



**Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias**

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Riegel Sch.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

PROFESOR CO-PATROCINANTE

Dr. José Núñez N.
Instituto de Zoología
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

**EVALUACIÓN DE LOCI MICROSATELITALES HETERÓLOGOS Y UTILIZACIÓN
DE SECUENCIAS DE CITOCROMO OXIDASA I MITOCONDRIAL EN ESTUDIOS
GENÉTICOS DE *Pudu puda* (Artiodactyla, Cervidae).**

Tesis de Grado, presentada como parte
de los requisitos para optar al **grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas.**

BENJAMIN ELIECER GUZMAN RIFFO
VALDIVIA – CHILE
2007

A mi abuelo, mi primer
profesor.

“¿Que es Ciencia, sino la filosofía
natural de la esencia de la vida
humana?”

AGRADECIMIENTOS

No puedo dejar de agradecer a mis profesores patrocinante y copatrocinante Dr. Ricardo Riegel y Dr. José Núñez, por haber confiado en mí este enriquecedor desafío, por haberme formado como científico, por entregarme las herramientas necesarias para mi desarrollo tanto personal como profesional y por su invaluable amistad. A mi profesor informante Dr. Jaime Jiménez por su especial dedicación, consejos, comentarios y ayuda en la corrección de esta tesis, al Dr. Daniel Gonzáles por la facilitarnos las muestras biológicas y al Dr. Ramón Formas por sus amistad, apoyo, comentarios y corrección de esta tesis A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (Karin y Débora) por su amable asistencia, a los integrantes del laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Zoología (Dr. Núñez, Felipe, Elías, Andrés y Renato) por proporcionarme su amistad, un espacio tanto físico en el laboratorio, como intelectual en las fructíferas discusiones emergentes, que sin lugar a dudas me hicieron crecer como persona y como científico. A don León y a la Sra. Rosario, por su hermosa amistad, ayuda y preocupación constante.

Al Instituto de Embriología, personal académico y no académico, por su amistad, ayuda incondicional y por su amable acogida en su laboratorio y sala de computadores.

A Tamara por su cariño incondicional y correcciones en la tesis, a mi “familia” en la acepción más amplia de la palabra, en la que involucra amigos y amigas, compañeros de laboratorio, de carrera, de terreno, de tristezas y alegrías, de ideologías y de utopías, a Macarena en la distancia y a mis padres.

“Como la metáfora al poeta, las insertazas mantienen vivo al científico.”

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | VI |
| ABREVIATURAS | VII |
| 1.- RESUMEN | 1 |
| 1.1 SUMMARY | 2 |
| 2.- INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3.- MATERIAL Y MÉTODOS | 9 |
| 3.1 Material | 9 |
| 3.1.1 Material biológico | 9 |
| 3.1.2 Material de laboratorio | 9 |
| 3.1.2.1 Equipos | 10 |
| 3.1.2.2 Material reutilizable | 10 |
| 3.1.3 Reactivos | 11 |
| 3.2 Métodos | 12 |
| 3.2.1 Aislamiento de DNA | 12 |
| 3.2.2 Concentración óptima de DNA para la amplificación enzimática de loci SSR | 12 |
| 3.2.3 Metodología para el análisis de loci microsatélites | 13 |
| 3.2.3.1 Evaluación de la amplificación enzimática de loci microsatélites | 13 |
| 3.2.3.2 Loci microsatélites evaluados | 15 |
| 3.2.3.3 Electroforesis de los productos de PCR en geles de poliacrilamida | 16 |
| 3.2.3.3.1 Preparación de los vidrios | 16 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3.3.2 Preparación del gel de poliacrilamida | 16 |
| 3.2.3.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis | 17 |
| 3.2.3.3.4 Electroforesis | 17 |
| 3.2.3.3.5 Tinción de los geles con Nitrato de Plata | 18 |
| 3.2.3.3.6 Análisis de los datos obtenidos | 19 |
| 3.2.4 Evaluación de la amplificación de genes mitocondriales (COI y <i>Cyt b</i>) | 20 |
| 3.2.4.1 Evaluación de la amplificación enzimática del gen COI mitocondrial | 20 |
| 3.2.4.2 Evaluación de la amplificación enzimática del gen <i>Cyt b</i> mitocondrial | 21 |
| 3.2.4.3 Electroforesis en gel de agarosa | 22 |
| 3.2.4.4 Análisis de las secuencias del gen COI mitocondrial | 22 |
| 4.- RESULTADOS | 23 |
| 4.1 Aislamiento de DNA | 23 |
| 4.2 Análisis de los loci microsatelitales | 26 |
| 4.2.1 Evaluación de la amplificación y del polimorfismo de los loci microsatélites | 26 |
| 4.2.2 Análisis de parámetros genético poblacionales | 30 |
| 4.2.3 Capacidad de los loci para detectar genotipos distintos | 31 |
| 4.3 Evaluación de la amplificación de COI y <i>Cyt b</i> y polimorfismo de COI | 32 |
| 4.3.1 Evaluación de la amplificación de COI y <i>Cyt b</i> | 32 |
| 4.3.2 Secuenciación y alineamiento de las secuencias por medio de Clustal X | 35 |
| 5.- DISCUSIÓN | 37 |
| 5.1 Amplificación de los loci microsatélites | 37 |
| 5.1.1 Aspectos técnicos | 37 |
| 5.2 Evaluación de polimorfismo de los loci microsatélites amplificados | 39 |

| | |
|--|----|
| 5.2.1 Análisis de parámetros genéticos poblacionales | 43 |
| 5.2.2 Detección de genotipos únicos en la muestra mediante SSR polimórficos | 45 |
| 5.3 Evaluación de la utilización de secuencias del gen COI mitocondrial | 45 |
| 5.4 Conclusiones | 47 |
| 5.4.1 Amplificación y polimorfismo de loci microsatélites heterólogos | 47 |
| 5.4.2 Índice de contenido polimórfico (PIC) | 48 |
| 5.4.3 Detección de genotipos únicos en los individuos analizados | 48 |
| 5.4.4 Amplificación del fragmento de Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo <i>b</i> (Cyt <i>b</i>) | 48 |
| 5.4.5 Análisis de las secuencias de COI | 48 |
| 6.- BIBLIOGRAFIA | 49 |
| ANEXOS | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa 0,7% buffer SB 1X y visualizado en luz UV. En carril 1 se cargo el marcador λ DNA / *Hind* III, en los carriles 2, 3, 4 se cargaron DNAs aislado de tejido muscular, se puede observar el último DNA que presentó degradación. 24
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 0,7% buffer SB 1X y visualizado en luz UV. En carril 1 se cargo el marcador λ DNA / *Hind* III, en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 se cargaron los DNAs aislados de tejido sanguíneo. 25
- Figura 3.** Geles de poliacrilamida, se observan los loci polimórficos y uno monomórfico, se les proporcionó un número a cada alelo y con estos se elaboró una planilla en Excel. A) Visualización de 8 alelos para el Locus NVHRT16 B) Visualización de 5 alelos para el Locus NVHRT24 C) Visualización de 4 alelos para el Locus CSRM60 y D) Locus ILSTS06 monomórfico. 27
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizada a la luz UV. En el carril 1 se cargó el marcador λ DNA / *Hind* III, en los siguientes se cargaron los 6 individuos que se amplificación con partidores universales para COI, la amplificación tiene un tamaño aproximado de 600 pb. 32

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizada a la luz UV. En el carril 1 se cargó el marcador λ DNA / *Hind* III, en los siguientes se cargaron los 6 individuos que se amplificaron con primarios universales para *Cyt b*, la amplificación tiene un tamaño aproximado de 400 pb. 33

Figura 6. Árbol filogenético de consenso derivado de análisis Bayesiano y máxima verosimilitud, basado en 4 marcadores moleculares (COII, Cyb, LAlb y PRKCI), se puede observar la divergencia evolutiva de Cervidae, (Gilbert *et al.* 2006). 41

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cálculo de volúmenes utilizados en la PCR, dadas las concentraciones iniciales de los reactivos, se ejemplifica la variación de la concentración de MgCl ₂ . | 14 |
| Tabla 2. Nombre, secuencia y referencia de los loci microsatélites evaluados. | 15 |
| Tabla 3. Matriz elaborada en base a los alelos obtenidos de cada locus. Esta Matriz fue ingresada para su análisis en el programa CERVUS 2.0. | 28 |
| Tabla 4. Loci amplificados y polimórficos, se resaltan en negrita los loci que resultaron polimórficos en pudu. | 29 |
| Tabla 5. Loci polimórficos en pudu, tipo de microsatélites y rangos de tamaños esperados y observados en este estudio. | 29 |
| Tabla 6. Parámetros genéticos poblacionales estimados; heterocigocidad esperada H(E)* según Nei (1973), heterocigocidad observada H(O), el contenido de información polimórfica (PIC) de los loci y su número de alelos por locus (K). | 30 |
| Tabla 7. Capacidad de los loci para detectar genotipos distintos, los loci son evaluados en forma individual y en grupos para encontrar genotipos únicos o diferentes en los 16 individuos analizados. | 31 |
| Tabla 8. Tabla de secuencias de 6 individuos (P1 y P2 de Valdivia y los demás del criadero de Concepción), se representa la variabilidad nucleotídica en las secuencias de COI mitocondrial en pudu. | 35 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| C | Celcius |
| Cyt <i>b</i> | Citocromo <i>b</i> |
| COI | Citocromo Oxidasa subunidad I |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| dNTP | Desoxinucleótidos Trifosfato |
| D.O. | Densidad óptica |
| EDTA | Acido Etilendiaminotetraacético |
| g | gramo |
| Kb | Kilobases |
| mA | miliamperes |
| ml | mililitro |
| mg | miligramo |
| mM | milimolar |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| ng | nanogramo |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PIC | Índice de contenido polimórfico |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SSR | Repeticiones de secuencias simples |
| SB | Sodio bórico |

| | |
|------|--------------------------|
| T° | Temperatura |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris borato EDTA |
| Tris | Tris-hidroximetilamina |
| µg | microgramo |
| µl | microlitro |
| µm | micrómetro |
| U | Unidad |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |

1.- RESUMEN

El pudu (*Pudu puda*) es una de las especies endémicas de Chile con graves problemas de conservación, debido a que sus poblaciones se han visto fragmentadas y disminuidas por efectos antropogénicos. En esta perspectiva, se ha incrementado el interés científico por mantener la diversidad genética de esta especie propiciando así la capacidad de adaptación a nuevos ambientes.

En este trabajo se evaluaron 20 loci microsatélites desarrollados en bovinos, ovinos y algunos cervidos, en 16 individuos de pudu. También se evaluó la amplificación por PCR de los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo *b* (Cyt *b*) en el genoma del pudu y además se analizó la secuencia COI mitocondrial para estudios intrapoblacionales en seis individuos de la misma especie. De los 20 microsatélites evaluados amplificaron 18 y solo tres presentaron polimorfismo con un PIC mayor a 0,5. Tanto los fragmentos de COI como Cyt *b* fueron amplificados en el genoma del pudu y las secuencias COI presentaron polimorfismos a nivel de individuos, diferenciando marcadamente a tres haplotipos. Los resultados obtenidos permiten concluir que los tres loci SSR polimórficos y la secuencia COI mitocondrial son potencialmente utilizables en estudios genéticos en pudu.

1.1 SUMMARY

The pudu (*Pudu puda*) is one of the endemic species of Chile with serious problems of conservation, given its fragmented and depaupered populations due to anthropogenic effects. In this perspective, scientific interest has increased to support the genetic diversity of this species, promoting in this way the adaptation ability to new environments.

In this work, I evaluate 20 microsatellites of bovine and sheep, in 16 individuals of pudu. Also the amplification of mitochondrial genes Cytochrome Oxidase subunit I (COI) and Cytochrome *b* (Cyt *b*) in the pudu genome and the mitochondrial COI sequence was evaluated for intraspecific variation analysis in six individuals of this species. Of 20, 18 were amplified and only three presented polymorphism, with a PIC higher 0.5. Both fragments (COI and Cyt *b*) were amplified in the pudu genome and the COI sequences presented polymorphisms at the individual level, differentiating markedly three haplotypes. The results found here allow us to conclude that three polymorphic SSR loci and the mitochondrial COI sequences are potentially useful in genetic studies in pudu.

2.- INTRODUCCIÓN

El Teorema Fundamental de la Selección Natural (Fisher 1930) señala que la tasa de cambio evolutivo es directamente proporcional a la varianza genética aditiva del valor adaptativo de la población (Ayala 1965). Es decir, la variabilidad genética hace posible que las especies se adapten a un ambiente que esté en cambio constante (Frankham *et al.* 2002, 2003).

En este sentido, la información genética de una determinada población o especie y conocer cuáles son los factores determinantes de su variabilidad son pasos fundamentales para la conservación de éstas (Frankham 1995, Schwartz *et al.* 2007). Existen varios mecanismos que determinan las probabilidades de extinción de las especies como por ejemplo: la depresión endogámica, la variación genética reducida por tamaños efectivos pequeños, la acumulación de mutaciones deletéreas, la migración reducida entre poblaciones fragmentadas y la amalgamación de acervos génicos no totalmente compatibles (Hedrick & Miller 1992, O'Brien 1994, Rand 1996). Por lo tanto, una manera de ayudar a conservar un recurso biológico es mantener su variabilidad genética y conocer la distribución intra e interpoblacional de ésta (Maynard-Smith & Szathmary 1995, Ramos 1998).

En nuestro país, una de las especies nativas que ha sufrido una disminución acelerada de sus poblaciones, transformándolas en poblaciones pequeñas y fragmentadas, es el pudu (*Pudu puda*), mamífero considerado el miembro más pequeño del mundo de la familia Cervidae (Jiménez 1995, Bello 2003).

El pudu en estado adulto mide entre 70 a 90 cm de largo, 40 cm de alzada a la cruz y pesa de 10 a 15 k. (Hershkovitz 1982, CEAL 1983, Czernay 1987, Blumberg 2002, Jiménez 2007 *in press*). Su pelaje es denso y firme, de color pardo rojizo en adultos. En cervatillos el pelaje es

suave y presenta pequeñas manchas blanquecinas en el dorso (Reyes 1991). Solo expresan dimorfismo sexual en la presencia de astas simples en los machos (Reyes *et al.* 1988).

Esta especie se distribuye desde los 35°10' S (VII Región) hasta los 46°45' S (XI Región) y habita los bosques lluviosos con sotobosque denso, los bosques secundarios y matorrales de especies nativas (Eldridge *et al.* 1987, Jiménez 1995, 2005). Altitudinalmente puede ser encontrado desde el nivel del mar hasta los 1700 m. Según Hershkovitz (1982) son tímidos, escurridizos y monógamos, son solitarios y en la época reproductiva andan en parejas o las hembras con su cría (Jiménez 2005).

Actualmente, la supervivencia del pudu se ha visto amenazada debido a la caza irracional por el hombre, ataques de perros domésticos (Neumann 1992, Jiménez 1995), la tala sin control de bosque nativo, la plantación masiva de monocultivos de árboles exóticos y por el extensivo desarrollo agropecuario (Walker 1975, Venegas *et al.* 2006). A esto se suma la introducción de tres especies de cérvidos exóticos en nuestro país como lo son el corzo (*Capreolus capreolus*), el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y el gamo (*Dama dama*), no existiendo ninguna información o estudio previo acerca de las posibles competencias, transmisión de enfermedades y superposición de hábitats con el pudu (Schlatter 1992). Es probable que la endogamia en estas poblaciones aisladas, se haya incrementado como consecuencia de la fragmentación y reducción de las poblaciones (CODEFF 1991, Mella *et al.* 2002).

Por estos antecedentes, el pudu ha sido registrado por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), como “Especie en Peligro de Extinción” y considerado como “Especie Vulnerable” por la CONAF en 1993 (Glade 1993). En algunas regiones, se han puesto en marcha medidas de protección a favor de esta especie como los proyectos de conservación en la Universidad de Concepción (Ojeda 1997), donde se han realizados algunos estudios

endocrinológicos del pudu (Reyes 1991). No obstante, la biología de la conservación no solo se basa en estudios ecológicos y reproductivos, sino que lleva implícito la realización de estudios transdisciplinarios que se ocupan de la diversidad biológica a tres niveles: ecosistémico, organísmico y genético (Humphries *et al.* 1995, Thorpe *et al.* 1995, Primack 2000). Es por lo menos preocupante entonces, que no exista hasta ahora un estudio que aborde más directamente la variabilidad genética de esta especie.

Para estudios genéticos en conservación son aplicables diversas técnicas moleculares que nos permiten detectar y monitorear la diversidad genética (polimorfismo) en las poblaciones. Ejemplo de ello son el estudio de marcadores moleculares genotípicos (Cushwa & Medrano 1996, Sunnucks 2000) los que pueden proporcionar información sobre la diversidad genética y aspectos tanto poblacionales como específicos (Schwartz *et al.* 2007).

Los microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats) son uno de los marcadores genotípicos más utilizados y corresponden a regiones cortas de DNA cuya secuencia consiste en unidades de 1 a 6 nucleótidos de longitud, como motivos repetidos en tándem un cierto número de veces (Chambers & MacAvoy 2000). Este tipo de secuencias se han encontrado en especies eucariontes (Tautz 1994), procariontes (Zane *et al.* 2002), y están esparcidas aleatoriamente por todo el genoma (Tautz 1989, Krawczak & Schmidtke 1998, Chambers & MacAvoy 2000). Se clasifican en mono, di, tri, tetra, penta y hexanucleotídicos según el número de bases que la componen (Goldstein & Schlötterer 1999, Tóth *et al.* 2000). Chambers & MacAvoy (2000) proponen los términos de puro (o perfecto), compuesto y complejo, para especificar que uno, dos o más tipos de motivos se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y el término de interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas al interior de los microsatélites (Anexo 1).

Las aplicaciones de los microsatélites son muy variadas, permiten realizar estudios de filogeografía (Pope *et al.* 2000, Zachos *et al.* 2003, Sarno *et al.* 2004), estimar flujo génico (Coulon *et al.* 2004), detectar reducción en el tamaño poblacional (Garza & Williamson 2001) o establecer los niveles de subdivisión genética de las poblaciones naturales (Slatkin 1995, Sunnucks 2000, Reusch *et al.* 2000, Feulner *et al.* 2004, Sarno *et al.* 2004, Thulin 2006). También han tenido especial auge en la genética de la conservación (Beaumont & Bruford 1999, Sarno *et al.* 2001, 2004) debido a la poca cantidad de material genético que se requiere para el análisis (Beaumont & Bruford 1999). Esto hace posible analizarlos a partir de muestras colectadas por métodos no invasivos, como desde pelos y fecas (May *et al.* 1997, Beaumont & Bruford 1999).

Otro marcador molecular muy utilizado en diversos estudios es el DNA mitocondrial. Las propiedades de este marcador han sido discutidas ampliamente por Anderson *et al.* (1981), Avise & Lasman (1983), Brown (1983, 1985), Cann *et al.* (1987), Vigilant *et al.* (1991) y Horai *et al.* (1993). Entre ellas se pueden mencionar su facilidad para ser diferenciado del DNA nuclear, que posee un genoma haploide, que es heredado generalmente por vía materna sin que ocurra recombinación génica (Brown *et al.* 1979, 1982). Además, algunas regiones del DNA mitocondrial poseen una alta tasa de mutación, lo que hace que su evolución en los vertebrados sea cuatro veces más rápida que en la mayoría de los genes nucleares (Wilson *et al.* 1985, Birky *et al.* 1983, Vences *et al.* 2005, Rubinoff 2006).

Se ha propuesto un segmento de Citocromo Oxidasa I mitocondrial, de aproximadamente 600 pb y que presenta evolución rápida por lo que resulta ser un marcador adecuado para realizar estudios a nivel intraespecífico y entre especies próximas (Avise 2000, Hebert *et al.* 2003a, Vences *et al.* 2005, Rubinoff 2006).

Según estas características, existe la posibilidad de encontrar variabilidad intraespecífica en las secuencias de este gen en el genoma mitocondrial del pudu y así utilizarlo como un marcador genético para establecer diferencias dentro y entre poblaciones. Junto con los microsátélites, las secuencias de DNA mitocondrial se han convertido en herramientas potentes al momento de realizar estudios en conservación de especies (Frankham 2003, Qui-Hong *et al.* 2004) y en especies crípticas (Ferguson 2002), puesto que se pueden diferenciar grupos taxonómicos a nivel molecular.

De acuerdo a los antecedentes antes descritos se han propuesto las siguientes hipótesis:

Hipótesis de trabajo

H1. Los loci microsátélites heterólogos en *Artiodactyla*, presentan polimorfismo en el genoma de *Pudu puda*.

H2. Los marcadores moleculares mitocondriales (COI y *Cytb*) son amplificables mediante partidores universales y COI presenta variabilidad intraespecífica en el genoma de *Pudu puda*.

Las predicciones para aceptar la hipótesis 1 son las siguientes:

- 1) Los partidores heterólogos amplificarán los loci microsátélites en el genoma de *Pudu puda*.
- 2) Los loci microsátélites heterólogos presentarán polimorfismo en el genoma de individuos de esta especie.

Las predicciones para aceptar la hipótesis 2 son las siguientes:

- 1) Los partidores universales para COI y Cyt *b* mitocondrial amplificarán en el genoma del pudu.
- 2) El análisis de las secuencias de COI mitocondrial presentará polimorfismo nucleotídico en el genoma de los individuos amplificados.

Los objetivos generales de este trabajo son:

- 1.- Amplificar y evaluar polimorfismo de los loci microsatélites descritos para las familias Bovidae y Ovidae, utilizados en otras especies de cérvidos (Engel *et al.* 1996, Roed & Midthjell 1998, Roed 1998, Kuehn *et al.* 1996, 2003, Ruiz *et al.* 2003, Royo *et al.* 2007) en el genoma de *Pudu pudu*.
- 2.- Amplificar fragmentos COI y Cyt *b* mitocondriales en el genoma de *Pudu pudu*, y evaluar polimorfismo nucleotídico en COI.

Los objetivos específicos son:

- 1) Evaluar las condiciones de amplificación de loci microsatélites heterólogos en pudu
- 2) Caracterizar los loci microsatélites utilizando geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata.
- 3) Evaluar las condiciones de amplificación de genes mitocondriales (COI y Cyt *b*) en pudu.
- 4) Obtener secuencias del fragmento COI mitocondrial, utilizado como marcador.
- 5) Determinar polimorfismo de los loci microsatélites y haplotipos en el alineamiento de las secuencias del fragmento COI mitocondrial.
- 6) Determinar el índice de información polimórfica (PIC) de los loci microsatélites polimórficos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

En el presente trabajo de tesis se utilizaron diversos materiales, los que se han clasificado en tres categorías: material biológico, material de laboratorio y reactivos.

3.1.1 Material biológico

El material biológico de los especímenes de pudues, se obtuvieron por medio de extracción de tejido sanguíneo de individuos de un criadero de Santa Juana, VIII Región de Chile. Estas muestras fueron facilitadas por el Dr. Daniel González Acuña de la Universidad de Concepción. Es importante señalar que los individuos que se mantienen allí son procedentes de distintas áreas geográficas, incluyendo la isla de Chiloé. También se logró obtener muestras de tejido muscular de tres individuos preservados a -20°C en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. En total se obtuvieron 16 muestras de las cuales 14 provenían de individuos de un criadero privado de la VIII Region a los cuales se les denominó P3 al P16 y de tres de localidades cercanas a Valdivia denominados P1 y P2. Esta gran variabilidad en cuanto al origen de los animales, aumenta las posibilidades de encontrar diferencias genéticas entre individuos, si es que existiesen.

3.1.2 Material de laboratorio

Se utilizó el laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, para las actividades prácticas del presente trabajo.

3.1.2.1 Equipos

Se contó con un refrigerador a 4°C, en los cuales se almacenaron los reactivos que necesitan tal temperatura y se utilizó un congelador a -20° C para almacenar y conservar las muestras de tejido sanguíneo y muscular, DNA, reactivos para la PCR, productos de PCR, marcadores de tamaño molecular, partidores y otros que necesitan una temperatura menor a los 4°C.

Para el aislamiento de DNA se utilizó una microcentrífuga para tubos Eppendorf, un baño termostático para incubar las muestras y un espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic) para determinar su concentración.

Para la amplificación y electroforesis se usó un termociclador marca Little Genius (Bioer) para 25 muestras, un horno microondas para la preparación de los geles de agarosa, cámaras de electroforesis horizontal para geles de agarosa con capacidad para 8 y 35 muestras y cámaras de electroforesis para geles de secuenciación vertical de poliacrilamida (Scie-plas) con fuente de poder con capacidad de 3000V. Se observaron las bandas de los geles de agarosa en un transiluminador UV (Vilbert Loumart). Se utilizó un destilador y un desionizador de agua, una autoclave para esterilización de agua y del material reutilizable, un agitador para disolver soluciones y un vortex (Lab-Line Instrument).

3.1.2.2 Material reutilizable

Se usó material de vidrio tal como matraces, probetas, pipetas, vasos de precipitado, vidrios para preparar los geles de poliacrilamida, frascos Schott de 100 ml, 500 ml y 1000 ml, material de plástico como los separadores y peinetas para la preparación de los geles de

poliacrilamida, doble clip, espátulas de metal, varillas agitadoras magnéticas y recipientes plásticos con y sin tapa (bandejas).

3.1.3 Reactivos

Los reactivos y soluciones que se utilizaron en el presente trabajo se describen a continuación.

Extracción de DNA: Tampón de lisis STE pH 8,5 (NaCl 200 mM, Tris 100 mM, EDTA 50 mM); proteinasa K 100 μ g /ml; SDS 20%; fenol saturado (Invitrogen); acetato de sodio 3M pH 5,3 y etanol 99.5%.

PCR: Tampón PCR 10X; cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 25 mM; mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato 100 mM (Invitrogen), oligonucleótidos (partidores), Taq polimerasa (Invitrogen).

Electroforesis en geles de agarosa: Hidróxido de sodio (Scharlau); ácido bórico (Mallinckrodt); agarosa (TCL); azul de bromofenol (Aldrich Chem. Co.); glicerol (Fluka); λ DNA / Hind III (Fermentas); bromuro de etidio 10 mg / ml (Gibco BRL).

Electroforesis de poliacrilamida y tinción de los geles: Tris; EDTA; ácido bórico; urea (TCL); acrilamida (TCL); bis-acrilamida (TCL); persulfato de amonio (TCL); silane A 174 (Merck); Sigmacote[®] (Sigma); azul de bromofenol; nitrato de plata (Equilab); carbonato de sodio (Scharlau); formaldehído 37% y tiosulfato de sodio pentahidratado (Scharlau).

3.2 Métodos

3.2.1 Aislamiento de DNA

Se aisló DNA mediante el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para ello se tomó aproximadamente 100 mg de tejido preservado en etanol 100%, se dejó secar por unos segundos para eliminar el alcohol residual, se introdujo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 500 µl de tampón STE 1X al que se le agregaron 25 µl de SDS 20% y 15 µl de proteinasa K. Se incubó por aproximadamente 2 hr en un baño termoregulado a 55°C, agitando periódicamente los tubos Eppendorf durante la incubación. Una vez terminada la incubación se agregó fenol saturado a cada tubo en proporción 1:1 y se agitó en vórtex hasta obtener una solución homogénea. Esta solución se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Una vez centrifugada la solución se obtuvo dos fases diferenciables, se traspasó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf nuevo y estéril con el cuidado de no tomar el contenido de la fase inferior. Luego se le agregó 40 µl de acetato de sodio y etanol 95% frío en proporción 2:1, se mezcló suavemente por inversión y se dejó precipitar el DNA a – 20°C por un mínimo de 2 hr hasta un máximo de 12 hr. Una vez precipitado el DNA se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Al observar seca la muestra, se procedió a resuspender el DNA en 100 µl de agua desionizada estéril para las muestras de tejido sanguíneo y 300 µl para las muestras de tejido muscular. Luego se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.2.2 Concentración óptima de DNA para la amplificación enzimática de los microsatélites

El DNA obtenido, se diluyó 10 veces (1:10) y de éste se tomaron 0,5 µl; 1µl; 5µl; 8 µl y 10 µl para evaluar su concentración en la PCR. Una vez obtenido el volumen que daba mayor

resolución de banda se estimó la concentración del DNA óptimo por medio de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Se consideró que la absorbancia a 260 nm (1 D.O.) equivale a 50 µg/ml de DNA de dos hebras (Sambrook *et al.* 1989). La calidad de los DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa 1% en tampón TBE 1X y se evaluó el tampón SB 1X (10 mM NaOH, pH ajustado a 8,5 con H₃BO₃) (Brody & Kern 2004), teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz UV.

3.2.3 Metodología para el análisis de loci microsatélites

3.2.3.1 Evaluación de la amplificación enzimática de loci microsatelitales

La solución para la PCR se realizó en tubos de PCR de 0,2 ml en un volumen final de 25µl. Se preparó una “solución madre”, la cual contenía todos los componentes para la PCR a excepción del DNA. Se evaluaron los factores que influyen directamente en la amplificación (MgCl₂ y T° de reasociación) 1,5 mM, 2 mM, 3 mM y 4 mM MgCl₂ (Tabla 1); 1,5 mM dNTPs; 10 pmol de cada partidor; 0,5 U de taq DNA polimerasa y agua, se preparó la mezcla en un volumen razonable según el número de genotipos a analizar. Una vez preparada la “solución madre” se agregó el volumen calculado de la solución final a cada tubo que contiene el templado (Tabla 1), se mezcló rápidamente en vórtex y se llevaron al termociclador para la amplificación por PCR.

La amplificación de los loci microsatélites se llevó a cabo usando los tiempos y temperaturas previamente programados y que se describen a continuación por etapas: una predenaturación inicial de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos conteniendo cada uno una denaturación de 1 min a 92°C, una reasociación de 1 min a temperatura óptima según el locus (Tabla 4) y una extensión por 1 min a 72°C, al finalizar se realizó una extensión por 7 min a

72°C. Una vez obtenidos los productos de la PCR se guardaron en frío hasta su evaluación por electroforesis.

Tabla 1. Calculo de volúmenes utilizados en la PCR, dadas las concentraciones iniciales de los reactivos, se ejemplifica la variación del volumen de MgCl₂ y los volúmenes para cada genotipo.

| | | | |
|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| Mix PCR | 1X | Mix PCR | 1X |
| H ₂ Odd | 2,4 µl | H ₂ Odd | 1,9 µl |
| Tampón PCR 10X | 2,5 µl | Tampón PCR 10X | 2,5 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,5 µl | MgCl ₂ 25 mM | 2,0 µl |
| dNTPs 10mM | 1,0 µl | dNTPs 10mM | 1,0 µl |
| Partidor F 10 µM | 1,0 µl | Partidor F 10 µM | 1,0 µl |
| Partidor R 10 µM | 1,0 µl | Partidor R 10 µM | 1,0 µl |
| Taq Polimerasa | 0,6 µl | Taq Polimerasa | 0,6 µl |
| Volumen total | 10 µl | Volumen total | 10 µl |

| | |
|--------------------|-------|
| A cada tubo | |
| H ₂ Odd | 7 µl |
| ADN | 8 µl |
| Solución mix | 10 µl |
| Volumen total | 25 µl |

Tabla 2. Nombre, secuencia y referencia de los loci microsatélites evaluados.

| Locus | Partidor F 5' – 3' | Partidor R 5' – 3' | Referencia |
|------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| CSSM16 | agagccacttgttacaccccaaag | gatgcagtctccacttgattcaaa | Kuehn et al. 2003 |
| CSPS115 | aaagtgacacaacagcttctccag | aacgagtgctctagtttggtgtg | Kuehn et al. 2003 |
| ETH225 | acatgacagccagctgctact | actctgcctgtggccaagtagg | Kuehn et al. 2003 |
| CSRM60 | aagatgtgatccaagagagaggca | ggaccagatcgtgaaaggcatag | Kuehn et al. 2003 |
| IOBT918 | acttatgaaaaattactgagagcg | ttactactctgtcgcctctga | Kuehn et al. 2003 |
| ILSTS30 | ctgcagttctgcatatgtgg | cttagacaacaggggtttgg | Kemp et al. 1993 |
| HAUT14 | ccaggaagatgaagtgacc | tgaccttactcatgttattaa | Kuehn et al. 2003 |
| CSSM14 | aatgacctctcaatggaagcttg | gaattctggcacttaataggattca | Kuehn et al. 2003 |
| HAUT24 | ctctctgcctttttccctgt | aatacactttaggagaaaaata | Kuehn et al. 2003 |
| ILSTS06 | tgtctgtattttctgtgtgg | acacggaagcgatctaaacg | Kuehn et al. 2003 |
| MM12 | caagacaggtgttcaatct | atcgactctgggatgatgt | Kuehn et al. 2003 |
| INRA35 | ttgtgctttatgacactatccg | atcctttgcagcctccacattc | Kuehn et al. 2003 |
| CSSM22 | tctctctaattggagttggttttg | atatccactgaggataagaattc | Kuehn et al. 2003 |
| CSSM19 | ttgacagcaacttctgtatctt | tgttttaagccaccaattattg | Kuehn et al. 2003 |
| NVHRT16 | attctaagcccaataatctt | tctaaggggtctgtgtctt | Roed & Midthjell 1998 |
| NVHRT24 | tgtggactataggagc | gtgtacaaaaagtattgattgag | Roed & Midthjell 1998 |
| CSSM06 | agcttctgacctttaaagaaaatg | agcttatagatttgacaagtgcc | Moore et al. 1994 |
| BM1818 | agtgtttcaaggtccatgc | agctgggaatataaccaagg | Kuehn et al. 2003 |
| Oar FCB304 | ccctaggagctttcaataaagaatcgg | cgctgctgtcaactgggtcagg | Buchanan & Crawford 1993 |
| MAF70 | cacggagtcacaagagtcagacc | gcaggactctacgggctttgc | Buchanan & Crawford 1993 |

3.2.3.2 Loci microsatélites evaluados

Los loci microsatélites que se evaluaron en este trabajo han sido descritos por diferentes autores en estudios de ovinos (Kemp *et al.* 1993, Buchanan & Crawford 1993), bovinos (Moore *et al.* 1994) y que han sido transferidos en su utilización a estudios de cérvidos (Engel *et al.* 1996, Roed & Midthjell 1998, Roed 1998, Kuehn *et al.* 1996, 2003, Ruiz *et al.* 2003, Royo *et al.* 2007), presentando gran estabilidad en la amplificación y alto polimorfismo. Los 20 loci evaluados y sus características se explicitan en la Tabla 2.

3.2.3.3 Electroforesis de los productos de PCR en geles de poliacrilamida

3.2.3.3.1 Preparación de los vidrios

Se prepararon las placas de vidrio de 41 x 33 cm de dimensión y los separadores que tienen 0,35 mm de grosor. En primer lugar se lavaron las placas de vidrio con agua corriente y luego con agua bidestilada para sacar toda impureza de ellos. El vidrio más grande se lavó una vez con etanol al 75% y dos veces con etanol 95% por ambos lados. En la cara del vidrio que está en contacto con el gel se le agregó 400 µl de Bind Xilane o solución adherente, el cual deja una película que recubre esta cara del vidrio y que permite que el gel quede adherido covalentemente a él. Una vez que se ha secado el vidrio se lavó nuevamente tres veces con etanol 95%. El vidrio más corto se lavó con agua corriente y con agua bidestilada para eliminar las impurezas y luego se lavó primeramente con etanol de 75% y dos veces con etanol de 95%, luego se le agregó SIGMACOTE[®] que es un repelente del agua y se dejó secar por 5 min y después se lavó el vidrio con etanol 95% (dos veces). Esto permite que una vez finalizada la corrida electroforética se separen fácilmente los vidrios y el gel quede adherido en su totalidad al vidrio más grande.

Se colocaron los espaciadores previamente lavados con agua bidestilada y etanol sobre el vidrio más grande y se montó el vidrio corto sobre él haciendo calzar los tamaños y los separadores, luego se puso los clips que presionaron la periferia mientras polimerizaba el gel.

3.2.3.3.2 Preparación del gel de poliacrilamida

La electroforesis de los productos de PCR se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, condiciones denaturantes puesto que deseamos observar la amplificación de cada alelo y en estos geles podemos discriminar tamaños con una resolución de hasta un par de bases.

Los geles de poliacrilamida se prepararon haciendo polimerizar 60 ml de una solución Stock de poliacrilamida al 6 u 8% (19:1 acrilamida: bisacrilamida, Tris pH 8,0) (Anexo 2) previamente elaborada, filtrada y almacenada a - 4°C en oscuridad. La polimerización se llevó a cabo al agregar 330 µl de persulfato de amonio 10% y 33 µl de TEMED (C₆ H₁₆ N₂) que son catalizadores e iniciadores de la reacción, respectivamente. La preparación de los geles se realizó el día anterior al día en que se realizó la electroforesis para darle el tiempo necesario de polimerización a la poliacrilamida.

3.2.3.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis

Los productos de la PCR se mezclaron con tampón de carga (formamida 79%, xilencianol 0,1%, azul de bromofenol 0,1%, NaOH 0,01 M y 25 µl de agua bidestilada desionizada estéril) en relación de volúmenes de 1:1. Antes de cargar las muestras en el gel se denaturaron a 95°C por 6 min y se pusieron inmediatamente en hielo para evitar su renaturación. Se cargaron 6 µl de las muestras en los carriles formados por la peineta y se utilizó 2 µl de marcador de peso molecular de 50 pb GeneRuler™ (Fermentas) en el primer y último carril del gel.

3.2.3.3.4 Electroforesis

Una vez polimerizado el gel se sacó la peineta invertida y el espaciador de la parte inferior del gel. Se lavó el espacio donde estaba la peineta y el espacio donde estaba el espaciador con agua destilada y con tampón de corrida TBE 1X (89 mM Tris-Ácido Bórico [pH 8,0]; 2 mM EDTA) a fin de no dejar residuos de poliacrilamida, se introdujo tampón de corrida con la ayuda de una jeringa en el extremo inferior del gel donde estaba el espaciador a fin de que quede el gel en contacto directo con el tampón de corrida.

Las placas de vidrio con el gel fueron fijadas cuidadosamente en la cámara de secuenciación vertical presionando los extremos laterales por medio de tornillos y dejando en contacto directo el gel con el tampón de corrida en su parte superior e inferior. Como esta electroforesis es en condiciones denaturantes se dejó correr inicialmente el gel sin muestras para que alcance la temperatura necesaria de 58°C, temperatura alcanzada luego de suministrar una potencia constante de 90 Watts por 45 min. Cuando el gel alcanzó dicha temperatura, se procedió a cargar rápidamente las muestras que habían sido denaturadas y el marcador de tamaño molecular lo que permitió reconocer el tamaño de los distintos alelos observados. La corrida electroforética se realizó a una potencia de 75 Watts, 80 mA, 2000 V.

Se detuvo la electroforesis teniendo en cuenta el avance de los colorantes que constituyen el tampón de carga que contiene cada muestra y el tamaño esperado de los fragmentos para cada marcador. Se realizaron geles de poliacrilamida al 6% y al 8% en los que varía el avance de los colorantes. En los geles al 6% el azul de bromofenol avanza con los fragmentos de 26 pb y el xilencianol con los de 106 pb, en los geles al 8% el xilencianol avanza con los fragmentos de 75 pb. Una vez concluida la electroforesis se sacaron los vidrios de la cámara, se separaron cuidadosamente y finalmente se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata.

3.2.3.3.5 Tinción de los geles con Nitrato de Plata

Existen dos opciones para la visualización de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida. Una es por medio de bromuro de etidio que es muy tóxico y perjudicial para la salud. Además, debido al tamaño de estos geles, es mayor la manipulación con el reactivo por lo que se ha descartado este método en este trabajo. Se optó por la tinción con Nitrato de Plata que pese a ser más laboriosa, es más sensible en la tinción del DNA y menos tóxico para el investigador y para

el personal que trabaja en el laboratorio. La metodología de tinción que se utilizó en este trabajo consistió en las siguientes etapas (Jaramillo *et al.* 1994):

1.- *Fijación*: Se preparó una solución de ácido acético glacial al 10% (usando agua bidestilada desionizada para la dilución). Se sumergió el gel en la solución por 20 min agitando periódicamente. Posteriormente se lavó dos veces el gel con agua desionizada bidestilada por 2 min cada lavado.

2.- *Tinción*: Esta solución se preparó al 0,1% de nitrato de plata; formaldehído al 0,05%, se llevó a cabo por 30 min con agitación cada 5 min y se realizó un lavado con agua bidestilada desionizada por 5 s.

3.- *Revelado*: La solución de revelado se preparó con NaCO_3 al 3%; formaldehído al 0,05 % y tiosulfato de sodio 2 mg/ml. Se sumergió el gel en esta solución hasta que las bandas se hicieron visibles, luego de lo cual se procedió a detener el revelado en la solución de fijación (ácido acético 10%) anteriormente usada por 5 a 7 min. Para finalizar se dió un último enjuague y se dejó secar toda la noche para su posterior evaluación. Además, se evaluó un método alternativo para este paso práctico descrito por Qu *et al.* (2005) (Anexo 3).

3.2.3.3.6 Análisis de los datos obtenidos

Los datos obtenidos (alelos) para cada locus microsatélite por medio de la electroforesis y tinción con plata, fueron cuantificados y evaluados visualmente. La genotipificación se realizó otorgándole un número a cada alelo con los que se procedió a generar una planilla Excel para cada uno de los locus SSR utilizados (Tabla 3). Con esta información se estimó el índice de contenido polimórfico (PIC) de cada locus, el cual expresa el grado de polimorfismo capaz de

detectar un determinado marcador molecular (Powell *et al.* 1996) e indica la capacidad de los partidores en detectar loci polimórficos (Anderson *et al.* 1993). Este análisis se realizó por medio del programa CERVUS 2.0 Parentage Analysis © (Slate *et al.* 2000). Además se estimó la heterocigocidad esperada y observada en los individuos analizados y se determinó la capacidad de los loci polimórficos para distinguir genotipos distintos o genotipos únicos entre los individuos muestreados. Este análisis se llevó a cabo por medio del Programa POPGENE V3.2 (Yeh *et al.* 1997).

3.2.4 Evaluación de la amplificación de genes mitocondriales (COI y Cyt b)

Se utilizaron seis individuos para evaluar la amplificación de cada gen mitocondrial, de los cuales dos (P15 Y P16) provinieron de la provincia de Valdivia y cuatro (P1, P2, P3, P4) del criadero de Concepción. Se realizó el mismo método para los DNAs aislados anteriormente y se realizó la evaluación de la concentración óptima de estos DNAs para la PCR, ahora con los partidores que amplifican la región variable COI y *Cyt b* mitocondrial.

3.2.4.1 Evaluación de la amplificación enzimática del gen COI mitocondrial

La solución para la PCR se realizó en tubos de 0,2 ml con un volumen final de 50 µl, el que estaba compuesto por 13 µl de la solución madre o mix; 10 µl de DNA diluido (10:1) (20 ng) y 27 µl de agua destilada deionizada estéril. La solución mix fue preparada con tampón de PCR 10X (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 1 mM dNTPs; 0,4 µM de cada partidor y 0,5 U de *Taq* polimerasa. La amplificación del marcador COI se llevó a cabo por medio de los siguientes partidores universales LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-

TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer 1994, Vences *et al.* 2005, Pie *et al.* 2006).

Una vez lista la solución “mix” se prepararon los tubos (según el número de genotipos o individuos) con los DNAs templados en la cantidad óptima evaluada previamente y el agua calculada para cada tubo. En último lugar se agrega *Taq* polimerasa y se agregó el volumen calculado a cada tubo que contiene el templado, se mezcla rápidamente en vortex y se llevan al termociclador para la amplificación.

La amplificación del gen COI mitocondrial se llevó a cabo usando los tiempos y temperaturas previamente programados y que se describen a continuación por etapas: Una predenaturación inicial de 7 min a 94°C y 35 ciclos que se constituyen de una denaturación a 92°C por 45 s, una reasociación a 50°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, finalmente se realiza una extensión de 7 min a 72°C. Una vez obtenidos los productos de PCR se guardaron en frío.

3.2.4.2 Evaluación de la amplificación enzimática del gen *Cyt b* mitocondrial

La evaluación de la amplificación del gen *Cyt b* mitocondrial, se llevó a cabo utilizando la misma metodología que se utilizó en COI. Se obtuvo un volumen final de 50 µl, el que estaba compuesto por 13 µl de la solución mix; 8 µl de DNA diluido (10:1) (20 ng) y 27 µl de agua destilada deionizada estéril. Se utilizaron los mismos volúmenes y concentraciones de los constituyentes de la PCR en la solución “mix”. La amplificación de *Cyt b* se realizó por medio de los siguientes partidores universales MT-CYB5 (5' - CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA - 3') y MT-CYB3 (3' - CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 5') (Kocher *et al.* 1989, Guha *et al.* 2006).

La amplificación del gen *Cyt b* mitocondrial se llevó a cabo usando los tiempos y temperaturas previamente programados y que se describen a continuación por etapas: una predenaturación inicial de 5 min a 94°C y 35 ciclos que se constituyen de una denaturación a 94°C por 30 s, una reasociación a 50°C por 40 s y una extensión a 72°C por 45 s, finalmente se realizó una extensión de 7 min a 72°C. Una vez obtenidos los productos de la PCR se guardaron en frío.

3.2.4.3 Electroforesis en gel de Agarosa

Se evaluó la amplificación del gen COI y *Cyt b* por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón SB (Brody & Kern 2004) y se estimó la concentración del producto de PCR de COI, por medio del programa UN-SCAN-IT V5.1 (Silk Scientific Corp., Orem, Utah, USA) (Agellon *et al.* 2006), para su posterior secuenciación.

3.2.4.4 Análisis de las secuencias del gen COI mitocondrial

Para la purificación y la secuenciación de los productos de PCR, las muestras se enviaron a la empresa MACROGEN, Seoul, Corea del Sur. Las secuencias se analizaron por alineamiento adoptando el criterio de homología posicional de los nucleótidos por medio del programa CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997).

Para el alineamiento se realizó una matriz en texto sin formato y se evaluaron distintos parámetros para el alineamiento. Los parámetros que se utilizaron para el alineamiento múltiple fueron los siguientes: costos de apertura del gap = 15 y costos de extensión del gap = 6,6.

4.- RESULTADOS

4.1 Aislamiento de DNA

Se aisló DNA de tejido muscular de tres individuos preservados en frío en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. De estos tres DNAs obtenidos solo dos fueron óptimos ya que el DNA obtenido del tercer individuo estaba degradado (Fig. 1), seguramente porque estos individuos son utilizados para estudios morfológicos y son constantemente descongelados.

Se aisló DNA de tejido sanguíneo de 14 individuos provenientes de un criadero privado de Santa Juana VIII Región. El DNA obtenido de los 14 individuos no fue de gran cantidad, apenas perceptible en gel de agarosa. No obstante, el DNA fué suficiente para un buen resultado en la técnica empleada (SSR), pues una de sus ventajas es la viabilidad de DNAs pobres en cantidad y calidad. Debido a que un DNA obtenido de tejido muscular presentó degradación, los análisis posteriores se llevaron a cabo con un “N” de 16 individuos.

Las electroforesis horizontales se realizaron en tampón SB 1X pH 8.5 (Brody & Kern 2004), el que presentó buena velocidad de corrida electroforética y buena resolución en la visualización de las bandas. Este tampón presenta la particularidad de proporcionar mayor amperaje a bajo voltaje y no se calienta el tampón ni el gel lo que aminora la degradación de los DNAs por temperatura.

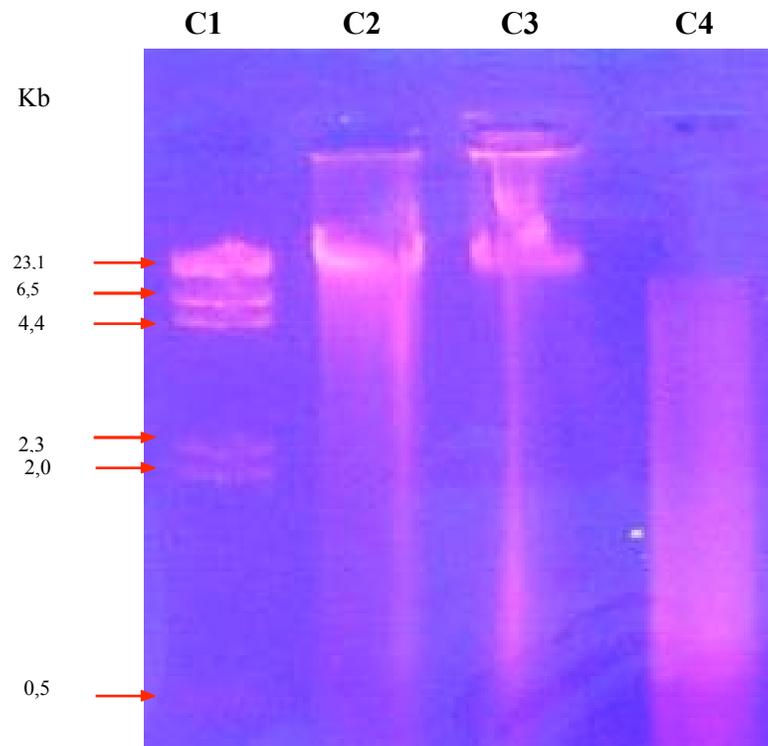


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 0,7% tampón SB 1X y visualizado en luz UV. En el carril C1 se cargó el marcador de peso molecular λ DNA / *Hind* III, en los carriles C2, C3, C4 se cargaron DNAs aislados de tejido muscular, se puede observar el último DNA que presentó degradación.

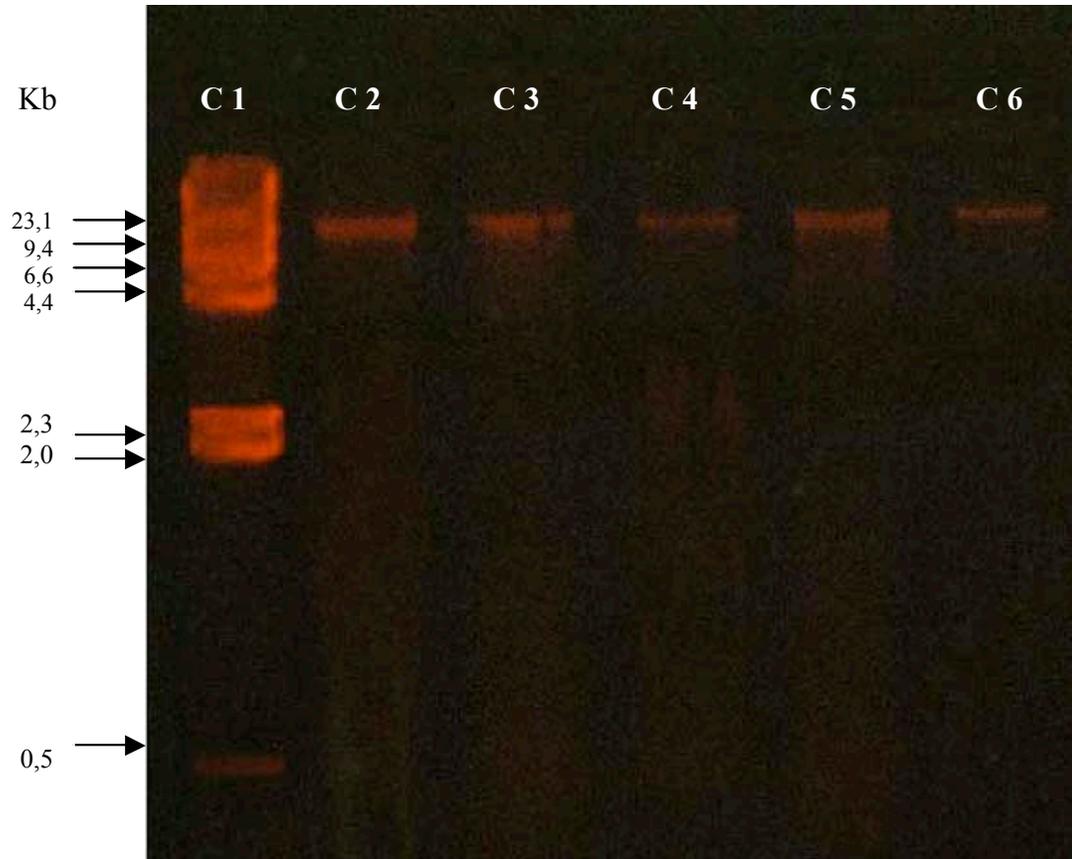


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 0,7% tampón SB 1X y visualizado en luz UV. En carril C1 se cargó el marcador λ DNA / *Hind* III, en los carriles C2, C3, C4, C5, C6 se cargaron los DNAs aislados de tejido sanguíneo.

4.2 Análisis de los loci microsatelitales

4.2.1 Evaluación de la amplificación y del polimorfismo de los loci microsatélites

Se evaluaron 20 loci microsatelitales de los cuales se obtuvo la amplificación de 18 loci (Tabla 4). Para los aislamientos de DNAs de tejido muscular se estandarizó en 7 μ l de DNA diluido 1:10 (20 ng) y 10 μ l (20 ng) para los aislamientos de DNAs de tejido sanguíneo.

Los 18 loci en los cuales se logró la amplificación por PCR, se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en cámaras de secuenciación vertical y en condiciones denaturantes. De ellos, tres loci presentaron variabilidad alélica (Fig. 3), lo que corresponde aproximadamente al 15% del total de los loci evaluados. Los otros 15 resultaron ser monomórficos (Tabla 4). Las características de estos tres loci polimórficos se representan en la tabla 5.

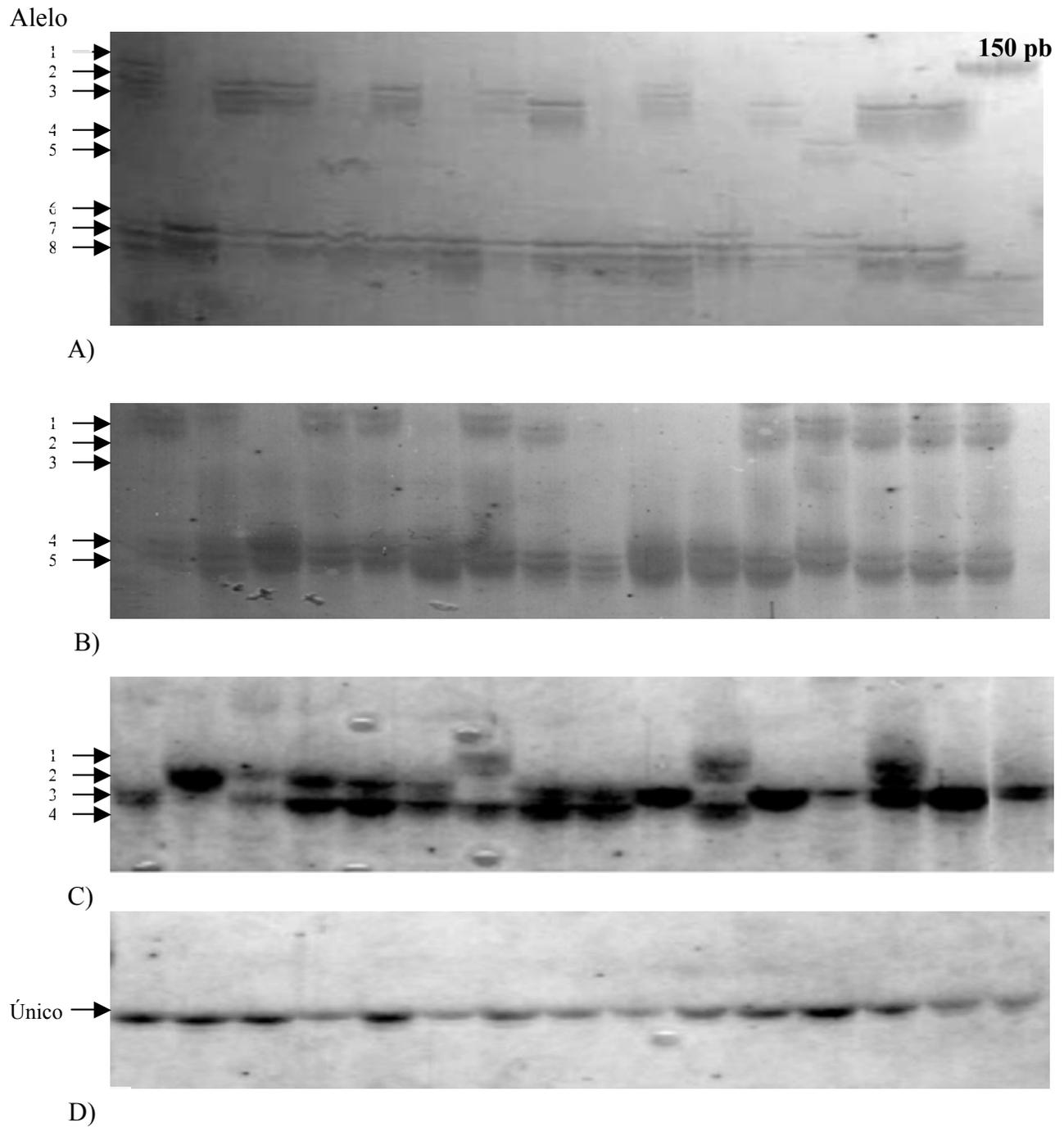


Figura 3. Geles de poliacrilamida en que se observan los loci polimórficos y uno monomórfico, se les proporcionó un valor numérico a cada alelo. A) Visualización de 8 alelos para el Locus NVHRT16 B) Visualización de 5 alelos para el Locus NVHRT24 C) Visualización de 4 alelos para el Locus CSRM60 y D) Locus ILSTS06 monomórfico.

Tabla 3. Matriz elaborada en base a los alelos obtenidos de cada locus. Esta Matriz fue ingresada para su análisis en el programa CERVUS 2.0.

| Ind. | Population | CSRM60A | CSRM60B | NVHRT16A | NVHRT16B | NVHRT24A | NVHRT24B |
|------|------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| P1 | PopA | 3 | 4 | 1 | 8 | 1 | 5 |
| P2 | PopA | 2 | 3 | 7 | 7 | 1 | 5 |
| P3 | PopA | 2 | 4 | 2 | 7 | 4 | 4 |
| P4 | PopA | 2 | 4 | 2 | 7 | 1 | 5 |
| P5 | PopA | 2 | 4 | 5 | 7 | 1 | 4 |
| P6 | PopA | 3 | 4 | 2 | 7 | 4 | 4 |
| P7 | PopA | 1 | 4 | 7 | 7 | 2 | 4 |
| P8 | PopA | 3 | 4 | 2 | 7 | 3 | 5 |
| P9 | PopA | 3 | 4 | 3 | 7 | 5 | 5 |
| P10 | PopA | 3 | 3 | 7 | 7 | 4 | 4 |
| P11 | PopA | 1 | 4 | 2 | 7 | 4 | 4 |
| P12 | PopA | 3 | 4 | 6 | 6 | 3 | 5 |
| P13 | PopA | 3 | 3 | 3 | 7 | 3 | 4 |
| P14 | PopA | 2 | 4 | 4 | 7 | 3 | 5 |
| P15 | PopA | 3 | 4 | 3 | 7 | 3 | 5 |
| P16 | PopA | 3 | 3 | 3 | 7 | 3 | 5 |

Tabla 4. Nombre, concentración MgCl₂ y temperatura de reasociación de los loci microsatélites. Se resaltan en **negrita** los loci que resultaron polimórficos en *pudu*.

| LOCUS | MGCL₂ | T° REASOC. | AMPLIFICACIÓN | POLIMORFISMO |
|----------------|-------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| CSSM16 | 2,5 mM | 58°C | √ | X |
| CSPS115 | 2,0 mM | 50°C | √ | X |
| ETH225 | 2,0 mM | 50°C | √ | X |
| CSRM60 | 1,5 mM | 54°C | √ | √ |
| IOBT918 | 2,0 mM | 50°C | √ | X |
| ILSTS30 | 2,0 mM | 50°C | √ | X |
| HAUT14 | | | X | -- |
| CSSM14 | | | X | -- |
| HAUT24 | 2,0 mM | 50°C | √ | X |
| ILSTS06 | 1.5 mM | 51°C | √ | X |
| MM12 | 2,0 mM | 55°C | √ | X |
| INRA35 | 2,0 mM | 55°C | √ | X |
| CSSM22 | 2,0 mM | 55°C | √ | X |
| CSMM19 | 2,0 mM | 55°C | √ | X |
| NVHRT16 | 1,5 mM | 57°C | √ | √ |
| NVHRT24 | 1,5 mM | 56°C | √ | √ |
| CSSM06 | 3,0 mM | 57°C | √ | X |
| BM1818 | 2,5 mM | 50°C | √ | X |
| Oar FBC304 | 3,0 mM | 57°C | √ | X |
| MAF70 | 3,0 mM | 57°C | √ | X |

Tabla 5. Loci polimórficos en *pudu*, tipo de microsatélites y rangos de tamaños esperados (**Ragifer tarandus*, ***Cervus elaphus*) y observados en este estudio.

| LOCUS | TIPO DE MICROSATÉLITE EN GENOMAS DE <i>Ragifer tarandus</i> y <i>Cervus elaphus</i> | RANGO DE TAMAÑO (pb) | |
|--------------|--|-----------------------------|---------------------------------|
| | | Esperado | Observado en <i>pudu</i> |
| CSRM60 | Puro (GT) | 101 – 123 * | 92–110 |
| NVHRT16 | interrumpido compuesto (CA) ₅ TA(CA) ₅ (TG) ₂ CG(CA) ₉ | 152 – 171 ** | 130–155 |
| NVHRT24 | Compuesto (TG) ₂ (TA) ₂ (CA) ₁₆ (TA) ₃ (CA) ₃ (TA) ₅ | 126 – 138 ** | 98–130 |

4.2.2 Análisis de parámetros genético-poblacionales

Para efectos de este trabajo, se darán a conocer los parámetros genéticos-poblacionales más relevantes, tales como el número de alelos por locus, PIC de cada locus, la heterocigocidad esperada y observada en los 16 individuos analizados (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros genéticos-poblacionales estimados; heterocigocidad esperada $H(E)^*$ según Nei (1973), heterocigocidad observada $H(O)$, el contenido de información polimórfica (PIC) de los loci y su número de alelos por locus (K).

| locus | N | K | Heterocigotos | Homocigotos | H(E)* | H(O) | pic |
|--------------|----------|----------|----------------------|--------------------|--------------|-------------|------------|
| CSRM60 | 16 | 4 | 13 | 3 | 0,666 | 0,813 | 0,602 |
| NVHRT16 | 16 | 8 | 12 | 4 | 0,670 | 0,750 | 0,641 |
| NVHRT24 | 16 | 5 | 11 | 5 | 0,732 | 0,688 | 0,686 |
| PROMEDIO | | 5,6 | 12 | 4 | 0,689 | 0,750 | 0,643 |

El mayor PIC se observó en NVHRT24 y el menor en CSRM60. Sin embargo, los tres loci están por sobre 0,5 de PIC. El índice de heterocigocidad esperada de Nei (1973) proporciona una aproximación de la diversidad genética cuando es comparada en un tiempo uno y un tiempo dos, especialmente cuando ha sucedido un evento como un cuello de botella en la población, por lo que es utilizado para medir este parámetro en las poblaciones.

4.2.3 Capacidad de los loci para detectar genotipos distintos

Se determinó la cantidad de genotipos distintos por medio del programa POPGEN V 3.2 (Yeh *et al.* 1997) que pueden ser encontrados en los 16 individuos que se ha analizados en este trabajo. Se evaluó la capacidad de cada locus y de grupos de loci (Tabla 7).

Tabla 7. Capacidad de los loci para detectar genotipos distintos, los loci son evaluados en forma individual y en grupos para encontrar genotipos únicos o diferentes en los 16 individuos analizados.

| Locus | Genotipos distintos diferenciados |
|---------------------------|-----------------------------------|
| CSRM60 | 5 |
| NVHRT16 | 7 |
| NVHRT24 | 7 |
| CSRM60 y NVHRT16 | 12 |
| CSRM60 y NVHRT24 | 12 |
| NVHRT16 y NVHRT24 | 13 |
| CSRM60, NVHRT16 y NVHRT24 | 16 |

4.3 Evaluación de la amplificación de COI y Cyt b y polimorfismo de COI

4.3.1 Evaluación de la amplificación de COI y Cyt *b*

Se amplificaron los fragmentos de las secuencias de COI y Cyt *b*, por medio de PCR y con los partidores mencionados en la sección 3.2.4. Previamente se evaluó la cantidad de DNA óptimo para la reacción que resultó ser de 30 ng para ambos fragmentos (10µl del DNA diluido 10 veces). La amplificación de ambos fragmentos resultó ser satisfactoria y la concentración obtenida en COI fue la necesaria para realizar la secuenciación (Fig. 4 y 5).

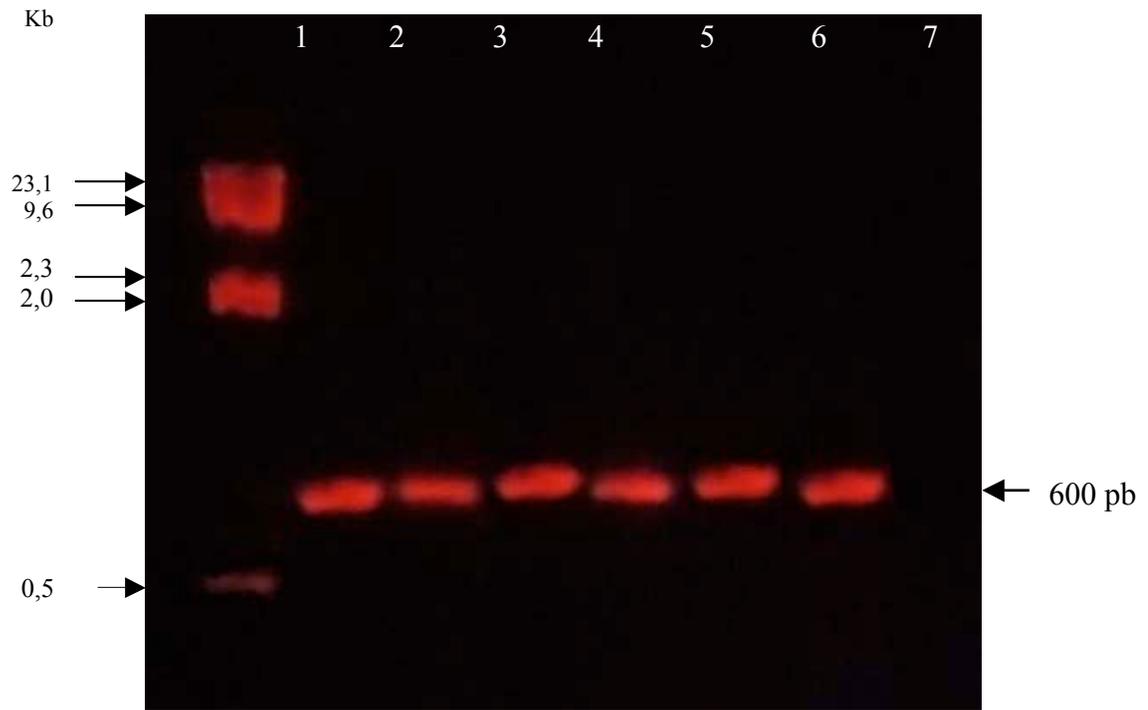


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizada a la luz UV. En el carril 1 se cargó el marcador λ DNA / *Hind* III. En los siguientes se cargaron los 6 individuos que se amplificación con partidores universales para COI. La amplificación tiene un tamaño aproximado de 600 pb.

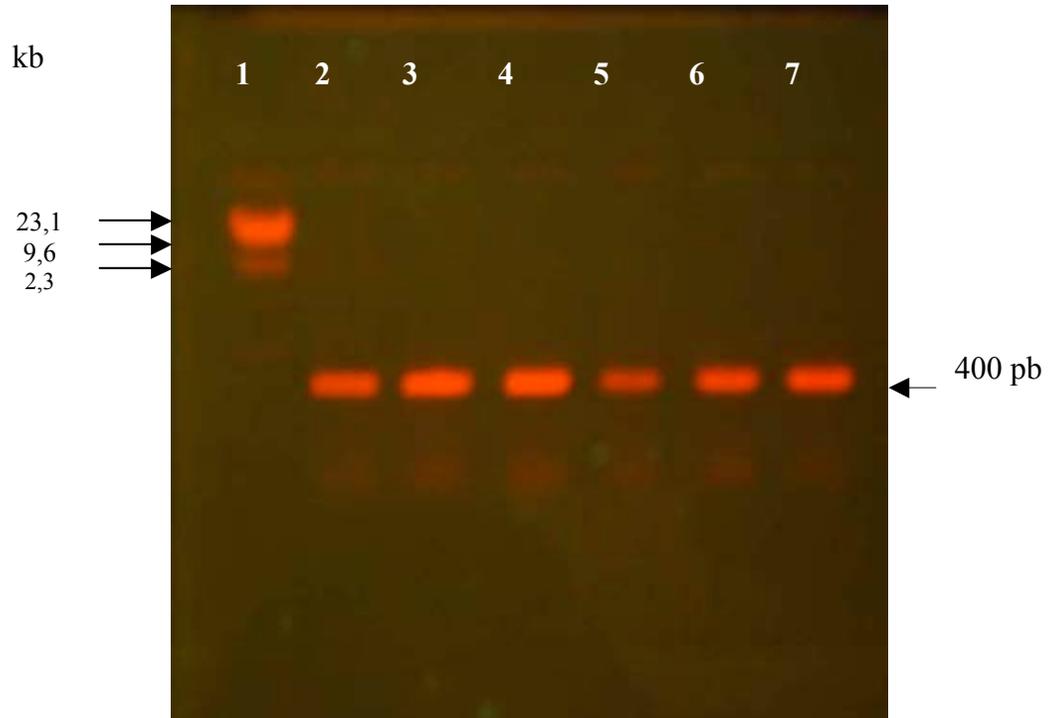


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizada a la luz UV. En el carril 1 se cargó el λ DNA / *Hind* III. En los siguientes se cargaron los 6 individuos que se amplificación con partidores universales para *Cyt b*. La amplificación tiene un tamaño aproximado de 400 pb.

4.3.2 Secuenciación y alineamiento de las secuencias por medio de Clustal X

El resultado de la secuenciación resultó ser buena, con ningún nucleótido sin identificar y muy fáciles de analizar en el programa Clustal X para el alineamiento. Para el alineamiento se realizó una matriz de texto la cual es reconocida por el programa y se evaluaron distintos parámetros para el alineamiento sin observar mayor cambio en ellas aún cuando los parámetros fueron extremos (apertura de gap = 1; extensión del gap = 1). Como ya se mencionó, se usaron los parámetros de 15 para la apertura de gap y 6,6 para la extensión de éste, lo que dió como resultado un alineamiento con tres haplotipos para esta secuencia, diferenciadas por dos mutaciones cada una (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de secuencias de 6 individuos (P1 y P2 de Valdivia y P3, P4, P5 y P6 de Santa Juana). Se representa la variabilidad nucleotídica en las secuencias de COI mitocondrial en pudu.

| IND. | 20 | 21 | 22 | 23 | . | 65 | 66 | 67 | 68 | 443 | 444 | 445 | 446 | 479 | 480 | 481 | 482 |
|------|----|----|----|----|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1 | G | C | C | C | | C | T | A | C | C | C | C | C | G | T | G | T |
| P2 | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| P3 | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| P4 | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| P5 | * | * | T | * | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * |
| P6 | * | * | * | * | | * | * | G | * | * | * | T | * | * | * | * | * |

5.- DISCUSIÓN

5.1 Amplificación de los loci microsatélites

De los loci heterólogos evaluados en pudu, 18 se amplificaron. Es decir, existieron 18 loci en los cuales las regiones flanqueantes no han variado. Es importante mencionar que la utilización de loci heterólogos está estrechamente condicionada a que las regiones flanqueantes al locus sean conservadas y que el locus en sí presente gran variabilidad, de allí la mayor potencialidad de estos loci en su utilización. Como las regiones flanqueantes darán lugar a los partidores, si son éstas lo bastante conservadas serán utilizables también en otras especies. Se infiere entonces que en los loci que no amplificaron ha ocurrido alguna mutación en las regiones flanqueantes (complementarias a los partidores), lo que no permite amplificar el locus.

5.1.1 Aspectos técnicos

El resultado del tampón SB (Brody & Kern 2004) en geles de agarosa presentó gran resolución y poca denaturación del DNA al no incrementarse demasiado la temperatura aún cuando el voltaje fue bastante elevado (110 - 120 V). Es importante destacar que el amperaje fue mayor también a bajos niveles de voltaje lo que resulta una corrida electroforética más rápida y estable que la electroforesis con tampón TBE normalmente utilizado en los laboratorios de biología molecular.

El mismo tampón SB se evaluó también en electroforesis vertical en geles de poliacrilamida y presentó regular resultado. Las bandas son igualmente bien diferenciables y el gel presentó buena resolución. Sin embargo, se observó inestabilidad en el pH que debe ser 8,5 y que es importante en lo que respecta al punto isoeléctrico de las moléculas. Esto provoca que las

moléculas se demoren más en la corrida electroforética y aumente demasiado la temperatura o provoque mayor difusión del DNA en el gel. Aún así, los geles corridos con este tampón (SB) se pudieron observar y discriminar las bandas, por lo que para efectos de este trabajo de tesis fue eficiente.

Además de presentar buena resolución y estabilidad en geles de agarosa en tiempos menores de corrida, se le debe sumar el menor costo que significa trabajar con este tampón ya que solo se constituye de hidróxido de sodio y ácido bórico, en bajas cantidades y se puede elaborar un stock al 20X a pH 8,0.

Se evaluó además un nuevo protocolo para tinción de geles de poliacrilamida descrito por Qu *et al.* (2005). Este nuevo procedimiento presenta algunas diferencias con respecto al procedimiento convencional (Jaramillo *et al.* 1994) y esta diferencia dice relación principalmente con la disminución de los tiempos empleados en el procedimiento (Anexo 3) y en los costos de reactivos. Primeramente se integran los pasos de fijación y tinción en un solo paso con etanol y ácido nítrico, los que presentan menores costos económicos que el ácido acético. En este mismo paso se agrega el nitrato de plata que no varía en cantidad.

Los tiempos que se emplean en este protocolo son menores que los usados en el método de Jaramillo *et al.* (1994). Sin embargo, los resultados obtenidos en la tinción con etanol y ácido nítrico no fueron mejores en resolución visual de las bandas que la metodología convencional con ácido acético. Es muy probable que tenga menor sensibilidad en la tinción y que cuando existen grandes cantidades de producto de PCR se observarán mejor las bandas. En este caso este protocolo presentaría la desventaja de tener que trabajar con DNAs mejores en calidad y cantidad para tener así un mayor producto de PCR.

Puesto que se trabajaron con concentraciones de DNA muy bajas, las bandas no fueron muy claras con este protocolo de tinción y presentaron mejores resultados con la metodología convencional. Es aconsejable utilizar este procedimiento de Qu *et al.* (2005) con DNAs de buena cantidad y calidad, para así tener mejores resultados en la PCR. Si se tiene poco DNA es aconsejable utilizar el procedimiento descrito por Jaramillo *et al.* (1994), pues presentó mayor sensibilidad y mejor visualización de las bandas, aún con poco DNA.

5.2 Evaluación de polimorfismo de los loci SSR amplificados

De los loci amplificados que fueron evaluados por electroforesis, tres loci presentaron variabilidad alélica o polimorfismo lo que demuestra que la tasa de mutación de los loci restantes no son altas o son nulas en el genoma del pudu y que estos loci son amplificables pero no utilizables en estudios genéticos de pudu.

Los loci que resultaron ser monomórficos no son informativos y es muy probable que se hallan mantenido conservadas las secuencias complementarias a los partidores pero los loci con características SSR ya no estén allí, es decir, ya no existe en ese lugar del genoma del pudu secuencias repetitivas. Si bien es cierto que estos loci monomórficos en pudu han presentado polimorfismo en especies de cérvidos, no presentan las características necesarias en el genoma del pudu que nos permitan detectar información genética de ellos.

Se puede inferir entonces una divergencia evolutiva entre los genomas de pudu y otros cérvidos reflejada en los loci SSR monomórficos en pudu y polimórficos en el genoma de otros cérvidos. Esta divergencia evolutiva entre los genomas de pudu y otros cérvidos ocurrió en el Plioceno (Breda & Marchetti 2005, Gilbert *et al.* 2006), y la divergencia evolutiva de la tribu Odocoileini en el Mioceno quedando como especie primitiva el reno (*Rangifer tarandus*) (Gilbert

et al. 2006) (Fig. 6). Esta divergencia ocurrió luego de que se levantaran cadenas montañosas como la de los Andes en el Cretácico tardío (Riccardi 1987, Mpodozis & Ramos 1989), pero que alcanzó sus grandes alturas en el Mioceno. Esta emergencia terrestre por plegamiento, de alguna manera aisló al pudu de las demás especies cercanas como *Mazama gouazoubira*, especie en la cual han resultado polimórficos estos loci microsatélites monomórficos en pudu (Ruiz *et al.* 2003). Un acontecimiento similar sufrió otra especie cercana al pudu como el Huemul (*Hippocamelus bisulcus*) y la Taruca (*Hippocamelus antisensis*), especies consideradas en peligro de extinción y en los cuales sería interesante evaluar estos loci heterólogos. Es importante mencionar que estos loci heterólogos evaluados en pudu, han resultado polimórficos en especies también lejanas al pudu como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), especie que pertenece a otra tribu (Gilbert *et al.* 2006) (Fig.6).

En la familia Cervidae, el carácter polimórfico de estos loci microsatélites heterólogos no se correlaciona entre las especies. Esto tiene sentido si tomamos en cuenta lo que postulan muchos autores en poner a la familia Bovidae como familia primitiva a Cervidae (Janis & Scout 1987, 1988, Janis 2000) y discrepa con el resultado de otros autores (Matthew 1934, Eisemberg 1981, Moyá-solá 1986, Gentry 2000) que sitúan a la familia Bovidae y Cervidae en clados diferentes.

Hassanin & Douzeri (2003), discuten ampliamente las relaciones filogenéticas de Bovidae y de Cervidae. Este trabajo sitúa a la familia Bovidae en un clado hermano a Cervidae. Kuznetsova *et al.* (2005), sugiere la relación más cercana de Cervidae con Bovidae, y éste, con Moschidae. Por contraste, la familia Giraffidae parece ser más distante de Cervidae y más cerca a Antilocapridae. Dado que estos loci microsatélites heterólogos presentan polimorfismos en varias especies de la familia Cervidae, aún en especies de tribus diferentes, es posible que estos locus

sean derivados de una familia primitiva a Cervidae como los es Bovidae (Janis 2000). Esto permite inferir también que es posible utilizar estos loci heterólogos en Huemul, que es una especie bastante cercana al pudu (Gilbert *et al.* 2006).

El hecho de que resultaron tres loci polimórficos en pudu, representa un avance en los estudios genéticos de esta especie pues eventualmente se podrían evaluar otros loci que se están utilizando en otras especies de cérvidos y que podrían ser utilizables en pudu. Éste número de loci polimórficos no es aconsejable aún para realizar estudios genéticos poblacionales o de genética de la conservación pues se debería trabajar con más loci y un “N” de muestra mayor para así obtener mejores y significativos resultados.

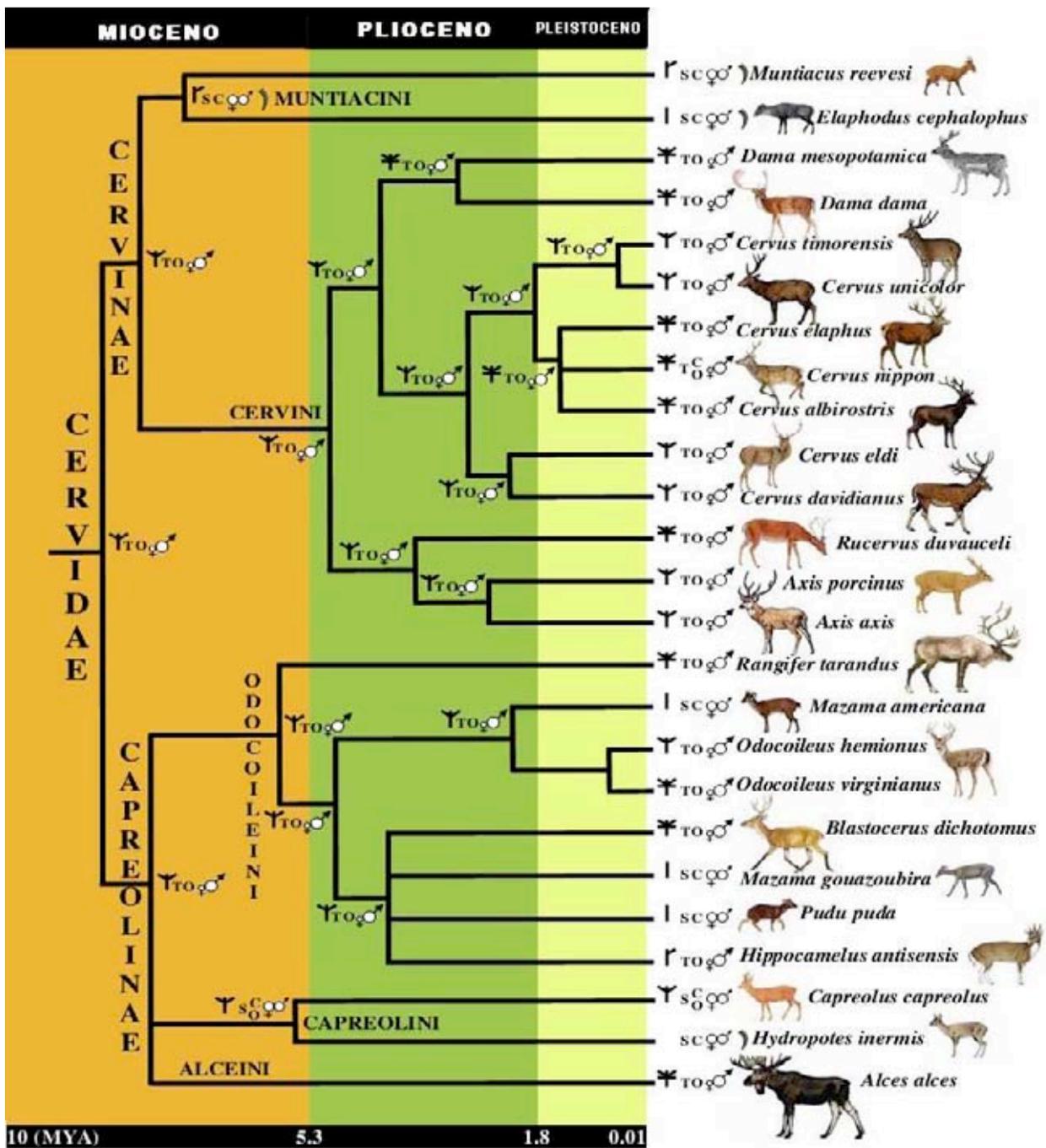


Figura 6. Árbol filogenético de consenso derivado de análisis Bayesiano y máxima verosimilitud, basado en 4 marcadores moleculares (COII, Cyb, LAlb y PRKCI). Se puede observar la divergencia evolutiva de Cervidae (Gilbert *et al.* 2006).

5.2.1 Análisis de parámetros genéticos poblacionales

El PIC es un índice importante al momento de evaluar la utilización de loci como marcadores moleculares basados en polimorfismo. Este índice expresa el grado de polimorfismo que puede detectar el loci como marcador molecular (Powell *et al.* 1996). El PIC esta estrechamente relacionado con el número de alelos que se obtienen por medio de la electroforesis, su frecuencia en la población y con el número de individuos analizados, pues si se realiza el análisis con un “N” mayor, es posible obtener mayor cantidad de alelos suplementarios.

Dados los tamaños del muestreo y desechados los posibles errores que asume el programa CERVUS 2.0 por probabilidad, el estadígrafo hace una estimación de la capacidad del marcador en detectar variabilidad de alelos o polimorfismo. Los loci que han presentado polimorfismo se presentan con PIC superior al 0.5 (Tabla 6), lo que nos permite inferir que son efectivos en detectar polimorfismo en las poblaciones de pudues, y por lo tanto detectar diversidad genética de las poblaciones en estudio. La elección de los loci SSR a ocupar depende de la aplicación que se le quiera dar y de las incertidumbres que se quieran responder. Por ejemplo si se quiere realizar un análisis de paternidad, son más efectivos los loci con un PIC mayor, pues se tendrá mayor evidencia para excluir a los eventuales padres y así tener un menor porcentaje de error. Si se quiere aplicar SSR para análisis de diversidad, inbreeding, también se pueden utilizar los de menor PIC siendo mucho mejor aplicables los de más alto grado de polimorfismo.

El resultado del análisis de los datos genéticos poblacionales se realizó por medio de POPGENE. Se obtuvo el número de heterocigotos, homocigotos y la heterocigocidad observada y esperada en la población muestral para cada locus. El mayor número de heterocigotos lo presentó el locus CSRM60 con 13 individuos heterocigotos y un índice de heterocigocidad

observada de 0,813. El menor número de heterocigotos lo presentó el locus NVHRT24 con 11 individuos heterocigotos y un índice de heterocigocidad observada de 0,688 (Tabla 6).

La media del PIC fue de 0,643. Esto significa que estos loci polimórficos presentan un polimorfismo tal que son capaces de detectar los individuos heterocigotos (Tabla 6). Esto proporciona gran información pues se puede inferir exceso de heterocigotos o bajo nivel de heterocigosidad dados los datos de heterocigocidad esperada para cada locus según el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg. La importancia de este índice en la genética de poblaciones es bastante amplia, pues si encontráramos en una población que para un determinado locus, todos los individuos son homocigotos para una misma variante alélica, no podrá haber evolución en dicho locus, puesto que las frecuencias génicas no pueden cambiar de generación en generación. Por el contrario, si otra población presenta dos alelos para este locus, podrá experimentar un cambio evolutivo, es decir, un alelo podría aumentar de frecuencia con respecto a su variante y así, dada la diversidad genética de la población, poder adecuar su postura biológica frente al ambiente que es muy heterogeneo y que está en constante cambio.

La heterocigocidad esperada según Nei (1973), nos proporciona una aproximación de la diversidad genética de la población, sin caer desde luego, en el error de considerar la heterocigocidad como un sinónimo de la diversidad genética. En este caso se obtuvo un promedio de 0,689, esto adquiere sentido si tomamos en cuenta que se obtuvieron muestras de un criadero en Santa Juana, donde se tienen individuos de diferentes áreas geográficas y además dos individuos de la provincia de Valdivia. Por lo tanto se esperaba obtener un alto número de individuos heterocigotos en estos 16 individuos analizados.

5.2.2 Detección de genotipos únicos en la muestra mediante SSR polimórficos

Se evaluó la capacidad de estos loci polimórficos, individualmente y agrupados, en detectar genotipos distintos en el grupo de individuos analizados (Tabla 7). Se determinó que tanto en la agrupación de los loci CSRM60 y NVHRT24 como CSRM60 y NVHRT16 se diferenciaron 12 genotipos, mientras que la agrupación de los loci NVHRT16 y NVHRT24 reconocieron 13 genotipos. En la agrupación de los tres loci se lograron diferenciar 16 genotipos distintos en los 16 individuos analizados. Esto proporciona una aproximación de la utilidad de estos loci para su aplicación en estudios genéticos en pudu, como análisis de paternidad, maternidad o filiación. Esta información se debe tener en cuenta al momento de decidir cuales utilizar y en que combinación, para obtener mejores resultados.

5.3 Evaluación de la utilización de secuencias del gen COI mitocondrial

El gen COI mitocondrial ha sido utilizado como marcador informativo de gran utilidad por su rapidez y facilidad técnica (Brown 1983, 1985, Cann *et al.* 1987, Vigilant *et al.* 1991, Horai *et al.* 1993). Presenta una amplia distribución en casi todos los organismos vivos. Además, es muy fácil de identificar y analizar por lo que se ha propuesto como un código de barras para identificar numéricamente las especies y catalogar diversidad biológica (Hebert *et al.* 2003b, Stoeckle 2003a, Stoeckle *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004).

Se utiliza en estudios filogenéticos mostrando variabilidad a nivel supraespecífico e intraespecífico.

Dilucidar incertidumbres taxonómicas de poblaciones pequeñas o fragmentadas, que son las más vulnerables a problemas ecológicos y de extinción, también es una problemática que presume un estudio a nivel genético, por lo que el análisis de secuencias de este gen es

igualmente importante. Esta técnica permitiría dilucidar las diferencias entre poblaciones continentales de pudu y las de la isla de Chiloé, entre las poblaciones que se encuentran al norte de la región del Bío Bío que presentan gran fragmentación entre ellas y las poblaciones del sur del Bío Bío.

En la amplificación de este segmento se usaron partidores universales (Vences *et al.* 2005, Pie *et al.* 2006), por lo que la amplificación fue muy eficiente. Esto se debe a que las secuencias flanqueantes de las cuales se han elaborado los partidores, son muy conservadas en todos los organismos vivientes.

La secuenciación demostró que los partidores funcionan muy bien en pudu y que las secuencias obtenidas de los seis individuos presentaron variabilidad en cuatro posiciones, separando así tres haplotipos diferenciados. Esta variabilidad o polimorfismo nos otorga la oportunidad de utilizar a COI como marcador molecular genotípico para el análisis de secuencias en las cuales se podrán determinar grupos diferenciados genéticamente.

En datos no publicados y obtenidos por comunicación personal con investigadores dedicados a estudios en esta especie, se observan algunas diferencias morfológicas en los individuos de poblaciones de Chiloé y los individuos de poblaciones continentales. Estas diferencias son el peso corporal de los individuos, la altura y el tamaño de las astas. Mayores diferenciaciones entre estas poblaciones, serían detectadas a través del análisis de secuencias del gen COI mitocondrial y de *Cyt b*. Además, se han observados individuos albinos provenientes de las poblaciones de Chiloé, de lo que se infiere alguna fijación alélica o alto nivel de consanguinidad, diferencias detectables por loci SSR.

La variabilidad que presentó COI permitió diferenciar tres haplotipos, es decir, presenta para este caso una gran variabilidad, esto es significativo en demostrar diferencias a nivel de

nucleótidos en las secuencias de este fragmento. Sin embargo, es aconsejable aumentar el “N” y obtener la información del origen geográfico real de los individuos muestreados, para así hacer más heterogéneo el muestreo con resultados aún más decisivos.

Aún cuando la variabilidad intraespecífica de este gen se ha demostrado en este trabajo, es aconsejable realizar estudios en que se complemente con otros genes igualmente variables. Ejemplo de ello es el gen mitocondrial *Cyt b*, el cual presenta gran variabilidad intraespecífica. Las secuencias flanqueantes son muy conservadas también entre las especies (Irwin *et al.* 1991), lo que permite aplicar partidores universales ya diseñados de este gen (Kocher *et al.* 1989), que se ha utilizado en el infraorden Pecora (Guha *et al.* 2006) y que hemos amplificados también en pudu (Fig. 5).

5.4 Conclusiones

5.4.1 Amplificación y polimorfismo de loci microsatélites heterólogos

De los 20 loci evaluados en la amplificación por PCR amplificaron 18 loci en el genoma de pudu. Las secuencias flanqueantes de estos 18 loci se han manteniendo conservadas en los grupos divergentes de Bovidae. De los 18 loci amplificados en pudu, tres presentaron polimorfismo y se puede concluir que existen estos loci heterólogos en el genoma del pudu. De los otros 15 loci en los que no se encontró polimorfismo se puede concluir que solo se han mantenido las secuencias flanqueantes complementaria a los partidores, pero estos loci se han perdido en el genoma del pudu por distintos eventos evolutivos.

5.4.2 Índice de contenido polimórfico (PIC)

Los tres loci SSR que han resultado ser polimórficos son utilizables en estudios de poblaciones en *Pudu puda*, pues presentaron un índice de contenido polimórfico superior a 0,5. El locus más polimórfico fue NVHRT24 con un PIC de 0,686. Por la tanto, el mejor locus de los evaluados para su utilización en pudu.

5.4.3 Detección de genotipos únicos en los individuos analizados

Los tres loci son utilizables como marcadores moleculares para complementar análisis de paternidad, maternidad o filiación.

5.4.4 Amplificación del fragmento de Citocromo Oxidasa I (COI) y de Citocromo *b* (Cyt *b*)

Los partidores que se utilizaron para amplificar tanto el gen COI como el Cyt *b* en el genoma de pudu, presentaron gran resolución en la amplificación de éstos, por lo que se confirma su utilidad en esta especie.

5.4.5 Análisis de las secuencias de COI

Las secuencias del gen COI mitocondrial presentan polimorfismo a nivel de individuos por lo que es utilizable como marcador molecular para inferencias intraespecíficas en pudu.

6. - BIBLIOGRAFIA

- Agellon, L., Li, L., Luong, L. & Uwiera, R. 2006. Adaptations to the loss of intestinal fatty acid binding protein in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 284: 159 – 166.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. & Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457 – 465.
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley S.D. & Sorrells M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- Avise, J.C. & Lansman, R.A. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. Pp. 147-164. En M. NEI and R. K. KOEHN, eds. *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass., USA.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography. The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Ayala, F.J. 1965. Evolution of fitness in experimental populations of *Drosophila serrata*. *Science*, 150: 903 – 905.
- Beaumont, M.A. & Bruford, M.W. 1999. Microsatellites in Conservation Genetics. En Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.) *Microsatellites, Evolution and Applications*: 165-182. Oxford University Press, Oxford., Reino Unido
- Bello, M. A. 2003. Ecología del pudu (*Pudu puda*, Molina 1782) y su valor como especie focal, en la Provincia de Valdivia, Ecorregión Valdiviana. DVM thesis, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

- Birky, C.W., Maruyama, T., & Fuerst, P. 1983. An approach to population genetic and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, 103: 513-527.
- Blumberg, C. A. 2002. *Contemplando aves y mamíferos de Aisén*. Universidad de Los Lagos, Coyhaique, Chile.
- Breda, M. & Marchetti, M. 2005. Systematical and biochronological review of Plio-Pleistocene Alceini (Cervidae; Mammalia) from Eurasia. *Quaternary Science Reviews*, 24: 775 – 805.
- Brody, J. & Kern, S. 2004. Sodium Boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*, 36: 214 – 216.
- Brown, W.M., George, M. & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76: 1967-71.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-39.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. Pp. 62-88. En M. NEI & R. K. KOEHN, eds. *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R. J. (Ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York: 95–130.
- Buchanan, F. & Crawford, A.M. 1993. Ovine microsatellite at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Animal Genetic*, 24: 145.
- Cann, R.L., Stoneking, M. & Wilson, A.C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31–36.
- CEAL. Centro Editor de América Latina. 1983. *Fauna Argentina N° 12*. Buenos Aires. Argentina.

- Chambers, G.K. & MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126: 455-476.
- CODEFF. 1991. Informe sobre la captura, comercio y tenencia en cautividad de pudu (*Pudu puda*) en Chile. Comité Nacional Pro Defensa de la Fauna y Flora.
- Coulon, A., Cosson, J. F., Angibault, J.M., Cargnelutti, B., Galan, M., Morellet, N., Petit, E., Aulagnier, S. & Hewison, A.J.M. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* 13, 2841–2850.
- Cushwa, W. & Medrano, J.F. 1996. Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Animal Biotechnology*, 7:11-31.
- Czernay, S. 1987. Die Spiesshirshe und Pudus. Die neue Brehm Büchere. Wittenberg Lutherstandt, Alemania.
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. En Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.) *Microsatellites, Evolution and Applications*: 34-48. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido
- Eisenberg, J. F. 1981. The mammalian radiations. An analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellite: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435 – 445.
- Engel, S.R., Linn, R.A., Taylor, J.F. & Davis, S.K. 1996. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*, 77: 504–518.

- Ferguson, J.W. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75: 509 – 516.
- Feulner, P.G., Bielfeldt, W., Zachos, F.E., Bradvarovic, J., Eckert, I. & Hartl, G.B. 2004. Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity*, 93: 299–306.
- Fisher, R. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido 291 pp.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Frankham, R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 640 pp. Cambridge University Press, Cambridge, Mass, USA.
- Frankham, R. 2003. Genetics and Conservation Biology. *C.R. Biologies*, 326: S22 – S29.
- Garza, J.C. & Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305–318.
- Gentry, A.W. 2000. The ruminant radiation. Pages 11–25 en *Antelopes, deer, and relatives. Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation* (E. S. Vrba & G. B. Schaller, eds.). Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut.
- Gilbert, C., Ropiquet, A. & Hassanin, A. 2006. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 101–117.

- Glade, A. (Ed.) 1993. Libro Rojo de los Vertebrados Terrestres de Chile. CONAF. Santiago, Chile. 65 pp.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites, Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido 352 pp.
- Guha, S., Goyal, S. & Kashyap, V. 2006. Genomic variation in the mitochondrially encoded Cytochrome *b* (MT-CYB) and 16S rRNA (MT - RNR2) genes: characterization of eight endangered Pecoran species. *Animal Genetics*, 37: 262–265.
- Hassanin, A. & Douzery, E.J.P. 2003. Molecular phylogeny of Ruminantia and the alternative position of the Moschidae. *Systematic Biology*, 52: 206–228.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270:313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society London, Series B*, 270 (Supplement): S96–S99.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2: 1657–1663.
- Hedrick, P.W. & Miller, P.S. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications*, 21: 30-46.
- Hershkovitz, P.H. 1982. Neotropical Deer (Cervidae) Part. I Pudu, Genus Pudu Gray. *Fieldiana Zoology*, 11: 1–86.
- Horai, S., Kondo, R., Nakagawa-Hattori, Y., Hayashi, S., Sonoda, S. & Tajima, K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 23 – 47.

- Humphries, C.J., Williams, P.H. & Vane-Wright, R.I. 1995. Measuring biodiversity value for conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26: 93-111.
- Irwin, D., Kocher, T. & Wilson, A. 1991. Evolution of the Cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Janis, C.M. & Scott, K.M. 1987. The interrelationships of higher ruminant families with special emphasis on the members of the Cervoidea. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2893: 1-85.
- Janis, C.M. & Scott, K.M. 1988. The Phylogeny of the Ruminantia (Artiodatyla, Mammalia) Pp. 173-182 en *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods, Volumen 2, Mammals* (M.J. Benton, ed.). Clarendon Press, Oxford, Reino Unido.
- Janis, C.M. 2000. The endemic ruminants of the Neogene of North America. Pp. 26-37. En *Antelopes, deer, and relatives. Fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation* (E.S. Vrba and G.B . Schaller, ed.). Yale University Press. New Haven, Connecticut, USA.
- Jaramillo, C., Emmanuel, D.N. & Andrew, F.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 914.
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424-429.
- Jiménez, J.E. 1995. Responses of pudus (*Pudu puda* Molina 1782) to human disturbances in Neotropical temperate rainforests. Final Report for the Lincoln Park Zoo Scott Neotropic Fund. 113 pp.

- Jimenez, J.E. 2005. Pudu (*Pudu puda*): el ciervo más pequeño del mundo. En Smith-ramirez, C., Armesto, J.J., Valdivinos, C. (Ed.) Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile: 547–549. Editorial Universitaria S.A., Santiago, Chile.
- Jimenez, J.E. 2007. *Pudu puda*. Neotropical Cervidology. M. Barbanti & S. González (eds.). En prensa.
- Kemp, S.J., Brezinsky, L. & Teale, A.J. 1993. A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 24:363-365.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K. & Meyer, A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6196– 200.
- Krawczak, M. & Schmidtke, J. 1998. DNA Fingerprinting. 2^a Ed. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, Reino Unido, 113 pp.
- Kuehn, R., Anastassiadis, C. & Pirchner, F. 1996. Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*). *Animal Genetics*, 27: 199–201.
- Kuehn, R., Schroeder, W., Pirchner, F. & Rottmann, O. 2003. Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*). *Conservation Genetics*, 1: 157-166.
- Kuznetsova, M. V., Kholodova, M. V. & Danilkin, A.A. 2005. Molecular phylogeny of deer (Cervidae: Artiodactyla). *Russian Journal of Genetics*, 41: 742–749.
- Matthew, W. D. 1934. A phylogenetic chart of the Artiodactyla. *Journal of Mammalogy*. 15:207-209.
- May, B., Krueger, C.C. & Kincaid, H.L. 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 1542-1547.

- Maynard-Smith, J. & Szathmary, E. 1995. *The Major Transitions in Evolution*. W.H. Freeman, Oxford, Reino Unido.
- Mella, J., Simonetti, J.A., Spotorno, A.E. & Contreras, L.C. 2002. Mamíferos de Chile. Pp. 151-183, en G. Ceballos y J.A. Simonetti (eds.), *Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neotropicales*. CONABIO-UNAM, México.
- Moore, S.S., Byrne, K., Berger, K.T., Barendse, W., McCarthy, F., Womack J.E. & Hetzel, D.J. 1994. Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, 5: 84–90.
- Moxon, E., & Wills, C. 1999. DNA Microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American*, 280: 94 – 99.
- Mpodozis, C & Ramos, V. 1989. The Andes of Chile and Argentina, pp. 59–90 in G. Ericksen, M. Cañas-Pinochet & J. Reinemund, Eds. *Geology of the Andes and its relation to hydrocarbon and mineral resources*. Circum-Pacific Council for Energy and Mineral Resources Earth Science Series, V11.
- Moyá-Solá, S. 1986. El género *Hispanomeryx* Morales *et al.* (1981): Posición filogenética y sistemática. Su contribución al conocimiento de la evolución de los Pecora (Artiodactyla, Mammalia). *Paleontología i Evolució*. 20:267–287.
- Nei, M. 1973. Análisis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 3321-3323.
- Ojeda, H. 1997. Estudio anatómico de los órganos no digestivos del pudu hembra *Pudu puda*, Molina 1782, a nivel de las cavidades abdominal y pélvica. Tesis. M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- O'Brien, S.J. 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annual Review of Genetics*, 28: 467–489.

- Pie, M., Boeger, W., Patella, L. & Falleiros, R. 2006. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *Journal of Molluscan Studies*, 72: 218-219.
- Pope, L.C., Estoup, A. & Moritz, C. 2000. Phylogeography and population structure of an ecotonal marsupial, *Bettongia tropica*, determined using mtDNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 9: 2041–2053.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Primack, R. B. 2000. *A primer of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass, USA, 319 pp.
- Qui-Hong, W., Hua Wu, Tsutomu, F. & Sheng-Guo, F. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165–2176.
- Qu, L., Li, X., Wu, G. & Yang, N. 2005. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 26: 99 – 101.
- Ramos, M.D. 1998. Polimorfismo en *loci* enzimáticos y microsátélites de locus único en salmón atlántico, *Salmo salar* L. Tesis. Doctorado. Universidad de Oviedo, España.
- Rand, D.M. 1996. Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation Biology*, 10: 665-671.
- Reusch, T.B.H., Stam, W.T. & Olsen, J.L. 2000. A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Molecular Ecology*, 9: 127–140.

- Reyes, E. 1991. Programa para la conservación del ciervo chileno *Pudu puda* (Molina). Revista del Instituto de Ecología de Chile, 10:18-21.
- Reyes, E., Guzmán, R., Angulo, A., Hermosilla, I. & Conejeros, S. 1988. Ciclo de vida y madurez sexual de *Pudu puda* (Molina) (Mammalia, Cervidae). Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, 59: 143-150.
- Riccardi, A.C. 1987. Cretaceous paleogeography of southern South America. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 59: 169–165.
- Roed, K.H. 1998. Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primers derived from Bovidae. Hereditas, 129: 19–25.
- Roed, K.H. & Midthjell, L. 1998. Microsatellite in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. Molecular Ecology, 7: 1771–1778.
- Royo, L., Pajares, G. Álvarez, I., Fernandez, I. & Goyache, F. 2007. Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): A phylogeographic reassessment within the European framework. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42: 47– 61.
- Rubinoff, D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conservation Biology, 20: 1026–1033.
- Ruiz García, M., Martínez Agüero, M., Alvarez, D., Goodman, S. 2003. Análisis de la variabilidad genética en diversos géneros de Cervidae neotropicales mediante el uso de loci microsatélites. International Journal of Tropical Conservation and Biology, 51: 225-242.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory, NY, USA.

- Sarno, R.J., Franklin, W.L., O'Brien, S.J. & Johnson, W.E. 2001. Patterns of mtDNA and microsatellite variation in an island and mainland population of guanacos in southern Chile. *Animal Conservation*, 4: 93–101.
- Sarno, R.J., Villalba, L., Bonacic, C., Gonzalez, B., Zapata, B., Macdonald, D., O'Brien, S.J. & Johnson, W.E. 2004. Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuña conservation and management. *Conservation Genetics*, 5: 89–102.
- Schlatter, R.R. 1992. Introducción del Corzo (*Capreolus capreolus*) en Chile: Como se deben hacer bien las cosas. En *Cérvidos Nativos e Introducidos en Chile*. Claudio Ortiz (Ed.) Chile.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.
- Schwartz, M., Luikart, G. & Waples, R. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 25–33.
- Slate, J., Marshall, T.C. & Pemberton, J.B. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program. CERVUS. *Molecular Ecology*, 9: 801 – 808.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457–462.
- Stoeckle, M. 2003a. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *BioScience*, 53: 2–3.
- Stoeckle, M., Janzen, D., Hallwachs, W., Hanken, J. & Baker, J. 2003b. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. Draft conference report. Barcode Conference 2003. The Rockefeller University, New York, USA.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.

- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17: 6463-6471.
- Tautz, D. & Renz, M. 1994. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research*, 12: 4127-4138.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. 1997. Clustal X: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalty and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680.
- Tóth, G., Gáspári, Z. & Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Thorpe, J.P. & Smartt, J. 1995. Genetic diversity as a component of biodiversity. En: V.H. Heywood *et al.* (eds.), *Global biodiversity assessment*. 57- 69 UNEP, Cambridge University Press, Cambridge.
- Thulin, C.G. 2006. Microsatellite investigation of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Scandinavia reveals genetic differentiation of a Baltic Sea Island population. *European Journal of Wildlife Research*, 52: 228-235.
- Venegas, F., Guillomot, M., Vignon, X., Servely, J.L., Audouard, C., Montiel, E., Le Bourhis, D., Perón, S., Soto, P. & Rojas, M. 2006. Obtención de embriones de pudu (*Pudu puda*) mediante técnicas de transferencia nuclear somática. *International Journal of Morphology*, 24: 285-292. ISSN 0717-9502.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A.V.D., Chiari, Y. & Vieites, D.R. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.

- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes K. & Wilson, A.C. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503-1507.
- Walker, E.P. 1975. *Mammals of the world*, Third edition. Vol III. Baltimore and London. The John Hopkins University Press.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. & Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society of London*, 26: 375-400.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. & Mao, J.X. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad de Alberta, Canadá.
- Zachos, F., Hartl. G.B., Apollonio, M. & Reutershan, T. 2003. On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mammal Biology*, 68: 284–298.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1–16.

ANEXOS

Anexo 1

| TIPO DE MICROSATELITE | EJEMPLO |
|----------------------------|---|
| SSR Puro | $(AAC)_{15}$ |
| SSR Interrumpido puro | $(AAC)_8 TG (AAC)_9$ |
| SSR Compuesto | $(AAC)_7 (TTG)_6$ |
| SSR Interrumpido compuesto | $(AAC)_9 TG (ACC)_5 GA (TTA)_6$ |
| SSR Complejo | $(ACC)_8 TG (GA)_5 (TTA)_{12} GC (TTA)_4$ |

Anexo 2

| SOLUCION | CONCENTRACION | | |
|----------------------|---------------|------------------|------------------|
| | FINAL | 8 % | 6 % |
| Urea | 7 M | 420 gr. | 420 gr. |
| Acrilamida | 8% - 6% | 80 gr. | 60 gr. |
| Bisacrilamida (1:20) | | 4 gr. | 3 gr. |
| TBE 10X | 1X | 50 ml | 50 ml |
| H ₂ Odd | ---- | Aforar a 1000 ml | Aforar a 1000 ml |

La solución de Poliacrilamida debe quedar bien disuelta, por lo que se agita y luego se filtra para eliminar impurezas. Se almacena a 4°C en oscuridad (envase forrado con papel aluminio).

Anexo 3

| PASO | PROCEDIMIENTO A | PROCEDIMIENTO B |
|---------------------------|---|---|
| Fijación | 20 min. en Ac. Acético 10% | _____ |
| Lavado | 3 lavados de 3 min. cada uno. | _____ |
| Tinción | 30 min. en 0,1 % AgNO ₃ ; 1,5 ml 37% HCOH/L. | 5 a 10 min. 25% Etanol; 1% HNO ₃ ; 0,2% AgNO ₃ . |
| Lavado | 1 Lavado por 20s | 1 Lavado por 3 min. |
| Revelado | 3 a 7 min. 3% Na ₂ CO ₃ ; 1,5ml 37% HCOH/L; Na ₂ S ₂ O ₃ H ₂ O (2 mg/L) | 3 a 7 min. 3% Na ₂ CO ₃ ; 0,2 % HCOH. |
| Detención del revelado | 10% Ac. Acético 5 min. | 10% Ac. Acético 2 a 5 min. |

Procedimiento A: Sugerido por Jaramillo *et al.* 1994.

Procedimiento B: Sugerido por Qu *et al.* 2005.