 077	D LOOP	159 pb	***
43	MNHN 1380	D LOOP	159 pb	***
44	MNHN 2604	D LOOP	159 pb	***
45	MNHN 3127	D LOOP	159 pb	***
46	MNHN 5501	D LOOP	159 pb	***
47	MNHN 6266	D LOOP	159 pb	***
48	MNHN 7357	D LOOP	159 pb	***
49	MNHN 7632	D LOOP	159 pb	***
50	MNHNP 1909	D LOOP	159 pb	***
51	MNHNP 804	D LOOP	159 pb	***
52	MNHNP 806	D LOOP	159 pb	***
53	MNHNP 807	D LOOP	159 pb	***
54	MSG 001	CIT B	985 pb	***
		D LOOP	443 pb	***
55	MSG 011	D LOOP	159 pb	***
56	MSG 012	D LOOP	159 pb	***
57	MSG 014	CIT B	985 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
58	MSG 015	D LOOP	159 pb	***
59	MSG 018	D LOOP	159 pb	***
60	MSG 019	D LOOP	159 pb	***
61	MSG 020	D LOOP	159 pb	***
62	MSG 026	D LOOP	159 pb	***
63	MSG 033	CIT B	260 pb	***
		CIT B	423 pb	***
64	MSG 033	D LOOP	159 pb	***
65	MSG 034	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	***
		CIT B	423 pb	***

66	MSG 035	D LOOP	159 pb	***
67	MSG 036	CIT B	260 pb	***
		CIT B	423 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
68	MSG 039	D LOOP	159 pb	***
69	MSG 040	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	***
70	MSG 043	CIT B	985 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
71	MSG 044	CIT B	260 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
72	MSG 045	CIT B	985 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
73	MSG 048	CIT B	260 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
74	MSG 050	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
75	MSG 051	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
76	MSG 052	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
77	MSG 053	CIT B	985 pb	Gen Bank
78	MSG 055	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
79	MSG 056	CIT B	423 pb	Bidegaray, 2003
80	MSG 055	D LOOP	159 pb	
81	MSG 060	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
82	MSG 061	CIT B	985 pb	Gen Bank
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
83	MSG 063	CIT B	320 pb	Gen Bank
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
84	MSG 064	CIT B	985 pb	Gen Bank
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
85	MSG 065	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
86	MSG 066	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
87	MSG 068	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
88	MSG 070	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
89	MSG 074	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
90	MSG 075	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
91	MSG 076	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
92	MSG 077	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
93	MSG 079	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010

94	MSG 085	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
95	MSG 088	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
96	MSG 089	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
97	MSG 091	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
98	MSG 092	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
99	MSG 094	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
100	MSG 099	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
101	MSG 100	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
102	MSG 101	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
103	MSG 105	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
104	MSG 107	D LOOP	159 pb	***
		CIT B PIA	159 pb	***
105	MSG 109	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
106	MSG 110	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
107	MSG 112	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
108	MSG 114	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
109	MSG 116	CIT B PIA	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
110	MSG 136	D LOOP	159 pb	***
111	MSG 137	IDMAZ	200 pb	***
		D LOOP	159 pb	***
112	MSG 138	D LOOP	159 pb	***
113	MSG 139	D LOOP	159 pb	***
114	MSG 325	D LOOP	159 pb	***
		CIT B	985 pb	Gen Bank
115	MSG 330	CIT B	985 pb	Gen Bank
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
116	T 014	D LOOP	600 pb	***
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013

117	T 015	D LOOP	600 pb	***
118	T 026	D LOOP	600 pb	***
119	T 048	D LOOP	600 pb	***
120	T 069	CIT B	985 pb	Gen Bank
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
121	T 075	D LOOP	600 pb	***
122	T 076	D LOOP	600 pb	***
123	T 077	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
124	T 079	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
125	T 083	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
126	T 091	D LOOP	600 pb	***
127	T 092	D LOOP	600 pb	***
128	T 101	CIT B	985 pb	Gen Bank
		D LOOP	600 pb	***
129	T 106	D LOOP	600 pb	***
130	T 111	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
131	T 112	CIT B	985 pb	Gen Bank
132	T 113	CIT B	985 pb	Gen Bank
133	T 125	D LOOP	159 pb	***
134	T 128	D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
135	T 129	D LOOP	159 pb	***
136	T 131	D LOOP	600 pb	***
137	T 132	D LOOP	600 pb	***
138	T 134	D LOOP	159 pb	***
139	T 135	CIT B	320 pb	Gen Bank
140	T 138	D LOOP	600 pb	***
		CIT B	320 PB	Gen Bank
141	T 139	D LOOP	600 pb	***
142	T 155	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	600 pb	Aristimuño, 2013
143	T 158	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	600 pb	Aristimuño, 2013
144	T 180	D LOOP	159 pb	***
145	T 194	D LOOP	600 pb	***
146	T 196	D LOOP	600 pb	***
147	T 209	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	159 pb	Aristimuño, 2013
148	T 273	D LOOP	600 pb	***
149	T 317	D LOOP	600 pb	***
150	T 318	D LOOP	600 pb	***

151	T 319	D LOOP	600 pb	***
152	T 320	D LOOP	600 pb	***
153	T 323	D LOOP	600 pb	***
154	T 348	D LOOP	600 pb	***
155	T 352	D LOOP	600 pb	***
156	T 354	D LOOP	600 pb	***
157	T 355	D LOOP	600 pb	***
158	ZVCM 1730	CIT B	260 pb	Elizondo, 2010
		D LOOP	443 pb	Gen Bank
159	ZVCM 1769	D LOOP	159 pb	***
160	ZVCM 5517	D LOOP	159 pb	***

*** Corresponden a secuencias obtenidas en el marco de la realización de esta tesis

Anexo II.b Listado de muestras incorporadas en este trabajo para el análisis de loci de microsatélites.

Nombre	Loci genotipados	Total
ANI 12	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
ANI 15	CSSM 41, TGLA 10, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16	5
ANI 16	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
ANI 68	CSSM 41, TGLA 10, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	6
BV 01 1	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
LC 1	TGLA 10, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16	4
MF 10	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 21	7
MF 12	BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	7
MF 13	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
MF 16	CSSM 41, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	6
MF 19	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 21	7
MF 31	GOUA 10, GOUA 8, GOUA 25, RT 09, GOUA 24, BM 203, GOUA 07, GOUA 03, TGLA 10	9
MF 32	GOUA 10, GOUA 8, GOUA 25, RT 09, GOUA 24, BM 203, GOUA 07, GOUA 03, BM 757, TGLA 10	10
MF 34	BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16	6
MF 51	BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 21	6
MF 57	CSSM 41, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	5
MF 60	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
MF 64	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 24, GOUA 21	6
MF 76	BM 203, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	6
MF 78	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 21	7
MSG 109	CSSM 41, BM 203, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	7
MSG 111	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8
MSG 124	CSSM 41, BM 203, TGLA 10, BM 757, GOUA 25, GOUA 24, GOUA 16, GOUA 21	8

ACTATTACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAATTATATTATACTACATATGCTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGACA
AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAATACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T194

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGC
GCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGAAGCTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
ACTATTACATAATATGTCCTAGTACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTATATATGCTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGAC
AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T158

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCA
CTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAGTTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTA
CTATTACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T323

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGC
GCTATGTACGGTCAATGATGTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
ACTATTACATAATATGTCCTAGTACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTATATATGCTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGAC
AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T348

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACGATTAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGT
GCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTACAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATATAATGT
ACTATTACATAGTATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTACATATGTTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAATAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGACA
AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T155

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCA
CTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTA
CTATTACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAATTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGCTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T319

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGT
 GCCATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTATAATTAATATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGTATATAATGTAATGT
 ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGACTATACACACGTGAAATTATATTGACTACATATGCTATGTAGTTTAT
 GTAATTAATAATAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAAATTGTATTAATTATTAAGATTTTTGAAAATTTAATACTGACA
 AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTGCCTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
 CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T075

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGC
 GCTATGTACGATCAATGATGTTATGACTATGACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATATAATGT
 ACTATTATACATAATATGTCCTAGTACATTAATTTTATGACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTATATATGCTATGTAGTTTAT
 GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTACTAAAGATTTTTGAAAATTTCAATACTGAC
 AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGCACGTGAGGGAATAGTTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
 GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T091

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGC
 GCTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
 ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTAT
 GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTACTAAAGATTTTTGAAAATTTAATACTGAC
 AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTGAGGGAATAGTTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
 GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T131

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAACGGATTTGACTTAATGC
 ACTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
 ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGACTATACACACGTGAAATTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTAT
 GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTACTAAAGATTTTTGAAAATTTAATACTGAC
 AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTGAGGGAATAGTTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
 GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T132

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGT
 GCTATGTACGATCAATAACTATGACTATGACTGTAATTAATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
 ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGACTATACACACGTAAAATCATATTATACTACATATGCTATGTAGTTTAT
 GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTATTAAGATTTTTGAAAATTTAATACTGATA
 AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTGCCTCAGGGAATAGTTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGG
 CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T273

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
 TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCA
 CTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTA

CTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTAATAACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTAATATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAATAAGATTTTTGGAAATTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGGC
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T092

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGT
GCTATGTACGATCAATAACTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
ACTATTATACATAGTATGTCCTAATACATTAATTTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
GTAATTAATAGTAATTAATTAATATAATAGCTATTGAGTGAAAACTGTATTAATTAATAAAGATTTTTGAAAAATTAATACTGACA
AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T196

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGC
ACTATGTACGATCAATAACTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
GTAATTAATAGTAATTAATTAATATAATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAATAAAGATTTTTGAAAAATTAATACTGAC
AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T076

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGC
GCTATGTACGATCAATGATGTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
ACTATTATACATAATATGTCCTAGTACATTAATTTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
GTAATTAATAGTAATTAATTAATATAATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAATAAAGATTTTTGAAAAATTAATACTGAC
AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T139

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGT
GCCATGTACGATCAATAACTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
GTAATTAATAGTAATTAATTAATATAATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAATAAAGATTTTTGAAAAATTAATACTGACA
AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T048

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGT
GCTATGTACGATCAATAACTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
ACTATTATACATAATATGTCCTAGTACATTAATTTTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAAATAGCTATGTAATAA
GTAATTAATAGTAATTAATTAATATAATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAATAAAGATTTTTGAAAAATTAATACTGAC
AAGGCTCTGAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTTAAATAGAACTTCAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T138

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAAATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGT
GCCATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTAAAAATTTTATTATATTACATATGTTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTATTAAGATTTTTGAAAATTTAATACTGACA
AGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTGCCTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
CTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T320

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAGTAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCA
CTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGCA
CTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAAATTTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGGC
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T317

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCA
CTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTA
CTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAAATTTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGGC
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T318

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAGTTAAGCTCGTGATCTAGTGGACGGGATACGCATGTTGACAAGAATAGATTTGACTTAATGCA
CTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTA
CTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAGTTATGTTATGCTACATATGCTATGTAGTTTATG
TAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAAATTTAATACTGACAA
GGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGGC
TATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

>T352

ACCAGATGTCTGATAAAGTTCATTAATAGCTACCCCCACAATAGATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGT
TGCTGGTTTCACGCGGCATGGTAATTAAGCTCGTGATCTAGTGGGCGGGATACGCATGTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGC
GCTATGTACGATTAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCTTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT
ACTATTATACATAATATGTCCTAATACATTAATTTTATGTACTATACACACGTGAAATTATGTTATACTACATATGCTATGTAGTTTAT
GTAATTAATAGTAATTAATTATAATATAGCTATTGAGTGCAAACTGTATTAATTAAGATTTTTGGAAAATTTAATACTGAC
AAGGCTCTAAATTTTATGGAGCTATATTAATAGTACGTCAGGGAATAGTTAAATAGAAGTTTCTAGCTTTGGGTGTTGATGGTGGGG
GCTATAGCTTCTCCTTGAGTCTTAG

Anexo III.b. Secuencias de 159 pb de la region *D- loop* del ADN mitocondrial de *Mazama gouazoubira*.

>MSG18

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>LC21

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGACGTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>LC32

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>BV011

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>BV012

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>BV013

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>BV018

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACCATGTACTGTAGTTAAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF1

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF2

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF3

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF6

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATGTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF7

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF8

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF13

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF15

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF16

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF17

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF18

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF19

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF23

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF31

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF32B

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF36

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF60

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF62

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF63

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF64

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF65

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF66

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF76

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MF77

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG01

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>MSG11

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG12

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGACCAATAATATCATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG14

GTTGACGAGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAACAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG15

GTTGACGAGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAACAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG19

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG20

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGACCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG26

GTTGACAAGAACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG33

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG34

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG35

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAGTGAATGA

>MSG36

GTTGACAAGAATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG39

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>MSG40

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG43

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGACCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG44

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG45

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG48

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG50

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG51

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATATAATGT

>MSG52

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG55

GTTGACAAGAATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG60

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG61

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG63

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGATACTATGTACCATGTACTGTAATTAAGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>MSG64

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG65

GTTGACGAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAACATTATGTACCATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATATAATGA

>MSG66

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGACATTATGTACCATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATATAATGA

>MSG88

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG89

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG91

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAACGA

>MSG92

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG94

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG99

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG100

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG101

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG105

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAACGA

>MSG107

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>MSG109

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG110

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG112

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG114

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG116

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG136

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG137

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG138

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG139

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG325

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MSG330

GTTGGCAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAGTGAATGT

>ZVCM1730

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAGTGAATGT

>ZVCM1769

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAATAATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ZVCM5517

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN1380

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGACGTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN2604

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN3127

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN5501

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN6266

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN7357

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATTTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHN7632

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>8-26

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTTATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>14-11

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>16-12

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>ANI15

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTCATGCGCTATGTACGATGAACAATACTATGTACTATGTACTATAAATAGTGAGGGGTACATGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ANI16

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATGAACAATACTATGTACTATGTACTATAAATAGTGAGGAGTACATGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ANI17

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATGAACAATACTATGTACTATGTACTATAAATAGTGAGGGGTACATGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ANI49

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ANI68

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTATGTACTATGTACTATAATTAATAATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>ANI71

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAANGA

>1987-273

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTACGTACTATGTACTATATTTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>39008

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTACGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHNP804

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATGTTACGTACTATTTACTATAATTAATATCATGGACTTGCTT
ATAAGCATGGGGCATATAATGTGATGA

>MNHNP806

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHNP807

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>MNHNP1909

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTGATGA

>T14

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T69

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATTAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T77

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGACATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T79

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T83

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGATACTATGTACCATGTACTGTAATTAAGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T101

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T106

GTTGACAAGGGCGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T111

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T125

GTTGACAAGAACGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACCATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T128

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T129

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T134

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATACTATGTACCATGTACTATAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T155

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>T158

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAGTTAAGGTCATGGACCTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGT

>T180

GTTGACAAGGGTAGATTTGACTTAATGTCCATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTATAATTAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>T209

GTTGACAAGAATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGA

>SG001

GTTGACAAGAATGGAATTGACTAAATGTGCCATGTACGATCAATAATAGTATGTACTATGTACTATAAATAATATCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGTATATAATGTAATGA

Anexo III.c. Secuencias de 226 pb del gen *citocromo b* de *Mazama gouazoubira*.

>MSG01

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG14

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG33

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG34

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG36

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTCTTC

>MSG40

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG43

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG44

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG45

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG53

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG55

CGCATTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTCTTC

>MSG56

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTATTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG61

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG63

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTTAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG64

CGCATTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTCTTC

>MSG330

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T69

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T111

CGCATTTATTGATCTCCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTCACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T112

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T113

CGCATTTGTTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T135

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T138

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACTCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T155

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T158

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T209

CGCATTATTGATCTCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>BV103

CGCAATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGAAGAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATACATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>BV108

CGCATTACTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCACGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGTGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>LC02

TGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>LC03

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTACTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG48

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTCTTC

>MSG50

CGCATTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG52

CGCATTTATTGATCTTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG66

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG68

CGCATTTATTGATCTTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCTTTACTAGGAATTCGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG70

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG74

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG75

AGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAGaTATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG76

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTTAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG77

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG79

CGCATTTATTGATCTTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG85

CGCATTTATTGANCNCCCAGCTCCATCAAATATCtCATCATGATGAAACTTTGGTTcTCTACTAgGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
TACTGGCCTATTCTTAgCAATACACTACTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGtCACCCACATCTGCCGAgACGTCAATTAT
GGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG88

CGCATTTATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG89

TGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTTCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
T TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>MSG325

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTGCTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTCACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>T101

CGCATTTATTGATCTCCCAGCCCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>BV101

CGCATTTATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACAAATCC
T TACTGGCCTATTCTTAGCAATACACTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGCTGAATTATTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>BV102

CGCATTTACTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATCTCATCACGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTGATTCTACACATC
CTTACTGGCCTATTCTTAGCAATACaCTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATT
ATGGCTGAATCATTTCGATATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTC

>OB2

CGCATTCATTGATCTACCAGCTCCATCAAATATCTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTAATTCTACAAATTC
T TACTGGCCTATTCTTAGCAATACATTATTCATCCGACACAACAACAGCATTTTCTCTGTACCCATATCTGCCGAGACGTCAATTA
TGGTTGAATTATCCGATATATGCATGCTAATGGAGCATCAATATTTTTT

Anexo III.d. Secuencias concatenadas de 159 pb de la región *D- loop* y 214 pb del gen *citocromo b* de *Mazama gouazoubira*.

>BV011

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAG

>BV012

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATTATCATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>BV013

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGACTATGACTGTAATTAAGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>BV018

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCCATGTACGATCAATAATATTATGTACCATGTACTGTAGTTAAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGTCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGAT
ATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTC
AGAAACATGAAACATTGGAG

>LC21

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGACGTTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>LC32

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>MSG01

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAATATTGGAG

>MSG40

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAATATTGGAG

>MSG50

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATTCATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>MSG52

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAATATTGGAG

>MSG63

GTTGACAAGGATGGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATGATACTATGTACCATGTACTGTAATTAAGGTCATGAACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTTAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>MSG88

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG

>MSG89

NTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATAACGTTATGTACTATGTACTGTAATTGAGGTCATGGACTTGC
TTATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
ATATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTC
AGAAACATGAAACATTGGAG

>MSG91

GTTGACAAGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAACGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG92

GTTGACANGGACGGATTTGACTTAATGCGCTATGTACGATCAATGATATTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGCTATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG99

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG100

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG101

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTCATTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG105

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTACTATGTACTGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAACGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA

TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG107

GTTGACAAGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGTGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG109

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG110

GTTGACAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG112

GTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG114

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGGCTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG116

GTTGACANGGATAGATTTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAACTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGAGCATTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
AAAACATGAAACATTGGAA

>MSG325

NTTGACANGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGCACGATCAATAATGCTATGTAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAATGTAATGANNNTTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAA

>MSG330

GTTGGCAAGGACAGATTTGACTTAATGCACTATGTACGATCAATAATGCTATGTACTATGTACTATAATTAAGGTCATGGACTTGCT
TATAAGCATGGGGCATATAGTGAATGTGCATTTTCCTCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATTCGATA
TATACATGCCAACGGAGCATCAATATTTTCATTTGCTTATTTATACATGTGGGACGGGGACTATACTATGGATCATATACTTTCTCA
GAAACATGAAACATTGGAG