

# Caracterización de un set de microsatélites para la especie *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae; Fischer, 1814)



***“Para conservar hay que conocer, comprender y cuestionar”***

**Gabriela da Rosa**

Tutora: Dra. Mariana Cosse.

Laboratorio de Genética de la Conservación, Departamento de Biodiversidad y Genética, División Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

2014

# **ÍNDICE**

## **AGRADECIMIENTOS**

## **RESUMEN**

### **I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.**

- I.I Genética de la Conservación.
- I.II Mazama Gouazoubira (Mammalia: Cervidae)
- I.III Marcadores hipervariables.

### **II. OBJETIVOS.**

- I.I Objetivo general.
- II.II Objetivos específicos.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

- III.I Muestras analizadas.
- III.II Extracción de ADN.
- III.III Selección y amplificación de loci.
- III.IV Puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa.
- III.V Amplificación con M13.y caracterización de los loci obtenidos.
- III.VI Equilibrio de Hardy-Weinberg.
- III.VII Contenido de información polimórfica y probabilidad de no exclusión.
- III.VIII Grado de endogamia.

### **IV. RESULTADOS**

- IV.I Muestras analizadas.
- IV.II Puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa y marcado con M13.
- IV.III Genotipificación de los fragmentos.
- IV.IV Desarrollo de la matriz y caracterización de los loci.
- IV.V Equilibrio de Hardy-Weinberg y grado de endogamia.
- IV.VI Contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de no exclusión.

### **V. DISCUSIÓN**

### **VI. PERSPECTIVAS**

### **VII. BIBLIOGRAFÍA**

### **VIII. ANEXOS**

- VIII.I Tabla de muestras analizadas.
- VIII.II Tabla de loci analizados.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Mariana Cosse por haberme guiado y acompañado en este proceso.

A Susana Gonzales por aceptarme en el laboratorio de Genética de la Conservación del IIBCE y colaborar con materiales, consultas, etc.

A mis compañeros del IIBCE por evacuar dudas, correr geles, sacar PCR y ayudarme siempre que molesté con preguntas.

Al Fondo Clemente Estable y a la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) por financiar este trabajo.

Al Laboratorio de Genética Molecular, Genia especialmente al Dr. Carlos Azambuja, Msc. Rosina Fossati y Leticia Repetto, por suministrar alícuotas de primers comerciales.

A Agus por estar siempre, por compartir cada paso, idea loca, sueños y ser mi amigo, mi amor y mi compañero de la vida.

A mis amigos de la facu por los tambores, mates, horas de estudio, tango, rondas de truco, torta fritas, campamentos, charlas y todos los momentos compartidos que hicieron que el estar lejos de casa no fuera tan difícil y el pasaje por la facultad sea una experiencia llena de magia.

A la facultad de ciencias por ese jardín hermoso y por cada rincón lleno de historias.

A Daniel porque además de un compañero del laboratorio se volvió un amigo. Gracias por el aguante, por ser tan radical, tan sincero, tan vos.

A mis amigos de la vida que más allá del tiempo, distancia, diferencias, edad, siguen estando ahí y que me hacen saber que la amistad y el amor son mucho más importantes que todo eso.

A mi familia porque gracias a ellos estoy acá y soy lo que soy. Porque siempre me estimularon a crecer no solo académicamente sino como persona. Porque me enseñaron que más allá de las adversidades, la vida es hermosa y que lo más importante es creer en mis sueños.

A mi papá que fue un luchador y me enseñó a soñar, a cuestionar, a amar la libertad, a pelear por lo que quiero y no bajar los brazos; que fue siempre una inspiración y un ejemplo de vida y que está siempre conmigo.

## **RESUMEN**

*El Mazama gouazoubira (Fischer, 1814), es un cérvido autóctono del país, que habita principalmente en bosques ribereños. Es de pequeño a mediano tamaño y posee astas simples sin bifurcar en los machos adultos. No está considerada en riesgo de extinción por la IUCN (International Union for Conservation of Nature), sin embargo se observa un decrecimiento poblacional, debido en parte a la caza deportiva y furtiva y al avance de las poblaciones humanas aunque no existen trabajos que confirmen la existencia de poblaciones fragmentadas.*

*A fin de realizar un análisis más detallado se caracterizó un set de marcadores hipervariables (microsatélites) que serán útiles para el estudio de la estructura genética de la especie. Para disminuir tiempo y costos del análisis se realizó la transferencia de cebadores entre especies cercanas (cross amplification). Se estudiaron 47 cebadores diseñados para ganado bovino, caprino y Mazama sp algunos. testeados anteriormente en ungulados; se determinó un total de 9 loci que fueron polimórficos y presentaron una correcta amplificación en 16 individuos. A partir del análisis con los programas Genepop® y Cervus 3.0® se observó que solamente BM757 estaba fuera del equilibrio. El valor global de Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue altamente informativo (PIC= 0.7761) y la probabilidad de no exclusión para el primer parental y para el segundo fueron bajas (NE-1P = 0.002929, NE-2P = 0.00008). La probabilidad de identidad, asumiendo que dos individuos puedan ser hermanos (NE-I) fue 6.03E-0.012. El valor global de endogamia (Fis) para la población fue 0.26.*

*Estos resultados indican que el set de microsatélites es adecuado para estudiar la estructura poblacional, de grupos, estrategias de apareamiento y relación evolutiva entre poblaciones.*

## **I.INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

Durante las últimas décadas ha habido en todo el mundo drásticos cambios ambientales debido principalmente al crecimiento demográfico que determinó un aumento de zonas urbanizadas y áreas cultivadas. Este proceso conlleva a la pérdida cada vez mayor de hábitats naturales así como también a la pérdida o disminución del número de especies. A su vez es cada vez más clara la importancia de la biodiversidad y su función ecológica en relación al beneficio que brinda al ser humano desde el punto de vista ecosistémico (Benayas et al., 2009).

La lista roja de animales y plantas amenazados a nivel mundial se revisa y publica cada dos años desde 1986 por el *World Conservation Monitoring Centre* en colaboración con IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), se basa en la información proveniente de científicos, naturalistas y conservacionistas de todo el mundo. Cada especie incluida en la lista roja tiene asignada una categoría, determinada en función del grado de amenaza a la que está sometida (IUCN 2013).

La Asamblea general de Naciones Unidas ha declarado la década del año 2010-2020 como "*Década Internacional de la Biodiversidad Biológica*", luego de que las Partes en el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) aprobaran en 2010 en Japón el Plan Estratégico 2011-2020. Uruguay junto a 192 países integra dicho convenio el cual es un acuerdo internacional en medio ambiente que busca "*conservar la biodiversidad con el objetivo de satisfacer las necesidades de recursos biológicos que tiene la sociedad a nivel global, nacional y local así como lograr los máximos beneficios con el mínimo deterioro, asegurando la sostenibilidad de los recursos naturales a largo plazo y la distribución justa y equitativa de los mismos. La conservación no significa un obstáculo al desarrollo económico y social, sino que busca que estos procesos sean sostenibles en el tiempo*". (Política del MVOTMA en Conservación y uso sostenible de la Biodiversidad, Bio-lineamientos 2012).

A nivel global, nuestro país aún se encuentra en la etapa de elaboración de las listas rojas para diferentes grupos taxonómicos, destacándose avances importantes en grupos como mamíferos y reptiles particularmente (IV informe nacional CBD, DINAMA, Uruguay, 2010, Soutullo et al, 2013)

Actualmente se está avanzando en el tema y existen varias leyes relacionadas a la conservación en el ámbito del MVOTMA. La ley 17.234 de febrero de 2000 y su Decreto Reglamentario 52/005, declara "de interés general" la creación de un SNAP (Sistema Nacional de

Áreas Protegidas) como "herramienta fundamental para la conservación de la biodiversidad". Dichas áreas son un instrumento de gestión ambiental que tiene como objetivo la conservación de los ecosistemas, las especies de relevancia y la diversidad biológica del país.

Para poder crear estas áreas, así como programas de manejo de especies y de ordenamiento territorial, es muy importante entonces que se considere dicha diversidad en todos los ámbitos y a distintos niveles ya sea el estudio de hábitats, comportamiento de individuos, cambio climático; o estructura genética (Achaval et al, 2005).

Por otro lado, el grado de conocimiento de la biodiversidad de nuestro país es muy irregular, mientras que algunos grupos son relativamente bien conocidos, otros apenas han comenzado a estudiarse. En el caso de mamíferos, hay un importante número de especies registradas (114). En este grupo se identificó el mayor número de especies de prioridad para la conservación (76%). Sin embargo, sólo el 27% de las mismas fue identificado como prioritario para su inclusión en el SNAP (Soutullo et al, 2013).

A nivel global se espera que Uruguay sea uno de los 20 países más afectados desde el punto de vista del paisaje debido al impacto en el uso del suelo (Lee & Jets, 2008). Se deduce que las principales presiones que afectan y/o amenazan a las especies son la agricultura y manejos ganaderos no sustentables, forestación con especies exóticas, extracción ilegal de leña de monte, caza, pesca, captura ilegal y contaminación a nivel puntual (IV informe nacional CBD, DINAMA, Uruguay, 2010).

Estos factores traen como consecuencia una disminución del número de individuos de las comunidades ecológicas, el efecto de dicha disminución depende de las características de las especies, tamaño, dieta, hábitat natural, nivel trófico, tipo de apareamiento, número de crías, entre otros.

Muchas veces una reducción en el número de individuos implica en una disminución de la variabilidad genética que incide en la persistencia de las estructuras de las comunidades, haciendo a las poblaciones más vulnerables a factores estocásticos tales como catástrofes ambientales, plagas, epidemias, pudiendo muchas veces determinar la extinción.(Diekmann et al., 1999). A su vez se produce un aumento de la homocigocidad de alelos recesivos deletéreos que en poblaciones mayores se mantienen enmascarados, lo que determina muchas veces la muerte prematura de individuos.

## **I.I Genética de la conservación**

El estudio de la estructura genética de las poblaciones y su variabilidad es de gran importancia a la hora de conocer la ecología de una especie dada. Actualmente se usan marcadores moleculares en combinación con técnicas no invasivas para la colecta de muestras que brindan información muy útil para estos estudios.

Los marcadores moleculares son secciones del genoma generalmente pequeñas que pueden o no ser parte de genes funcionales que tienen el potencial de contestar preguntas en ecología que muchas veces son difíciles de resolver por otros métodos. Brindan información útil para determinar patrones demográficos como tamaños poblacionales, sistemas de apareamiento, grado de parentesco, organización social, patrones de dispersión, entre otras. Para que puedan ser utilizados deben poseer una variación detectable experimentalmente en los individuos de una población y modo de herencia Mendeliana, no epistática (sin interacción entre genes) (Bee Bee & Rowe, 2008).

En biología de la conservación son ampliamente utilizados los marcadores hipervariables (microsatélites) debido a su esperada neutralidad desde el punto de vista evolutivo y a que presentan locus con alelos codominantes que se pueden determinar de manera certera. También evolucionan más rápido que el ADN mitocondrial y por lo tanto son especialmente útiles para relevos a escalas espaciales reducidas y escalas temporales finas (Balkenhol et al., 2009; Landguth et al., 2010).

En el campo de la conservación tienen un gran significado en varias áreas del manejo de especies amenazadas ya que la información que brindan puede ser aplicada para determinar tráfico ilegal, establecer planes de translocación, prevenir disturbios de ecosistemas garantizando la minimización del impacto humano y para el discernimiento a la hora de la creación de un área protegida, programas para el manejo de especies y lineamientos para el ordenamiento territorial (Jarne & Lagoda, 1996; Wang & Schreiber, 2001; Lettink et al., 2002; Ortega et al., 2002; van Hoof et al., 2003; Beja-Pereira et al., 2004; Armstrong et al., 2010).

En este trabajo se describe la caracterización de un set de micorsatélites para el cérvido autóctono *M. gouazubirá*. Si bien dicha especie no se considera en peligro de extinción, sí es considerada vulnerable debido principalmente a la caza furtiva y la destrucción de hábitats

naturales (IUCN) (Elizondo, 2010). Además se desconoce el tamaño de las poblaciones uruguayas, su grado de endogamia y el nivel de aislamiento genético de las mismas.

### **I.II *Mazama Gouazoubira* (Mammalia: Cervidae)**

La historia evolutiva de los venados data de hace 20 millones de años en el mioceno y en el plioceno temprano en Eurasia. En este último período, fueron identificados cérvidos en Norte América aunque aún no está clara la historia evolutiva en esta región (Webb, 2000). Luego, hace aproximadamente 2.5-3 millones de años la elevación del canal de Panamá permitió que los venados avanzaran hacia el sur, siendo parte del “Gran Intercambio Americano” entre el Norte y el sur de América. En el Sur tuvieron gran éxito debido en parte, a la ausencia de otros rumiantes (Duarte et al., 2008). Estos venados del centro y sur de América se dividieron en dos grandes grupos, aquellos en que los adultos no superan los 60cm, en los que los machos desarrollan una cornamenta no ramificada y habitan lugares de vegetación más frondosa; y los de mayor tamaño y cornamenta que habitan zonas más abiertas.



**Fig. 1.** Ejemplar macho adulto de *M. gouazoubira*, Jorge La Grotteria©.

Dentro de los cérvidos de gran tamaño se encuentran los géneros *Odocoileus*, *Hippocameleus*, *Ozotoceros* y *Blastocerus* y los de pequeño tamaño *Mazama* y *Pudu* (Eisenberg, 2000).

El género *Mazama* es el más numeroso del mundo (Duarte & Merino, 1997; Duarte et al., 2008) y existe una gran controversia respecto a la taxonomía y número de especies dentro de este género (Groves & Grub, 1987; Duarte & Merino, 1997; Weber & Gonzales, 2003; Duarte et al., 2008, 2010). La primera revisión fue realizada por Allen en 1915, donde describió 18 especies separándoles en dos grupos según la coloración rojiza o marrón.

Actualmente, y luego de varias revisiones filogenéticas se distinguen diez especies dentro del género, aunque reportes a partir de herramientas moleculares sugieren que es un género polifilético donde se distinguen dos clados, por un lado los de coloración grisácea y por otro los de coloración rojiza (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012).

El *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1914) conocido vulgarmente como guazuncho, viracho, guazú virá, masuncho, urina o corzuela parda es una de las dos especies de cérvidos autóctonos de nuestro país. Se caracteriza por ser de pequeño a mediano tamaño y poseer astas simples sin bifurcar de hasta 12cm en los machos adultos, siendo éstas consideradas adaptaciones morfológicas a su hábitat.

La distribución del “guazubirá” en Sudamérica abarca el este de la región pre andina en Argentina y Bolivia, extendiéndose hasta la costa del océano Atlántico, el límite norte de su distribución es el sur de la región Amazónica y su límite sur incluye todo el territorio uruguayo hasta la provincia de Entre Ríos, Argentina (Duarte & González, 2010). Habitan gran variedad de ecosistemas, desde montes y florestas hasta sabanas, encontrándose principalmente en ambientes cerrados.



**Fig. 2.** Distribución en América del Sur de la especie *M. gouazoubira* mapa obtenido de Worldmap location NED (Natural Earth Data) Distribution data from the IUCN Red List of Threatened Species.

En nuestro país se encuentra distribuido ampliamente en mayor medida en ambientes de bosque ribereño aunque hace también incursiones a lugares de campo abierto (Bidegaray et al., 2003). Si bien no vive en estas zonas, las utiliza para obtener alimento, sobre todo en horarios nocturnos (Gayot et al., 2004; Black & Vogliotti, 2008).

Presenta una gran variabilidad de coloración del pelaje, relacionada a los diferentes ambientes que habita, variando desde marrón en los individuos de sabana, hasta grisáceo en los de bosque (Duarte & Merino, 1997). Son diurnos y principalmente solitarios, machos y hembras son considerados territoriales, siendo animales muy esquivos principalmente hacia el hombre, lo que los hace muy difíciles de observar (Duarte et al., 2012). Su dieta es principalmente frugívora por lo que puede ser considerada como una especie dispersora de semillas, también puede consumir brotes tiernos dependiendo de la disponibilidad.

Es muy poco conocido su comportamiento de dispersión, y las estimaciones del ámbito hogar varían en gran medida; los valores publicados para adultos van desde 0.027 km<sup>2</sup> a 3.48 km<sup>2</sup> (Barrientos, Segundo & Maffei, 2000; Duarte & Gonzalez, 2010). Tampoco hay muchos estudios sobre su distribución en el país pero se considera una especie abundante. A partir de colecta de fecas y colocación de cámaras remotas se determinó su presencia en Rocha, Rivera, Tacuarembó, Maldonado, Salto (Elizondo, 2010).

*M.gouazoubira* no está considerada actualmente en riesgo de extinción por la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), sin embargo se observa una tendencia al decrecimiento poblacional, debido en parte a la caza deportiva y furtiva (Black & Vogliotti, 2008) y también al avance de las poblaciones humanas, desapareciendo en ámbitos cercanos a las mismas. No existen estudios que confirmen la existencia de poblaciones fragmentadas, y la especie continua siendo abundante en gran parte de su rango de distribución (IUCN, 2011).

Es interesante, entonces, el análisis de la estructura genética de esta especie por medio de marcadores hipervariables, como los microsatélites, para analizar el grado de estructuración de sus poblaciones en nuestro país a distintas escalas espaciales.



*Fig.3. Juvenil de la especie M. gouazoubira, Ricardo Kuehn ©*

Son muy pocas las especies de mamíferos neotropicales para las que se han caracterizado set de loci de microsatélites (Kays et al., 2000; Cutrera et al., 2005; Cosse et al., 2007; Corti et al., 2009; Viteri & Waits 2009; Feijoo et al., 2011; Raimondi et al., 2012). Existen numerosos trabajos donde se amplifican microsatélites en especies de cérvidos con cebadores diseñados para otros cérvidos, bovinos y caprinos (Galan et al., 2003; Gaur et al., 2003; Beja- Pereria et al., 2004; Cosse et al., 2007; Montellato et al., 2010).

Para *Mazama gouazoubira* no se ha caracterizado hasta el momento un conjunto marcadores moleculares que pueda ser utilizado en trabajos de genética de poblaciones, por lo tanto es necesario describir cada uno de los loci asegurándose de que cumplan con los presupuestos de neutralidad y no ligamiento.

Los microsatélites caracterizados en este trabajo podrán ser utilizados en futuros estudios de relevamiento poblacional, determinación del grado de endogamia, nivel de aislamiento e influencia de los cambios en el paisaje sobre *M. gouazubira*.

### **I.III Marcadores hipervariables**

Los microsatélites son secuencias simples repetidas en tandem que se encuentran distribuidas en todo el genoma, están presentes tanto en regiones codificantes como no codificantes y tienen un elevado grado de polimorfismo (Zane et al., 2002). Aunque aún queda por conocer gran parte de las funciones, se cree que están relacionados con la estructura y

organización de la cromatina, regulación de la replicación, transcripción, traducción y expresión de genes (Chistiakov et al., 2006).

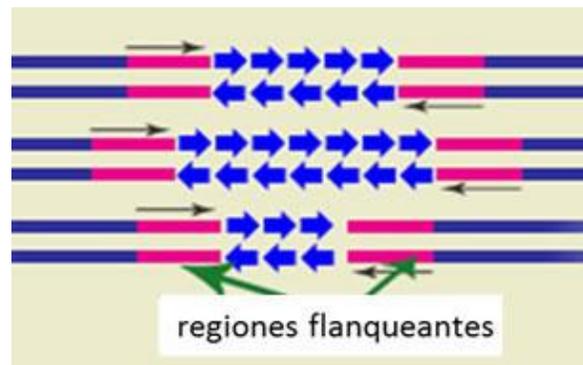
Los motivos repetidos presentan entre 1 y 6 nucleótidos encontradas en alta frecuencia en la mayoría las taxa, tanto en organismos procariotas como en eucariotas. Estos últimos tienen cientos o miles de loci microsatelitales a lo largo de todo el genoma aún en poblaciones que han sufrido procesos de cuello de botella con pocas, o directamente sin, alozimas polimórficas (Maudet et al., 2002). Un alelo típico está formado por entre 5 y 40 repeticiones aunque puede haber incluso más largos, los más comunes son dinucleótidos. En vertebrados el motivo repetido más frecuente es (AC) $n$  (Chistiakov et al., 2006).

La evolución y el alto grado de polimorfismo de los microsatélites se cree que se relaciona con el deslizamiento (slippage) de la enzima polimerasa que envuelve la disociación transitoria de la enzima durante la replicación del ADN, proceso que genera errores, aumentando o disminuyendo el número de repetidos. Algunos de estos errores son corregidos por los mecanismos de reparación, actividad exonucleótica de *proofreading* de la polimerasa y de reparación de errores de ADN. Sin embargo una proporción de los mismos puede escapar de estos mecanismos y generar nuevas mutaciones. La inestabilidad observada en las secuencias repetidas simples se genera del balance entre los errores de replicación y su reparación por diferentes medios (Eisen, 1999; Li et al., 2002). Por otro lado se cree que también tiene gran importancia en el polimorfismo la recombinación no recíproca (conversión génica) y entrecruzamiento desigual. Este último, junto con deriva génica y la selección, pueden tener un efecto importante en la acumulación de secuencias repetidas en tándem en el genoma (Jarne & Lagoda, 1996; Li et al., 2002).

Para poder trabajar con microsatélites es necesario comprender los modelos que subyacen a la evolución de los mismos para el desarrollo de una estadística precisa que pueda reflejar la estructuración genética. Se han propuesto varios modelos que tratan de explicar los eventos de deslizamiento de la polimerasa que aumentan o disminuyen el número de repeticiones. El modelo de mutaciones en un paso (SMM, *Stepwise Mutation Model*) asume que en cada evento se da un cambio en una única unidad repetida simple. Dos alelos de tamaños muy diferentes estarán menos relacionados que dos alelos de tamaño similar (Bell & Jurka, 1997). El modelo de mutación en dos fases (TPM, *Two Phase Mutational Model*) por otro lado, permite que las mutaciones generen cambios mayores que una sola base (Di Rienzo et al., 1994). Por último, el Modelo de Alelos Infinitos (IAM) del inglés *Infinite Alleles Model* (Kimura & Crow 1964), asume que como la diversidad potencial alélica es muy alta, dos alelos muy diferentes es difícil que compartan una historia en común y alelos idénticos comparten el mismo ancestro y son idénticos por

descendencia (IBD, *Identical by Descent*). Este modelo entonces no permite la homoplasia (Balloux & Luginbuhl, 2002).

Los microsatélites son fácilmente amplificables por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) usando dos cebadores (*primers*) que se unan a las regiones adyacentes a los mismos. Aunque la clonación, es decir el aislamiento *de novo*, es la mejor técnica para desarrollar estos cebadores en una especie dada, requiere gran cantidad de tiempo y esfuerzo. Estudios recientes han demostrado que estas regiones adyacentes al microsatélite, que flanquean la región repetida, son conservadas a nivel de especie e incluso entre especies emparentadas (Selkoe & Toole, 2006). Esta característica hace posible la transferencia de cebadores entre especies cercanas (*cross amplification*) para poder analizar regiones heterólogas en menor tiempo y con menores costos (Schlötterer & Pemberton, 1996; Zane et al., 2002, Cosse et al., 2007, Mannise et al., 2013). Actualmente se han realizado trabajos con este método en vacas, ovejas (Moore et al., 1991), primates (Morin & Woodruff, 1992), perros (Roy et al., 1994) y tortugas (FitzSimmons et al., 1995).



**Fig 4.** Esquema de microsatélites (azul) y regiones flanqueantes a los mismos indicadas en la figura. En flechas negras se representan los cebadores.

El grado de resolución del análisis depende de la cantidad de loci, el número de alelos que presenten los marcadores y la distribución de frecuencias de los mismos. Es por tanto un primer requerimiento para el trabajo con este tipo de marcadores (en una especie dada) la caracterización de un set de loci microsatelitales, estableciendo así su potencial para distintos tipos de análisis entre poblaciones de la especie estudiada.

Para que sirvan como marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones, y por lo tanto puedan ser usados como herramienta para detectar patrones demográficos, deben ser selectivamente neutros, presentar desequilibrio de ligamiento y ser polimórficos (Selkoe & Toole, 2006).

## **II OBJETIVO**

### **II.I Objetivo general**

Caracterizar un conjunto de microsatélites suficientemente polimórficos para la especie *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae, Fischer, 1814) para poder utilizarlos en posteriores estudios de poblaciones uruguayas.

### **II.II Objetivos específicos**

- Extracción de ADN de muestras biológicas de individuos de la especie.
- Amplificación por PCR de loci de microsatélites.
- Caracterización del conjunto de loci obtenidos.

## **III MATERIALES Y MÉTODOS**

Este trabajo se encuentra en el marco del proyecto “Genética del paisaje: Impacto de las características del ambiente en la estructura genética de tres especies de mamíferos autóctonos”, responsables Dra. Mariana Cosse y Dr. Alvaro Soutullo.

### **III.I Muestras analizadas**

Las muestras utilizadas pertenecen al banco de tejidos y ADN de Genética de la Conservación (Departamento de Biodiversidad y Genética-IIBCE).

Todas las muestras de ADN fueron analizadas para determinar el grado de pureza y la concentración (ng/ul) por espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000®) a partir del cociente de

absorbancias 260/280 y 260/230. Se considera que el grado de pureza del ADN analizado es alto cuando la relación 260/280 es próxima a 1.8 y 260/230 está en un rango de entre 2 y 2.2. Valores menores a 1.8 indican presencia de proteínas y fenoles y mayores a 2.2 corresponden a ARN u otros contaminantes que absorben a 230 nm. Del total de las muestras analizadas se utilizaron en las siguientes etapas un total de 35 muestras que arrojaron valores de absorbancias adecuados.

### **III.II Extracción de ADN**

Se realizó una extracción de ADN de muestras biológicas según el protocolo Medrano et al., (1990) con modificaciones (Gonzales et al., 1998). Se extrajo ADN de tejidos y pelos de vaca y cabra respectivamente que fueron utilizados como controles positivos para las primeras reacciones de PCR realizadas.

El ADN extraído se visualizó en gel de agarosa al 1% (Amresco®), nuevamente se cuantificó y determinó el grado de pureza usando espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000).

### **III.III Selección y amplificación de loci**

Se analizaron un total de 47 loci para microsatélites: una serie de 15 cebadores desarrollados para distintas especies de ungulados testeados en *Ozotoceros bezoarticus* (Cosse et al., 2007), un panel de 13 cebadores desarrollados para análisis de trazabilidad de ganado bovino y caprino y 20 loci más desarrollados para *M. gouazoubira* diseñados por el Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Responsable Mauricio Barbanti Duarte, Departamento de Zootenia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Brasil, datos sin publicar (tabla 1, 2, 3).

**Tabla1.** Loci testeados en *Ozotoceros bezoarticus* (Cosse et. al, 2007). Se detalla secuencia y temperatura de anidamiento para cada locus (\*ya tienen incorporada fluorescencia).

Locus	Secuencia 5'-3'	Ta (°C)
BM757*	F TGGAAACAATGTAAACCTGGG	54
	R TTGAGCCACCAAGGAACC	
CSSM41*	F AATTTCAAAGAACC GTTACACAGC	54
	R AAGGGACTTGCAGGGACTAAAACA	
BM1818*	F AGCTGGGAATATAACCAAAGG	53
	R AGTGCTTTCAAGTCCATGC	
BM203*	F GGGTGTGACATTTTGTTCCC	56
	RR CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	
BM4513	F GCGCAAGTTTCCTCATGC	56
	R TCAGCAATTCAGTACATCACCC	
CSSM43	F AAAACTCTGGAACTTGAAAATA	48
	R GTTACAAATTTAAGAGACAGAGTT	
ETH225	F ACATGACAGCCAGCTGCTACT	56
	R GATCACCTTGCCACTATTTCTT	
HUI175	F GGAGCATGTATGTGTGTGTGC	54
	R AAGGATTAACAAGAATGGCTGG	
INRA05	F CAATCTGCATGAAGTATAAATAT	46
	R CTCAGGCATACCCTACACC	
INRA40*	F TCAGTCTCCAGGAGAGAAAAC	55
	R CTCTGCCCTGGGGATGATTG	
OarVH98	F ATGAACTAACCTCCGTAGACCCAGC	59
	R CCGGAAGTCCATAAGAGCTATTCTTAACC	
SR12	F TGACCAGGTGACTAACAC	54
	R AATCTGATTTCAATTCATG	
SR24	F AGCAAGAAGTGCCACTGACAG	55
	R TCTAGGTCCATCTGTGTTATTGC	
TGLA378	F TTTATAGCCAACCATATACTTTGCC	53
	R CAGTACCTCTCAACTTCATGTATGT	
TGLA10	F CTAATTTATCCCACTGTGGCTCTT	55
	R CAATCTGCAGTAGCATACATCCTTG	

**Tabla 2.** Loci desarrollados para ganados bovino y caprino. Se detalla secuencia y temperatura de anidamiento para cada locus, estos loci ya tienen incorporada fluorescencia.

Locus	Secuencia 5'-3'	Ta (°C)
BM2113	F CTGTGATGATAAATGCCTGGAG	60
	F GCTGCCTTCTACCAAATACCC	
ETH3	R ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	55
	F GAACCTGCCTCTCTGCATTGG	
TGLA 53	FGCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA	55
	R ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	
TGLA 227	F CGAATTCCAATCTGTTAATTTGCT	60
	R ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	
ETH10	F GTTCAGGACTGGCCCTGCTACA	58
	R TGTTAGCAGGGCCAGTCTGAAC	
TGLA126	F CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT	58
	R AGAAGCCTCTCTCATTCTAAATTAG	
TGLA122	F CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	58
	R GCTGATTTACCTGGAGGAGGG	
INRA23	F GAGTAGAGCTACAAGATAAAC	55
	R GTTTATCTTGTAGCTCTACTC	
ETH225	F GATCACCTTGCCACTATTTCT	60
	R AGGAAATAGTGGCAAGGTGATC	
BM1824	F GAGCAAGGTGTTTTCCAATC	58
	R GATTGGAAAAACACCTTGCTC	
SPS115	F CACAGCCAACTAGGACACTCGTT	58
	R AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	
SPS113	F CCTCCACACAGGCTTCTGACTT	58
	R CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCC	

**Tabla 3.** Loci desarrollados para *M. gouazoubira* (datos sin publicar, Barbanti, com. per, NUPECCE). Se detalla secuencia y temperatura de anidamiento par cada locus.

Locus	Secuencia 5'-3'	Ta (°C)
Goua6	F CTGTGATGATAAATGCCTGGAG	55
	R CTCAGGCATTTATCATCACAG	
Goua7	F GTCTGATCCAAATCTGAGGGTC	55
	R GACCCTCAGATTTGGATCAGAC	
Goua8	F AAAGGAGATGTCAGGATATGGG	55
	R CCCATATCCTGACATCTCCTTT	
Goua9	F TCAGAGTGAGATAAAGCTGAGGC	57
	R GCCTCAGCTTTATCTCACTCTGA	
Goua10	F TAGTGGGACGTTTGTGTGTGT	55
	R AACAACAACAACGTCCCACTA	
Goua11	F GCCATAACCAACGAAAGGATAC	55
	R GTATCCTTTCGTTGGTTATGGC	
Goua12	F GAAGCCGATTTGACCTCATCT	55
	R GTATCCTTTCGTTGGTTATGGC	
Goua13	F GGAGTATTCTGTCTTTGGCGAT	55
	R AGATGAGGTCAAATCGGCTTC	
Goua14	F GTCTGGTAGCCGCATAAAG	55
	R ATCGCCAAGACAGAATACTCC	
Goua15	F GGGACAGTGATAAACTAGGTGT	55
	R CTTTATGGCGGCTACCAGAC	
Goua16	F TTCCAGGCAAGAATACAGGAGT	55
	R GCGTACTTTGCTATCTCATTAG	
Goua18	F GGCGATAGCTTGGTGCATTA	52
	R ACTCCTGTATTCTTGCCTGGAA	
Goua19	F ACAACTGGAGAAAACCCTTGTG	50
	R TAATGACACCAAGCTATCGCC	
Goua20	F GAGTACAACAGCCATGCAGAGA	55
	R CACAAGGGTTTTCTCCAGTTGT	
Goua21	F GATTCAGTTTTGGGAGAA	52
	R CTTCTTAGGTGAACCCCAATG	
Goua22	F GAGGAGGGAATTAGTAGATACA	55
	R TTCTCCCAAACTGAATC	
Goua23	F CTTCTGAGAGAAGCAACACC	52
	R TGTATCTACTAATTCCTCCTC	
Goua24	F AAGAAGCTCAAACCTGCCTGTC	55
	R AAGAAGCTCAAACCTGCCTGTC	
Goua25	F AGGACAACCATGCACCTACTTT	55
	R TTGTGTTAAAAGGAGCTGGGAT	

### **III.IV Puesta a punto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Como primera etapa del trabajo se realizó una reacción de PCR para todos los loci según Cosse et al. (2007), para verificar las amplificaciones de los mismos en las especies para las que fueron diseñados y poner a punto los protocolos utilizados. Se utilizaron los ADN extraídos de vaca y cabra como control positivo de los experimentos y en venado se amplificaron varios individuos para elegir el mejor control, luego se testearon las muestras de la especie *M. gouazoubira* para cada uno de los loci.

La PCR consistió en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l, una concentración de primer *forward* (F) y *reverse* (R) de 0.5 $\mu$ l, 0.3 mg/ml de BSA, 5 $\mu$ l del mix de PCR *ImmoMix 2X<sup>TM</sup>* de *Bioline* y una concentración final de ADN de 10 ng/ $\mu$ l. Las temperaturas de anidamiento para cada loci fueron optimizadas a través de PCR con gradiente de temperatura. Las condiciones de ciclado fueron las mismas para todos los experimentos (tabla 4).

Para confirmar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (*Amresco*®) con tinción *GoodView<sup>TM</sup>* de 3.0  $\mu$ l del producto de cada PCR. La corrida se extendió hasta que la migración fue aproximadamente 2/3 del total del gel a 100V y se visualizó con luz UV.

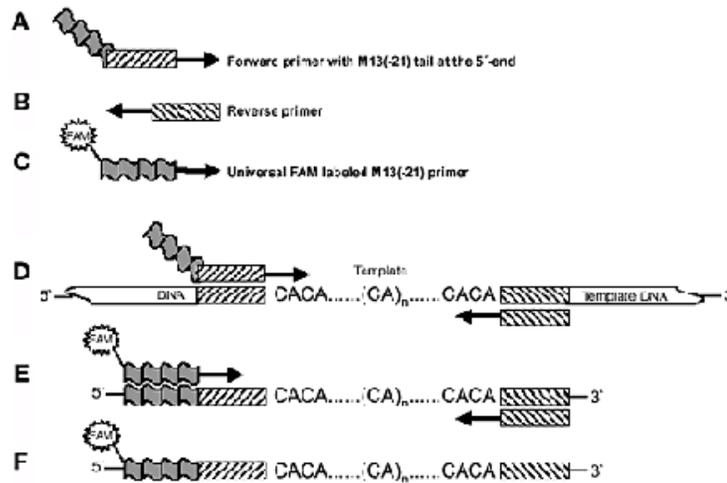
**Tabla 4.** *Detalles de las condiciones de ciclado para PCR. Las temperaturas de anidamiento (\*)utilizadas para cada par de primers corresponden a las detalladas en las tablas 1 a 3.*

Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
95	10 min	1
94	30 seg	
*	45seg	35
72	45seg	

### **III.V Amplificación y caracterización de los fragmentos de microsatélites**

Como los fragmentos obtenidos por PCR son pequeños y generalmente se diferencian en pocos pares de bases deben ser analizados por electroforesis microcapilar, la cual requiere que estén marcados con fluorescencia. Para los loci que arrojaron una correcta amplificación en las condiciones de PCR anteriores en por lo menos 3 individuos de la especie *M. gouazoubira* y no

tenían incorporada fluorescencia, fueron amplificados en una reacción en cadena de la polimerasa utilizando 3 cebadores (*primers*); un *forward* complementario a la región que flanquea el microsatélite en el extremo 5', un *reverse* complementario a la región 3' y un cebador universal de 21 pb M13 con cola FAM. El cebador *forward* posee a su vez, una región de 21 pb complementaria al cebador M13, lo que permite que los fragmentos amplificados sean marcados con fluorescencia. (Schuelke, 2000).



**Fig 5.** Representación del proceso de incorporación de M13(-21) por los fragmentos (A,B) representan el cebador forward con cola complementaria a M13 y cebador reverse respectivamente, (C) representa el cebador universal M13(-21) marcado con fluorescencia FAM (D) en los primeros ciclos el cebador F con cola M13 es incorporado a los productos de PCR. (E) los productos son marcados con M13 que es incorporado en los siguientes ciclos de la PCR. (F) el producto final puede ser analizado por electroforesis microcapilar. Figura obtenida de *Nature Biotechnology* 18: 233-234 (2000).

Para la PCR se utilizó un protocolo en base a Cosse et al. (2007), con modificaciones según cada caso. Se utilizó un volumen de reacción de 10uL, conteniendo 0.13 pM del cebador forward con la secuencia cola para M13 (-21), 0.5uM del cebador M13 (-21), 0.5uM del cebador reverse específico, buffer taq 10 X con KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 ug/uL de BSA, 0.2 mM de dNTPs, 0.03 unidades de Taq polimerasa *Invitrogen*® y una concentración final de ADN de 10 ng/ul. Las condiciones de termociclado consistieron en dos etapas diferentes; los primeros ciclos permitían que se incorporara el cebador forward (para cada cebador se utilizó la temperatura de anidamiento correspondiente); la segunda etapa permitía la incorporación del cebador M13. Los detalles del ciclado se describen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Detalles de condiciones de ciclado para PCR utilizando el marcador universal M13. \*Se refiere a las temperaturas de anidamiento utilizadas para cada par de cebadores corresponden a las detalladas en las tablas 1 a 3.

Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5min	1
95	30seg	30
*	45seg	
72	45seg	9
95	30seg	
53	45seg	
72	45seg	
72	20 min	

Para confirmar la amplificación nuevamente se realizó electroforesis en gel de agarosa, al 2% (Amresco®) en las mismas condiciones que para la puesta a punto de la PCR. Los fragmentos obtenidos fueron enviados a analizar al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

Se realizó la asignación del tamaño y polimorfismo de cada alelo con el software GeneMarker 1.9®. A partir de los tamaños asignados para cada loci en cada individuo, grado de polimorfismo, eficiencia y patrón de amplificación se seleccionó un set de 9 loci y 16 individuos con los cuales se diseñó una matriz que se utilizó para la caracterización de los mismos.

### **III.VI Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Para determinar la neutralidad de los loci obtenidos se evaluó si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando el software Genepop® (Raymond & Rousset, 1995) que utiliza el método de cadenas de Markov descrito por Guo y Thompson, (1992).

Es necesario que el marcador genético utilizado para analizar una población, sea neutro desde el punto de vista evolutivo, o sea, que no esté bajo presión de selección. Cada uno de los loci seleccionados en este trabajo, fue evaluado para estimar la probabilidad de que se encontrara en equilibrio de H-W.

La ley del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) establece que en una población ideal, sin fuerzas evolutivas actuando, las frecuencias génicas y genotípicas se mantendrán constantes de

generación a generación. Las frecuencias genotípicas para un locus con n alelos (A1, A2, A3,..., Ak; con frecuencias p1, p2, p3,..., pk ), estará dada por:

$$\sum_i p_i^2 A_i A_i + \sum_{i < j} 2 p_i p_j A_i A_j$$

donde pi es la frecuencia alélica para Ai y pj es la frecuencia alélica para Aj. Si las frecuencias genotípicas observadas para un locus dado no se separan con una significación estadística de las esperadas para H-W, se dice que estará en equilibrio. Para valores de p >0,05 se considera que el marcador molecular tiene un comportamiento neutral. En los casos donde se observó un apartamiento de el equilibrio de H-W, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

### **III.VII Contenido de información polimórfica y probabilidad de no exclusión**

El grado de información que se puede obtener a partir de los loci depende de cuan informativos y polimórficos son dichos loci. El polimorfismo depende del número y la frecuencia de alelos que presente un set de marcadores genéticos.

Se define el contenido de información polimórfica (PIC) como la probabilidad de que se pueda deducir, a partir del genotipo de la descendencia, de que parental fueron heredados cada uno de sus alelos (Botstein et al., 1980; Guo & Elston, 1999). El valor de PIC se calcula según:

$$PIC = 1 - \sum (P_i)^2$$

donde Pi es la proporción de las muestras que presentan el alelo i de un alelo en 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 0.5 y 0.25 razonablemente informativos y los que se encuentran por debajo de 0.25 débilmente informativos.(Botstein et al., 1980).

La probabilidad de no exclusión parental es la probabilidad de no excluir del análisis de parentesco uno (NE-1P, NE-2P) o un par (NE-PP) de individuos seleccionados al azar que no

están emparentados con el individuo en cuestión para un locus dado (Marshall, 1998-2007; Kalinowsky et al., 2007).

### **III.VIII Grado de endogamia**

El grado de endogamia de una población mide el exceso de homocigotas en relación al que cabría esperar si dicha población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Usando el programa *Genepop*® se estimó el coeficiente de endogamia  $F_{is}$  (Beebee & Rowe, 2008) para la matriz analizada. Estima la relación que hay entre la heterocigosidad promedio observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad promedio esperada ( $H_e$ ) según;

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e$$

Este coeficiente puede tomar un valor de  $-1$  a  $1$ . Si es de  $0$  no hay endogamia y la población está en equilibrio de Hardy Weinberg. Cuando el valor es negativo, significa que hay un exceso de heterocigosis y si es positivo que hay un exceso de homocigosis, ya que cuando  $H_o < H_e$  se asume que en esa población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar.

## **IV RESULTADOS**

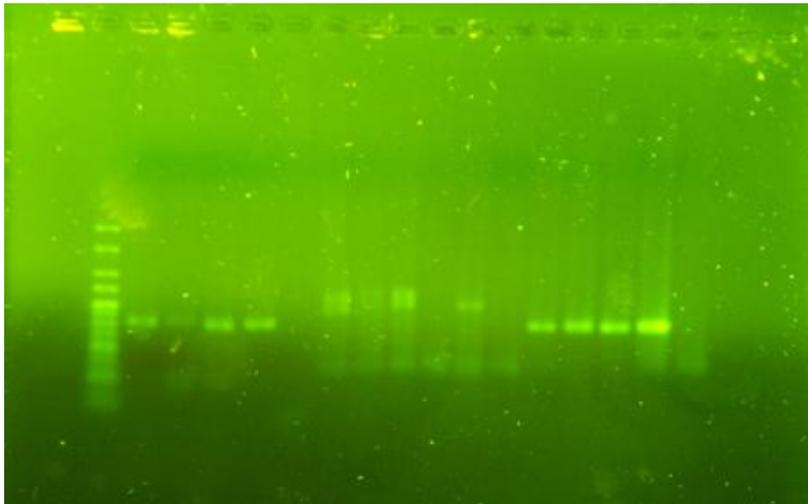
### **IV.I Muestra analizadas**

Se determinó la concentración y grado de pureza de las muestras de ADN de *M. gouazoubira* y se seleccionó un total de 35 muestras que fueron utilizadas en las reacciones de PCR siguientes (Anexo 1).

### **IV.II Puesta a punto de la reacción de PCR y marcado con M13**

Se logró poner a punto las condiciones de ciclado con el primer universal M13 y se corroboró la amplificación de cada uno de los cebadores en las especies que fueron diseñados.

Las amplificaciones por PCR usando el cebador M13 fueron exitosas para 27 del total de los cebadores analizados. En la figura 6 se muestra un gel de agarosa donde se corrieron las amplificaciones obtenidas para los cebadores *goua7*, *goua20* y *tgla10* respectivamente. El marcador de peso molecular fue *GeneRuler*<sup>TM</sup> de 100 bp de *Fermentas*®.

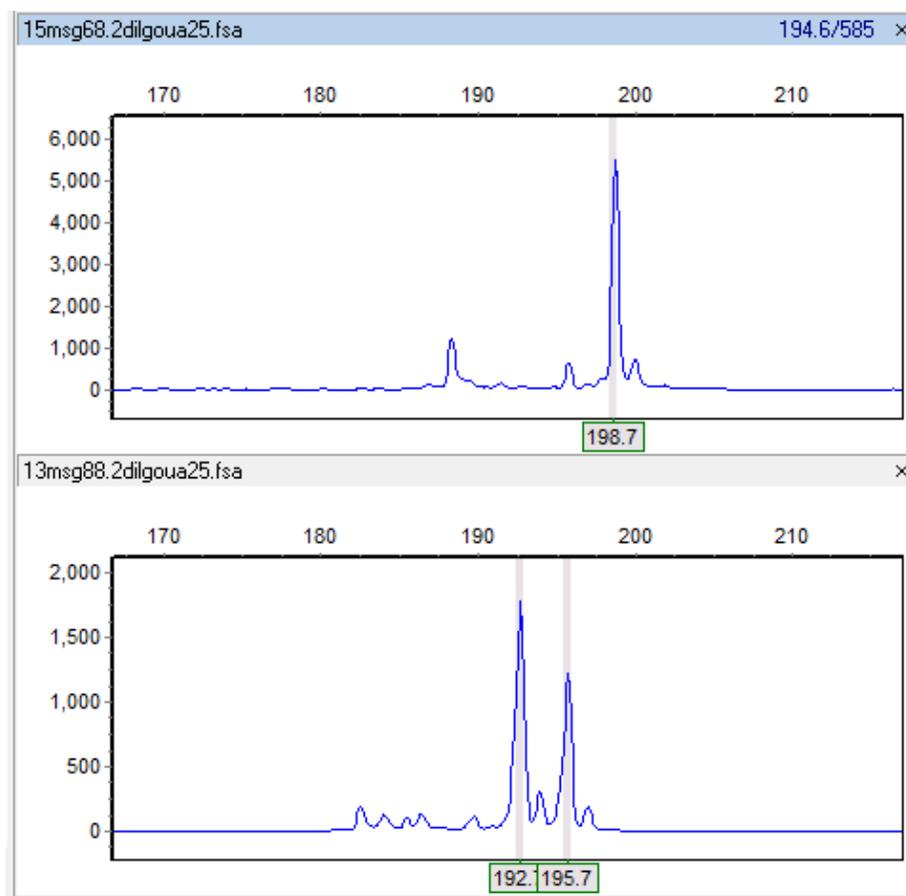


**Fig.6.** Fotografía de gel de agarosa 2%. Los primeros cinco posillos corresponden a los fragmentos amplificados con el cebador *goua 7*, los siguientes cinco corresponden a *goua 20* y los últimos con *tgla10*.

### IV.III Genotificación de los fragmentos

A partir de los resultados obtenidos por electroforesis microcapilar se determinaron los alelos para cada individuo en los distintos loci. (Anexo 2)

En cada caso se examinó la forma y el patrón de picos obtenido de los fragmentos corridos y se determinó el grado de polimorfismo en cada loci (Fig. 7). Se seleccionaron nueve loci polimórficos en la especie que presentaron buenos patrones de amplificación y consistencia en por lo menos tres individuos (Anexo 2).



**Fig7.** Imagen extraída del programa GenMarker 1.9®. Se observa el patrón de picos obtenido para el locus *goua25* en dos muestras: *msg 68* en la parte superior (alelos 198/198) y *msg 88* en la inferior (alelos 192/196).

#### **IV. IV Desarrollo de la matriz y caracterización de los loci**

A partir del set de nueve loci seleccionados anteriormente se construyó una matriz de genotipos para un total de 16 individuos de *Mazama gouazoubira* (tabla 6).

**Tabla 6.** Matriz diseñada a partir de los 9 loci que resultaron polimórficos para por lo menos tres individuos de la especie. El total de individuos es 16. (Detalles de loci seleccionados en anexo2)

	bm1818	bm203	bm757	cssm41	sps115	sps113	goua10	goua24	goua25									
msg22	227	239	000	000	000	000	137	137	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
msg35	233	233	219	219	169	169	129	133	237	239	131	137	000	000	000	000	171	175
msg36	227	239	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
msg49	000	000	211	213	167	179	000	000	000	000	000	000	000	000	150	150	000	000
msg53	233	237	213	229	137	139	131	135	237	237	137	139	000	000	156	174	165	175
msg59	233	233	221	221	137	137	131	135	233	233	137	137	000	000	162	164	175	181
msg66	000	000	225	231	177	187	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
msg68	233	237	000	000	169	169	000	000	000	000	000	000	123	131	164	172	177	177
msg70	000	000	000	000	000	000	127	127	241	243	000	000	127	127	164	164	000	000
msg75	227	239	000	000	000	000	127	133	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
msg76	239	239	205	227	183	191	129	133	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
msg77	237	243	233	235	191	191	000	000	231	245	000	000	129	135	152	168	171	175
msg78	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	141	141	000	000	000	000
msg83	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	123	131	000	000	000	000
msg88	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	173	175
msg96	239	239	267	269	161	177	000	000	249	249	135	139	000	000	160	172	171	171

#### **IV.V Equilibrio de Hardy-Weinberg y grado de endogamia**

Los resultados arrojados por el programa *Genepop*® indicaron que solamente tres de los nueve loci se encontraban en equilibrio con valores mayores a 0.05 (goua10, goua24, goua25); para el locus sps113 no fue posible resolver el equilibrio. Para los locus que se encontraban fuera del equilibrio se aplicó la corrección de Bonferroni y finalmente solamente el locus bm757 arrojó un valor menor a 0,05, fuera del equilibrio (Tabla 7).

El rango de valores Fis se ubicó entre 0,000 para sps113 y 0,4737 para sps115 y según las estimaciones usando el método Weir & Cockerham (1984) (Tabla 7). El valor global de Fis para estimar la endogamia total de la población fue alto, 0,26.

**Tabla 7.** Resultados arrojados por el programa Genepop®. Se detalla Pval antes y después de la corrección de Bonferroni, valores de Fis para cada uno de los 9 loci seleccionados. En negro se destacan bm757 (fuera del equilibrio) y sps113 (No Resuelto).

Locus	P val	Bonferroni	Fis
bm1818	0,009	0,07	0,2394
bm203	0,049	0,26	0,2432
<b>bm757</b>	0,003	<b>0,02</b>	0,4074
sps115	0,018	0,06	0,4737
<b>sps113</b>	NR	<b>NR</b>	0
cssm41	0,038	0,32	0,2105
goua10	0,063	0,06	0,3333
goua24	0,146	0,15	0,2308
goua25	0,324	0,32	0,1304

#### **IV.VI Contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de no exclusión**

El contenido de información polimórfica global para los 9 loci analizados en los 16 individuos de la especie fue altamente informativo (PIC= 0.7761); la probabilidad de no exclusión tanto para el primer parental como para el segundo fueron bajas (NE-1P = 0.002929, NE-2P = 0.00008,) así como también la probabilidad de identidad, asumiendo que dos individuos puedan ser hermanos (NE-I = 6.03E-0.012).

La diversidad alélica promedio por locus fue 7.33; el número de alelos varió entre 13 en bm203 y 4 en sps113.

La heterocigosidad esperada para el conjunto de loci fue 0,8695. Para cada locus dicha heterocigosidad varía entre 0,975 (bm203) y 0,750 (goua10), en todos los casos la heterocigosidad

observada es menor a la esperada exceptuando sps113 donde son iguales. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos para cada loci y para el conjunto.

```

**** Summary statistics ****
Locus      k      N      Hobs  HExp  PIC    NE-1P  NE-2P  NE-PP  NE-I   NE-SI  HW    F(Null)
bm1818     5      10    0.600 0.779 0.697 0.670 0.494 0.312 0.111 0.408 ND +0.1179
bm203      13     8     0.750 0.975 0.908 0.298 0.175 0.050 0.014 0.296 ND ND
bn757      10     9     0.556 0.915 0.850 0.428 0.271 0.109 0.033 0.326 ND ND
cssm41     6      7     0.714 0.890 0.802 0.526 0.351 0.177 0.054 0.350 ND ND
sps115     8      6     0.500 0.924 0.830 0.470 0.304 0.134 0.041 0.337 ND ND
sps113     4      4     0.750 0.750 0.605 0.761 0.593 0.415 0.169 0.464 ND ND
goua10     5      5     0.600 0.867 0.745 0.614 0.435 0.255 0.084 0.381 ND ND
goua24     9      7     0.714 0.912 0.831 0.463 0.298 0.126 0.039 0.336 ND ND
goua25     6      7     0.714 0.813 0.719 0.638 0.460 0.272 0.097 0.397 ND ND

Number of individuals:          16
Number of loci:                 9
Mean number of alleles per locus: 7.33
Mean proportion of individuals typed: 0.4375
Mean expected heterozygosity:   0.8695
Mean polymorphic information content (PIC): 0.7761
Combined non-exclusion probability (first parent): 0.00292916
Combined non-exclusion probability (second parent): 0.00008816
Combined non-exclusion probability (parent pair): 0.00000015
Combined non-exclusion probability (identity): 6.03E-0012
Combined non-exclusion probability (sib identity): 0.00010964

```

**Fig 8.** Resultados obtenidos en el programa Cervus ®, se muestran en orden k número de alelos, N número de individuos, Hobs, heterocigosidad observada, HExp, heterocigosidad esperada, contenido de información polimórfica (PIC), propiedades de no exclusión para el primer parental y para el segundo para cada uno de los loci analizados.

## **V. DISCUSIÓN**

La combinación en la reacción en cadena de la polimerasa con el cebador universal con fluorescencia M13 para cada locus (Schuelke, 2000), es una técnica que permite reducir el costo de la amplificación, aunque la exposición de la muestra a un ciclo con las bajas temperaturas que requiere el M13 generó resultados de difícil interpretación y probablemente influyó en la eficiencia de la amplificación ya que cuando se amplifica con cebadores específicos, la señal obtenida es más clara (Cosse, 2010).

A su vez, la baja eficiencia de la amplificación de las muestras (sólo 16 de las 35 pudieron ser amplificadas), probablemente se deba a la baja calidad ya que cuando se trabaja con material colectado por métodos no invasivos las condiciones cuali y cuantitativas del ADN decaen (González y Duarte, 2007). También pueden haber ocurrido mutaciones puntuales en las regiones flanqueantes a los microsatélites que no permiten la unión de los cebadores y por lo tanto la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (Chistiakov et al).

De los 47 loci analizados se seleccionaron 9 que amplificaron de manera consistente en la especie *M. gouazoubira*. Estos presentaron buenas condiciones para estudiar la estructura poblacional, hacer inferencias sobre la estructura de los grupos, las estrategias de apareamiento y relación evolutiva entre distintas poblaciones de la especie.

En el estudio de equilibrio de Hardy Weinberg, luego de la corrección de Bonferroni, solamente presentó una desviación el locus *bm757*, si bien el número de individuos analizados y número de alelos para este locus fue alto, 9 y 10 respectivamente. Las posibles explicaciones serían que el locus se encuentre asociado a un carácter sometido a alguna fuerza de selección, que los alelos no segreguen de manera independiente, o que reflejen una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio (Soriguer F et al., 2007). Para el locus *sps113* no se pudo resolver el equilibrio probablemente debido al bajo número de muestras analizadas (4 individuos).

La deficiencia de heterocigocidad observada con respecto a la esperada puede deberse a la presencia de alelos nulos. Es decir, un alelo de cierto locus sufre una mutación en la región flanqueante complementaria al cebador que produce una reducción en el éxito de la amplificación de ese alelo. Así individuos que eran heterocigotos para uno de estos loci, son genotipados como homocigotos para el alelo no mutado y este alelo mutante es denominado alelo nulo (Chapuis & Estoup, 2007). Estos resultados pueden estar sesgados por la baja calidad de las muestras debido al método de colecta mencionado anteriormente. Para la evaluación de este tipo de errores existen estimativos que permiten corregir las frecuencias alélicas para los loci que presentan pérdida de

alelos y presencia de alelos nulos. Dentro de los programas existentes el más utilizado es el Micro-checker: calcula la probabilidad para cada homocigota observado y detecta los alelos nulos si dicha probabilidad muestra que hay un exceso significativo de homocigotas en la población. Si este exceso no tiene una distribución homogénea, el patrón no será consistente con el esperado para los alelos nulos y entonces puede ser determinado como un error de genotipado o a que el apareamiento no es al azar (Oosterhout et al., 2004). Como el número de muestras que pudieron ser amplificadas fue bajo, no fue posible realizar el estimativo de alelos nulos, por lo que sería conveniente aumentar el tamaño muestral.

Los valores de  $F_{is}$  para cada locus y para el global de la población presentaron grados de endogamia altos. Estos resultados pueden deberse a que el bajo número de muestras que fueron analizadas conllevan a errores relacionados con el genotipado, (comentados anteriormente) ya que el valor de  $F_{is}$  depende del valor de heterocigocis observada y esperada ( $F_{is} = (H_e - H_o)/H_e$ ). El valor de  $F_{is}$  0 para sps113 puede deberse al bajo número de muestras analizadas y no a que se encuentre en EHW, ya que este valor no pudo ser resuelto por el programa (Tabla 7)

A su vez, se ha observado que pueden producirse errores de genotipado y de dominancia alélica con mayor frecuencia a medida que aumenta el número de loci analizados. Es por eso que se busca obtener un conjunto mínimo de marcadores con un buen nivel de heterocigosidad (Taberlet et al., 1999; Waits et al., 2001; Waits & Paetkau, 2005).

Finalmente se obtiene que los valores de contenido de información polimórfica, de probabilidad de no exclusión y de identidad individual obtenidos indican que los marcadores seleccionados puedan ser utilizados para identificación individual y grado de parentesco con alto nivel de confianza en estudios de ecología molecular.

## **VI. PERSPECTIVAS**

Se considera relevante para futuros estudios aumentar esfuerzos de muestreo en el territorio uruguayo así como también mejorar la calidad de las muestras para obtener una mayor eficiencia en las amplificaciones. Es conveniente para este punto, entonces, el análisis de nuevos métodos de extracción de ADN para pelos y tejidos y comparación de las eficiencias de cada método.

Por otro lado, para que la caracterización de los loci seleccionados sea más certera se recomienda aumentar el número de muestras amplificadas para dichos loci y volver a realizar las

estimaciones correspondientes para equilibrio de H-W, contenido de información polimórfica, probabilidad de no exclusión, grado de endogamia y la evaluación de errores en la asignación de genotipos, pérdida de alelos y presencia de alelos nulos con el software *Micro-checker*®.

Por último, a partir de los loci seleccionados se diseñarán PCR múltiplex para poder avanzar en investigaciones de genética poblaciones de *M.gouazoubira* en Uruguay, y determinar en qué situación se encuentra la especie en el país.

A su vez se realizarán estudios de genética del paisaje utilizando los resultados obtenidos ya que la especie ha sido considerada indicadora de biodiversidad y predictora de la distribución de otros taxones en el proyecto “Genética del paisaje: Impacto de las características del ambiente en la estructura genética de tres especies de mamíferos autóctonos” responsables Dra. Mariana Cosse, Dr. Alvaro Soutullo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Achaval, F. (2005) *La diversidad de vertebrados del Uruguay, Biodiversidad y Taxonomía: Presente y futuro en el Uruguay*. MVOTMA, PEDECIBA, UdelaR, UNESCO.
- 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, Montevideo, Uruguay.
- Armstrong, E., Leizagoyen, C., Martínez, A.M., González, S., Delgado, J.V. & Postiglioni, A. (2010). *Genetic structure analysis of a highly inbred captive population of the African antelope Addax nasomaculatus. Conservation and management implications*. Zoo Biology 29:1-14.
- Aulagnier, S., Maillard, J.C., Thévenon, S. & Hewison, A.J.M. (2003). *Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (Capreolus capreolus) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci*. Molecular Ecology Notes 3:142-6.
- Balkenhol, N., Guguerli, E., Chusman, A., Waits, P., Coulon, A., Arntzen, J. W., Holderegger, R. & Wagner, H. (2009), *Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here?*. Landscape Ecology, 24(4):455-463.
- Balloux, F. & Lugon-moulin, N. (2002). *The estimation of population differentiation with microsatellite markers*. Molecular Ecology 11:155-165.
- Barrientos Segundo, J. y Maffei, L. (2000). *Radiotelemetría en la urina Mazama gouazoubira en el campamento Cerro Cortado, Izozog, Santa Cruz, Bolivia*. Manejo de fauna silvestre en Amazonía y Latinoamérica, 369-371.
- Beebee, T. & Rowe, G. (2008). *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford, Oxford University Press (2nd ed.) 400pp.
- Beja-Pereira, A., Zeyl, E., Ouragh, L., Nagash, H. & Ferrand, N. (2004). *Twenty polymorphic microsatellites in two of North Africa's most threatened ungulates: Gazella dorcas and Ammotragus lervia (Bovidae; Artiodactyla)*. Molecular Ecology Notes, 4:452-5.
- Bell, J.I. & Jurka, J. (1997). *The Length Distribution of Perfect Dimer Repetitive DNA Is Consistent with Its Evolution by an Unbiased Single-Step Mutation Process*. Journal of Molecular Evolution, 44(4):414-421.

- Benayas, J.M.R, Newton, A.C., Diaz, A., Bulloc K, J.M. (2009). *Enhancement of Biodiversity and Ecosystem Services by Ecological Restoration: A Meta-Analysis*. Science, 35 (5944):1121-1124.
- Bidegaray, L. (2003) *Variabilidad genética en Mazama (Mammalia: Cervidae)*. Tesis de grado, sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Black, P. & Vogliotti, A. (2008). *Mazama gouazoubira*. In: *IUCN Red List of Threatened Species*. 2009. Version 2009.1.
- Botstein, D., Whit, R. L., Skolnic, 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.
- Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007). *Microsatellite null alleles and estimation population differentiation*. Molecular Biology Evolution, 24(3):621- 631.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B. & Volckaert, F.A.M. (2006). *Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics*. Aquaculture, 255:1–29.
- 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., Gonzales, S. & Maldonado, J.E. (2007). *Cross-amplification test of ungulate primers in the endangered neotropical pamps deer (Ozotoceros Bezoarticus)*. Genteics and Molecular research, 6(4):1118-1122.
- Curi, R. A, & Lopes, C. R. (2002). *Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frecuency in a population of Gyr breed bovines*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 39(3):129-135.
- Cutrerá, A. P., Lacey, E. A. & Busch, C. (2005). *Genetic structure in a solitary rodent (Ctenomys talarum): implications for kinship and dispersal*. Molecular Ecology, 14: 2511- 2523.
- Diekmann, A. & Franzen, A. (1999). *The wealth of nations and the enviromental concern*. Enviromental behavior, 31(4):540-549.

- Di Rinzo, A., Peterzon, A.C., Garza, J.C., Valdéz, A.M., Stalkin, M. & Freimer, N.B. (1994). *Mutational process of simple sequence repeats loci in human population*. Proceedings of National Academia of Science of the USA, 91:3166-3170.
- Duarte, J. M. B., González, S. & Maldonado, J.E. (2008). *The surprising evolutionary history of South American deer*. Molecular Phylogenetics & Evolution, 49:17–22.
- Duarte, J.M.B. & Gonzalez, S. (2010). *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil & Gland, Switzerland: IUCN.
- Duarte, J.M.B. y Merino, M.L. (1997). *Taxonomia e Evolução*. In: Duarte JMB (Ed.) *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, 1–21.
- Eisen, J.A. (1999). *Mechanistic basis for microsatellite instability: evolution and application* (eds: Goldstein D.B. and Schölotterer C. Oxford Universtiy Press, Oxford, New York, 34-48.
- 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.
- Feijoo, M., Lessa, E. P., Loizaga de Castro, R. & Crespo, E.A. (2011). *Mitochondrial and microsatellite assessment of population structure of South American sea lion (Otaria flavescens) in the Southwestern Atlantic Ocean*. Marine Biology, 158(8):1857-1867.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C. & Moor, S.S. (1995). *Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci over 300 Million Years of Marine Turtle Evolution*. Molecular Biology Evolution. 12(3):432-440.
- Galan, M., Cosson, J.F., Aulagnier, S., Maillard, J.C., Thévenon, S. & Hewison, A.J.M. (2003). *Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (Capreolus capreolus) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci*. Molecular Ecology Notes, 3:142-6.
- Gaur, A., Singh, A., Arunabala, V., Umapathy, G., Shailaja, K. & Singh, L. (2003). *Development and characterization of 10 novel microsatellite markers from Chital deer (Cervus axis) and their cross-amplification in other related species*. Molecular Ecology Notes, 3:607-9.
- Gayot, M., Henry, O., Dubost, G. & Sabatier, D. (2004). *Comparative diet of the two forest cervids of the genus Mazama in French Guiana*. Journal of Tropical Ecology, 20: 31-43.

- 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.
- Geist, V. (1998). *Deer of the World, Their Evolution, Behavior, and Ecology*. Stackpole Books, Mechanicsburg.
- González, S. (2004). *Biología y conservación de Cévidos Neotropicales del Uruguay*. Informe Proyecto CSIC-UdelaR. pp. 57.
- González, S. & Duarte, J.M.B. (2007). *Noninvasive methods for genetic analysis applied to ecological and behavioral studies in Latino-America*. *Revista brasileira de Zootecnia*, 36:89-92.
- González, S. y Elizondo, C. (2010). *Distribución de Mazama gouazoubira en el Uruguay*. Primer Congreso Uruguayo de Zoología, 5 al 10 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.
- 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. 21-59.
- Guo, X. & Elston R.C. (1999). *Linkage information content of polymorphic genetic markers*. *Human Heredity*, 49:112-118.
- Guo, S.W. & Thompson E.A. (1992). *Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles*. *Biometrics*, 48:361-72.
- 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.
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. (1996). *Microsatellites: from molecules to population and back*. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10):424-429
- 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

- Kays, R.W., Gittleman, J. L. & Wayne, R. K. (2000). *Microsatellite analysis of kinkajou social organization*. *Molecular Ecology* 9:743- 751.
- Kimura, M. & Crow, J.F. (1964). *The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population*. *Genetics*, 49(9):725-738.
- Landguth, E.L., Cushman, S.A., Schwartz, M.K., McKelvey, K.S, Murphy, M. & Luikart, G. (2010). *Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics*. *Molecular Ecology*, 19(19):4179-4191.
- Lee, T.M. & Jetz, W. (2008). *Future battlegrounds for conservation under global change*. Royal Society Publisher, 275(1640):1261-1270.
- Lettink, M., Jamieson, I.G., Millar, C.D. & Lambert, D.M. (2002). Mating system and genetic variation in the endangered New Zealand takahe. *Conservation Genetics*. 3: 427-434.
- Li, Y- C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles A. & Nevo, E. (2002). *Microsatellites: genomic distribution, putative function and mutational mechanisms, a review*. *Molecular Ecology*, 11(12):2453-2465.
- Mannise, N., Cosse, M.y Repetto, L. (2012) *Análisis genético sobre la presencia de Aguará Gazú (Carnívora, Mammalia) en Uruguay*. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 21: 30-38.
- Mantellatto, 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)*. *Genetics and Molecular Research* 9:277-282.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. (1998). *Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations*. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- Maudet, C., Miller, C., Bassano, B., Breitenmoser-Würsten, C. & Gauthier, D. (2002). *Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [Capra ibex (ibex)]*. *Molecular Ecology* 11:421-36.
- Medrano, J.F., Aasen, E. & Sharrow L. (1990). *DNA extraction from nucleated red blood cells*. *BioTechniques*, 8:43.

- Moore, S.S., Sargeant, L.L., King, T. J., Mattick, J.S., Georges, M. & Hetzel, D.J.S. (1991). *The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species*. *Genomics*, 10:6554-6560.
- Morin, P.A., Woodruff, D.S. & Moore, J.J. (1992). *Identification of Chimpanzee Subspecies with DNA from Hair and Allele-Specific Probes*. Royal Society Publisher, 249(1326):293-297.
- Ortega, J., Maldonado, J.E., Arita, H.T., Wilkinson, G.S. & Fleischer, R.C. (2002). *Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification*. *Molecular Ecology Notes*, 2:462-4.
- Palstra, F.P. & Ruzzante, D.E. (2008). *Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence?* *Molecular Ecology* 17:3428-3447.
- Periago, M. P. & Leynaud, J. C. (2009). Density estimates of *Mazama gouazoubira* (Cervidae) using the pellet count technique in the arid Chaco (Argentina). *Ecología Austral*, 19:73-77.
- Queller, D.C., Strassmann J.E. & Hughes, C.R. (1993). *Microsatellites and kinship*. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 285- 288.
- Raimondi, V. B., Maruyama Mori, G., Piedrabuena, M.R., Wolfenson, L. & Mirol, P. (2012). *Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Cervidae)*. *Conservation Genetics Resources*, 4(4): 1089-1092.
- Randall, D., Pollinger, J., Argaw, K., Macdonald, D. & Wayne, R. (2009). *Fine-scale genetic structure in Ethiopian wolves imposed by sociality, migration, and population bottlenecks*. *Conservation Genetics*.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). *GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact test and ecumenicism*. *Journal of Heredity*, 86:248- 249.
- Rice, W.R. (1989). *Analysing tables of statistical tests*. *Evolution*, 43:223-5.
- Rousset F. (2009). *Genepop 4.0 for Windows and Linux*.
- Ruiz-Garcia, M., Martinez-Aguero, M., Alvarez, D. y Goodman, S. (2009). *Variabilidad genética en géneros de ciervos neotropicales (Mammalia: Cervidae) según loci microsatelitales*. *Revista de Biología Tropical*, 57:879-904.

- Ruiz-Garcia, M., Randi, E., Martinez-Aguero, M. & Alvarez, D. (2007). *Phylogenetic relationships among Neotropical deer genera (Artiodactyla: Cervidae) by means of DNAmT sequences and microsatellite markers*. *Revista de Biología Tropical*, 55:723-741.
- Schlötterer, C. & Pemberton, J. (1998). *The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review*. *Molecular approaches to Ecology and Evolution*, 71-86.
- Schlötterer, C & Pemberton J. (2000). *Evolutionary dynamics of microsatellite DNA*. *Chromosoma*, 109(6):365-371.
- Selkoe, K.A. & Toonen, R.J. (2006). *Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers*. *Ecology Letters* 9:615–629.
- Soutullo, A., Clavijo, C., Martínez-Lanfranco, J.A. (2013) *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. SNAP/DINAMA/MVOTMA Y DICYT/MEC, Montevideo
- Soriguer, F. y Morcillo, S. (2007) *¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg?* *Endocrinología y Nutrición* 54(3):169-173.
- van Hoof, W.F., Groen, A.F. & Prins, H.H.T. (2003). *Genetic structure of African buffalo herds based on variation at the mitochondrial D-loop and autosomal microsatellite loci: Evidence for male-biased gene flow*. *Conservation Genetics* 4: 467-77.
- Viteri, M.P. & Waits, L.P. (2009). *Identifying polymorphic microsatellite loci for Andean bear research*. *International Association for Bear Research and Management*, 102-108.
- Wang, M. & Schreiber, A. (2001). *The impact of habitat fragmentation and social structure on the population genetics of roe deer (Capreolus capreolus L.) in Central Europe*. *Heredity*, 86:703-15.
- 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, 38–64.
- Weber, M. & González, S. (2003). *Latin American deer diversity and conservation: A review of tatus and distribution*. *Ecoscience*, 10:443-454.
- Weir, B.S. (1996). *Genetic data analysis II*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Zane, L., Bargellon, L. & Patarnello, T. (2002). *Strategies for microsatellite isolation: a review*.  
Molecular Ecology, 11:1-16.

<http://www.mvotma.gub.uy/>

## **VIII. ANEXOS**

### **VIII.I Tabla de muestras analizadas.**

Para cada una de las 36 muestras analizadas se especifica lugar de recolección y relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230.

<b>ID</b>	<b>PAÍS</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>LUGAR</b>	<b>Abs260/280</b>	<b>Abs260/230</b>
MSG 03	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1.67	1.35
MSG22	Brasil	San Pablo	Municipio_ITU	1.73	1.21
MSG23	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1.87	1.2
MSG27	Brasil	San Pablo	Sao_Roque	1.93	1.07
MSG35	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1.61	1.03
MSG36	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1.23	0.98
MSG47	Uruguay	Rocha	Don Bosco	1.63	0.64
MSG49	Paraguay	Asunción	Asunción_ZOO	1.66	1.22
MSG53	Brasil	Paraná	Hacienda_Municipio_de_Lapa	1.88	1.91
MSG59	Brasil	San Pablo	Sorocaba_ZOO	1.61	0.98
MSG63	Uruguay	Rivera	Parque_Lecocq	1.7	0.38
MSG66	Argentina	Tucumán	Este_Tucumán_Límite_Santiago_del_Estero	1.7	1.29
MSG70	Perú			1.84	1.36
MSG71	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.55	0.82
MSG72	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.87	1.33
MSG73	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.86	1.96
MSG75	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.13	0.47
MSG76	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.31	0.51
MSG77	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.93	1.42
MSG78	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.48	0.64
MSG79	Argentina	Tucumán	Tucumán	1.78	1.34
MSG83	Perú	Cuzco	La_Convención_Echarate_Campamento_Yamihua	1.92	1.67
MSG88	Uruguay	Lavalleja	Aguas_Blancas	1.88	1.69
MSG90	Uruguay	Paysandú	Arroyo_Quebracho	1.84	1.06
MSG92	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.81	0.85
MSG93	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	2.13	2.32
MSG96	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.58	0.9
MSG100	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.66	0.93
MSG107	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.96	1.57
MSG108	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	2.01	1.43
MSG111	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.85	1.87
MSG117	Uruguay	Lavalleja	Parque_Salus	1.93	1.99
MSG122	Uruguay	Tacuarembó	A_Laureles	1.94	0,73
MSG137	Paraguay	Boquerón	Agua_Dulce	1.77	1.87
MSG139	Paraguay	Itapúa	Isla_Yacyretá	1.48	0.94

## VIII.II Tabla de loci analizados.

Loci analizados no incluidos en la matriz, se especifica secuencias, especie en la que fueron clonados, temperatura de anidamiento para cada uno y la caracterización en función de los resultados obtenidos en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

locus	Secuencia Reverse 5'-3'	Secuencia Forward 5'-3'	clonado en	ta (°C)	caracterización
BM4513	TCA GCAA TTCA GTACATCACCC	GCGCAA GTTTCCTCATGC	vaca	56	no amplifica
CSSM43	GTTACAAA TTTAAGAGACAGAGTT	AAA ACTCTGGGAACTTGAAA ACTA	vaca	48	no genotipable
ETH225	GATCA CCTTGCCA CTA TTTCTT	ACATGACA GCCA GCTGCTACT	vaca	56	no amplifica
HUJ175	AAGGATTAACAAGAATGGCTGG	GGAGCATGTATGTGTGTGTGC	vaca	54	no amplifica
INRA05	CTTCA GGCATACCTCA CACC	CAATCTGCATGAAGTATAAATAT	vaca	46	baja eficiencia amp.
INRA40	CTCTGCCCTGGGATGATG	TCA GTCTCCAGGAGAGAAAAC	oveja	55	no genotipable
OarVH98	CCGGAAGTCCATAAGAGCTATTCTTAACC	ATGAACTAACCTCCGTAGACCCAGC	vaca	59	no amplifica
SR12	AATCTGATTTCA TTTTCATG	TGACCAGGTGACTAAACAC	cabra	54	baja eficiencia amp.
SR24	TCTAGGTCCATCTGTGTTATTGC	AGCAA GAAGTGTCCACTGACAG	cabra	55	baja eficiencia amp.
TGLA378	CAGTACCTCTCAACTTCATGTATGT	TTTATAGCCAA CCA TATACTTTGCC	vaca	53	no genotipable
TGLA10	CAA TCTGCATGATGATACCTCTG	CTAAATTTATCCCACTGTGGCTCTT	vaca	55	monomórfico
Goua6	CTCCA GGCATTTATCA TCA CAG	CTGTGATGATAAATGCCTGGAG	m.gouazoubira	55	no amplifica
Goua7	GACCCTCAGATTTGGATCAGAC	GTCTGATCCAAATCTGAGGGTC	m.gouazoubira	55	polimórfico*
Goua8	CCCATA TCCTGACATCTCCTTT	AAAGGAGATGTCAAGGATATGGG	m.gouazoubira	55	no genotipable
Goua9	GCCTCAGCTTTATCTCACTCTGA	TCAGAGTGAGATAAAGCTGAGGC	m.gouazoubira	57	no consistente
Goua11	GATCCTTTTCGTGGTTATGGC	GCCATAACCAACGAAA GGATAC	m.gouazoubira	55	no genotipable
Goua12	GATCCTTTTCGTGGTTATGGC	GCCATAACCAACGAAA GGATAC	m.gouazoubira	55	no amplifica
Goua13	AGATGAGGTCAAATCGGCTTC	GAA GCGCATTTGACCTCATCT	m.gouazoubira	55	no amplifica
Goua14	ATCGCCAAAGACAGAA TACTCC	GGAGTATCTGTCTTTGGCGAT	m.gouazoubira	55	no genotipable
Goua15	CTTTATGGCGGCTACAGAC	GTCTGGTAGCCGCCATAAAG	m.gouazoubira	55	no amplifica
GOUA16	GCGTACTTTGCTATCTCATTAG	GGGACAGTGATAAATAAGGTGT	m.gouazub.	55	no amplifica
Goua17	TTGGTAGCTTGATAGGGATTGC	GCAATCCCTATCAAGCTACCAA	m.gouazoubira	55	baja eficiencia amp.
Goua18	ACTCCTGATTTCTGCTGGAA	TTCCAGGCAAGAAATACAGGAGT	m.gouazoubira	52	baja eficiencia amp.
Goua19	TAA TGACACCAAGCTATCGCC	GGGATAGCTTGGTGTCA TTA	m.gouazoubira	50	no amplifica
Goua20	CACAAGGGTTTTCTCCAGTTGT	ACAACTGGAGAAAACCTTGTG	m.gouazoubira	55	no genotipable
GOUA21	CTTCTCTAGGTGAA CCCCATG	GAGTACAACGCCATGCAGAGA	m.gouazub.	52	no genotipable
Goua22	TTCTCCCCAAA CTGAAATC	GATTCAGTTTTGGGGAGAA	m.gouazoubira	55	no amplifica
Goua23	TGTATCTACTAA TTCCTCCTC	GAGGAGGGAATAGTAGATACA	m.gouazoubira	52	no amplifica
BM2113	GCTGCCTTACCAAA TACCC	CTTCTGAGAGAAAGCAACACC	vaca	60	monomórfico
ETH3	GAACTGCCTCTCTGCA TTGG	ACTCTGCCTGTGGCCAA GTAGG	vaca	55	no genotipable
TGLA 53	ATCTTCACATGATTTACAGCAGA	GCTTTCA GAAATAGTTTGCATTC	vaca	55	monomórfico
TGLA 227	ACAGACAGAAACTCAA TGAAAGCA	CGAA TTCCAAA TCTGTTAATTTGCT	vaca	60	no genotipable
ETH10	TGTTAGCAGGGCCATCCTGAAC	GTTACGACTGGCCCTGCTAACA	vaca	58	no amplifica
TGLA126	AGAAGCCTCTCTCA TTTCAAATTAG	CTAA TTTAGAA TGAGAGGGCTTCT	vaca	58	no genotipable
TGLA122	GCTGATTTACTGGAGGAGGG	CCCTCTCCAGGTAATCA GC	vaca	58	no amplifica
INRA23	GTTTATCTTGATGCTCTACTC	GAGTAGACTCAAGATAAAC	vaca	55	no amplifica
ETH225	AGGAAATAGTGCCAAGGTGATC	GATCACCTTGCCACTATTTCTT	vaca	60	baja eficiencia amp.
BM1824	GATGGAAAACACCTTGCTC	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	vaca	58	no amplifica

\* amplificó en pocos individuos