



Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

**DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES NUCLEARES Y MITOCONDRIALES
Y ANÁLISIS GENÉTICO DE POBLACIONES DE GUANACO DE LA PATAGONIA
ARGENTINA**

Bioq. María Laura Maté

**Trabajo de Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Exactas**

Director: Dra. Lidia A. Vidal-Rioja

Codirector: Dr. Andrés Zambelli

Asesor Académico: Dra. M. Laura Garcia

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

2006

En primer lugar quisiera agradecer a las personas e Instituciones que hicieron posible este trabajo de Tesis Doctoral:

Dra. Lidia Arbeletche Vidal-Rioja, muchas gracias por su confianza, paciencia y dedicación

Dr. Andrés Zambelli, gracias por estar siempre conmigo, aún a la distancia

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT)

Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA)

En segundo lugar y muy especialmente quisiera agradecer al Dr. Guillermo Giovambattista, quién me enseñó con paciencia, entera disposición y desinteresadamente mucho de lo que se de genética de poblaciones.

A mis amigas del laboratorio y las nombro al azar porque todas para mí significan lo mismo: Flor, Miri, Ceci y Ana. Gracias por hacer del laboratorio ó mi segundo hogar en La Plata. Gracias por lo que me enseñaron de la amistad cada una de ustedes.

Muchas gracias a mis demás compañeros y amigos del IMBICE, Dani, Sil, Gri, Bamba, César, Rita, Nahuel, Hebe, Betty, Juan, Mirta, Alejandro, Olga, Esteban, Sebastián, Miguelito, Rubén y Gi.

A mis amigas de alma Cel, Celi, Pau, Lau y Vane, gracias por vivir conmigo esta etapa tan linda de la vida, y hacer de La Plata mi lugar en el mundo.

Dedico esta Tesis

A los mejores padres que pude haber tenido, a mis hermanos tan queridos, a mis sobrinitos del alma.

A Migue, mi esposo, por su apoyo, confianza y compañía, por ser la paz en mi vida.

Indice

	Páginas
1- Introducción	
1.1- Historia de los Camélidos	1
1.1.1- Camélidos del Viejo Mundo	1
1.1.2- Camélidos Sudamericanos	2
1.1.2.1- Guanaco	3
1.1.2.2- Vicuña	7
1.1.2.3- Camélidos domésticos: antecedentes genéticos	7
1.1.2.4- Llamas y alpacas	9
1.2- Marcadores moleculares	11
1.2.1- ADN microsatélite	12
1.2.1.1- Mecanismos mutacionales que determinan la inestabilidad de los microsatélites	13
1.2.1.2- Modelos mutacionales teóricos de los microsatélites	17
1.2.2- Marcadores mitocondriales: Región Control del ADN mitocondrial	17
1.3- Genética de poblaciones	22
1.3.1- La diversidad genética	23
1.3.2- Leyes de Hardy-Weinberg	24
2- Objetivos – Hipótesis	28
3- Materiales y métodos	
3.1- Muestras	29
3.1.1- Guanacos	29
3.1.2- Llamas	30
3.1.3- Vicuñas	30
3.1.4- Alpacas	30
3.2- Obtención de muestras y extracción de ADN total	30
3.3- Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites específicos de guanaco	31
3.3.1- Metodología experimental	31
3.3.1.1- Construcción de bibliotecas genómicas de tamaño restringido	31

3.3.1.2- Caracterización de los microsatélite en llamas y guanacos	34
3.3.2- Análisis estadístico	34
3.4- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial de las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos	37
3.4.1- Muestras analizadas	37
3.4.2- Metodología experimental	37
3.4.3- Análisis de secuencias	39
3.5- Análisis genético de las poblaciones de guanacos con marcadores microsatélites y de ADNmt	40
3.5.1- Poblaciones analizadas	40
3.5.2- Marcadores de ADN microsatélite utilizados en el análisis genético de las poblaciones	40
3.5.2.1- Amplificación de los loci microsatélites	41
3.5.2.2- Análisis estadístico	42
3.5.3.- Análisis del ADN mitocondrial	46
3.5.3.1- Muestras analizadas	46
3.5.3.2 - Metodología experimental	46
3.5.3.3- Análisis estadístico	48
4- Resultados	
4.1- Aislamiento y caracterización de marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco	49
4.2- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial en las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos	59
4.2.1- Heteroplasmia	66
4.3- Análisis genético de poblaciones de guanacos	70
4.3.1- Marcadores microsatélites	70
4.3.2- Región Control del ADN mitocondrial: Monitoreo de diversidad mitocondrial en guanacos mediante PCR-SSCP	75
5- Discusión	83
5.1- Marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco	85
5.2- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial en	

las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos	88
5.2.1- Polimorfismos de longitud y heteroplasma	89
5.3- Análisis genético de las poblaciones de guanacos con marcadores microsatélites y de ADN mitocondrial	92
5.3.1- Marcadores de ADN microsatélite	93
5.3.2 - Región Control del ADN mitocondrial	98
6- Conclusiones	102
7- Bibliografía	104
Anexo: Material Suplementario	

Introducción

DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES NUCLEARES Y MITOCONDRIALES Y ANÁLISIS GENÉTICO DE POBLACIONES DE GUANACOS DE LA PATAGONIA ARGENTINA

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Historia de los Camélidos

La familia *Camelidae* se originó en las Montañas Rocallosas de América del Norte hace 40-45 millones de años, según demuestran los restos fósiles encontrados en esta región. Posteriormente, hace unos 11 millones de años, se habría producido la separación entre los dos grupos genéticos antecesores de las tribus modernas *Lamini* y *Camelini* (Harrison 1979). Estos últimos migraron a Eurasia a través del Estrecho de Behring hace unos 3 millones de años (Webb 1974), originando el Camello bactriano y el Dromedario de la actualidad. Simultáneamente, otro grupo atravesó el istmo de Panamá e ingresó a Sudamérica donde evolucionó durante 1 millón de años para finalmente diferenciarse en las 4 especies que conforman la tribu *Lamini* y que conocemos como camélidos sudamericanos (CS). Hace 12.000 a 14.000 años los camélidos se extinguieron en Norteamérica pero sus descendientes continuaron evolucionando en Asia, África y Sudamérica.

1.1.1- Camélidos del Viejo Mundo

Actualmente la tribu *Camelini* abarca el género silvestre *Camelus bactrianus ferus* y las especies domésticos *Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*. Estudios recientes de divergencia filogenética entre ambas especies domésticas postulan que la especiación de sus ancestros ocurrió antes de la migración a Eurasia, en contraposición con la hipótesis de domesticación separada de los mismos, ocurridas en Arabia la del dromedario y en Asia Central la del camello bactriano, hace 4000-5000 años (Jianglin 2004).

El dromedario se encuentra en 35 países desde el este de la India hasta el oeste de Senegal y desde el sur de Kenia al norte de Turquía, con una población global de 17.7 millones de animales estimada para el año 2002. El camello bactriano se encuentra en los países de Asia central, Pakistán, India, Rusia, China y Mongolia.

Según datos de 2002 su población total se estima en 0.82 millones de animales. Sólo 900 bactrianos silvestres viven en China y Mongolia por lo cual desde septiembre de 2002 fueron incluidos en la lista de las Naciones Unidas para las especies con mayor peligro de extinción (Jianglin 2004).

1.1.2- Camélidos Sudamericanos

Los camélidos sudamericanos (CS) así como los camellos del viejo mundo, se clasifican taxonómicamente en el orden *Cetartiodactyla*, suborden *Tylopoda*, familia *Camelidae* (Montgelard *et al.* 1997). Actualmente se reconocen 4 especies, dos silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*, Müller 1776) y la vicuña (*Vicugna vicugna*, Miller 1924) y dos domésticas: la llama (*Lama glama*, Linnaeus 1758) y la alpaca (*Lama pacos*, Linnaeus 1758).

Es ampliamente conocido el impacto de la colonización española en la fauna autóctona. En documentos sobre este particular Flores Ochoa (1982) informa que en alrededor de cien años desaparecieron aproximadamente el 90% de las poblaciones de camélidos domésticos. Los animales introducidos por los europeos, tales como ovejas, vacas, cerdos y cabras, desalojaron a los camélidos de las costas y valles interandinos y los forzaron a ocupar zonas marginales donde las extremas condiciones ambientales impedían la sobrevivencia de los animales introducidos. El efecto de la colonización sobre las poblaciones de guanacos de la patagonia también fue drástico, ya que su número en esa época se estima entre 30 y 50 millones de animales (Raedeke 1979) y en la actualidad es de poco más de 400.000 animales (Amaya *et al.* 2001). La influencia de estos cuellos de botella sobre la composición genética de los camélidos y las consecuencias de la hibridación interespecífica sobre la variabilidad individual nunca han sido investigadas en profundidad, pero hoy se sabe que han tenido un papel muy importante en el estado actual de los camélidos sudamericanos, tanto en las especies silvestres como en las domésticas (Kadwell *et al.* 2001).

A continuación describiremos brevemente las características más importantes, distribución y origen de los camélidos sudamericanos, poniendo énfasis en el guanaco, por ser ésta la especie que en este trabajo se estudió con más detalle.

1.1.2.1- Guanaco

El guanaco es el cetartiodáctilo silvestre más grande de Sudamérica y la forma ancestral de la llama doméstica. En la época prehispánica se distribuía sobre la totalidad de Argentina y Chile, la porción occidental del territorio peruano, gran parte del territorio oriental de Bolivia y noroeste de Paraguay (Torres 1985). En la actualidad existen alrededor de 600.000 guanacos, distribuyéndose un 94 % en Argentina, 5 % en Chile y el 1 % restante en Perú y Bolivia (Cunazza et al. 1995). Este camélido posee una serie de cualidades desde el punto de vista anatómico y funcional que lo hacen particularmente apto para sobrevivir en condiciones climáticas y ecológicas extremas. Estas cualidades le permiten soportar el estrés hídrico, las temperaturas extremas y el ambiente hipóxico de las grandes alturas, por lo cual se encuentran animales viviendo desde los 4.500 metros de altura hasta el nivel del mar aunque preferentemente en climas fríos. Su distribución actual (Figura 1A) es la más amplia de los CS, encontrándose poblaciones de esta especie desde el sudeste de Perú, la Cordillera de Mochará en Bolivia y sudeste de Paraguay, hasta la Isla de Tierra del Fuego chilena y argentina. Al este de los Andes los guanacos llegan hasta las Sierras de Curamalal y la Ventana, en la provincia de Buenos Aires (MacDonagh 1949) y hasta la costa atlántica en toda la Patagonia. La población actual de guanacos sólo en la patagonia argentina es de alrededor de 450.000 animales, los que representan el 75 % de la población mundial (Amaya et al. 2001).

Se han descrito cuatro subespecies de guanacos aunque no existen pruebas biológicas suficientes que sostengan tal división: *Lama guanicoe guanicoe* (Müller 1776) en Argentina al sur de 35° de latitud, Patagonia y Tierra del Fuego. *L. g. huanacus* en Chile (Molina, 1782), *L. g. cacsilensis* (Lönnerberg 1913) en los altos Andes de Perú, Bolivia, y noreste chileno y *L. g. voglii* (Krumbiegel 1944) en la vertiente oriental de los Andes argentinos, entre 21° y 31° de latitud sur. Actualmente hay una tendencia a reconocer sólo *L. g. guanicoe* y *L. g. cacsilensis*, pero es probable que existan otras subespecies aún no identificadas.

Todos los guanacos tienen una coloración de pelaje semejante, que varía desde el marrón oscuro rojizo en el sur (*L. g. guanicoe*) a marrón más claro en el norte (*L. g. cacsilensis*). El diámetro de su fibra varía desde 16.5 a 24 micras lo cual la convierte en la segunda fibra comercialmente más apreciada después de la de vicuña. No

existen diferencias fenotípicas que permitan identificar los animales de distinto sexo. En *L. g. guanicoe*, la alzada de los adultos varía desde 1,10 hasta 1,20 m y el peso promedio es de 120 a 130 kg y de 96 kg para *L. g. cacsilensis* (Wheeler 1991).

La organización social del guanaco es cambiante según la etapa del año, pero siempre con un patrón básico compuesto de grupos familiares, tropillas de machos y machos solitarios. Los grupos familiares están formados por un macho adulto dominante y 5 a 13 integrantes más (con un promedio de 6-7), que incluyen hembras y crías de hasta 15 meses de edad. En los grupos de machos no existen crías pequeñas, están compuestos por 7 a 20 machos (con un promedio de 10) de más de un año de edad, no existen un liderazgo marcado y la actividad predominante es la de juego agresivo. Los machos solitarios se considera que son machos maduros jóvenes o seniles, no asociados a ningún grupo social. En la Patagonia la composición y tamaño de los grupos cambia durante el año; el verano constituye la estación reproductiva, en la que tienen lugar los nacimientos y apareamientos, presentándose las estructuras sociales descritas anteriormente. En otoño se inician las migraciones en busca de mejores condiciones ambientales y disponibilidad de alimentos, manteniéndose las estructuras sociales del verano, que en invierno pasan a conformar los grupos mixtos. En primavera la población comienza a regresar al área estival, y los grupos mixtos se desglosan en las estructuras sociales de verano (Puig et al. 1995). Antes del inicio de la parición durante el verano, el macho dominante expulsa del grupo familiar a las crías de más de 15 meses. Las crías machos se unen a las tropillas de machos migratorias mientras que las hembras lo hacen a otros grupos familiares establecidos, ya que a partir de los dos años éstas alcanzan la madurez sexual necesaria para reproducirse. Los grupos de machos solitarios tratan de desplazar al macho dominante y asumir el control de grupo familiar (Franklin 1982).

El período de gestación del guanaco es de 345 a 360 días (Franklin 1982) y la época de parición varía de norte a sur siendo entre noviembre y diciembre en la Patagonia y Chile y de diciembre a fines de febrero en Tierra del Fuego. El período de vida de esta especie puede alcanzar un máximo de 30 años. Las principales causas de mortalidad de los guanacos son la depredación por pumas, zorros y la caza realizada por humanos, en tanto que la mortandad por inanición sobre todo en invierno, es también causa importante en Tierra del Fuego (Raedeke 1979).

Importancia actual del guanaco

La amplia distribución del guanaco anterior a la colonización posibilitó su utilización como recurso para la subsistencia por gran parte de los grupos culturales que habitaron Sudamérica en esos tiempos. Esta especie fue un recurso fundamental para las poblaciones nativas que habitaron el territorio de la Patagonia en el período precolombino. De hecho, unos 8.000 años atrás, el guanaco fue el proveedor básico de carne, piel, lana y cuero para la confección de vestimenta, mantas y otras artesanías (Casamiquela 1983; Mengoni 1995).

Como expusimos anteriormente, durante y después de la colonización europea se produce un importante cuello de botella numérico. Aunque imposible de cuantificar ya que no se cuenta con datos previos a esa época se supone que el cuello de botella numérico provocó un empobrecimiento genético importante de esta especie silvestre. Sumado a esto, en los últimos 100 años se produjo una importante retracción en la distribución geográfica del guanaco en todo Sudamérica. En nuestro país la retracción del hábitat del guanaco posterior a la colonización fue provocada por la acción del hombre, que difiere según la región. En Patagonia y Tierra del Fuego el guanaco fue desplazado de sus áreas de alimentación por la introducción de grandes rebaños de ganado ovino, y por la introducción de la liebre europea, introducidos a principios del siglo pasado. En la zona central del país la retracción del hábitat se debió a desmonte, desarrollo de actividades agropecuarias intensivas y urbanización, mientras que en el norte se debió principalmente a la desaparición de abras y pampas al introducirse el ganado vacuno (Cunazza *et al.* 1995).

Es en este contexto, y a partir del año 1992, que el guanaco es incluido en forma definitiva en el Apéndice II de la Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de la Flora y Fauna Silvestre (CITES). La misma surge como una recomendación primaria del comité de Fauna hacia la Argentina. En esta nueva coyuntura se propone un nuevo enfoque sobre el uso racional del recurso que contempla tanto la conservación de la especie como aspectos productivos (De Lamo 1997). Para cumplir con las recomendaciones del Comité de Fauna de la secretaría CITES, se elaboró un proyecto de plan de manejo de la especie que incluye su uso sustentable. En marzo de 1993 el mismo fue aprobado por el comité permanente y fue actualizado en los años 1996 y 1999 (Amaya *et al.* 2001).

Parte de los presupuestos del plan de manejo sustentable contemplan las evaluaciones del estado de conservación de las poblaciones silvestres y los programas de gestión necesarios para conservar la especie. En el año 2000 Amaya y colaboradores realizaron un censo de animales que habitan la Patagonia, ya que los datos disponibles sobre la distribución y densidad de guanacos en esta región databan del año 1989. Este trabajo concluyó en una cifra total de guanacos para toda la Patagonia fluctuante entre 401.612 y 455.446, según el método de cálculo utilizado (Amaya *et al.* 2001), además de los aproximadamente 20.000 guanacos contabilizados en la Pcia. de Tierra del Fuego (Montes *et al.* 2000). El trabajo finalizó afirmando que en el ámbito patagónico existirían suficientes guanacos como para asegurar su sustentabilidad a futuro, siempre y cuando se establezcan normas de manejo racional en los diferentes niveles de decisión local, provincial y nacional (Amaya *et al.* 2001).

En los últimos 20 años varios productores patagónicos tradicionalmente dedicados a la explotación ovina, emprendieron paralelamente, la cría de guanacos en semicautiverio, incentivados principalmente por la depreciación de la lana ovina en el mercado internacional y la creciente valorización de la fibra de guanaco, considerada "fibra preciosa" por los mercados interesados en ese tipo de productos, principalmente Inglaterra, Alemania, Italia, Reino Unido, Japón, los Países Bajos y Hong Kong.

Los animales fundadores de las unidades de cría en semicautiverio son capturados en la naturaleza utilizando como único criterio de selección la morfología y su fenotipo joven. Sin embargo, el conocimiento de la composición genética y particularmente de su variabilidad genética, es un aspecto importante a tener en cuenta cuando se intenta realizar el aprovechamiento sustentable de una especie (De Lamo 1997), y asegurar que se está protegiendo el mayor número posible de variantes genéticas y no sólo incrementando el número de subgrupos potencialmente empobrecidos genéticamente.

Los iniciadores de este proyecto apuestan a la integración de autoridades provinciales y nacionales, investigadores y productores con el objetivo de avanzar hacia mecanismos de manejo consensuados por todas las partes que aseguren el manejo sustentable de guanacos en la Patagonia, además del cuidado y protección de esta especie silvestre por los propietarios, que verán transformarse a un competidor por sus pasturas en una valiosa alternativa de producción.

1.1.2.2- Vicuña

La vicuña se distribuye en las punas altoandinas (Figura 1B). Evidencias arqueozoológicas indican que la distribución prehispánica de esta especie es idéntica a la actual, extendiéndose desde el Parque Nacional Huascarán en Perú hasta las provincias de Atacama en Chile y La Rioja en Argentina. En toda la zona su distribución comprende áreas de altura entre 3.800 y 4.300 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m). Actualmente en Ecuador existen vicuñas importadas desde Perú, pero no hay evidencias paleontológicas de que esta especie haya habitado esa región. En los últimos 20 años la vicuña ha experimentado una importante recuperación numérica y debido a los esfuerzos realizados por los países andinos para proteger la especie pasó de una situación de especie en extinción en 1969, a especie vulnerable en 1972 (Wheeler 1991)

1.1.2.3- Camélidos domésticos: antecedentes genéticos

La bibliografía es bastante confusa respecto de la clasificación de la vicuña como un género distinto dado que se trata de una única especie: *Vicugna vicugna* que, al igual que los otros camélidos posee cariotipo $2n=74$, puede cruzarse y producir descendencia fértil (Gray 1954, Fernández Baca 1971). La definición del género *Vicugna*, propuesta por Miller en 1924, se basó en la observación de que tanto el guanaco como la vicuña poseen cada uno incisivos específicos bien diferenciados. Como los incisivos de la vicuña exhiben características morfológicas excepcionales entre los ungulados, debido a que no forman raíces, se la clasificó como género aparte. El estudio de Miller quedó incompleto y al no haber incluido la observación de llamas y alpacas, dejó a estas especies junto al guanaco en el género *Lama*, lo cual implicaría que ambas son descendientes del guanaco. Sin embargo, los incisivos de la alpaca son semejantes a los de la vicuña en tanto que los de la llama coinciden con los del guanaco, con lo cual la alpaca podría clasificarse como *Vicugna pacos* (Wheeler 1982, 1984 a y b, 1991). Si bien esta nomenclatura es apoyada por Kadwell *et al.* (2001) aún no ha sido confirmada.

La evidencia existente hasta el momento, señala a los sitios arqueológicos de Telarmachay, en la puna de los Andes peruanos entre 4.000 y 4.900 m.s.n.m., como la región donde comenzó la domesticación de los camélidos llama y alpaca. El análisis de huesos e incisivos (una de las pocas características morfológicas que

sirven para diferenciar las cuatro formas de CS entre sí) muestran que tanto el guanaco como la vicuña habitaron esta zona durante los últimos 12.000 años y que con el ciervo huemul (*Hippocamelus antisensis*) fueron las presas primarias de los cazadores humanos. Las condiciones climáticas de esta zona constituyen el límite superior apto para el pastoreo de estos animales que debido a su capacidad de convertir el pasto seco y lignificado de la puna representaban la fuente de proteínas más confiable y útil para el consumo humano. El análisis arqueo-zoológico de Telarmachay reveló la aparición de las primeras llamas y alpacas domésticas entre 6000 y 5.500 años atrás y la identificación de los mismos basada en la morfología de los incisivos, propone a la llama como la forma doméstica del guanaco por poseer incisivos idénticos. La aparente retención en la alpaca adulta de las características dentales de la vicuña juvenil sugiere una relación ancestral entre ambas especies (Wheeler 1995).

En contraste con éstos datos arqueológicos existen otras opiniones sobre el origen de los camélidos domésticos basadas en animales vivientes. Así, numerosos trabajos en base a características morfológicas y de comportamiento concluyen que la alpaca se origina a partir de la hibridación entre llama y vicuña, mientras que otro estudio basado en el pelaje concluye que la llama es un intermedio evolutivo entre el guanaco y la alpaca especializada en la producción de fibra, eliminando a la vicuña como posible ancestro. De acuerdo con estos estudios fenotípicos y de comportamiento sobre camélidos, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina en las cuatro especies revela que la vicuña nunca fue domesticada. Sin embargo, estudios realizados sobre muestras de sangre y músculo de estas especies, así como análisis de genes ribosómicos indican una asociación mas fuerte entre llama-guanaco, y entre alpaca-vicuña (Wheeler 1995). Los primeros estudios citogenéticos realizados sobre el taxón muestran que los CS poseen cariotipo $2n= 74$ (Capanna *et al.* 1965; Taylor *et al.* 1968; Bianchi *et al.* 1986; Gentz y Yates 1986). Estudios posteriores de ADN satélite (Vidal-Rioja *et al.* 1987, 1989; Saluda-Gorgul *et al.* 1990) y de citocromo b (Stanley *et al.* 1994) demuestran por primera vez la existencia de hibridación entre los camélidos sudamericanos. Estudios sobre llamas y alpacas momificadas sugieren que la hibridación post-conquista modificó la constitución genética de las poblaciones actuales, un hecho que podría explicar la diversidad de conclusiones existentes sobre la ancestría de estas especies (Wheeler 1995).

El desarrollo posterior de marcadores moleculares de ADN nuclear como los microsatélites dinucleotídicos (Lang *et al.* 1996; Obreque *et al.* 1998, 1999; Penedo *et al.* 1998; Sarno *et al.* 2000; Bustamante *et al.* 2003) y de ADN mitocondrial como el gen citocromo b (Stanley *et al.* 1994) y la Región Control (Maté *et al.* 2004) demostró la utilidad de tales loci para analizar el origen de los camélidos domésticos llama y alpaca (Kadwell *et al.* 2001), las relaciones entre poblaciones de vicuñas de Bolivia y Chile (Sarno *et al.* 2004), la diferenciación genética entre llamas y guanacos de Argentina (Bustamante *et al.* 2002), entre poblaciones de guanacos de la Patagonia Argentina (Maté *et al.* 2005) y entre los guanacos de Chile continental y los de la Isla de Tierra del Fuego (Sarno *et al.* 2001).

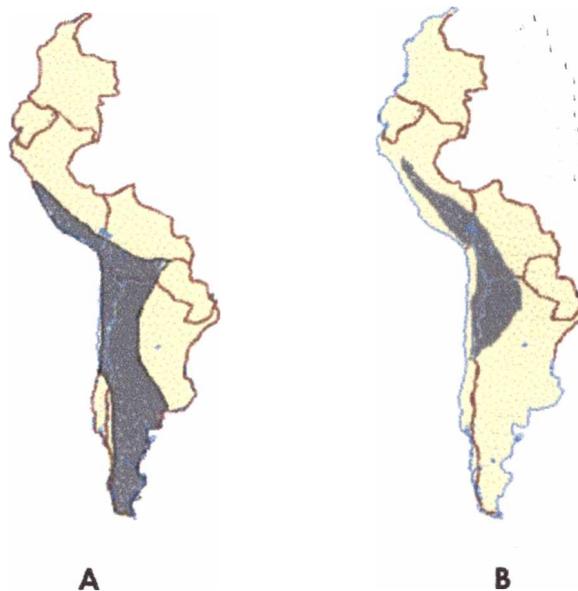
1.1.2.4- Llamas y alpacas

La **llama** es el camélido doméstico de mayor tamaño y se asemeja a su ancestro, *Lama guanicoe cacsilensis*. Después de su domesticación en la puna peruana (Wheeler 1984 b), hace 3.800 años la llama fue llevada por el hombre a los valles interandinos peruanos y al norte de Chile y 2.400 años más tarde a la costa de Perú y al Ecuador. Durante el Incanato (1470-1532) caravanas de llamas acompañaban a los ejércitos reales, por lo cual se distribuyeron desde el sur de Colombia hasta la zona central de Chile. La actual distribución es resultado de la historia de estas poblaciones durante la colonización española y la introducción en 1532 de ganado foráneo. Debido a estas últimas acciones los rebaños nativos fueron diezmados y desplazados de la costa y los valles interandinos a las punas de gran altura donde los animales europeos no prosperaban. Actualmente se encuentran llamas desde Colombia y Ecuador hasta el centro de Chile y noroeste argentino. No han sido estimadas las poblaciones de llamas y alpacas prehispánicas, pero los documentos de esa época relatan que la invasión humana y animal minimizaron los rebaños de ambas especies hasta casi su desaparición (Figuras 1C y 1D). Durante los últimos años la población de llamas se ha mantenido relativamente estable con aproximadamente 3.800.000 animales (Wheeler 1991).

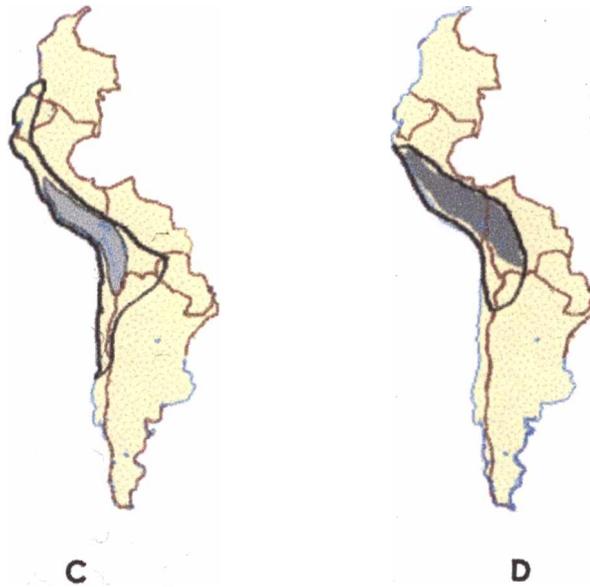
La **alpaca** es el camélido doméstico más pequeño y en este sentido se asemeja a su probable antecesor, la vicuña. Al igual que la llama, su distribución también sufrió el impacto de la colonización española. Desde su domesticación hace 6.000 años en la puna peruana (Wheeler 1984 b), la crianza de alpacas fue llevada por el

hombre al resto del territorio peruano. A partir de 1500 las alpacas (como las llamas) fueron eliminadas de algunos sitios o desplazadas de otros a las zonas más altas de los Andes donde se las encuentra hoy, principalmente en Perú y Bolivia con un número muy reducido de animales en el norte de Chile y noroeste argentino. Al igual que las llamas no se conoce el número de alpacas existentes antes de la colonización española. Actualmente el 89% de las alpacas se encuentra en Perú, y su número se estima en alrededor de 2.500.000 animales. La alpaca ha sido seleccionada como productor de fibra durante los últimos 3.000 años (Wheeler 1991).

Figura 1



A *Lama guanicoe* y **B** *Vicugna vicugna*, las áreas grises representan la zonas actuales de distribución, las áreas punteadas representan las localidades fósiles del Pleistoceno y Holoceno (Wheeler 2003).



C *Lama glama* y **D** *Lama pacos*, las líneas negras representan la distribución de estas especies antes de 1532, y las áreas grises representan los sitios arqueológicos actuales que contienen restos fósiles de llama y alpaca (Wheeler 2003).

1.2- Marcadores moleculares

A lo largo del tiempo el concepto de marcador molecular han ido cambiando conforme lo han hecho las técnicas moleculares. Los primeros marcadores utilizados fueron los marcadores de grupos sanguíneos (Stormont *et al.* 1943) tales como el sistema ABO en humanos. En la década del 60 y con la aparición de diferentes métodos de electroforesis comienza a utilizarse la información aportada por los polimorfismos presentes en proteínas enzimáticas (Bernstein *et al.* 1973; Aquadro *et al.* 1982a; Ayala 1982b). Posteriormente, el conocimiento de la mayor variabilidad presente en las secuencias de ADN no codificante, comparada con la de las secuencias codificantes de proteínas, inician una etapa de estudios genéticos donde los marcadores previamente utilizados como los antígenos eritrocitarios y las proteínas son reemplazados por los polimorfismos de secuencias de ADN, conocidas como marcadores genéticos. Este tipo de marcadores moleculares, cuya ubicación dentro del genoma puede o no ser conocida, constituyen herramientas fundamentales para medir la variabilidad genética existente en una población. Los marcadores genéticos tienen tres características importantes: 1) son locus específicos; 2) son polimórficos en las poblaciones estudiadas y 3) son fáciles de determinar. La calidad de un marcador genético se mide generalmente a través de

los parámetros Heterocigosidad y contenido de información polimórfica (PIC) (Botstein *et al.* 1980).

En 1980 Botstein *et al.* publican el trabajo de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) con el cual inician una nueva orientación en el estudio de la genética de mamíferos basada en el análisis de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción. También en 1980 Wyman *et al.* describen polimorfismos de ADN debidos a variaciones en el número de repetidos en tándem en un minisatélite, llamando a esas secuencias VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*). En 1985 Jeffreys *et al.* demuestran que los minisatélites se organizan en familias de secuencias relacionadas y usan esta propiedad para desarrollar el sistema de huellas digitales genéticas o *fingerprinting*, utilizando una sonda multilocus capaz de hibridar simultáneamente con varios minisatélites. En 1989 Weber *et al.* y Litt *et al.* descubren las secuencias microsatélites o marcadores STR (*Short Tandem Repeats*) demostrando su abundancia, distribución a lo largo de todo el genoma y fundamentalmente su alto nivel de polimorfismo debido al número de veces que se repite un motivo de 2 a 6 nucleótidos. Finalmente aparecen los marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*), que detectan variaciones en las secuencias de ADN debidas a cambios de un solo nucleótido. Algunos de los métodos utilizados para detectar mutaciones puntuales son SSCP (*Single Strand Conformation Polimorphism*), ASO (*Allele Specific Oligonucleotides*), ASA (*Allele Specific Amplification*) y pirosecuenciación.

Dentro del genoma mitocondrial existe un fragmento altamente variable denominado región control, el cual constituye uno de los marcadores de este genoma mas ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones, evolución, filogeografía y enfermedades mitocondriales.

A continuación desarrollaremos con más amplitud los dos tipos de marcadores genéticos utilizados en este trabajo.

1.2.1- ADN microsatélite

Microsatélite es el término comúnmente utilizado para describir repeticiones en tándem de un motivo de secuencia corta de 2 a 6 nucleótidos de longitud, detectados a lo largo del genoma nuclear de especies animales y vegetales. Los microsatélites tienen altos niveles de polimorfismos, principalmente los que poseen abundancia de repetidos ininterrumpidos. Los modelos de genética poblacional

asumen que son secuencias de ADN neutras, se heredan en forma mendeliana y son codominantes por lo cual existen individuos homocigotos y heterocigotos para estos caracteres. Las secuencias que flanquean el microsatélite son de copia única y por tanto son fácil y rápidamente amplificables mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) lo que los convierte en una herramienta de análisis altamente sensible y reproducible. Estas características hacen de los microsatélites marcadores genéticos moleculares de herencia biparental muy útiles para estudios de hibridación ínterespecífica, historia de poblaciones naturales, filogeografía, detección de cuellos de botella, endocría y mapeo de genes. También son útiles para analizar el efecto de la fragmentación, contracción demográfica y endocría en la estructura poblacional (Hancock 1999; Beaumont *et al.* 1999).

Existe evidencia de que las secuencias microsatélites poseen diferentes roles funcionales. Por ejemplo, como elementos de regulación, se encuentran en posición corriente arriba (5') de las secuencias promotoras de muchos genes, donde actúan acrecentando (*enhancers*) la expresión de los genes, mientras que su ausencia produce una reducción notable de esta actividad. Los microsatélites también poseen la capacidad de unirse a proteínas regulatorias. Estas capacidades están relacionadas con el número de motivos repetidos del microsatélite. Existen también secuencias microsatélites cercanas a regiones codificantes cuya variación en el número de repeticiones suele estar asociada con procesos patológicos. Por ejemplo en el Síndrome del X frágil, la forma mas común de retardo mental familiar humano, la expansión por encima de 250 repeticiones del triplete CGG ubicado en el extremo 5' no traducido del gen *FMRI*, provocaría una represión de la transcripción de dicho gen y la manifestación del Síndrome.

El conocimiento de estos roles funcionales y la alta velocidad de mutación espontánea apoyan la idea de que los microsatélites constituyen una poderosa herramienta para observar y cuantificar los cambios genéticos y evolutivos en las diferentes especies, así como para predecir la aparición o curso de una patología asociada (Kashi *et al.* 1999).

1.2.1.1- Mecanismos mutacionales que determinan la inestabilidad de los microsatélites

La característica que convierte a los loci microsatélites en herramientas particularmente útiles para los estudios genéticos y evolutivos es su inestabilidad, ya

que la velocidad de mutación de los mismos es varios órdenes de magnitud más alta que la de otros loci dentro del mismo genoma. El modelo más ampliamente aceptado explica que la inestabilidad microsatélite (IM) se debe a errores durante la replicación del ADN. Durante el apareamiento de las hebras del ADN se produciría un defecto debido a la elevada velocidad en el deslizamiento de una de ellas (*slip-strand mispairing*) (SSM). Este modelo apoyaría la hipótesis de que los repetidos incrementan la probabilidad de un apareamiento incorrecto durante la replicación del ADN y posterior al deslizamiento (*slipagge*) de la polimerasa (Eisen 1999).

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el proceso SMM ocurre en tres etapas: deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación, reapareamiento incorrecto del templado con la hebra de ADN naciente y continuación de la replicación usando el templado mal apareado (Figura 2). Es más frecuente que el deslizamiento de la polimerasa ocurra cuando replica secuencias repetidas ya que las estructuras inusuales formadas por este tipo de ADN facilitan dicho deslizamiento. La naturaleza del microsatélite influye mucho en el SMM. Los microsatélites con mayor número de repeticiones poseen mayor velocidad de mutación y tienden a sufrir más deleciones / inserciones que los que tienen menor número de repetidos. Por otro lado, la existencia de *repetidos variables* produce una disminución de la IM de los repetidos dinucleotídicos. Resumiendo, la elevada velocidad de SMM en microsatélites relativo a secuencias de ADN no repetidas puede deberse al incremento de la probabilidad de deslizamiento de la polimerasa y apareamiento incorrecto entre bases (Eisen 1999).

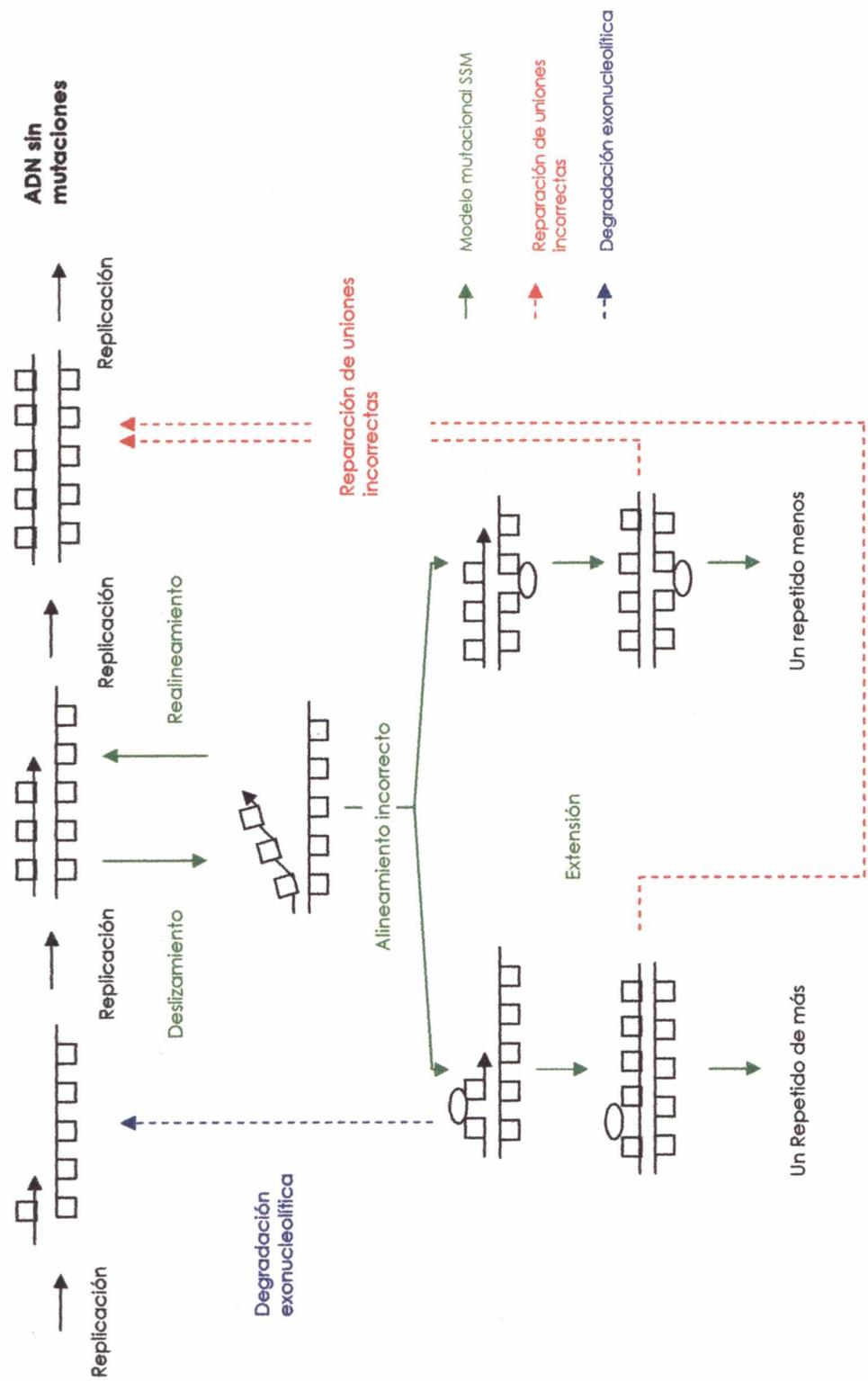
En los diferentes organismos existen dos mecanismos de reparación que tienden a contrarrestar las mutaciones introducidas en las secuencias de ADN repetido. El primero de ellos, llamado lectura de pruebas exonucleolíticas (*exonucleolytic proofreading*), es el proceso por el cual la polimerasa examina los errores en el ADN recién sintetizado, los degrada con su actividad exonucleotídica y luego continúa replicando correctamente. Las exonucleasas con lectura de pruebas detectan estructuras de doble hélice anormales en el ADN recién sintetizado. Como esta capacidad de monitoreo existe dentro de unas pocas bases cercanas al sitio activo de la polimerasa, afecta más a los microsatélite formados por unidades de repetición cortas (Eisen 1999). Por otro lado el impacto del mecanismo de lectura de pruebas exonucleolíticas varía ampliamente entre especies por lo tanto aquellas que no poseen esta actividad asociada a sus polimerasas serán más proclives a la

IM. De esta manera los microsatélites mono- y dinucleotídicos serán más inestables en las especies que no posean esta actividad compensadora de errores.

El segundo mecanismo corrector de errores SMM se denomina reparación de errores de apareamiento (*mismatch repair*). Este mecanismo posee un rol mucho más importante que el mecanismo anterior en la regulación de la estabilidad del microsatélite y ha sido estudiado en un rango de especies desde bacterias hasta humanos. El paso crítico es el reconocimiento de la base mal apareada y posterior unión de la proteína homodimérica MutS. Seguidamente, el homodimero MutL junto con MutH marca la zona de ADN que posee la base mal apareada y que debe ser removida. Otras proteínas completan la reparación sintetizando el fragmento removido usando como templado la hebra complementaria, reparando así al ADN. La causa más importante de variación en este mecanismo es la naturaleza del repetido. No todos los lazos o *loops* del ADN son reconocidos por este mecanismo, y la especificidad varía entre especies. Algunas como *E. coli* reconocen *loops* de hasta 4 pb, mientras que este mecanismo de reparación en levaduras reconoce y repara perfectamente *loops* de hasta 6 pb. Este límite en el tamaño del *loop* que puede ser reconocido y reparado ayuda a explicar porqué los microsatélites con repetidos de diferentes tamaños poseen diferentes velocidades de mutación. Además de la naturaleza del repetido otros factores tales como el contenido de GC, el estado de metilación del ADN y el nivel de transcripción modulan la efectividad de este mecanismo de reparación de errores (Eisen 1999).

Podemos concluir que la IM puede ser considerada como el balance entre la aparición de errores por deslizamiento y la tasa de error de la ADN polimera durante la replicación del ADN, y la corrección de algunos de esos errores por lectura de pruebas y reparación de bases mal apareadas. La Figura 2 esquematiza el modelo mutacional por deslizamiento de la polimerasa y apareamientos incorrectos (SSM), y los dos mecanismos correctores de errores (Eisen 1999).

Figura 2 Modelo mutacional de los loci microsatélite (SSM) y mecanismos correctores de errores (Eisen 1999).



1.2.1.2- Modelos mutacionales teóricos de los microsatélites

El conocimiento de los eventos mutacionales que llevan a la evolución de los microsatélites es necesario para optimizar la información provista por estos marcadores. Por ejemplo, la estimación de varios parámetros poblacionales tales como diferenciación genética y número de migrantes por generación depende del modelo mutacional que se supone afecta a estos marcadores. Clásicamente se consideran dos modelos extremos: el modelo de alelos infinitos **IAM** (*infinite allele model*) y el modelo mutacional de a pasos **SMM** (*stepwise mutation model*). Este último describe la mutación de los alelos microsatélites por la pérdida o ganancia de un único motivo repetido, por lo cual los alelos mutan originando alelos ya presentes en la población. Contrariamente, el modelo IAM asume que las mutaciones en los alelos presentes involucran varias unidades de repetición originando de esta manera alelos que no se encontraban en la población. Actualmente el modelo más aceptado para explicar la evolución de los marcadores microsatélites es el SMM, aunque existen en la literatura trabajos que describen la mutación de estos marcadores por inserciones y deleciones en las secuencias que flanquean el repetido. Estas observaciones son más frecuentes cuando se comparan diferentes especies que cuando se comparan individuos de la misma especie (Estoup *et al.* 1999).

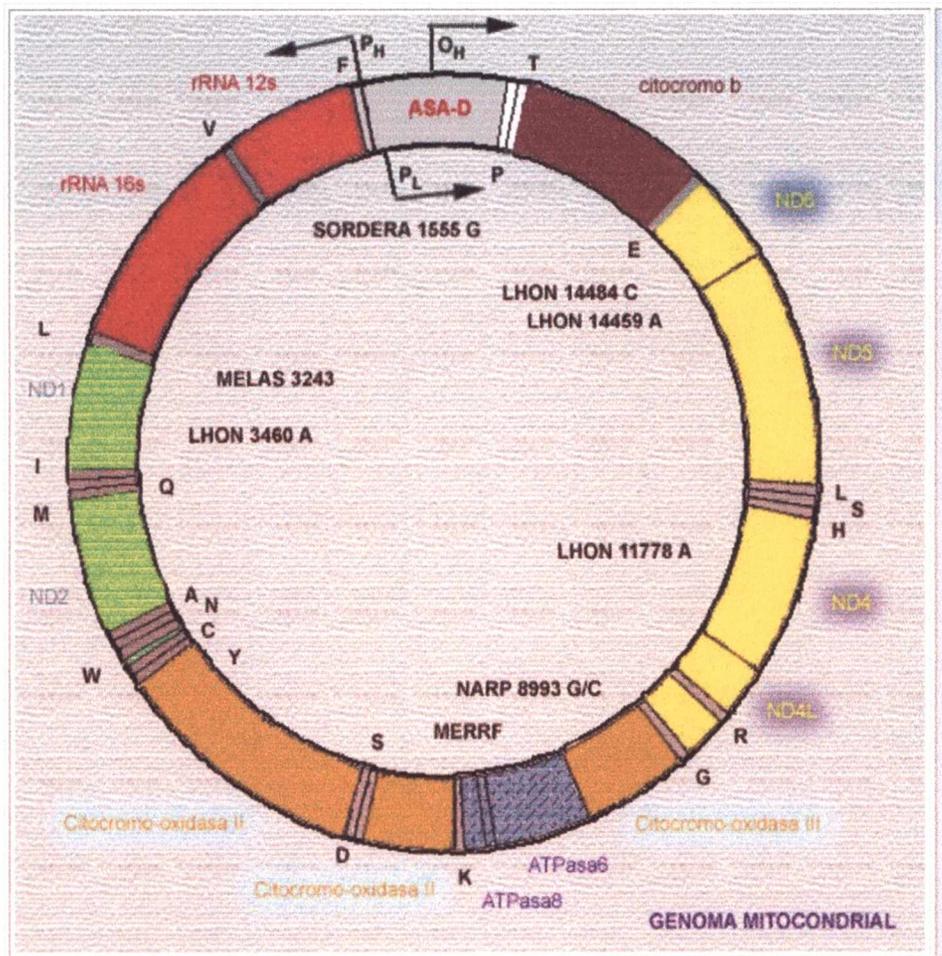
1.2.2- Marcadores mitocondriales: Región Control (RC) del ADN mitocondrial

Cuando se realizan estudios de genética poblacional animal utilizando marcadores de origen biparental, como los microsatélites, es importante complementarlos con el uso de marcadores de herencia uniparental y de este modo ampliar el perfil de variabilidad genética reflejando la historia matrilineal o patrilineal de las poblaciones. Dentro de los marcadores uniparentales se encuentran los marcadores del ADN mitocondrial (ADNmt), que se heredan por vía materna, y los marcadores del cromosoma Y, que se heredan por vía exclusivamente paterna. En el caso de los camélidos sudamericanos (CS), estos marcadores permitirían verificar aspectos de dinámica y estructura poblacional como la variabilidad de linajes que componen las poblaciones, el desplazamiento de progenitores, la supremacía de determinados haplotipos y la determinación de los haplotipos ancestrales.

El ADNmt de los mamíferos es una molécula circular y cerrada de 16.000 a 18.000 pb. Ambas hebras poseen diferente contenido de G+C por lo que pueden separarse en un gradiente de densidad en hebra pesada (*H-strand*) y hebra liviana (*L-strand*). Cada mitocondria puede contener 4-5 copias de ADNmt y dependiendo de la especie, cada célula puede contener cientos de mitocondrias.

El ADNmt contiene 37 genes que abarcan los ARNs ribosómicos de 12S y 16S, 22 ARNs de transferencia y el ARN mensajero de 13 polipéptidos que constituyen subunidades del sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria. Siete de esos polipéptidos, ND1 a ND6 y ND4L constituyen las subunidades del Complejo I; otro, Citocromo b, es parte del Complejo III; tres polipéptidos, CO I a III, son las subunidades catalíticas del Sistema IV, y los dos restantes, ATPasa 6 y 8 son subunidades del Complejo V (ATP sintetasa) (Figura 3). Una de las características del genoma mitocondrial en mamíferos es su organización génica compacta, con todas sus secuencias codificantes contiguas sin separación por intrones o separadas por unas pocas bases. En algunos casos los genes se superponen (ATPasa 6 y 8 por ejemplo) y en otros los codones de terminación no están codificados y se generan por poliadenilación post-transcripcional del mensajero correspondiente (Ojala *et al.* 1981).

Figura 3 Esquema del genoma mitocondrial de mamíferos



MEDICICLOPEDIA. Diccionario ilustrado de términos médicos.
www.iqb.es/monografia/fichas/ficha027.htm - 8k

- rRNA 12s y rRA 16s: genes que codifican el ARN ribosomal
- genes que codifican el complejo I de NADH deshidrogenasa
- genes que codifican el complejo IV de citocromo oxidasa
- genes que codifican el complejo I de NADH deshidrogenasa
- genes que codifican el complejo V (ATP-sintasa)
- genes que codifican el complejo III (ubiquinona-citocromo b oxido-reductasa)

Otra característica importante del genoma mitocondrial es la asociación de mutaciones en algunos de sus genes con varias patologías humanas, razón por la cual esta molécula ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Algunas de las patologías asociadas a las mutaciones señaladas en la Figura 3 son:

MELAS (miopatía mitocondrial con encefalopatía, ácidos láctico y episodios similares al ictus). Se debe a una disfunción del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial debida a un cambio de bases en el par 3243 de la cadena pesada.

MERRF (epilepsia mioclónica, fibras rojas deshilachadas): se debe sobre todo a una mutación del gen que codifica el ARNt de la lisina por un cambio de bases en la posición 8344 de la cadena pesada. Este cambio produce una disfunción del complejo V de la cadena respiratoria.

NARP (neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa) se debe a una mutación del gen que codifica el complejo V de la cadena respiratoria (ATP-asa 6).

LHON (neuropatía hereditaria de Leber) se debe a múltiples mutaciones en los genes que codifican el complejo I (NADH-deshidrogenasa).

El arreglo de genes en el genoma mitocondrial es generalmente estable y diferencias en el orden de los genes se utilizan para estudios filogenéticos (Desjardins *et al.* 1991). El genoma mitocondrial evoluciona rápidamente debido al constante ataque de radicales libres producidos en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, los cuales son potencialmente mutagénicos debido a la falta de un mecanismo eficiente de reparación del ADN (Wilson *et al.* 1985) y a la falta de proteínas del tipo histonas que lo protejan. Una característica interesante que convierte al ADNmt en una importante herramienta de estudios genéticos es su falta de recombinación y transmisión predominantemente materna en la mayoría de las especies, aunque recientemente se han descrito excepciones a esta regla (Zhao *et al.* 2004). Desde una perspectiva funcional esta molécula representa una unidad genealógica no recombinante con múltiples alelos.

Dentro del ADNmit existe una región no codificante denominada Región Control o Asa-D (*D-loop*) (Figura 3), la que posee los elementos necesarios para la replicación y transcripción del genoma mitocondrial. Esta región muestra una extraordinaria

variabilidad a nivel de especies, exhibiendo una tasa de mutación 5 veces mayor que la del resto del genoma mitocondrial (Aquadro *et al.* 1983) y por esta razón es utilizada para trazar los patrones geográficos de diversidad genética poblacional y evolución (filogeografía), flujo génico, expansión demográfica, deriva genética e hibridación entre individuos genéticamente relacionados (Bruford *et al.* 2003).

Como dijimos anteriormente, los marcadores de ADN microsatélites son de uso frecuente en la estimación de la variabilidad genética en poblaciones naturales. Una estrategia común de estudio consiste en la selección de marcadores altamente variables para la caracterización de un grupo de poblaciones. La variabilidad promedio de esos loci se usa como estimador de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Esos datos dan idea de la estructura poblacional y dinámica demográfica de las poblaciones analizadas. A partir de ellos se pueden implementar estrategias para la conservación de la biodiversidad (Schlötterer *et al.* 1999).

En el caso de las poblaciones animales silvestres o domésticas, con comportamiento social relativamente complejo como el exhibido por los Camélidos, con una dispersión génica dependiente del sexo o filopatría, los patrones de estructura poblacional, basados en marcadores biparentales como los loci microsatélites, pueden diferir de aquellos basados en marcadores de herencia uniparental, como los de origen mitocondrial o los procedentes del cromosoma Y (Castella *et al.* 2001). Mediante esta combinación de marcadores Nyakaana *et al.* (1999, 2002) Vidya *et al.* (2005), describieron la variabilidad genética y diferenciación existente en poblaciones de elefantes africanos y asiáticos, respectivamente. Con una estrategia semejante, Sarno *et al.* (2001, 2004) y Feulner *et al.* (2004) detallaron estos parámetros poblacionales en guanacos chilenos y vicuñas del norte de Chile y Bolivia y en poblaciones de ciervos de los Cárpatos, respectivamente.

En párrafos anteriores expusimos las características de los marcadores de ADN microsatélite y de la región control del ADN mitocondrial, y la oportunidad de su uso como herramientas moleculares para el análisis genético de 4 poblaciones de guanacos de la Patagonia argentina manejadas en semicautiverio. A continuación desarrollaremos los parámetros más importantes de la genética poblacional necesarios para comprender la diversidad, estructura y diferenciación genética de estas poblaciones.

1.3- Genética de poblaciones

Kimura y Ohta (1971) definieron la genética de poblaciones como aquella rama de la genética cuyo objetivo es investigar las leyes que gobiernan la estructura genética de las poblaciones naturales y clarificar mediante ellas los mecanismos de evolución. Teniendo en cuenta que la evolución se manifiesta a través del cambio en la composición genética de las poblaciones, también puede definirse a la genética de poblaciones como la rama de la biología evolutiva que investiga las leyes de la transformación que rigen el proceso evolutivo. En sentido amplio, la genética de poblaciones es el estudio del comportamiento del conjunto de los genes de las poblaciones. Esto implica la investigación de la adaptación de los organismos a ambientes estables o cambiantes y, por consiguiente, al estudio del mecanismo de la evolución. Aunque la evolución puede estudiarse a diferentes niveles, reducida a sus términos más sencillos es un proceso de cambio en las frecuencias de los alelos o variantes de los genes. De allí que la preocupación central de los estudiosos de la genética de poblaciones sea la investigación de la dinámica del cambio en las frecuencias alélicas (Catanesi 2001).

Para comprender los principios genéticos y estadísticos de esta área científica es oportuno definir algunos conceptos claves:

Gen es una unidad básica de material hereditario que determina las características del individuo, a menudo en combinación con otros genes y / o con el medio ambiente. Las formas alternativas de un gen se denominan **alelos**. Dentro de una célula, los genes se ubican a lo largo de los cromosomas, de manera tal que un cromosoma puede contener varios genes. La posición del gen en el cromosoma se denomina **locus**, y el conjunto de locus **loci**. En organismos superiores las células somáticas contienen dos copias de cada cromosoma, por lo cual se denominan organismos diploides, uno de los cromosomas del par se hereda de la madre y el otro del padre. Si los dos alelos de un locus son químicamente idénticos, o sea poseen una secuencia de ADN idéntica, se dice que el individuo es **homocigoto** para ese locus, y **heterocigoto** si ambos alelos difieren en uno o más nucleótidos. Los alelos **A** y **a** son **codominantes** por lo tanto decimos que el individuo es heterocigota **Aa** si los productos de ambos alelos se detectan fenotípicamente (Hartl *et al.* 1997).

1.3.1- La diversidad genética

Cuando un gen presenta más de una forma alélica se dice que es polimórfico, siempre y cuando el alelo más común posea una frecuencia menor a 0,95. Antes del descubrimiento de marcadores genéticos ubicados en regiones no codificantes del genoma, el término polimórfico se aplicaba únicamente a los genes codificantes y sus manifestaciones fenotípicas, como por ejemplo el color de ojos y los grupos sanguíneos. Más tarde se encontró una cantidad importante de regiones variables sin funciones de codificación con distribuciones alélicas diferentes de una población a otra. A partir de allí el término polimórfico se extendió a estos nuevos marcadores y se demostró que constituyen las regiones de mayor variabilidad del genoma, ya que por ser no codificantes no sufren presiones selectivas ni son indispensables para la supervivencia del organismo (Catanesi 2001).

Si contamos los individuos de una población que portan una u otra variante alélica de un gen o de otro carácter hereditario cualquiera, estaremos estableciendo las proporciones de esas variantes en cada población examinada. Con el paso del tiempo, estas proporciones varían respondiendo a diferentes fuerzas evolutivas, tales como el flujo génico, la deriva genética, la selección natural y las mutaciones. Estos cambios en las proporciones alélicas que ocurren lentamente a través de las generaciones constituyen el proceso evolutivo (Cavalli-Sforza et al. 1996).

La diversidad genética existe tanto entre poblaciones de una misma especie como dentro de una población, debido a diferencias genéticas entre individuos de esa población. La diversidad entre poblaciones constituye una herramienta de gran utilidad para investigar la historia evolutiva de esa especie. Esta diversidad puede estudiarse utilizando caracteres fenotípicos (morfología, proteínas séricas, grupos sanguíneos) o caracteres genéticos. Debido a que muchos caracteres genéticos variables son completamente neutros en términos de selección natural, se los llama "selectivamente neutros" (Kimura 1983). Estas áreas del genoma no sufren las presiones de selección natural porque no son codificantes, lo cual significa que dicho fragmento de ADN no dará origen a ningún producto de transcripción (ARN) y por ende tampoco a proteínas. Ello las convierte en zonas de especial interés para estudios evolutivos, pues los cambios que los afectan son siempre al azar y ocurren a una mayor velocidad que en el resto del genoma (Kimura 1983; Cavalli-Sforza et al. 1996). Como ejemplo podemos citar a los marcadores de ADN microsatélites, los cuales son frecuentemente utilizados en genética de poblaciones por ser altamente

respectivamente, las frecuencias genotípicas en el equilibrio se obtienen por expansión del binomio:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

y las relaciones matemáticas entre las frecuencias alélicas y genotípicas son las siguientes:

$$AA: p^2 \quad Aa: 2pq \quad aa: q^2$$

donde p^2 , $2pq$ y q^2 son las frecuencias genotípicas de los genotipos AA, Aa y aa respectivamente de los cigotos en cada generación.

Una de las consecuencias más importantes de este principio es la constancia de las frecuencias alélicas a lo largo de las generaciones y por lo tanto de la composición genotípica de las poblaciones. Este hecho implica que en ausencia de fuerzas evolutivas que cambien las frecuencias alélicas, el mecanismo de herencia mendeliana mantiene constantes estas frecuencias y por lo tanto las preserva de variación genética (Hartl *et al.* 1997). En otras palabras, la herencia mendeliana por sí misma no engendra cambio evolutivo, no es un mecanismo de alteración de las frecuencias de los genes en las poblaciones. Sin embargo, como la ley es un enunciado teórico, las condiciones de base para la aplicación de la misma no siempre se dan en una población natural.

Entre los principales factores que apartan a las poblaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg podemos destacar:

1) Las **mutaciones** que generan nuevos alelos e incluso nuevos genes si se duplica una región completa. Sin las mutaciones, la evolución muy pronto se detendría. Cada región del genoma puede presentar una velocidad o tasa de mutación diferente a la de otras regiones, pero el destino de las mutaciones ocurridas depende de las otras fuerzas evolutivas (como la deriva genética por ejemplo), las cuales pueden afectar la frecuencia alélica de un alelo presente en una población (Cavalli-Sforza *et al.* 1996).

2) La **deriva genética** que se refiere a los cambios en las frecuencias alélicas debido a la selección al azar de gametas en cada generación sin provocar efectos

adaptativos determinados (Cavalli-Sforza *et al.* 1981). Las gametas de los individuos que participan en la producción de descendencia determinan las frecuencias alélicas de la siguiente generación. En una población pequeña el número total de gametas que dan origen a la siguiente generación es pequeño y como consecuencia de esto las frecuencias alélicas pueden tener una gran fluctuación de una generación a la otra, mientras que si la población es grande se mantendrán más estables porque la estabilidad aumenta con el tamaño poblacional. Por efecto de la deriva la frecuencia de un alelo puede volverse 0% llevando a la extinción del alelo o 100% conduciendo a su fijación. De hecho, la fijación o la extinción es el destino inevitable de un alelo si la deriva continúa por un tiempo suficiente, más allá del tamaño de la población. Pero si la población es grande, el proceso lleva mucho más tiempo (Cavalli-Sforza *et al.* 1996).

3) Las migraciones o **flujo genético** (intercambio de individuos entre poblaciones) al igual que la selección natural, modifican las frecuencias alélicas en una dirección específica. El efecto de las primeras puede aumentar la variación genética de las poblaciones receptoras de inmigrantes y así retardar el proceso de diferenciación genética de las poblaciones ocasionado por la deriva (Ayala 1980).

4) La **selección natural** es el proceso que resulta del cumplimiento de 3 condiciones: 1) variación fenotípica entre los individuos de una población, 2) supervivencia o ventaja reproductiva asociada a esa variación y 3) herencia de la variación. La selección tiene importancia especial en la determinación del futuro de las especies pues es la selección de tipos "aptos" que eventualmente pueden convertir un alelo raro en el más común de la población si este confiere alguna ventaja. Es el único factor evolutivo que tiene consecuencias adaptativas directas ya que en general se favorecen individuos con mutaciones ventajosas y se eliminan los que poseen mutaciones desfavorables. Los primeros se reproducen en forma diferencial generando mayor descendencia. La selección natural hace posible el mejoramiento funcional de los organismos vivientes aunque, al mismo tiempo, establece restricciones al proceso evolutivo subsiguiente. Afecta a cada gen en una manera determinada aunque muchas secuencias de ADN no codificante, como los marcadores microsatélite, no están sujetas a ella y por eso se los denomina "selectivamente neutros".

Es interesante comparar las consecuencias y considerar las interacciones entre las distintas fuerzas evolutivas. La migración afecta en gran medida los efectos de la deriva, en general reduciéndolos. A su vez la efectividad de la deriva depende de factores demográficos tales como el tamaño poblacional. La deriva influye sobre todos los genes y demás secuencias de ADN en una manera cuantitativamente similar, pero afecta a cada uno en dirección azarosa e independiente, excepto en el caso de los genes ligados y del genoma mitocondrial que se heredan en bloque. Por el contrario la selección natural actúa sobre un determinado gen en una dirección particular, independientemente de los restantes loci. Todos los genes están sujetos a cambios al azar y aún una mutación favorecida por selección natural puede perderse por deriva. La mutación, como la deriva, se produce al azar, pero su destino depende de su efecto en el portador: si es favorable para la supervivencia se extenderá en la población y puede finalmente fijarse en un tiempo que depende inversamente del tamaño poblacional. Si es desfavorable, la mutación tiende a ser eliminada de la población por selección negativa (Catanesi 2001).

2- Objetivos – Hipótesis

El guanaco (*Lama guanicoe*) constituye en la actualidad un sistema ganadero complementario a la producción tradicional ovina de la patagonia. Por este motivo, durante los últimos 10 años, se han constituido en esta región grupos dedicados a la explotación sustentable de este camélido. Sin embargo, para alcanzar el potencial beneficio que encierra su cría y producción sustentable, es necesario conocer la diversidad genética de los planteles fundadores y de los animales de reposición de manera de asegurar la viabilidad del recurso a largo plazo, mayor capacidad de renovación y mejores rendimientos. Por lo expuesto, este trabajo de Tesis propone abordar, teórica y experimentalmente, los siguientes **objetivos**:

- Desarrollar marcadores moleculares de ADN específicos de guanaco,
- Aplicar los marcadores al análisis genético de las poblaciones de guanacos destinadas a la explotación y evaluar la diversidad genética actual,
- Analizar la estructura y dinámica poblacional del taxón,
- Transferir los conocimientos adquiridos a productores y técnicos asesores de manera de avanzar hacia mecanismos de manejo consensuados que aseguren el manejo sustentable de guanacos en la Patagonia.

Hipótesis de trabajo: la variabilidad genética de los guanacos de la Patagonia es suficientemente alta como para asegurar la existencia de un importante reservorio genético de la especie de la cual pueden extraerse los animales fundadores de núcleos de cría en semicautiverio, sin afectar negativamente el bagaje genético y la dinámica poblacional de la especie.

El presente trabajo de Tesis propone entonces confirmar esta hipótesis, y mediante la transferencia de los conocimientos adquiridos, contribuir al manejo sustentable de la especie teniendo en cuenta la responsabilidad que implica para nuestro país contar con el 90% de la población mundial de guanacos, convirtiendo a esta alternativa en una oportunidad exclusiva para los productores interesados.

Materiales y Métodos

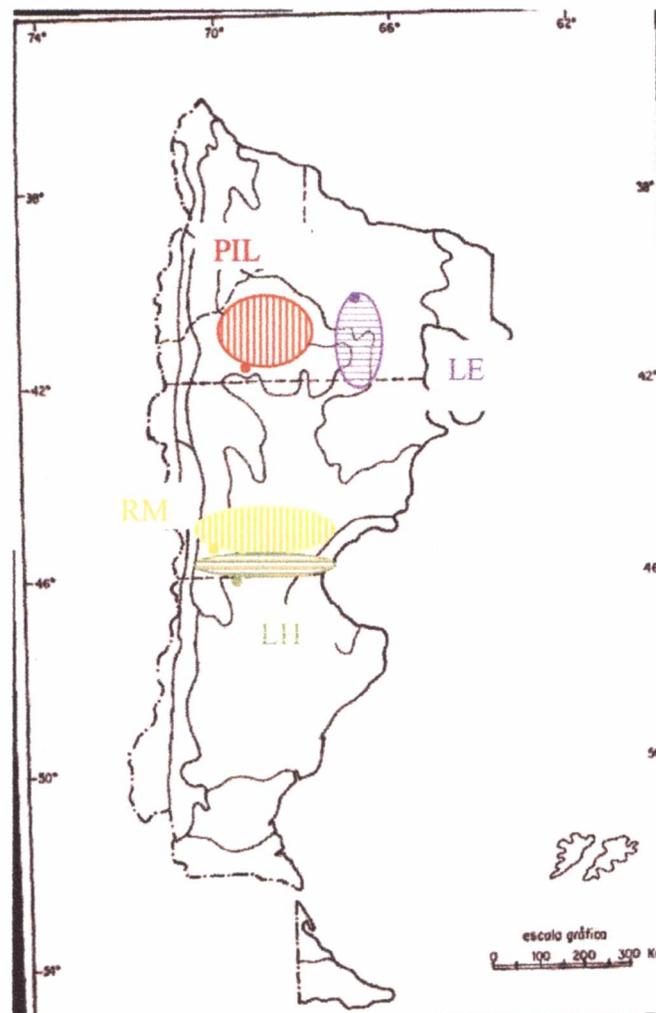
3- MATERIALES Y METODOS

3.1- Muestras

3.1.1- Guanacos

Agradecemos a los Dres. Daniel de Lamo (CENPAT, Puerto Madryn) y Julieta von Thüngen (INTA-Bariloche) por la provisión de las muestras de sangre de animales pertenecientes a estaciones de cría en semicautiverio recientemente establecidas en la Patagonia argentina. La Figura 4 ilustra las zonas de recolección de los animales y la ubicación actual de las unidades en semicautiverio.

Figura 4 Área de extracción de animales y ubicación de los núcleos de cría



Se colectaron muestras de sangre completa, con anticoagulante, de 133 animales provenientes de la zona de  Pilcaniyeu (PIL, n = 29),  La Esperanza (LE, n = 26),  Río Mayo (RM, n = 48), y  Las Heras (LH, n = 30) ubicadas respectivamente en las provincias de Río Negro, Chubut, y Santa Cruz de la República Argentina. En la Figura 4 los puntos llenos (   ) señalan la ubicación actual de las poblaciones estudiadas.

3.1.2- Llamas

Le agradecemos a la Dra. Marisa Urioste () por la provisión de las muestras de sangre de animales procedentes de Colonia Santa Isabel, Provincia de La Pampa. También agradecemos al Dr. Hugo Lamas (INBIAL, Jujuy) por proveer las muestras procedentes del establecimiento de cría Los Pioneros, ubicado en la Reserva Laguna de Pozuelos, comisión Municipal de Cieneguillas, Jujuy, Argentina.

3.1.3- Vicuñas

Algunas de las muestras de los individuos analizados corresponden a poblaciones de animales silvestres capturadas para su esquila y luego liberadas en el año 2003 en la Provincia de Jujuy por la Dra. Bibiana Vilá (), a quien agradecemos la provisión de muestras. También agradecemos al Dr. Virgilio Roig (Mendoza Zoo) por la provisión de las muestras procedentes del Zoológico de la ciudad de Mendoza.

3.1.4- Alpacas

Agradecemos a las autoridades de los siguientes organismos por la provisión de las muestras de alpacas utilizadas en el presente trabajo: Estación INTA-Abra Pampa (Jujuy), Estación ECAS (Buenos Aires) y Zoológico de Mendoza.

3.2- Obtención de muestras y extracción de ADN total

Se colectaron 10 ml de sangre periférica de cada animal utilizando como anticoagulante Ácido cítrico-Citrato de sodio-Glucosa (25mM ácido cítrico, 45mM

citrato de sodio, 80mM glucosa) en una proporción de sangre-anticoagulante de 6:1. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de la extracción de ADN a -20°C .

El ADN genómico se obtuvo mediante la técnica de extracción orgánica de Sambrook *et al.* (1989), consistente en lisis de las células sanguíneas por incubación con una solución hipertónica de Sacarosa 0,32 M, Cl_2Mg 5mM, Tris-Cl 10 mM pH 8, y Tritón X 100, lavado del pellet con solución salina e incubación con 100 mg / ml de Proteinasa K en presencia de 1% de SDS durante 3 horas en un baño de H_2O a 65°C . A continuación se extrajeron proteínas y lípidos contaminantes mediante 3 extracciones con solventes caotrópicos: a) 1 volumen de fenol saturado pH 7,8, b) 1 volumen de fenol: cloroformo, y c) 1 volumen de cloroformo. Finalmente el ADN se precipitó con alcohol etílico al 100%, se lavó con el mismo alcohol al 70%, y se resuspendió en una solución de TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5).

3.3- Aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites específicos de guanaco

3.3.1- Metodología experimental

3.3.1.1- Construcción de bibliotecas genómicas de tamaño restringido

- Digestión de ADN genómico

Treinta microgramos de ADN genómico de 3 guanacos seleccionados al azar se digirieron con las isoesquizómeros de restricción *DpnII* (New England BioLab) o *Sau3A* (New England BioLab) que reconocen y clivan secuencias de ADN idénticas. Se utilizaron 5 UE / μg ADN, en 1X del buffer recomendado por el proveedor y un volumen final de 300 μl se incubaron 16 hs a 37°C . El producto de digestión se purificó mediante precipitación con 1 volumen de 2-propanol, lavado con 1 volumen de etanol 70% y resuspensión en 30 μl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5). La digestión de ADN genómico de guanaco se controló en geles de agarosa al 1%, utilizando *PhiX174* / *HaeIII* y *Lambda* / *HindIII* (Promega) como marcadores de peso molecular. Posteriormente se recuperó, por corte del gel, la banda de ADN ubicada entre 300 y 600 pares de bases. Los fragmentos recuperados se purificaron mediante

cromatografía en columnas con filtro de lana de vidrio impermeabilizada con silicona y elusión en TE.

- Linearización del vector de clonación

El vector plasmídico p-GEM3Zf- (Promega) se digirió con la enzima de restricción *BamHI* (Promega) generando extremos compatibles con los producidos por las enzimas utilizadas para digerir el ADN genómico. Finalizada la abertura del plásmido se purificó mediante extracciones con 1 volumen de fenol: cloroformo, 1 volumen de cloroformo, precipitación con 2-propanol, lavado con etanol 70% y resuspensión en buffer TE. La correcta linearización del vector de clonado se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con Bromuro de Etidio 0,5 mg/ml y posterior visualización con luz UV. El peso molecular se controló mediante la utilización de los marcadores PhiX174/ *HaeIII* y Lambda / *HindIII* (Promega).

- Construcción del plásmido recombinante

Los fragmentos de ADN de guanaco se ligaron al vector de clonado linearizado p-GEM3Zf- (Promega), mediante el uso de la enzima T4 ligasa (Promega) y el buffer provisto con la enzima, durante 1,5 hs a temperatura ambiente, en un volumen final de 10 μ l. La masa de fragmentos de restricción utilizada se calculó mediante la siguiente formula:

Fragmento ADN pb X ng de vector / vector pb = ng de fragmento de ADN

- Transformación de bacterias XL1Blue con el plásmido recombinante

Se transformaron 100 μ l de bacterias XL1 Blue (Stratagene), previamente competidas por tratamiento en $CaCl_2$ 100 mM, con 5 μ l del vector recombinante. La mezcla se incubó en hielo durante 1 h, luego se sometió a un shock térmico de 42° C durante 1 minuto y se colocó en hielo durante un minuto adicional. Posteriormente se agregaron 400 μ l de medio LB fresco (Tryptona 1%, extracto de levadura 0,5%, CINa 1%) y se incubó 1 hora a 37° C. Finalmente se agregaron 10 μ l de isopropil- β -D-galactosidasa (IPTG) (200mg/ ml) y se sembraron 250 μ l del cultivo en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con LB ágar - Ampicilina - X gal (20mg/ ml). Las cajas se incubaron toda la noche en estufa a 37° C.

- Transferencia de las colonias recombinantes a membrana (colony blot) e hibridación con sonda radiactiva. Identificación de las colonias +

Luego de la incubación, las colonias blancas transformantes se transfirieron mediante estriado con palillos de madera estériles, a un segunda caja de Petri con LB agar- Ampicilina- X gal (20mg/ ml) y se incubaron toda al noche a 37° C. Posteriormente se realizó la transferencia de ADN (Southern Blot) a membranas de Nylon (Hybond-N, Amersham) las que se homearon a 80° C en estufa de vacío para fijar el ADN. A continuación se realizó la identificación de las estrías pertenecientes a las colonias de bacterias recombinantes conteniendo el repetido de interés, mediante hibridación con una sonda sintética poli (dA - dC). Poli (dT - dG) (Amersham Pharmacia Biotech). Finalizado este paso las membranas se lavaron y expusieron a una película radiográfica (AGFA - Ortho-CG P Plus). El revelado de las placas radiográficas y la superposición de dichas placas con las cajas de Petri nos permitió identificar y aislar las estrías +, es decir las colonias de bacterias recombinantes con un inserto microsatélite.

- Aislamiento de plásmidos recombinantes

Las colonias portadoras de plásmidos con inserto microsatélite se tocaron levemente con anza en anillo estéril y se sembraron en 10 ml de medio LB + Ampicilina e incubaron a 37° C durante toda la noche. A continuación se purificaron mediante la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989.) Para confirmar la existencia de la secuencia repetida en el plásmido recombinante, se digirió una alícuota de 1 µl con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI* (Gibco, BRL) que clivan a ambos lados del lugar de inserción, liberando de esta manera el fragmento de ADN ligado. Finalmente la mezcla de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a membrana de nylon, y se hibridó con la sonda poli (dA - dC). Poli (dT - dG) radiactiva para confirmar la presencia de la secuencia repetida.

- Secuenciación del clon y diseño de primers

La secuencia microsatélite inserta en el vector plasmídico se secuenció manualmente con la técnica de terminación de cadena de Sanger utilizando el kit T7 Sequencing (USB Corporation). Las secuencias se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturizante al 6%, acompañadas de una secuencia de pUC18, la cual se utilizó para determinar la longitud exacta del microsatélite. Posteriormente se diseñaron

cebadores (primers) utilizando el programa Primer 3 (Rozen et al. 2000) flanqueantes de la secuencia del microsatélites, para su amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y caracterización en camélidos sudamericanos.

3.3.1.2- Caracterización de los microsatélites en llamas y guanacos

Para caracterizar los microsatélites de ADN específicos de guanaco aislados se utilizaron muestras de ADN total proveniente de 30 llamas y 30 guanacos tomados al azar (ver inciso 3.1.1 y 3.1.2).

Los microsatélites se amplificaron en cada una de las muestras mediante la técnica de PCR en 15 μ l de una mezcla de reacción compuesta de 30 ng de ADN genómico, 0,1 mM de dNTPs, 2mM de Cl_2Mg , 0,8 - 1,2 μ M de cada primer, 1U de Taq polimerasa (Invitrogen, Argentina), y buffer 1X (buffer 10X: ClK 500 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,4). Las temperaturas de amplificación variaron, según la composición de la secuencia del primer, entre 48 y 56 ° C y las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial:	95° C durante 3 min
35 ciclos de:	Paso 1: 95° C 1min
	Paso 2: 48-56° C 1min
	Paso 3: 72° C 1min
Extensión final:	72° C durante 3 min.

Los diferentes alelos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante al 6% (19:1 acrilamida: bisacrilamida, 50% p/v urea, 0,01% persulfato de amonio, 0,001X de TEMED) utilizando como buffer de corrida TBE 1X (0,090M de trisborato, 0,002 M de EDTA). Finalmente el ADN se fijó en el gel con ácido acético al 10% durante 20 min, se tiñó con $NO_3 Ag$ al 0,1% durante 30 min y se reveló con Na_2CO_3 al 3%.

3.3.2- Análisis estadístico

Los parámetros utilizados para caracterizar los microsatélites aislados tales como frecuencia alélica, rango alélico, número de alelos por locus, heterocigosidad

esperada (h), PIC, PEX y PEA se calcularon utilizando el programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.* 1998). A continuación definimos estos parámetros:

- Frecuencia alélica

Es la frecuencia relativa de un alelo particular en una población. La frecuencia del alelo i se calculó mediante la fórmula:

$$p_i = n_i / 2.N$$

siendo p_i = la frecuencia del alelo i , n_i = número de veces que aparece el alelo i en la población y N = número total de individuos analizados.

- Número total de alelos (A_i)

Se calculó el número total de alelos para cada marcador y en cada una de las diferentes especies.

También calculamos el número medio de alelos por locus (NMA) para cada población, utilizando la fórmula:

$$NMA = \sum A_i / n$$

siendo A_i el número de alelos detectados en el locus i y n = el número de loci tipificados. El correspondiente desvío estándar lo calculamos mediante el programa Excel Microsatellite Tool (Park 2001).

- Rango alélico

Está determinado por la diferencia entre el alelo de mayor longitud y el de menor longitud para un determinado locus. Se calcularon los rangos alélicos de los loci aislados en ambas especies.

- Heterocigosidad Esperada (h) y Heterocigosidad Esperada Media (H_e)

La heterocigosidad esperada (h) se define como la proporción de individuos heterocigotas para un locus, en una población con apareamientos al azar ó, en otras palabras, como la proporción esperada de loci heterocigotas en un individuo tomado

al azar. Este parámetro, denominado por Nei (1973) como diversidad génica, puede ser estimado para un locus (h) o para una serie de loci (H). Si definimos la heterocigosidad en términos de las frecuencias alélicas y considerando una población con apareamientos al azar donde p_i es la frecuencia alélica del alelo i en un locus determinado, la heterocigosidad para dicho locus puede definirse como:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde n es el número de alelos presentes en ese locus.

El índice H_e se estima según la siguiente fórmula:

$$H_e = \sum h_{ei} / n$$

siendo h_{ei} las heterocigosidades esperadas en el locus i y n = el número total de loci tipificados.

El desvío estándar del estadístico Heterocigosidad Esperada Media (H_e) se calculó mediante el programa Excel Microsatellite Tool (Park 2001).

- Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica es una medida del grado de polimorfismo de un locus variable. El mismo es directamente proporcional al número y a la frecuencia de los alelos, aumentando en forma logarítmica (Bolstein *et al.* 1980). Se puede calcular el PIC de cada locus y el PIC promedio de todos los loci tipificados en una población, como el promedio aritmético de los valores de PIC de cada locus. En nuestro trabajo se lo calculó mediante la siguiente expresión:

$$PIC = 1 - \left[\sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 \times p_i^2 \times p_j^2 \right]$$

donde p_i y p_j son las frecuencias de los alelos i y j en la muestra y n es el número de alelos observados.

- Poder de exclusión y Poder de Exclusión Acumulado

El poder de exclusión (PE) es un estadístico que permite cuantificar *a priori*, a partir de las frecuencias génicas de un marcador, la probabilidad que tiene un sistema de marcadores genéticos de excluir un determinado suceso (por ejemplo, un individuo de una paternidad). El poder de exclusión acumulado (PEA) es el producto de todas las probabilidades obtenidas por todos los marcadores utilizados. Los índices PE y PEA se estimaron según las siguientes fórmulas descritas por Jamieson (1994) y Weir (1990):

$$PE = 1 - 2 \sum_{i=1}^k x_i^2 + \sum_{i=1}^k x_i^3 + 2 \sum_{i=1}^k x_i^4 - 3 \sum_{i=1}^k x_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^k x_i^2 \sum_{i=1}^k x_i^3$$

siendo x_i la frecuencia génica del alelo i y k es el número de alelos.

$$PEA = 1 - \prod_r (1 - PE_i)$$

siendo PE_i la probabilidad de exclusión del i -th locus y r el número de loci.

3.4- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial de las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos

3.4.1- Muestras analizadas

Se analizaron 5 individuos de cada una de las 4 especies de Camélidos Sudamericanos. Los mismos se seleccionaron al azar de las poblaciones de origen descritas en el punto 3.1 de esta sección.

En el laboratorio se trabajó con muestras de ADN genómico total extraído como se detalla en el punto 3.2 de esta sección.

3.4.2- Metodología experimental

- Amplificación de la Región Control (RC) del ADN mitocondrial

La RC completa de los 20 camélidos seleccionados se amplificó por PCR utilizando los primers flanqueantes de la región mitocondrial, diseñados en base a la secuencia mitocondrial completa de una alpaca depositada en el EMBL (Y19184) y publicada por Ursing *et al.* (2000).

Fw: 5'CTGATAAATCCCATAGAGC 3' y

Rv: 5'TTTCAGCGCCTTGCTTAAG 3'

La amplificación se realizó en un volúmen final de 15 µl conteniendo alrededor de 30 ng de ADN genómico, 1 µM de cada primer, 0,2 mM dNTPs, buffer 1 X PCR (buffer 10 X: 50 mM ClK, 10 mM Tris-HCl pH 9,0 y 0,1% Tritón X-100), 2,0 mM Cl₂Mg y 0,4 U de Taq Polimerasa (Promega).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador programable (PTC-100, MJ Research) y se utilizó un ciclado con las siguientes características: 1 ciclo a 94° C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 52° C y 1 min a 72° C, con una extensión final a 72° C durante 3 min.

- Aislamiento y purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%; para confirmar el tamaño del fragmento amplificado utilizamos p-Gem (Promega) como marcador de peso molecular y Bromuro de Etidio como colorante.

Posteriormente se recuperaron, desde el gel de agarosa, los fragmentos de ADN de alrededor de 1200 pares de bases, los cuales se purificaron en columnas de cromatografía con filtro de lana de vidrio impermeabilizada con silicona y eluyeron en TE.

- Construcción del plásmido recombinante

Mediante el uso de la enzima T4 ligasa (Promega) y el buffer de trabajo provisto, se construyó un plásmido recombinante mediante la ligación del ADN aislado y purificado en el paso anterior y el vector de clonado p-GEM T-easy vector System II, el cual provee las bacterias competentes JM109 (Promega).

- Transformación de bacterias con el plásmido recombinante

Se transformaron 50 µl de bacterias competidas JM109 (Promega) con 2 µl de la

mezcla de ligación e incubación en hielo durante 20 min seguido de un shock térmico a 42° C durante 45 - 50 seg y 1 minuto adicional en hielo. Posteriormente se agregaron 950 µl de medio SOC fresco (Triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, ClNa 0,05%, 1% ClK 250mM, 0,5% Cl₂Mg 2M y 4% glucosa 2M) y se incubó 1,5 hs a 37° C con agitación constante. Finalmente se agregaron 10 µl de isopropil-β-D-galactosidasa (IPTG) (200mg/ml) y se sembraron 100 µl del cultivo en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con LB - agar - Ampicilina - X gal (20mg/ ml). Las cajas se incubaron toda la noche en estufa a 37° C.

- Extracción y digestión del plásmido recombinante

Las colonias portadoras de plásmidos recombinantes (entre 2 y 6 clones por animal) se levantaron con anza en anillo estéril y se incubaron en frasco con medio LB + Ampicilina a 37° C durante toda la noche. A continuación se extrajeron plásmidos recombinantes mediante la técnica de precipitación descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para confirmar la existencia de la secuencia esperada de 1200 pb, se digirió una alícuota de 1 µl con la enzima de restricción EcoRI (Gibco, BRL) que cliva a ambos lados del lugar de inserción y por tanto libera el fragmento de ADN ligado. Finalmente la mezcla de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% con p-Gem (Promega), como marcador de peso molecular y Bromuro de Etidio como agente colorante.

- Secuenciación de los clones

Secuenciamos ambas hebras de los clones mediante Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de las reacciones de secuenciación se realizó en un equipo ABI PRISM 377 y un ABI PRISM 3770 (Applied Biosystem). Las secuencias se analizaron mediante el programa Chromas Lite 2.01 (www.technelysium.com.au)

3.4.3- Análisis de secuencias

La correlación entre las secuencias obtenidas y la Región Control mitocondrial se confirmó mediante la utilización del programa Nucleotide Blast (www.ncbi.nih.gov). Todas las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron utilizando los programas CLUSTAL V (Higgins *et al.* 1988) y GeneDoc v 2.6.002 (Nicholas *et al.* 1997). Las

secuencias consenso de la RC así como los dominios conservados se identificaron mediante comparación con secuencias publicadas de diferentes mamíferos (Gemmell *et al.* 1996; Sbisà *et al.* 1997) y el programa Blast Pairwise (www.ncbi.nih.gov).

Las secuencias repetidas dentro de la RC se identificaron y localizaron con el programa EQuicktandem del paquete EMBOSS (www.emboss.org).

El programa Network 4.1.1.2 (Bandelt *et al.* 1999) se utilizó para determinar las relaciones entre los diferentes haplotipos mitocondriales encontrados.

3.5- Análisis genético de las poblaciones de guanacos con marcadores microsatélites y de ADNmt

3.5.1. Poblaciones analizadas

Se analizaron 133 animales provenientes de las unidades de cría y manejo en semicautiverio cuya ubicación se muestra en la Figura 40.

3.5.2 - Marcadores de ADN microsatélite utilizados en el análisis genético de las poblaciones

La caracterización poblacional se realizó mediante la tipificación genética de cada individuo con un grupo de 14 marcadores microsatélites dinucleotídicos; cinco de ellos corresponden a los marcadores específicos de guanaco cuyo aislamiento y caracterización se describió en el punto 3.3 de esta sección, y nueve marcadores específicos de llama previamente aislados y caracterizados en nuestro laboratorio (Tabla 1) (Bustamante *et al.* 2003).

Tabla 1 Presentación de los marcadores de ADN microsatélite utilizados en el análisis de diversidad genética de las poblaciones de guanacos de la Patagonia argentina

Locus	Repetido (pb) _n	Secuencia (5' → 3')	Especie	T. amplif. ° C	Nº acceso GenBank
LAB1	(GT) ₁₉	AGAGGATCAATCCCTCTGAGAT ATTAGAGGCCAGTATAACAATC	Llama	52	AF524934
LAB3	(GT) ₁₉	TGGCGGGGAGGGGTGCTTG GATGTAACCTACCTAATTG	Llama	52	AF524935
LAB6	(TG) ₁₈	AGCTTTGGTGAGTTGAGGC CTGCATGCGCACATGTATGC	Llama	58	AF524936
LAB7	(GT) ₁₄	CATAGCTGACCTAACAGAAT GTGAGTTATGCCCATGAATC	Llama	58	AF524937
LA13	(TG) ₂₆	TCCCAATTCCTCATCTGTCAA CAGCAGTGGCGGAGACATAACC	Llama	62	AF524938
LAB14	(TG) ₁₆	GCTAGAGTAGGAGGAAGGAG TGCTCCTTTGCCTATGCCCC	Llama	52	AY661538
LAB15	(AC) ₁₈	ATCCCTTAGACCTGGTTAC TACAGCATAAAGTCCCAGTC	Llama	58	AY661539
LAB16	(GT) ₁₉	GCTTCCAAA AAACCAGCAT CACCCCATTTGGCTTGAGTC	Llama	52	AY661540
LAB17	(TG) ₂₃	CATACTCTACCACTGTGGC TTAAGTTGCACTAAAACCTG	Llama	52	AY661541

3.5.2.1- Amplificación de los loci microsatélites

El ADN genómico se amplificó por PCR en un termociclador programable mediante la técnica descrita en el punto 3.3.1.2. El ciclado incluyó una desnaturalización inicial a 94° C durante 3 min, seguida por 35 ciclos con temperatura de asociación dependiente del par de primers utilizado. Los productos de PCR se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% desnaturalizante y los diferentes alelos se visualizaron mediante tinción del ADN con AgNO₃. El tamaño de los alelos se determinó utilizando escaleras de referencia para GenePrint® HUMTHO, HUMvW y HUMLPL (Promega).

- Investigación de alelos nulos

Los alelos nulos se investigaron mediante amplificación del ADN por PCR con nuevos oligonucleótidos cebadores rediseñados para los loci *LAB7* y *LAB13*

LAB7 Fw 5' CAGAATACATATCAGAATGCAG 3'
Rv 5' TATGGCTTTCATACTTCTGA 3';
LAB13 Fw 5' AGGAGACTGTGTGTGTGTGT 3'
Rv 5' TCTAGCATGTAACCCCAATG 3'.

3.5.2.2- Análisis estadístico

Para la caracterización genética de las poblaciones se aplicaron los estadísticos que se detallan a continuación:

- Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas se calcularon mediante la fórmula descrita en 3.3.2

Las frecuencias genotípicas se calcularon mediante la fórmula:

$$p_{ij} = n_{ij} / N$$

siendo p_{ij} = la frecuencia del genotipo ij , n_{ij} = número de veces que aparece el genotipo ij en la población y N = número total de individuos analizados.

- Diversidad genética

La diversidad genética se midió en términos de Heterocigosidad esperada media (H_e), Heterocigosidad observada media (H_o) y número medio de alelos por locus (MNA). Si tenemos en cuenta que los animales que constituyen cada población fueron elegidos al azar desde sus poblaciones silvestres, estos animales representan la diversidad genética presente en el área de recolección. Sin embargo, para reducir posibles desvíos debido a los diferentes tamaños muestrales, hicimos, para calcular el MNA corregido (MNA*), un re muestreo por 1000 veces de 26 individuos tomados al azar dentro de los 48 animales de Río Mayo. Para este cálculo utilizamos un algoritmo

diseñado en una hoja de trabajo de Microsoft Excel. Los estadísticos H_e y NMA se definieron previamente en 3.3.2

- Heterocigosidad Observada (h_o)

Es la proporción de individuos de la población con genotipo heterocigota para un determinado locus y se calcula mediante la fórmula:

$$h_o = h_i / N$$

h_i : número de individuos con genotipo heterocigota para el locus en la población

N : número total de individuos analizados.

El índice Heterocigosidad observada media (H_o) se estimó según la siguiente fórmula:

$$H_o = \sum h_{oi} / n$$

siendo h_{oi} las heterocigosidades observadas en el locus i y n = el número total de loci tipificados.

Las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la diversidad genética medida en términos de Heterocigosidad esperada (H_e), Heterocigosidad observada (H_o) y número medio de alelos por locus (MNA) se calcularon mediante la utilización del software MStools v 3 (Park 2001).

- Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento, que evalúa la independencia entre los genotipos de dos loci determinados, se estimó mediante el método exacto de Fisher utilizando el método de cadena de Markov implementado en el programa Genepop v 3.2 (Raymond *et al.* 2000).

- Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Describe las frecuencias esperadas de genotipos en una población ideal. La estimación de las probabilidades del HWE se realizó a través de las pruebas exacta y probabilística incluidas en el programa Genepop 3.2 (Raymond *et al.* 2000), utilizando el método de cadena de Markov (Guo *et al.* 1992). Los niveles de significancia corregidos para el desvío de Hardy - Weinberg en cada población se basan en la técnica secuencial de Bonferroni para pruebas simultáneas (Rice 1995). La evaluación del HWE global para todos los loci tomados en conjunto en cada población y para el conjunto de poblaciones en cada locus se realizó mediante la prueba global de EHW utilizando el método de Fisher (Raymond *et al.* 1995).

- Estructura poblacional

a - Índices de Wright y estadístico Rho_{ST}

Para estimar las desviaciones de las frecuencias genotípicas con respecto a las proporciones teóricas propuestas por el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizaron los Índices de Wright (1921) o índices de fijación. Wright propuso calcular las desviaciones de las frecuencias genotípicas en una población subdividida en términos de tres parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . En la terminología de Wright, F_{IS} y F_{IT} son correlaciones entre los genes de un individuo relativas a la subpoblación y relativas al total, respectivamente (el F_{IS} determina las desviaciones del EHW en la subpoblación). El F_{ST} es la correlación de dos genes muestreados al azar de cada subpoblación o en otras palabras, la varianza estandarizada de las frecuencias génicas entre las subpoblaciones.

Los tres índices se relacionan por la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = 1 - \frac{(1 - F_{IT})}{(1 - F_{IS})}$$

F_{ST} es el estadístico más informativo para examinar la divergencia genética entre subpoblaciones. Aunque el mínimo teórico de F_{ST} es 0 (no existe diferencia genética) y el máximo teórico es 1 (indica la fijación de diferentes alelos en las subpoblaciones), el máximo observado es usualmente mucho menor que 1 y Wright (1978) sugiere lo siguiente para interpretar los valores de F_{ST} :

- el rango de 0 a 0,05 puede ser considerado como indicativo de *pequeña* diferenciación genética
- 0,05 a 0,15 indica *moderada* diferenciación genética
- 0,15 a 0,25 indica *grand* diferenciación genética, y finalmente
- valores de F_{ST} superiores a 0,25 indican diferenciación genética *muy grande*

El nivel de diferenciación genética entre las 4 poblaciones de guanacos de la Patagonia argentina se realizó con el Genepop versión 3.2 (Raymond *et al.* 2000). Además del estadístico F_{ST} que compara poblaciones basándose en las frecuencias alélicas, utilizamos el Genepop versión 3.2 para calcular el estadístico Rho_{ST} que depende de los tamaños alélicos y está especialmente adaptado a los datos microsatélites ya que se basa en el modelo de mutaciones por pasos (*Stepwise Mutation Model*), el cual explica las mutaciones que ocurren a nivel de estos loci (Slatkin 1995).

b - Prueba de AMOVA

Otra manera de estudiar la estructura genética de las poblaciones es mediante el análisis de la varianza de las frecuencias génicas. El Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA), fue definido inicialmente por Cockerham (1969; 1973) y extendido por otros autores (Weir *et al.* 1984). El método de cálculo utilizado en el AMOVA permite evaluar las diferencias entre grupos de poblaciones definidas arbitrariamente.

El AMOVA es un análisis jerárquico que consiste en la partición de la varianza genética total, en componentes de covarianza debidos a: diferencias entre los individuos dentro de cada población, diferencias entre las poblaciones y diferencias entre los grupos de poblaciones (Weir 1996).

El análisis de la varianza de las poblaciones de guanacos aquí estudiadas se realizó con el programa de computación Arlequin 2.0 (Excoffier *et al.* 1992).

c - Migración entre poblaciones

El número efectivo de migrantes por generación (N_m) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$N_m = 1 - F_{st} / 2 F_{st}$$

asumiendo que las poblaciones intercambian individuos en cada generación y que la velocidad de migración es mucho mas grande que la velocidad de mutación (Schneider *et al.* 1997).

d - Test de aislamiento por distancia

Si consideramos que los apareamientos al azar están limitados por la distancia, de manera que los animales tendrán una mayor probabilidad de aparearse con vecinos que con individuos más lejanos, esperamos que las distancias genéticas, estimadas por los estadísticos F y R se correlacionen linealmente con las distancias geográficas entre poblaciones. Esta prueba se realizó mediante el Análisis de aislamiento utilizando la prueba de distancia implementada en Genepop 3.2 (Raymond *et al.* 2000).

- Asignación de poblaciones

La distribución de frecuencias alélicas se utilizó para asignar los diferentes individuos a las diferentes poblaciones, mediante la utilización del software WHICHRUN 4.1 (Banks *et al.* 2000).

3.5.3.- Análisis del ADN mitocondrial

3.5.3.1- Muestras analizadas

Se analizaron 133 animales pertenecientes a las poblaciones de Pilcaniyeu, Río Mayo, Las Heras y La Esperanza.

3.5.3.2 - Metodología experimental

Monitoreo de haplotipos mitocondriales mediante PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

- Amplificación del fragmento hipervariable

La amplificación, clonado y secuenciación de la Región Control mitocondrial en 5 individuos de cada especie de camélido nos permitió identificar un fragmento hipervariable de 337 pb que concentra 11 sitios polimórficos. Para amplificar este

fragmento partimos del conocimiento previo de la secuencia mitocondrial completa de la RC de los Camélidos Sudamericanos (Maté *et al.* 2004) y el diseño de un par de cebadores (primers) realizado con el programa Primer 3 (Rozen *et al.* 2000) flanqueantes de esta región. La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos es:

Fw 5' TACAATACGACTGTGTGCC 3' y
Rv 5' TGAATATCATTACCCGCAT 3'

La amplificación se realizó por PCR mediante la técnica descrita en 3.4.2 en la cual incluimos 2,00 mM de Cl₂Mg y una extensión final de 10 min a 72° C.

La amplificación del fragmento hipervariable se comprobó mediante electroforesis de una alícuota de 2 µl de producto de amplificación, en agarosa al 2%, utilizando Bromuro de Etidio para visualizar el ADN y p-Gem (Promega) como marcador de peso molecular.

- Electroforesis en geles SSCP

La técnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) es ampliamente utilizada para detectar polimorfismos de secuencia sin recurrir a la secuenciación del ADN. La doble hebra de ADN se desnaturaliza por calentamiento y luego se pone en hielo donde la hebra de ADN adquiere una estructura secundaria que depende de su secuencia. En geles de poliacrilamida nativos, esta estructura secundaria adopta un comportamiento migratorio que permite distinguir diferentes conformaciones.

Para el análisis de SSCP se mezclaron 15 µl del producto amplificado con 30 µl de buffer de carga LIS (*Low Ionic Strength*) (sacarosa 10%, xylene cyanol FF 0,01% y azul de bromofenol 0,01 %), y se calentaron durante 10 min a 95° C. A continuación 10 µl de la mezcla se sembraron en un gel de poliacrilamida nativa al 10 %. La electroforesis se realizó a 350 V, en buffer TBE al 0,5%, durante 20 hs a 4° C. Las bandas de ADN se visualizaron mediante tinción del gel con sales de plata.

Los animales clonados y usados previamente para describir y caracterizar la región control mitocondrial de los CS se utilizaron como patrones de referencia para definir nuevos haplotipos. Los guanacos que poseían un patrón de corrida idéntico a algunos de los haplotipos descritos se calificaron con ese patrón, y aquellos que mostraron un patrón de SSCP diferente se amplificaron nuevamente por PCR y se secuenciaron

ambas hebras de ADN mediante Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se realizó en el sistema automático ABI PRISM 3770 (Applied Biosystem)

3.5.3.3- Análisis estadístico

- Alineamiento de secuencias

Las secuencias se alinearon con el programa GeneDoc v 2.6.002 (Nicholas *et al.* 1997).

- Diversidad haplotípica

La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan haplotipos diferentes (Kittles *et al.* 1998). La diversidad haplotípica dentro de cada población se calculó comparando los haplotipos de cada animal. Para calcular esta probabilidad utilizamos el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

- Diversidad nucleotídica

En marcadores haploides, como la Región Control mitocondrial, no puede aplicarse el concepto de heterocigosidad. Sin embargo, se calcula la diversidad nucleotídica o diversidad génica h , que es equivalente a la H_e de los marcadores autosómicos diploides, cuando satisfacen la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg. La diversidad génica mide la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes y al igual que la heterocigosidad, depende de los valores de frecuencias haplotípicas (Nei 1987). La fórmula utilizada es la citada en el caso de H_e

$$h = H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde p_i son las frecuencias alélicas de los n haplotipos observados.

Esta probabilidad también se calculó utilizando el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

Resultados

4- RESULTADOS

4.1- Aislamiento y caracterización de marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco

La Tabla 2 presenta cinco marcadores específicos de guanaco aislados durante el presente trabajo.

Tabla 2 Marcadores microsatélites específicos de guanaco

Locus	¹ Microsatélite	² Primers	³ Temperatura	⁴ GenBank
GLM 2	(TG) ₉ TT(TG) ₄	TCTAAATCCCACAGCCAAAAGG AAGGTGTTCAAAGCATCAAGAG	52	AF524939
GLM 4	(AC) ₁₃	TGAAGGAATGCAGATGAGAAGC TAGCTACAAACTTCCATGACAC	56	AF524940
GLM 5	(TG) ₁₄	TTACTACACAGGTGGGCGATTA TCAATTGTAGAAAAATAAAACC	48	AF524941
GLM 6	(TA) ₃ TG(CA) ₉ GCTA(CA) ₄ TG (CA) ₃	CCAGTCATCATATAGGGGCTTA GGCAACTCTCAAAGGGTATCTG	52	AF524942
GLM 7	(AC) ₁₄	GGGACACATTTTCATTTCATTCA GTGATTGGAACATTATCTGGT	48	AF524943

¹ Secuencia de bases repetida en tandem que componen el microsatélite

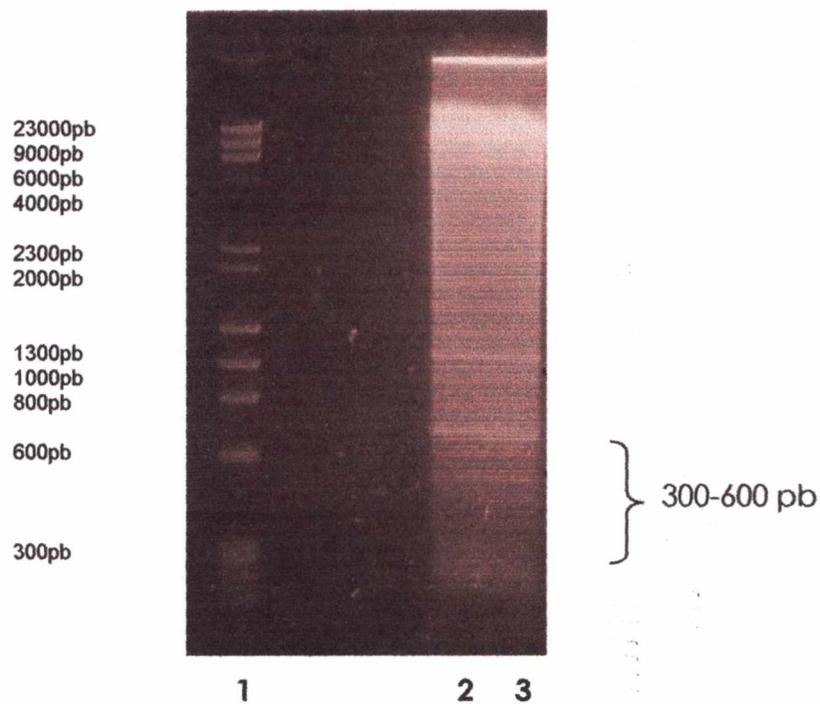
² Secuencia de bases flanqueantes del microsatélite

³ Temperatura de asociación del primer al ADN blanco

⁴ Número de depósito del microsatélite en el GenBank

Utilizamos el marcador GLM 7 como ejemplo de la secuencia de resultados obtenidos hasta finalizar el aislamiento, clonado, secuenciación y amplificación de cada uno de los 5 marcadores microsatélites.

La Figura 5 muestra una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% de una digestión de ADN genómico de guanaco con la enzima de restricción DpnII.

Figura 5 Electroforesis de una digestión genómica de ADN de guanaco

Calles 1 marcador de peso molecular PhiX174/ *HaeIII* y Lambda / *HindIII* (Promega); 2 ADN genómico digerido con la enzima de restricción *DpnII*. La llave señala el rango de ADN posteriormente purificado, desde donde se procede a aislar los microsatélites de ADN.

A continuación presentamos un autorradiograma correspondiente a la hibridación de colonias recombinantes portadoras de inserto (colonias blancas) con la sonda poli (dA - dC) (Figura 6). El objetivo de esta hibridación es detectar entre las colonias recombinantes a aquellas portadoras de ADN microsatélite.

Figura 6

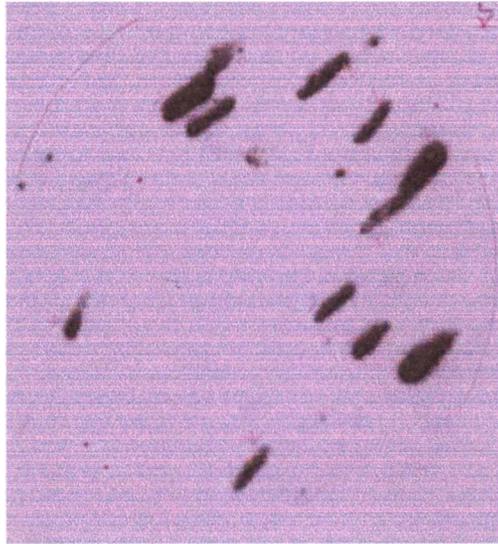
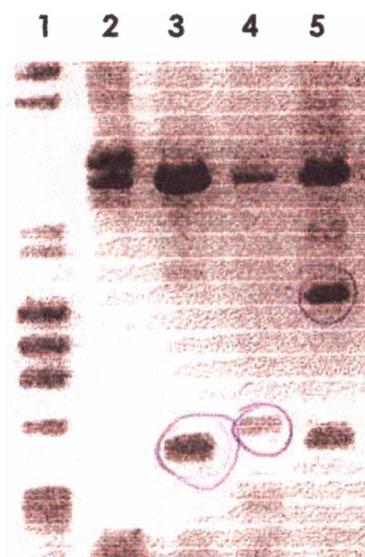


Figura 6 Las señales más oscuras corresponden a las estrías positivas, identificando aquellas colonias de bacterias recombinantes con insertos de ADN microsatélite.

La Figura 7 corresponde a la corrida electroforética en gel de azarosa del plásmido recombinante (estría positiva) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*.

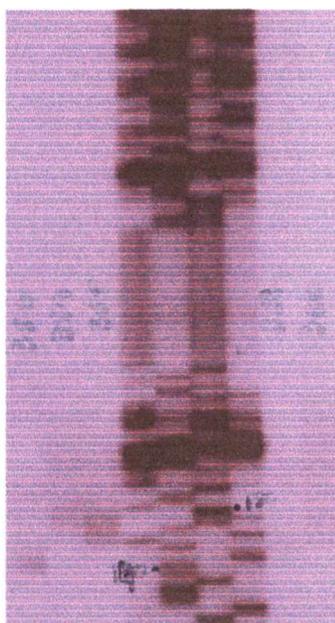
Figura 7 electroforesis de la digestión de un plásmido recombinante p-GEM3Zf- (Promega) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* (Gibco, BRL).



Calles 1 marcador de peso molecular PhiX174/ HaeIII y Lambda / HindIII (Promega); 2 Plásmido sin digerir; 3 y 4 las bandas inferiores (400-600 pb) corresponden a los insertos y las superiores al plásmido digerido; 5 banda de peso molecular intermedio de 1500 pb aproximadamente correspondiente a un inserto recombinado, por lo cual su peso molecular es superior al esperado.

La figura 8 muestra la secuenciación manual del microsatélite *GLM7*.

Figura 8 secuenciación manual del microsatélite GLM7

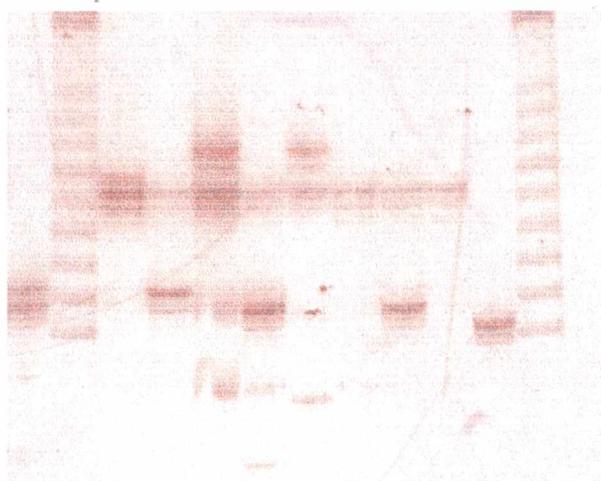


G A T C

Las figuras 9 a y b muestran geles de poliacrilamida donde se observan los diferentes alelos del marcador GLM7 y GLM5 respectivamente, observados en la población de guanacos de La Esperanza.

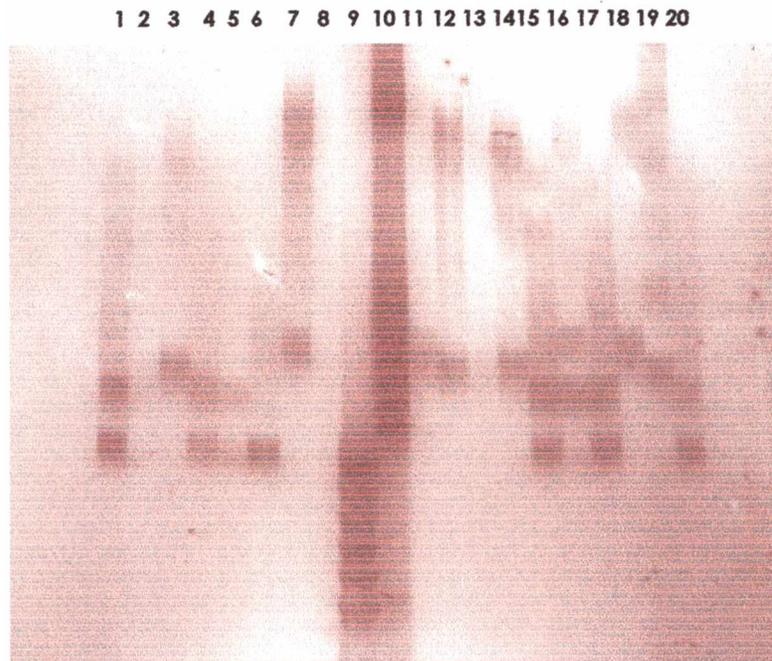
Figura 9 a corrida electroforética de la amplificación por PCR del locus GLM7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Calles 1 Marcador de pesos moleculares FFv; 2-10 separación electroforética de los diferentes alelos del locus GLM7 en 9 animales diferentes; 11 Marcador de pesos moleculares FFv.

Figura 9 b corrida electroforética de la amplificación por PCR del locus *GLM5*



Calles 1-8 separación electroforética de los diferentes alelos del locus *GLM5* en 8 animales diferentes; 9 y 10 marcadores de pesos moleculares LPL y FFv respectivamente; 11-20 separación electroforética de los diferentes alelos del locus *GLM5* en 10 animales diferentes.

- Caracterización de los 5 marcadores GLM en 30 guanacos y 30 llamas tomados al azar

La Tabla 3 presenta las frecuencias alélicas correspondientes a los 5 marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco, obtenidas por la amplificación de los loci mediante PCR en 30 llamas y 30 guanacos seleccionados al azar.

Tabla 3 Frecuencias alélicas de los 5 marcadores microsatélites ensayados en 30 guanacos y 30 llamas tomadas al azar

GLM2	GLM4			GLM5			GLM6			GLM7				
	Guanaco	Llama	Alelo	Guanaco	Llama									
127	0,0500	-	183	-	0,1379	133	0,1071	-	148	0,2167	0,1833	195	0,1333	0,2500
129	0,0333	-	185	0,0167	0,0172	135	0,0893	0,1000	150	0,1167	0,0167	197	0,0167	0,0667
131	0,1500	0,1000	189	0,3333	0,1379	143	0,1607	0,3333	152	0,4500	0,4500	199	0,7500	0,6500
133	0,0500	0,0167	191	0,3500	0,3621	145	0,0179	0,1167	154	0,1833	0,0333	201	0,0667	-
135	0,2833	0,4167	193	0,1000	0,0172	147	0,1964	0,1000	156	0,0333	0,2667	205	0,0333	0,0333
137	0,0167	0,1000	195	0,1333	0,1379	149	0,3214	0,1833	158	-	0,0500			
139	0,4167	0,3667	197	0,0333	0,0862	151	0,0357	0,0833						
			199	0,0167	0,0345	155	0,0179	0,0500						
			201	-	0,0172	161	0,0179	0,0333						
			203	-	0,0172	163	0,0179	-						
			207	0,0167	0,0345	165	0,0179	-						

En color rojo se indica los valores de frecuencias alélicas medias para cada marcador en ambas especies.

Tabla 4 Caracterización de los loci microsatélites

Especie	Loci	Rango Alélico	Nº de alelos (Ai)	h	PIC ¹	PE ²	PEA ³
Guanaco	GLM2	127-139	7	0,73	0,674	0,312	
	GLM4	185-207	8	0,75	0,695	0,335	
	GLM5	133-165	11	0,83	0,787	0,461	
	GLM6	148-156	5	0,71	0,658	0,289	
	GLM7	195-205	5	0,42	0,387	0,091	
Promedio			47,20 +/- 2,49	50,688 +/- 0,069	0,640		0,84071
Llama	GLM2	131-139	5	0,68	0,612	0,252	
	GLM4	183-207	11	0,82	0,779	0,452	
	GLM5	135-155	8	0,83	0,787	0,464	
	GLM6	148-158	6	0,70	0,639	0,273	
	GLM7	195-205	4	0,52	0,451	0,134	
Promedio			46,80 +/- 2,8	50,708 +/- 0,056	0,654		0,96815

¹ PIC = contenido de información polimórfica, ² PE = poder de exclusión, ³ PEA = poder de exclusión acumulado ⁴ NMA = Número medio de alelos por locus y su desvío estándar y ⁵ H_e = heterocigosidad esperada promedio y su desvío estándar.

Los gráficos a continuación (Figura 10) muestran el tamaño alélico versus frecuencia alélica, de los 5 marcadores microsatélites ensayados en guanacos y llamas tomadas al azar.

Figura 10 a

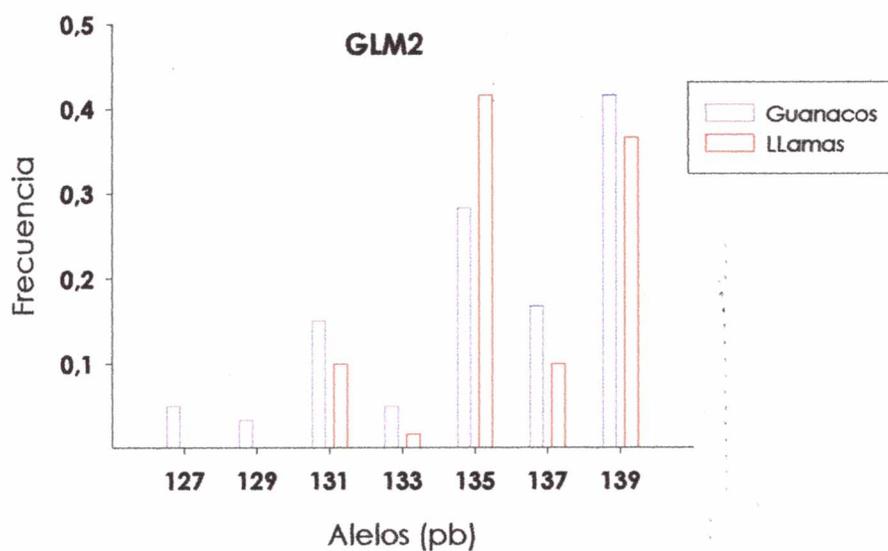


Figura 10 b

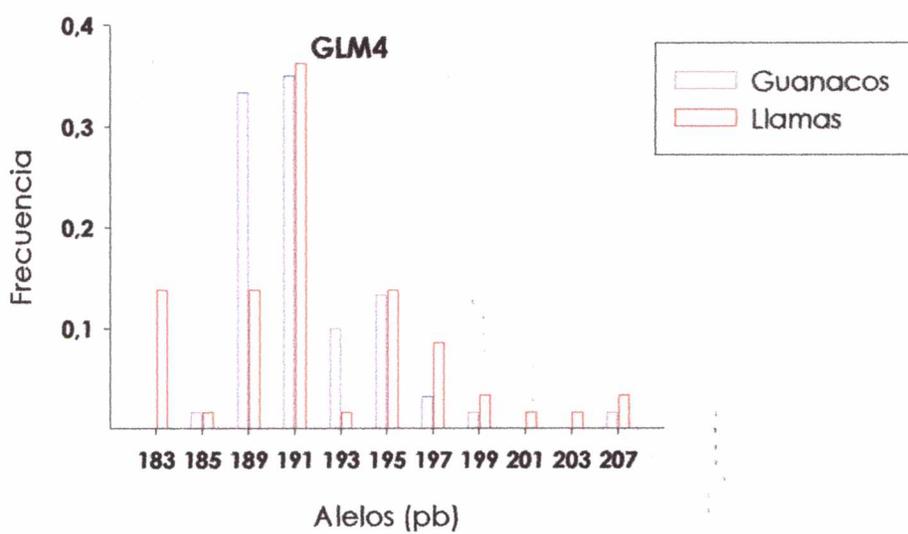


Figura 10 c

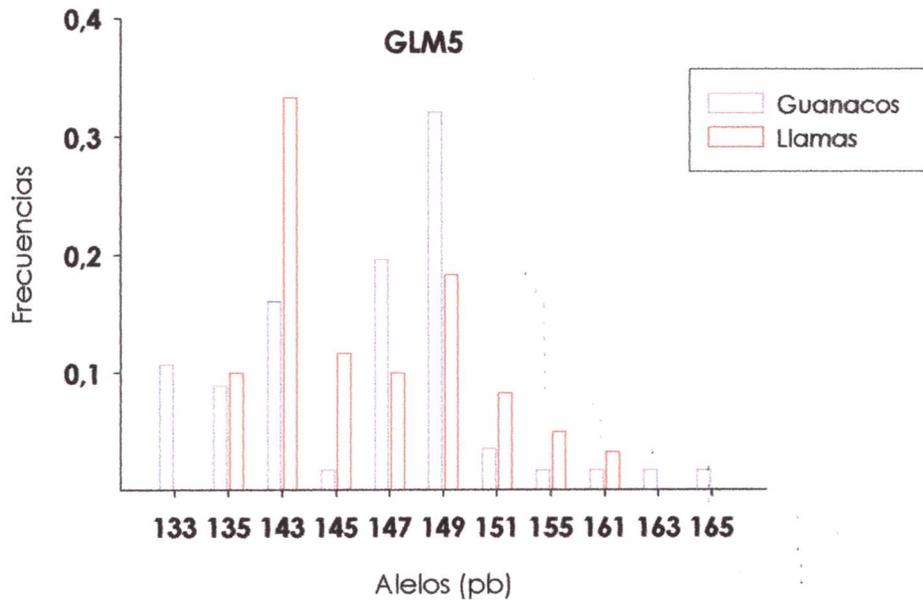


Figura 10 d

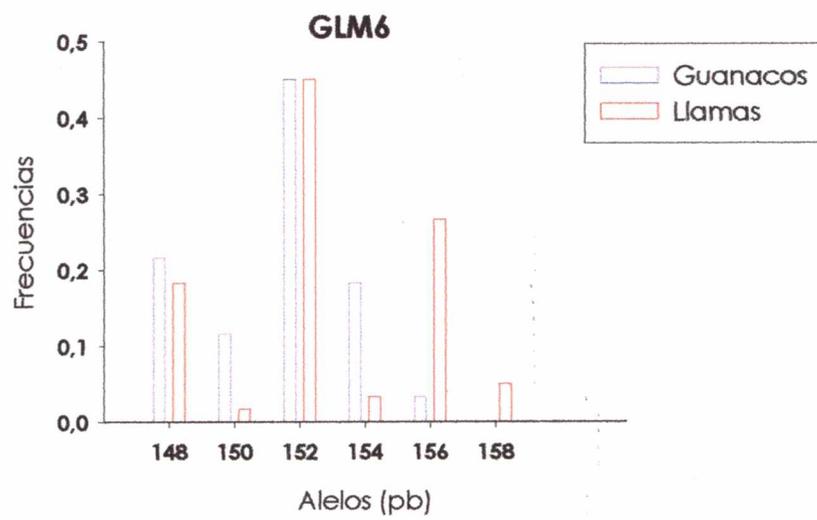
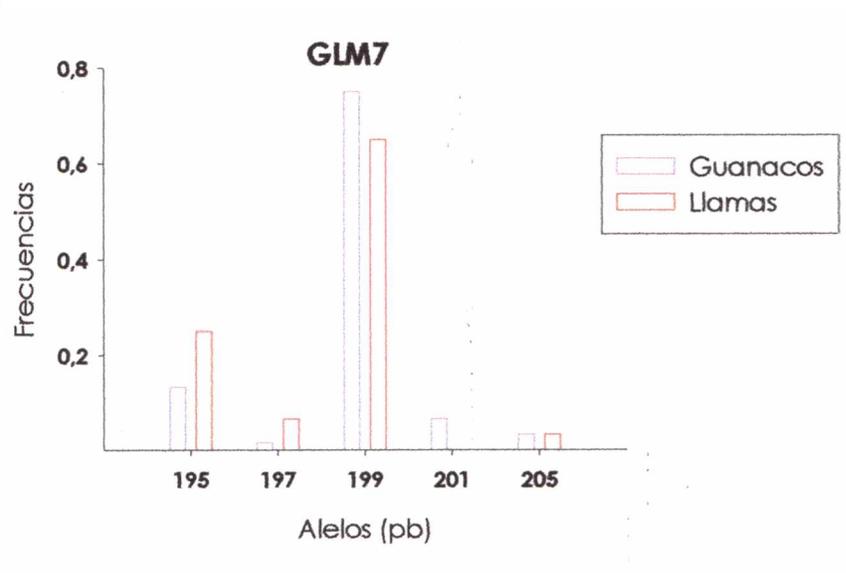


Figura 10 e



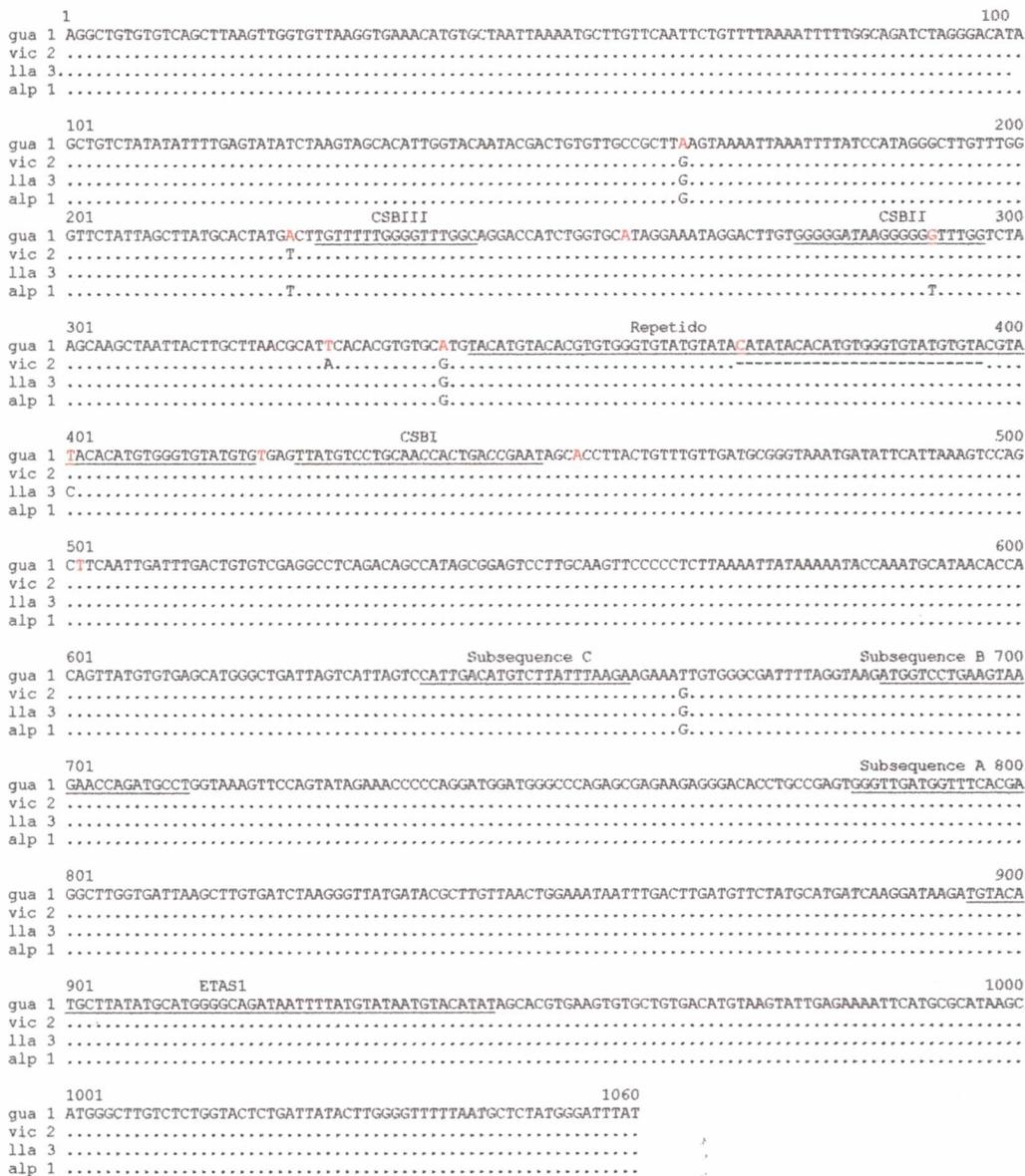
4.2- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial en las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos

El clonado de la Región Control completa en 5 animales de cada una de las 4 especies de Camélidos Sudamericanos se realizó mediante amplificación de ADN genómico por PCR utilizando primers complementarios a las secuencias de los genes de ARN^t_{phe} y ARN^t_{pro}, que en todos los géneros de mamíferos analizados hasta el momento flanquean esta región mitocondrial. El fragmento de ADN amplificado, previamente ligado al vector de clonado p-Gem, se insertó en bacterias JM109 previamente competidas.

En las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos la Región Control (RC) del ADN mitocondrial abarca 1060 pares de bases (pb) flanqueadas, en su extremo 5' por el gen ARN^t_{phe} y en su extremo 3' por el gen ARN^t_{pro}. Incluye además una secuencia repetida de 26 pares de bases, localizada entre los bloques de secuencia conservada (CSB) CSB1 y CSB2, que se repite dos o tres veces según veremos más adelante.

La figura 11 muestra el alineamiento de la RC de un animal de cada especie, con la secuencia de un guanaco tomado como referencia por tratarse de una especie silvestre seleccionada naturalmente.

Figura 11 Alineamiento de la Región Control mitocondrial completa en las 4 especies de Camélidos Sudamericanos



Los puntos (.) significan identidad con la secuencia de referencia (gua 1), los guiones (-) identifican bases deletadas; en rojo se indican los sitios polimórficos.

Los dominios conservados se identificaron por comparación con los motivos de la RC de diferentes especies de mamíferos publicadas hasta el momento (Gemmell et al. 1996; Sbisà et al. 1997).

La figura 12 muestra un esquema de la organización de los diferentes componentes de la RC de los camélidos: tres bloques de secuencia conservada (CSB 1-3) de 26, 19 y 17 pb respectivamente, el dominio central (CD) de alrededor de 322 pb de longitud, y la secuencia extendida asociada a la terminación (ETAS) de 52 pb de

longitud. Entre los bloques de secuencia conservada 1 y 2 se encuentra una secuencia de 26 pares de bases repetida, según el caso, dos o tres veces.

Figura 12 Esquema de la organización de la región control mitocondrial de los Camélidos Sudamericanos



- CSB 1, 2 y 3 bloques de secuencia conservada ▲ secuencia repetida
- CD dominio central ■ ETAS secuencia extendida asociada a la terminación

Dominio CSB (Conserved Sequences Blocks)

Este dominio conservado, se ubica en el extremo 5' de la RC y contiene los elementos regulatorios del metabolismo del genoma mitocondrial, los promotores de las cadenas liviana (L-strand) y pesada (H-strand) y el origen de replicación de la cadena pesada. Una característica de este dominio es la presencia de tres bloques de secuencia conservada, identificados por Walberg y Clayton (1981) como CSB1, CSB2 y CSB3. CSB1, está presente en todos los vertebrados analizados hasta el presente y posee un rol funcional vital para la replicación del genoma mitocondrial. CSB2 y CSB3 a pesar de ser altamente conservados pueden o no estar presentes, y su función no ha sido determinada hasta el momento (Sbisà *et al.* 1997).

La Figura 13 muestra los bloques de secuencia conservada 1, 2 y 3 que forman parte de la Región Control completa observada en los animales aquí analizados. Mientras que el alineamiento de CSB1 y CSB3 muestra idéntica constitución en las 4 especies de camélidos, CSB2 contiene un motivo repetido rico en G y ocasionalmente presenta una transversión G/T en la posición nucleotídica 291.

Todos los camélidos analizados en este trabajo exhiben un segmento de 337 pb que se extiende desde la base 165 de la RC hasta la base 502, y que concentra la mayoría de los sitios polimórficos, de los cuales 8 corresponden a transiciones y 3 a transversiones. En base a la secuencia de este fragmento hipervariable y considerando la secuencia del guanaco 1 como referencia, definimos 8 haplotipos mitocondriales (H) los cuales difieren de la referencia desde 1,19 % (cuatro diferencias nucleotídicas) a 2,07 % (7 diferencias nucleotídicas) (Tabla 5).

Tabla 5 Sitios polimórficos dentro del fragmento hipervariable en las cuatro especies de CS

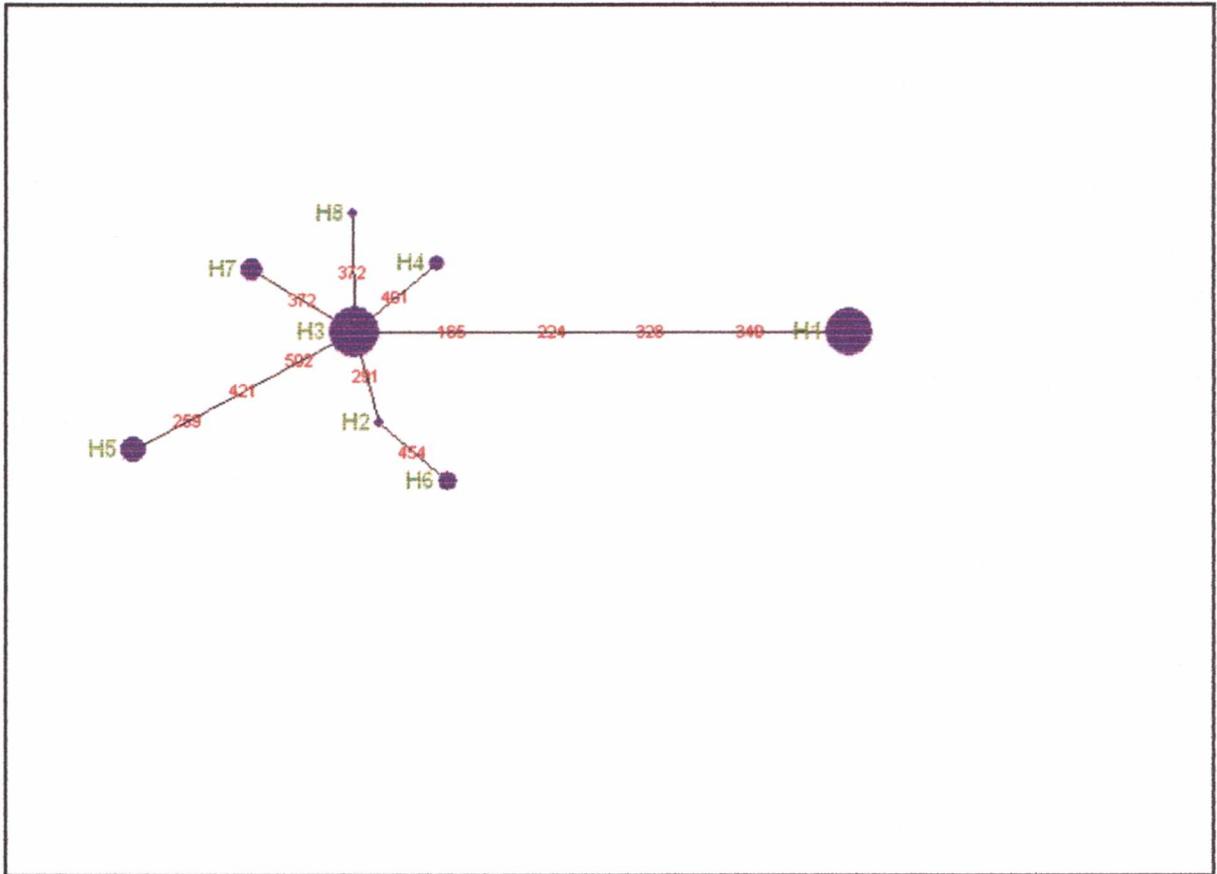
Animal	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	Haplotipo
	6	2	5	9	2	4	7	0	2	5	0	
	5	4	9	1	8	0	2	1	1	4	2	
Guanaco1	A	A	A	G	T	A	.	T	T	A	T	H1
Alpaca1	G	T	.	T	A	G	H2
Guanaco3	G	T	.	.	A	G	H3
Llama3	G	T	.	.	A	G	.	C	.	.	.	H4
Vicuña3	G	T	G	.	A	G	.	.	C	.	C	H5
Vicuña4	G	T	.	T	A	G	.	.	.	G	.	H6
Vicuña7	G	T	.	.	A	G	del	H7*
Vicuña8	G	T	.	.	A	G	T	H8

En la Tabla los números verticales indican los sitios polimórficos de la Región Control, en distintos animales y utilizando la secuencia de un guanaco como referencia. Por debajo se encuentran los cambios nucleotídicos y los haplotipos resultantes. Los puntos representan igualdad con la referencia.

* El haplotipo H7 presenta además una delección (del) de una unidad de repetición de 26 pb con respecto a la referencia H1.

Para visualizar las relaciones evolutivas entre los diferentes haplotipos mitocondriales realizamos un análisis de red, utilizando el programa Network 4.1.1.2 (Bandelt *et al.* 1999) (Figura 14). El haplotipo H3, además de ser el mas frecuente en las 4 especies y el único compartido entre todas ellas, es el haplotipo a partir del cual se generó, por 1 a 4 pasos mutacionales, el resto de los haplotipos encontrados.

Figura 14 median joining network mostrando las relaciones evolutivas entre los 8 haplotipos mitocondriales detectados en las 4 especies de Camélidos Sudamericanos



Los números entre líneas indican la posición nucleotídica que diferencia los haplotipos. El nombre de cada haplotipo se encuentra al costado del círculo respectivo. El área de los círculos es proporcional a la frecuencias de los haplotipos.

Dominio Central CD (Central Domain)

La secuencia del dominio central (CD), en todos los individuos analizados es altamente conservada, ya que en las 322 pares de bases que constituyen este dominio encontramos sólo 2 sitios polimórficos.

Debido al alto grado de conservación de este dominio en muchas especies de vertebrados, se ha sugerido un rol biológico para esta región mitocondrial. Una de las teorías actuales sostiene que secuencias específicas de este motivo son capaces de unir elementos del citoesqueleto asociado a mitocondrias (Jackson *et al.* 1996). Otros autores proponen que la región central posee un rol regulatorio de la replicación y transcripción mitocondrial, aunque no hay evidencia directa que apoye esta hipótesis (Sbisà *et al.* 1997).

En el CD de los camélidos encontramos tres potenciales estructuras secundarias, subsecuencias A, B y C (Figura 11), homólogas de las descritas por Gemmel *et al.*

excepto en una vicuña donde se lo halló dos veces. La secuencia consenso de la unidad de repetición es TACATGTACACGTGTGGGTGTATGTA, y la imperfección se debe a que en las posiciones 4, 6 y 26 (marcadas en rojo) de cada unidad encontramos indistintamente A ó G. La secuencia de Alpaca depositada por Arnason en 2004 (GenBank AJ536364) presenta en la misma posición, entre CSB 1 y 2, un repetido perfecto de 30 pb que se repite 6 veces, y que comparte con el repetido presente en los animales aquí analizados una secuencia de 8 pb.

El análisis de las secuencias repetidas muestra finales autocomplementarios (TACAT / ATGTA) capaces de formar una estructura en horquilla. Esta particularidad también se ha observado en otros artiodáctilos del género *Cervus* (Cook *et al.* 1999).

4.2.1- Heteroplasmia

En el punto anterior hicimos referencia al fragmento hipervariable de 337 pares de bases y describimos 8 haplotipos diferentes utilizando como referencia el haplotipo H1 correspondiente a la secuencia del guanaco 1. Posteriormente, cada haplotipo se amplificó mediante PCR y se analizó por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida con el fin de relacionar la secuencia del haplotipo con un patrón de SSCP determinado (Tabla 6). Esta técnica (PCR-SSCP) la aplicamos con el objetivo de monitorear haplotipos presentes en poblaciones de animales sin tener que recurrir a la secuenciación de todos los animales y reservar esta última para los individuos con patrones de SSCP desconocidos.

Tabla 6 Correlación entre haplotipos mitocondriales y patrones SSCP.

Nº acceso GenBank	Haplotipo	Dif. con H1	Patrón SSCP
AY500896	H1	-	P1
AY500895	H2	5	P2
AY500897	H3	4	P2
AY500898	H4	5	P3
AY500894	H5	7	P4
AY500899	H6	6	P5
DQ270409	H7	4 + del 26 pb	P6
DQ270408	H8	5	P7

La Figura 16 muestra la correspondencia entre patrones de SSCP y haplotipos mitocondriales observados mediante una corrida electroforética de geles SSCP.

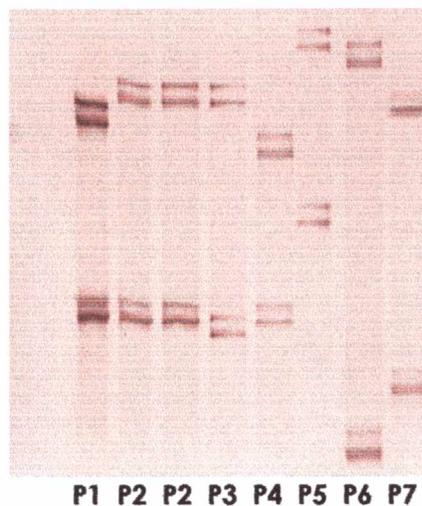
Figura 16 Correspondencia entre patrones en geles SCP y haplotipos mitocondriales

Figura 16 patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida nativa correspondientes a los 8 haplotipos mitocondriales descritos en las 4 especies de camélidos. Vemos como los haplotipos sembrados en las calles 2 y 3 (H2 y H3) presentan el mismo patrón electroforético

No obstante que los haplotipos H2 y H3 son indistinguibles por PCR-SSCP, la secuenciación de cada uno de esos clones confirmó que H2 y H3 difieren en 1 nucleótido (T).

Una vez halladas las condiciones experimentales adecuadas para distinguir los diferentes haplotipos y relacionarlos con un determinado patrón SSCP, utilizamos

esta metodología para analizar 72 clones de la RC del ADN proveniente de 20 animales clonados. Previo a la corrida en geles SSCP controlamos el producto amplificado por PCR en geles de azarosa al 2%. Esto nos permitió detectar que 67 clones pertenecientes a 19 de los 20 animales aquí analizados presentaban un fragmento hipervariable de 350 pb. Los 5 clones pertenecientes al animal número 20, correspondiente a una vicuña, presentaron una banda en agarosa de un peso molecular ligeramente inferior al esperado y un patrón SSCP de mayor movilidad electroforética. La secuenciación de estos clones nos permitió describir el haplotipo 7 compuesto por una RC con una delección de 26 pb correspondiente al segundo motivo repetido.

Las tablas 6a, 6b, 6c y 6d de material suplementario muestran la distribución de haplotipos mitocondriales en los 72 clones correspondientes a 5 llamas, 5 guanacos, 5 alpacas y 5 vicuñas, respectivamente.

Quizás el hallazgo mas importante referente a la caracterización mitocondrial de CS es el presentado en las tablas anteriores, donde se evidencia la presencia de más de un haplotipo mitocondrial (heteroplasmia) en 10 de los 20 animales que componen este estudio. Diez de ellos, tres guanacos (60%), una llama (20%), tres alpacas (60%) y tres vicuñas (60%), presentaron heteroplasmia debido a la existencia de 2 o más haplotipos mitocondriales que difieren entre sí por mutaciones puntuales. Dos de estos animales (una llama y una vicuña) presentaron heteroplasmia compuesta, debida a la existencia de tres haplotipos mitocondriales diferentes

Figura 17 corrida electroforética de los fragmentos hipervariables de la región control mitocondrial provenientes de clones de un animal de cada especie de camélido con heteroplasmia

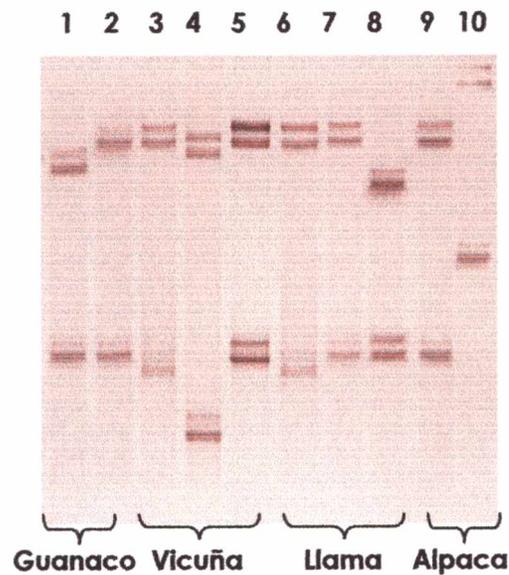


Figura 17 patrones SSCP correspondientes a corridas electroforéticas de Camélidos Sudamericanos con heteroplasmia; **1, 2** patrones de 2 clones correspondientes a 1 guanaco; **3, 4, 5** patrones de una vicuña; **6, 7, 8** tres patrones diferentes provenientes de una llama, y **9, 10** patrones SSCP de una alpaca con 2 haplotipos diferentes correspondientes a una alpaca

La frecuencia de polimorfismos de longitud encontrada en los animales analizados fue baja, ya que sólo una vicuña presentó una RC con una longitud 26 pb menor que la del resto de los animales. La Tabla 7 resume la distribución de los distintos haplotipos observados.

Tabla 7 Distribución de haplotipos mitocondriales en los 20 animales analizados.

Especie	Nº de clones	Haplotipo							
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Guanacos	16	6	-	9	-	1	-	-	-
Llamas	19	14	-	3	1	1	-	-	-
Alpacas	16	-	1	9	-	5	1	-	-
Vicuñas	21	4	-	6	2	-	3	5	1

4.3- Análisis genético de poblaciones de guanacos

4.3.1- Marcadores microsatélites

- Diversidad genética

En las 4 poblaciones de animales analizados los 14 marcadores microsatélites fueron polimórficos. La Tabla 8 muestra los parámetros de diversidad genética nuclear en las 4 poblaciones. Las frecuencias alélicas de todos los marcadores en cada una de las poblaciones se encuentran tabuladas (tabla 1) en la sección de material suplementario de esta Tesis. En 133 animales estudiados observamos 162 alelos diferentes. El número total de alelos por locus (NMA) tuvo un valor mínimo de 2 para el marcador *GLM7* en la población de La Esperanza y un máximo de 15 alelos para el marcador *LAB13* en la población de Río Mayo. Los valores de Heterocigosidad Esperada (h_e) variaron entre 0,28 (*GLM7* en La Esperanza) y 0,92 (*LAB13* en Las Heras). Los valores medios de Heterocigosidad Observada y Esperada (H_o y H_e respectivamente) y de NMA por locus en las cuatro poblaciones se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8 Parámetros de diversidad genética en las 4 poblaciones de guanacos tipificadas con 14 marcadores microsatélites

Población	Tamaño muestra	H_e	H_o	NMA	NMA*
PIL	29	0,7061	0,5534	7,79	-
RM	48	0,7404	0,5373	9,00	8,19
LH	30	0,6934	0,4167	7,07	-
LE	26	0,6575	0,4114	6,50	-
Promedio		0,6990	0,4797	7,59	7,39

PIL = Pilcaniyeu, RM = Río Mayo, LH = Las Heras, LE = La Esperanza
 H_e = heterocigosidad esperada media
 H_o = heterocigosidad observada media
 NMA* = número medio de alelos por locus corregido para un re-muestreo de 26 individuos

La población de Río Mayo posee el mayor valor de NMA ($NMA^* = 8,19$) mientras que el menor valor, igual a 6,5, corresponde a la Esperanza. Esta última, además, exhibe los valores mínimos de H_o y H_e , en tanto que Río Mayo y Pilcaniyeu poseen los valores más altos de H_e y H_o , respectivamente.

- Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para evaluar posibles desvíos del equilibrio predicho por Hardy-Weinberg realizamos 56 pruebas exactas (14 loci en 4 poblaciones, $14 \times 4 = 56$) mediante la prueba probabilística implementada en GENEPOP versión 3.1 (Raymond *et al.* 1997). De las 56 pruebas realizadas 40 mostraron desvíos significativos del EHW (Tabla 3a Material Suplementario). Las hipótesis alternativas de desequilibrio por deficiencia o exceso de homocigotas mostraron desequilibrio por exceso de homocigotas en todos los loci excepto el locus *LAB1* en la población Pilcaniyeu (Tablas 3b y 3c, Material Suplementario). En concordancia con estos datos, la prueba global, para todos los loci en todas las muestras, basada en el Método Exacto de Fisher mostró desvío del equilibrio en todas las poblaciones ($p < 0,01$) (Tabla 5 Material Suplementario).

- Prueba de desequilibrio de ligamiento y prueba de neutralidad

Teniendo en cuenta que la ubicación cromosómica de los marcadores microsatélites desarrollados y utilizados durante este trabajo no se conoce, verificamos la falta de ligamiento entre loci con el Método de Cadena de Markov (Raymond *et al.* 1997). De 364 combinaciones de loci, 21 mostraron desequilibrio de ligamiento significativo ($p < 0,05$) en las 4 poblaciones estudiadas (Tabla 9). Este resultado es esperable por azar de manera que no tiene significado estadístico, aunque debemos destacar que los loci *LAB1* y *LAB3* aparecen ligados en las 4 poblaciones analizadas.

Tabla 9 Loci en desequilibrio de ligamiento en cada Población, con valores de $p < 0,05$

Pilcaniyeu	Río Mayo	Las Heras	La Esperanza
LAB1-LAB3	LAB1-LAB3	LAB1-LAB3	LAB1-LAB3
LAB14-LAB17	LAB13-LAB15	LAB3-LAB16	LAB3-LAB17
LAB1-GLM2	LAB3-LAB17	LAB13-GLM4	LAB14-LAB17
LAB17-GLM2	LAB13-LAB17		LAB3-GLM4
	LAB15-LAB17		LAB6-GLM5
	LAB7-GLM2		
	LAB7-GLM5		

La prueba exacta de Ewens – Watterson - Slatkin indicó alelos selectivamente neutros en 48 de las 56 pruebas en tanto que 8 pruebas (14%) mostraron una distribución génica mas aplanada ($p < 0,028$), sugiriendo, para estos alelos, una tendencia hacia la selección balanceadora mas fuerte que la esperada bajo neutralidad. Es interesante marcar que esto ocurrió en el locus LAB6 en 3 poblaciones y en los loci LAB13 y LAB15 en 2 de las 4 poblaciones analizadas.

- Diferenciación poblacional

La prueba de diferenciación genética, teniendo en cuenta todos los loci de las 4 poblaciones, fue altamente significativa ($p < 0,00025$). En acuerdo con esos resultados, los valores promedio de F_{ST} ($F_{ST} = 0,071$; $p = 0,000$) y Rho_{ST} ($Rho_{ST} = 0,083$; $p = 0,000$) (Tabla 10) indican una moderada pero significativa diferencia entre las poblaciones. Si se comparan ambos parámetros, se ve que Rho_{ST} es ligeramente mayor que F_{ST} . Esos resultados señalan que la diferenciación entre las poblaciones obedece a diferencias en los perfiles de frecuencias alélicas y no a diferencias en los tamaños alélicos.

La Tabla 10 y los valores de los parámetros F_{ST} y Rho_{ST} incluidos muestran que los diferentes microsatélites poseen una gran variación en el poder de diferenciación de las poblaciones. Esos parámetros varían considerablemente entre loci siendo significativos en todos los casos excepto *LAB6* y *LAB13*.

Tabla 10 Diferenciación genética (F_{ST} y Rho_{ST}) entre poblaciones de guanacos de la patagonia argentina

Microsatélite	F_{ST}	Rho_{ST}	p
	0,022	0,075	0,012
LAB1			
LAB3	0,037	0,212	0,000
LAB6	0,010	0,022	0,100
LAB7	0,049	0,110	0,001
LAB13	0,010	0,024	0,090
LAB14	0,194	0,403	0,000
LAB15	0,032	0,149	0,000
LAB16	0,106	0,081	0,000
LAB17	0,098	0,000	0,000
GLM2	0,054	0,224	0,008
GLM4	0,095	0,014	0,000
GLM5	0,031	-0,003	0,001
GLM6	0,216	0,204	0,000
GLM7	0,045	0,031	0,003
Promedio	0,071	0,083	0,000

El análisis de alelos compartidos indica la presencia de un 22% (35 alelos) de alelos privados totales detectados en las 4 poblaciones (Tabla 11). Río Mayo presenta la mayor cantidad de ellos, con frecuencias que varían entre 1,06 y 6,52 %, a excepción del alelo 201 del locus *GLM7* que tubo una frecuencia de 14,06 % (Tabla 1 Material suplementario). Las demás poblaciones presentaron entre 4 y 8 alelos

privados, y en todos los casos las frecuencias de los mismos variaron entre 1, 67 y 5,36 % (Tabla 1 Material suplementario).

Tabla 11 Distribución de alelos privados por Locus y por Población

Locus	Pilcaniyeu	Río Mayo	Las Heras	La Esperanza	Total
LAB1	1	2	-	-	3
LAB3	-	1	-	2	3
LAB6	-	1	-	-	1
LAB7	1	1	-	-	2
LAB13	1	2	1	-	4
LAB14	-	-	1	-	1
LAB15	-	3	-	-	3
LAB16	2	1	1	-	4
LAB17	1	-	1	-	2
GLM2	1	-	-	-	1
GLM4	-	3	1	2	6
GLM5	1	-	1	-	2
GLM6	-	-	1	-	1
GLM7	-	2	-	-	2
Total	8	16	7	4	35

La estimación del flujo génico entre poblaciones indica 6,6 migrantes por generación. La prueba de AMOVA muestra que la variación genética entre poblaciones es del 5,6% mientras que la variación genética dentro de las poblaciones es del 94,4%.

La diferenciación genética entre pares de poblaciones también se estimó mediante parámetros apareados F_{ST} y Rho_{ST} . El valor de F_{ST} varía entre 0,031 y 0,132, mientras que el de Rho_{ST} varía entre 0,051 y 0,141 (Tabla 12). El test de aislamiento por distancia que correlaciona las distancias genéticas y geográficas entre poblaciones no fue significativo ($p = 0,516$).

Tabla 12 Distancia genética entre pares de poblaciones medida a través de los parámetros apareados R_{ST} y F_{ST}^2

Población ¹	PIL	RM	LH	LE
PIL		0,071	0,062	0,104
RM	0,067		0,051	0,141
LH	0,107	0,031		0,071
LE	0,132	0,075	0,032	

¹ PIL = Pilcaniyeu, RM = Río Mayo, LH = Las Heras, LE = La Esperanza
² R_{ST} y F_{ST} arriba y debajo de la diagonal respectivamente

- Asignación de poblaciones

Las pruebas de asignación de animales a su respectiva población mostraron 93, 87 y 92,00 % de los animales asignados correctamente a Pilcaniyeu, Las Heras y La Esperanza respectivamente, mientras que 18,75% de los animales de Río Mayo se asignaron en forma incorrecta a la población de Las Heras.

4.3.2- Región Control del ADN mitocondrial

- Monitoreo de diversidad mitocondrial en guanacos mediante PCR-SSCP

El análisis de diversidad genética de 133 animales con los marcadores de herencia biparental (microsatélites dinucleotídicos) se complementó con análisis de la variabilidad existente en la Región Control mitocondrial (marcador de herencia materna). Para ello amplificamos, en cada animal, el fragmento hipervariable de 350 pb y analizamos los diferentes patrones de SSCP en electroforesis de poliacrilamida nativa al 10%. La separación electroforética de los productos de amplificación en agarosa al 2% reveló que en todos los animales analizados el fragmento hipervariable posee una longitud de 350 pb.

Como se indicó en el inciso 4.2 que describe y caracteriza la Región Control mitocondrial en los CS, utilizamos como referencia la correlación entre patrones de SSCP y haplotipos de los animales clonados descritos previamente. Los guanacos que poseían un patrón de corrida idéntico a algunos de los haplotipos descritos

anteriormente se calificaron con ese patrón y aquéllos que poseían un patrón de SSCP diferente se amplificaron nuevamente por PCR y el producto se secuenció automáticamente en un ABI PRISM 3770 (Applied Biosystem).

Las Figuras 18 y 19 presentan fotos de geles de SSCP obtenidos en las poblaciones de guanacos analizadas

Figura 18 corrida electroforética correspondiente a la amplificación por PCR del fragmento hipervariable en animales pertenecientes a la población de Las Heras

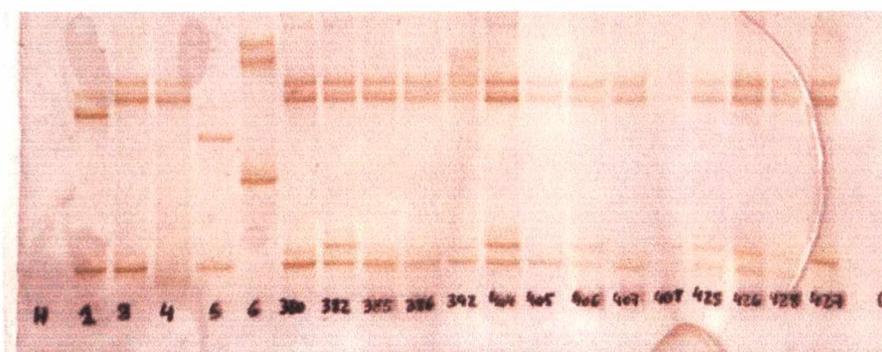
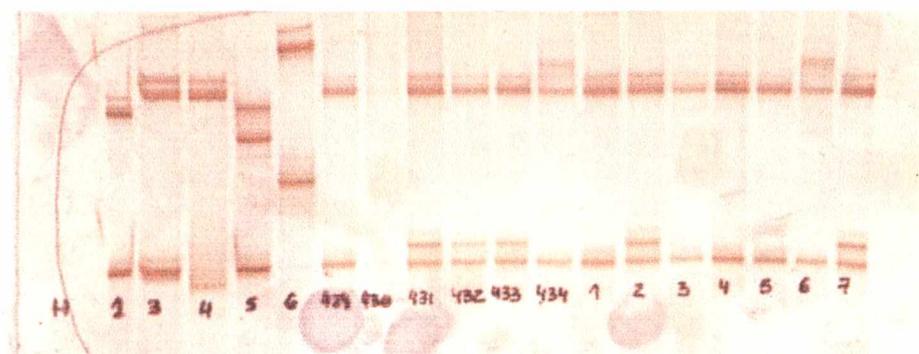


Figura 19 corrida electroforética correspondiente a la amplificación por PCR del fragmento hipervariable en animales pertenecientes a distintas poblaciones



La tabla 13 resume los haplotipos encontrados en los guanacos patagónicos aquí analizados.

Tabla 13 Distribución de haplotipos mitocondriales en guanacos patagónicos

Población	Haplotipo							
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Pilcaniyeu	2	-	26	-	-	-	-	-
Río Mayo*	-	-	7	-	2	-	-	-
Las Heras	-	-	23	-	-	-	-	-
LaEsperanza#	1	-	23	-	-	-	-	-

PIL = Pilcaniyeu, RM = Río Mayo, LH = Las Heras, LE = La Esperanza

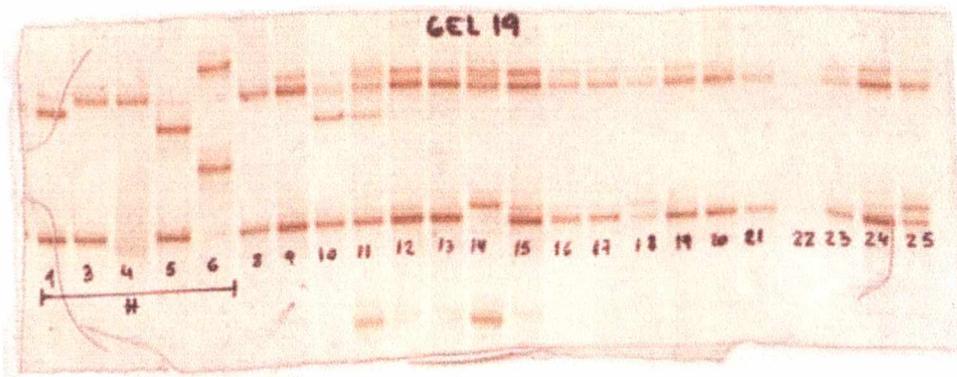
* 30 animales con heteroplasma debida a patrones H1 y H3

2 animales con heteroplasma debida a patrones H3 y H5

El análisis del fragmento hipervariable, mediante amplificación por PCR y separación electroforética en geles nativos (análisis SSCP), mostró, en numerosos animales de las poblaciones de Las Heras y Río Mayo, patrones electroforéticos correspondientes a dos haplotipos mitocondriales, en los cuales H3 se encontró junto a H1 ó H5 (Figura 20). La amplificación y posterior secuenciación automática de algunos de estos animales confirmó la existencia de heteroplasma, la cual en los electroferogramas obtenidos se observó como una señal doble en las bases generadoras de dicho hallazgo. Probablemente no hayamos identificado a todos los animales existentes con más de un haplotipo mitocondrial, debido a la limitación que posee la amplificación por PCR para detectar heteroplasma. De todas formas, los animales detectados y las pruebas realizadas posteriormente con ellos, nos permitieron confirmar este hallazgo en guanacos de la patagonia.

La figura 20 muestra una corrida electroforética en geles de poliácridamida nativa correspondiente a una amplificación por PCR del fragmento hipervariable de un grupo de animales correspondientes a la población de La Esperanza. En la misma se evidencia la coexistencia de dos patrones electroforéticos en dos animales.

Figura 20 corrida electroforética correspondiente a la amplificación por PCR del fragmento hipervariable en animales pertenecientes a la población de La Esperanza



Las figuras 21 a y b corresponden a los electroferogramas de un guanaco (secuenciación de ambas hebras de ADN), donde se ve, claramente, la existencia de una doble señal, la que corresponde al sitio polimórfico 328. La figuras 22 a y b muestran el mismo hallazgo en el sitio polimórfico 340.

Figura 21 a) electroferograma de secuenciación con el primer Fw SSCP, heteroplasma en el sitio polimórfico 328

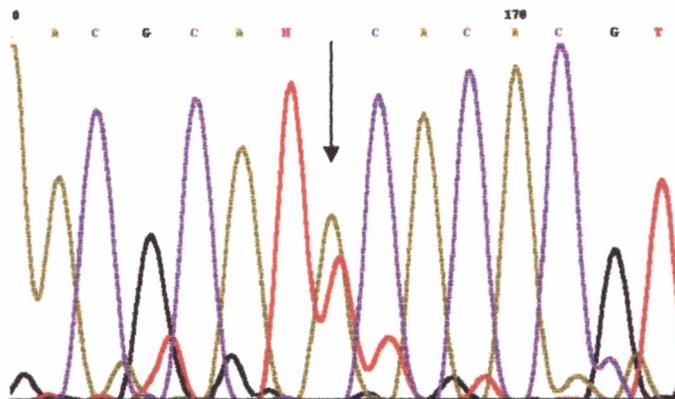


Figura 21 b) electroferograma de secuenciación con el primer Rv SSCP, heteroplasma en el sitio polimórfico 328

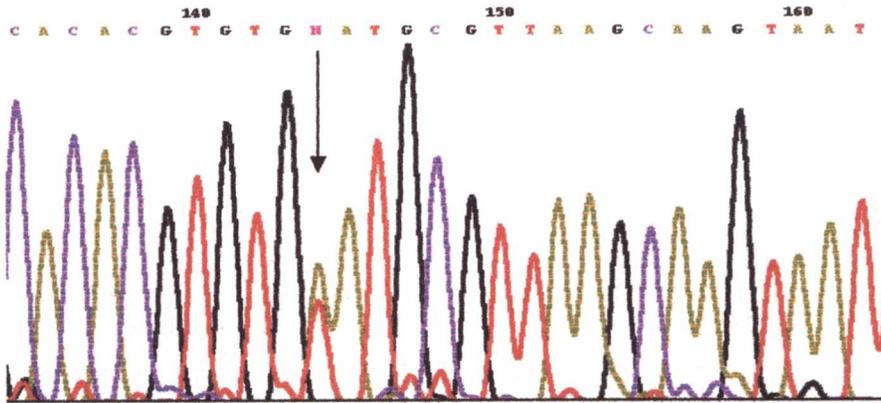


Figura 22 a) electroferograma de secuenciación con el primer Fw SSCP, heteroplasmia en el sitio polimórfico 340

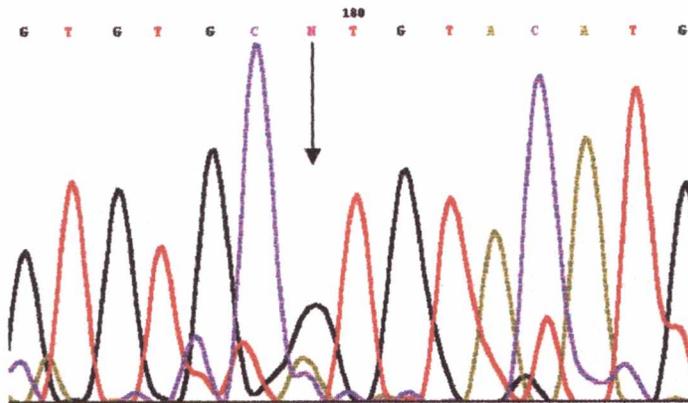
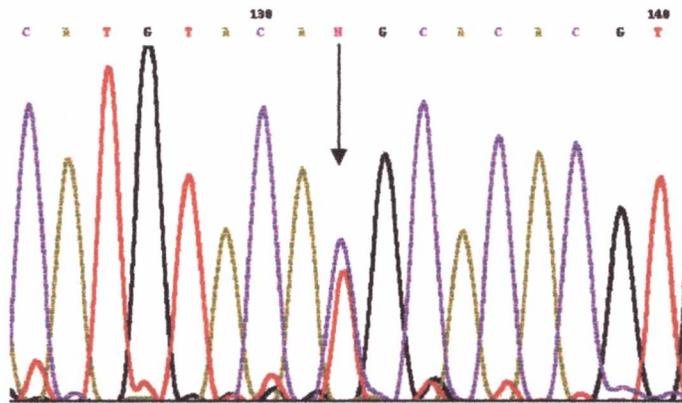


Figura 22 b) electroferograma de secuenciación con el primer Rv SSCP, heteroplasmia en el sitio polimórfico 340



Con la finalidad de calcular la diversidad genética mitocondrial utilizando los datos aportados por el fragmento hipervariable, tuvimos que efectuar un ajuste debido a que el programa Arlequín v. 2.0 (Schneider *et al.* 2000) utilizado en el análisis no contempla trabajar con datos de heteroplasmia para calcular los diferentes parámetros de diversidad y diferenciación genética. Para ello, en el caso de animales poseedores de más de un haplotipo, seleccionamos para los cálculos aquel que aumenta el número de haplotipos totales presentes en la población analizada. Por ejemplo, en una Población que contiene animales con haplotipos H1, H3 y animales con heteroplasmia debido a la coexistencia de los haplotipos H1 y H5, calificamos a estos últimos con el haplotipo H5, de manera que esta población tendrá 3 haplotipos totales (H1, H3 y H5).

A continuación la Tabla 14 muestra la distribución de haplotipos adjudicados a las distintas Poblaciones analizadas con el objetivo de calcular los diferentes parámetros poblacionales.

Tabla 14 Distribución de haplotipos mitocondriales adjudicados

Población	Haplotipo							
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Pilcaniyeu	2	-	26	-	-	-	-	-
Río Mayo	30	-	7	-	2	-	-	-
Las Heras	-	-	23	-	5	-	-	-
La Esperanza	1	-	23	-	-	-	-	-
Total	33	0	79	0	7	0	0	0

Considerando el conjunto de las 4 poblaciones encontramos entre 2 y 3 haplotipos mitocondriales, y de 3 a 7 sitios polimórficos. Los valores de Diversidad Haplotípica y Nucleotídica fueron mínimos en la población de La Esperanza (0,083 +/- 0,075; 0,001 +/- 0,001) y máximos en Río Mayo (0,383 +/- 0,084; 0,005 +/- 0,003), respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15 Diversidad mitocondrial en guanacos de la Patagonia argentina

Población	N	Nº de haplotipos	Sitios polimórficos	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Pilcaniyeu	28	2	4	0,138 +/- 0,084	0,002 +/- 0,002
Río Mayo	39	3	7	0,383 +/- 0,084	0,005 +/- 0,003
Las Heras	28	2	3	0,304 +/- 0,094	0,003 +/- 0,002
La Esperanza	24	2	4	0,083 +/- 0,075	0,001 +/- 0,001

Los valores +/- que siguen a los datos de Diversidad Haplotípica y Nucleotídica representan desvíos estándares.

La Tabla 16 presenta los valores de diferenciación genética calculados entre pares de poblaciones. La diferencia genética calculada mediante el parámetro F_{ST} no es significativa entre Pilcaniyeu y La Esperanza ($F_{ST} = -0,032$; $p > 0,05$), mientras que entre los demás pares de poblaciones la diferencia genética es alta y significativa ($F_{ST} > 0,107$; $p < 0,05$).

Tabla 16 Diferenciación genética (F_{ST}) entre pares de Poblaciones

Población	Pilcaniyeu	Río Mayo	Las Heras
Río Mayo	0,604*		
Las Heras	0,109*	0,628*	
La Esperanza	-0,032	0,631*	0,107*

* Significativa, $p < 0,05$

Discusión

5- DISCUSION

En Sudamérica la familia *Camelidae* es un taxón autóctono de mamíferos artiodactilos que actualmente está representada por los géneros *Lama* y *Vicugna*, y cuatro especies de las cuales *Lama guanicoe* y *Vicugna vicugna* son silvestres y *Lama glama* y *Lama pacos* son domesticadas.

La explotación racional de los Camélidos Sudamericanos (CS) por las culturas precolombinas, quedó demostrada en su utilización como principal recurso nutritivo proteico, de piel y lana para el vestido, de cuero para la confección de mantas y otras artesanías, de medio de locomoción y carga, de fuente de energía y medicinas, de objeto destinado al culto (Mengoni 1995). Se estima que antes de la conquista española las poblaciones de guanaco alcanzaban entre 30 y 50 millones de cabezas (Raedeke 1979). Luego de ese acontecimiento histórico-cultural el número de éste y los demás CS disminuyó drásticamente como consecuencia de la presión antropogénica. Actualmente, la población de guanacos en todo el rango de distribución se estima en unos 600.000 animales de los cuales, aproximadamente el 80-90 %, se encuentra en territorio Argentino (Montes *et al.* 2000; Amaya *et al.* 2001). Hoy, aunque bastante retraído por las actividades humanas que avanzaron sobre su hábitat natural, el guanaco se encuentra en los altos Andes peruanos desde los 8° S, en la pendiente occidental de los Andes chilenos y bolivianos, en la pendiente oriental en Argentina (entre los 21° y 32° S) y en toda la Patagonia y Tierra del Fuego hasta 55° S, llegando por el Este hasta la costa atlántica.

A partir de los años 70, la intervención de la IUCN (*International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*) y de su Grupo Especialista en Camélidos Sudamericanos, condujo a la creación de reservas y al establecimiento de medidas de protección en los países de mayor concentración: Argentina, Chile, Perú y Bolivia. En el curso de algo más de 20 años de aplicación de estas medidas, los CS han experimentado un repunte numérico, fundamentalmente en la región patagónica y Tierra del Fuego, el cual, a través de esfuerzos privados y un modesto apoyo oficial ha permitido planificar extracciones particularmente de guanacos dando comienzo a un programa de manejo sustentable del recurso en áreas patagónicas. Esta programación, si bien tiene en cuenta los criterios modernos de sustentabilidad de la IUCN para el aprovechamiento de especies silvestres (1990, 1992a, 1992b; Torres 1995),

carece de datos sobre la composición y dinámica genética de los núcleos fundadores de las nuevas poblaciones cuya viabilidad y calidad de producción a largo plazo, no deben quedar comprometidas por el aprovechamiento. Por tanto, no se sabe si las poblaciones que están entrando a programas de conservación o las que se están seleccionando como núcleos fundadores para la cría y utilización sustentable son, desde el contexto genético, lo suficientemente variables o si por el contrario pertenecen a subgrupos genéticamente empobrecidos con viabilidad y o calidad de sus productos potencialmente comprometidos.

La genética de poblaciones predice que dentro de una especie los individuos o poblaciones con mayor diversidad genética representan los mejores recursos para iniciar o repoblar colonias de conservación y o utilización sustentable. En consecuencia, el registro de la variabilidad genética y la medida de la distancia genética entre y dentro de distintas poblaciones constituyen datos de suma importancia para la creación de reservorios genéticos que aseguren mayor flexibilidad y adaptabilidad de las especies a la interacción con los humanos, posean mejor capacidad de recuperación y provean mejores rendimientos (Hammond 1994). Por ello, tanto en guanacos como en las demás especies de camélidos, además de la evaluación fenotípica, reproductiva, de dinámica poblacional, comportamiento familiar y social y uso del ambiente, es necesario conocer la constitución genética que subyace y acompaña las anteriores características.

El objetivo principal de este trabajo de Tesis fue la caracterización genética de poblaciones de guanacos de la Patagonia argentina, ya que como dijimos anteriormente existen en la misma emprendimientos de explotación sustentable del recurso para los cuales es de suma importancia contar con ese conocimiento. El análisis genético de estas poblaciones abarcó tres etapas: una primera en la que desarrollamos marcadores de ADN microsatélite específicos de la especie *L. guanicoe*, ya que en los últimos años los microsatélites han sido la herramienta molecular de elección para contestar estas preguntas. Prueba de ello es la notable cantidad de publicaciones científicas que informan la aplicación de estos marcadores al estudio poblacional de diferentes especies animales, salvajes y domésticas, en peligro o no de extinción (Samo *et al.* 2001; 2004; Kadwell *et al.* 2001; Wheeler *et al.* 2001; Bustamante *et al.* 2002; Bruford *et al.* 2003; Mburu *et al.* 2003; Maté *et al.* 2005). A continuación estudiamos la estructura y organización de la Región control (RC) del ADN mitocondrial

por ser éste otro marcador genético altamente variable, con una tasa de mutación que supera en 5 veces al resto de las secuencias mitocondriales y por tanto de suma utilidad en la evaluación de la variabilidad genética de las poblaciones. Al igual que el resto del genoma mitocondrial, este marcador es de herencia matrilineal y no sufre recombinación meiótica. Por estas características la RC mitocondrial es una herramienta sensible e informativa para establecer la diversidad genética de una especie, analizar la estructura matrilineal de una población, y en algunos casos detectar su distribución biogeográfica (Nagata *et al.* 1999). Por estas razones en una segunda etapa del trabajo aislamos y caracterizamos esta región mitocondrial, en las 4 especies de camélidos, lo cual nos permitió identificar un fragmento altamente polimórfico y por tanto muy informativo.

Finalmente, y con el objeto de inferir la variabilidad genética existente en guanacos pertenecientes a 4 poblaciones de la región patagónica, desarrollamos la tercera y última etapa de esta Tesis consistente en aplicar, para dicho fin, los dos tipos de marcadores descritos (microsatélites y fragmento hipervariable mitocondrial), además de una batería de otros 9 marcadores de ADN microsatélite específicos de camélidos, previamente desarrollados en nuestro laboratorio (Bustamante *et al.* 2003, Bustamante *et al.*, en preparación). Por último, los resultados poblacionales obtenidos en el presente trabajo de Tesis fueron transferidos a grupos de personas involucradas en proyectos de cría y manejo sustentable de esta especie e interesados en la identificación y selección del grupo genético que mejor se adapte a estos fines.

En los próximos párrafos discutimos los resultados más relevantes obtenidos en las tres etapas de este trabajo.

5.1- Marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco

Los marcadores de ADN microsatélite son ampliamente utilizados en el estudio genético de las poblaciones de diferentes especies animales (muy a menudo especies en peligro de extinción) porque ofrecen ventajas operativas particularmente destacables. Primero, en muchas especies los microsatélites son relativamente fáciles de obtener, ya sea directamente a través de la construcción de bibliotecas de ADN genómico de tamaño restringido y el aislamiento de marcadores específicos de especie, o por la aplicación de marcadores originalmente aislados de especies

relacionadas. Segundo, pueden utilizarse diferentes loci microsatélites de acuerdo a su nivel de variabilidad. Otra característica de los microsatélites es su fácil automatización ya que muchos de ellos se pueden amplificar conjuntamente en una única reacción de PCR. Finalmente, los microsatélites permiten estudiar la historia de una población, los procesos de hibridación, la filogeografía, la detección de cuellos de botella y endocría, la estructura poblacional, el comportamiento reproductivo y social, sin estar en contacto directo con la especie estudiada (Beaumont *et al.* 1999).

En el presente trabajo de Tesis aislamos 5 marcadores de ADN microsatélite dinucleotídico específicos de guanaco utilizando como estrategia de trabajo la construcción de bibliotecas de ADN genómico de tamaño restringido. Estos marcadores ampliaron la lista de marcadores microsatélites específicos de camélidos sudamericanos obtenidos hasta el momento (Lang *et al.* 1996; Obreque *et al.* 1998, 1999; Penedo *et al.* 1999a, b; McPartlan *et al.* 1998; Samo *et al.* 2000, Bustamante *et al.* 2003). Tres de los marcadores aislados son perfectos, lo cual significa que consisten de un único motivo repetido no interrumpido por ninguna base diferente. En el marcador GLM5 la unidad de repetición es el dinucleótido TG y en los marcadores GLM4 y GLM7 se repite el motivo AC. El marcador GLM2, (TG)₉TT(TG)₄, es un microsatélite interrumpido compuesto, en el que el motivo repetido TG se halla interrumpido por la inserción de algunas bases que no forman parte de la estructura repetida. Por último, el marcador GLM6, (TA)₃TG(CA)₉GCTA(CA)₄TG(CA)₃, está formado por 4 unidades de repetición separadas por bases que no forman parte de las unidades que se repiten; este tipo de microsatélite recibe el nombre de *microsatélite compuesto* (Microsatellites Glossary).

Los 5 marcadores de ADN microsatélite aislados y caracterizados resultaron variables e informativos tanto en la especie *guanaco* de la cual fueron aislados, como en llama. En el guanaco el número de alelos por locus varió desde 5 para los marcadores GLM 6 y 7, hasta 11 para el marcador GLM5. En las llamas el marcador GLM7 resultó ser el menos polimórfico (4 alelos) y el GLM4 el más polimórfico con 11 alelos. Los loci GLM2, GLM5 y GLM7 resultaron más polimórficos en guanaco que en llama en tanto que lo inverso ocurrió para los marcadores GLM4 y GLM6. Si consideramos el número medio de alelos por locus (NMA), éste fue ligeramente superior en guanacos, NMA = 7,20, en comparación con las llamas que exhiben un NMA = 6,80. Este dato concuerda con el hecho de que los marcadores de ADN microsatélites muestran, en general, un mayor

polimorfismo en la especie de la cual fueron aislados, respecto al polimorfismo en una especie relacionada (Ellegren *et al.* 1995).

El marcador *GLM7* es el menos polimórfico en ambas especies. Además de presentar los valores mínimos de NMA, mostró valores mínimos de H_e (0,42 en guanacos y 0,52 en llamas) y de PIC (0,387 en guanacos y 0,451 en llamas). Contrariamente, el marcador *GLM5* es el más polimórfico en ambas especies, con valores de H_e y PIC de 0,83 y 0,787 respectivamente, en ambas especies.

Los gráficos de barras presentados en la sección 1 de resultados (Figuras 10 a-e) muestran la distribución de frecuencias alélicas calculadas para cada marcador en ambas especies de camélidos. En las llamas y los guanacos los loci *GLM6* y *GLM7* poseen el mismo alelo modal 152 y 199, respectivamente. Además, no obstante no compartir el mismo alelo modal en el resto de los loci estudiados, es evidente una superposición de rangos alélicos en ambas especies. Este hallazgo no es sorprendente considerando la hipótesis más aceptada en la actualidad de que el origen de la llama se remonta a la domesticación del guanaco por las culturas precolombinas, hace unos 6000 años en los andes peruanos (Wheeler 1984b). La coexistencia en llamas y guanacos de los mismos alelos señalaría que los mismos se originaron antes de la divergencia de ambas especies, por lo cual las llamas retienen los alelos presentes en su antecesor el guanaco.

Si comparamos los marcadores de ADN microsatélite aquí descritos con los descritos por otros autores, encontramos algunas diferencias y semejanzas: en primer lugar la mayoría de los microsatélites de camélidos conocidos hasta el momento se aislaron de ADN de llama (Lang *et al.* 1996; Penedo *et al.* 1998, 1999) y alpaca (Obreque *et al.* 1998), mientras que los únicos marcadores de ADN microsatélite específicos de guanaco corresponden a los aislados por Sarno *et al.* (2000), y los aquí descritos (Bustamante *et al.* 2003). En todos los casos los marcadores se caracterizaron utilizando animales de la misma especie de la cual fueron aislados, además de otras especies de camélidos sudamericanos, y en *Camelus dromedarius* en algunos casos (Sasse *et al.* 1999). Si bien los marcadores aquí descritos no se caracterizaron en poblaciones de bactrianos y dromedarios debido a la imposibilidad de contar con un número adecuado de muestras, se amplificaron en un animal de cada especie, lo cual no permitió observar que los mismos son amplificables y presentan polimorfismos en ambas especies (Bustamante *et al.*, en preparación). El número de alelos observados, tanto en

guanaco como en llama, fue comparable al observado por Lang *et al.* 1996, Obreque *et al.* 1998 y Penedo *et al.* 1999, aunque los valores de H_e resultaron mayores a los reportados por Penedo *et al.* 1998, 1999; Sasse *et al.* 2000.)

Finalmente, el trabajo de aislamiento y caracterización realizado demostró que los 5 marcadores de ADN microsatélite conjuntamente con los producidos previamente en nuestro laboratorio (LAB1, LAB3, LAB6, LAB7, LAB13, Bustamante *et al.* 2003, y LAB14, LAB15, LAB16 y LAB17 con acceso al GenBank AY661538 - AY661541) conforman una batería de 14 marcadores recomendables para análisis de identificación genética de individuos, establecimiento de registros de genealogías, asignación de individuos a poblaciones y cuantificación de parámetros de genética poblacional.

5.2- Caracterización de la Región Control del ADN mitocondrial en las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos

El análisis de la secuencia completa de la región control (RC) del ADNmt en 5 animales de cada una de las cuatro especies de CS nos permitió determinar que la RC en este taxón es de 982 pares de bases (pb). Esta longitud sin embargo, puede variar dependiendo del número de veces que se encuentre un motivo repetido de 26 pb. Coincidiendo con todas las especies de mamíferos analizadas hasta el momento la RC de los CS está flanqueada en su extremo 5' por el gen ARNt^{phe} y en su extremo 3' por el gen ARNt^{pro}. Esta región comprende un Dominio central (CD), tres bloques de secuencia conservada (CSBs), y un dominio ETAS. Las secuencias CSB1, CSB2 y ETAS resultaron idénticas en todos los animales analizados, mientras que CSB3 presentó algunas diferencias entre animales (dos animales tienen una transversión G/T). El alto grado de conservación y la presencia de las secuencias CSB1 y ETAS está relacionado con la función vital de las mismas en el recambio del genoma mitocondrial; la secuencia CSB1 está involucrada en las etapas iniciales de la replicación del mismo, constituyendo una señal regulatoria para el procesamiento del transcrito de ARN generado a partir de la transcripción de la cadena liviana (L-Strand), necesario para generar un corto primer de ARN e iniciar la replicación de la cadena pesada (H-Strand). ETAS es clave para señalar el sitio donde finaliza la replicación de la misma (Fernández-Silva *et al.* 2003). El rol fisiológico de las secuencias CSB 2 y 3 es aún discutido, aunque se sabe que su presencia no es necesaria para el metabolismo

mitocondrial y prueba de ello es la extensa lista de especies a la que les falta parte o la totalidad de estas secuencias en su genoma: orangután, gorila, vaca, oveja, delfín, diferentes especies de ballena (Sbisà *et al.* 1997). En las 4 especies de CS el CD es altamente conservado exhibiendo unos pocos sitios polimórficos en los 322 pares de bases que lo componen (Maté *et al.* 2004). Tanto los CSBs, como las secuencias ETAS y CD tienen una similitud de alrededor de 90% con las de diferentes mamíferos (*Cetartiodáctilos*, *Perisodáctilos* y *Camívoros*). Esta conservación evolutiva a través de diferentes órdenes confirma la importancia funcional de estas secuencias en los procesos involucrados en la replicación y transcripción del genoma mitocondrial (Saccone *et al.* 1987).

La RC de los camélidos presenta en su extremo 5' próximo al gen *ARN^t_{phe}* un fragmento de 337 pb de longitud que concentra el mayor número de sitios polimórficos. El alineamiento de las secuencias de este fragmento hipervariable en los 20 animales analizados permitió definir 8 haplotipos mitocondriales (H1-H8) cuyas secuencias se encuentran depositadas en el GenBank con números de acceso AY500894 - AY500899 y DQ270408 - DQ270409. El análisis de red (network) realizado con el fin de determinar las relaciones evolutivas existentes entre estos haplotipos demostró que 4 pasos mutacionales separan los haplotipos H1 y H3, y es a partir de este último que se habrían originado los demás haplotipos encontrados. Los haplotipos H2, H4, H7 y H8 se diferencian de H3 por un solo paso mutacional, mientras que el resto de los mismos presentan de 2 a 4 diferencias nucleotídicas con H3. Hasta el momento no hemos detectado los haplotipos intermedios entre ellos y mas adelante en esta discusión planteamos algunas posibles explicaciones para este hecho.

Polimorfismos de longitud y heteroplasmia

Diferentes trabajos científicos publicados en los últimos años revelan variaciones en la longitud del genoma mitocondrial de distintas especies habiéndose identificado hasta el momento tres causas de diferenciación: 1) duplicación de largas secuencias en el genoma mitocondrial como la observada en los albatros (*Alca torda*) que incluyen tanto genes estructurales como la región control (Abbott *et al.* 2005); 2) variaciones en el número de nucleótidos en un homopolímero de C descrito en seres humanos y bovinos (Bendall *et al.* 1995, Hauswirth *et al.* 1984); 3) polimorfismos de longitud

causados por variaciones en el número de copias de secuencias repetidas en tándem. La existencia de motivos repetidos en la RC, con variabilidad en el número de repeticiones tanto dentro como entre individuos de una misma especie ha sido ampliamente descrita (Nagata *et al.* 1999; Xu *et al.* 1994; Hiendleder *et al.* 1998).

El fragmento hipervariable de 337 pb antes descrito concentra el mayor número de polimorfismos nucleotídicos e incluye una secuencia repetida imperfecta de 26 pb. Teniendo en cuenta este último hallazgo y considerando los antecedentes en otras especies, decidimos investigar la existencia de polimorfismos de longitud y heteroplasma en la RC de camélidos sudamericanos, mediante la técnica de PCR-SSCP en combinación con secuenciación.

Los resultados indican polimorfismos de longitud, aunque en baja frecuencia, dado que de los 20 animales analizados sólo una vicuña mostró un fragmento hipervariable con una delección de 26 pb correspondiente a una unidad de repetición. Los 19 animales restantes, en todos los casos, presentaron la secuencia de 26 pb repetida tres veces. Otro hallazgo interesante fue la existencia de mutaciones puntuales heteroplásticas en las 4 especies de camélidos (Maté *et al.* 2006, en prensa). Hemos encontrado tres guanacos, tres vicuñas, tres alpacas y una llama con 2 haplotipos mitocondriales, siendo los casos extremos una llama y una vicuña con tres haplotipos diferentes. La secuenciación de la RC de estos animales mostró que las posiciones identificadas como puntos de heteroplasma coinciden con algunas de las posiciones nucleotídicas generadoras de polimorfismos entre individuos (Maté *et al.* 2004). Un estudio similar realizado por Moum *et al.* (2001) en aves *Alca torda*, sugiere que el mismo mecanismo mutacional es responsable tanto de la heteroplasma puntual como de los polimorfismos. Por su lado, Grzybowski (2000) encuentra cierta correlación entre la velocidad de mutación de algunos sitios de la región hipervariable I del genoma mitocondrial humano y la ocurrencia de heteroplasma en dichos sitios, por lo cual considera que la heteroplasma podría representar un estado intermedio entre dos situaciones homoplásticas. Los datos de camélidos presentados parecerían no apoyar esta hipótesis porque las diferencias entre los haplotipos que se encuentran en estado heteroplástico (H1, H3 y H5) involucran de 2 a 4 pasos mutacionales, por lo cual sería improbable que la coexistencia de por ejemplo H1 y H3 constituya una situación intermedia entre ambos estados homoplásticos.

Se ha sugerido que el cuello de botella que tiene lugar durante la diferenciación de células primordiales a ovocito primario es el responsable del mantenimiento de la homoplasma (Bendall *et al.* 1995). Sin embargo, la idea primaria de organismos homoplásmicos ha sido cuestionada por trabajos recientes que describen heteroplasma mitocondrial en un amplio rango de mamíferos incluyendo humanos, insectos, aves y peces (Solignac *et al.* 1983; Kondo *et al.* 1990; Crochet *et al.* 2000; Nesbø *et al.* 1998; Gyllensten *et al.* 1991; Wilkinson *et al.* 1991; Savolainen *et al.* 2000; Schwartz *et al.* 2002). Las condiciones heteroplásmicas más frecuentes incluyen variaciones de longitud causadas por un número variable de repeticiones en tándem, y la causa propuesta como generador de tal variabilidad es el deslizamiento de la ADN polimerasa y el consecuente error de apareamiento durante la replicación del genoma mitocondrial (Bendall *et al.* 1995). La heteroplasma originada por sustituciones nucleotídicas simples ha sido publicada en varias especies como bovinos (Hauswirth *et al.* 1982), humanos (DiMauro *et al.* 2001), albatros (Moum *et al.* 2001), y en este trabajo describimos, por primera vez, este tipo de heteroplasma presente en las 4 especies de CS (Maté *et al.* 2006). Se sostiene que esta forma de heteroplasma es causada por mutaciones *de novo* en el individuo o por la existencia de condiciones heteroplásmicas dentro del oocito (Bendall *et al.* 1995). Los animales heteroplásmicos aquí descritos presentan dos o más tipos mitocondriales, que difieren entre sí por más de un paso mutacional, por lo cual descartamos las mutaciones *de novo* como causa posible de este hallazgo.

El ADN mitocondrial animal es de herencia estrictamente materna, sin embargo, la posibilidad de encontrar mitocondrias paternas parecería ser una falla debida a un problema técnico: la contribución de ADN mitocondrial proveniente del espermatozoides es extremadamente pequeña comparada con el ADNmt proveniente del oocito. Así, otro mecanismo que podría generar individuos con heteroplasma sería el "derrame paterno" (*paternal leakage*), el cual ocurre cuando las mitocondrias paternas no son completamente eliminadas durante la fertilización del óvulo. La ocurrencia de derrame mitocondrial paterno ha sido informado en *Drosophila*, ratones, mejillones, humanos y aves (Kondo *et al.* 1990; Gyllensten *et al.* 1991; Zouros *et al.* 1992; Schwartz *et al.* 2002; Kvist *et al.* 2003, respectivamente).

La organización social de los camélidos sudamericanos comprende tres grupos: grupos familiares formados por el macho dominante, alrededor de 7 hembras y las crías

menores a 1 año, grupos de machos y machos adultos solitarios (Puig *et al.* 1995). Debido al carácter poliginico del grupo familiar, el macho dominante podría cruzarse con hembras de la primera generación. De acuerdo a Gyllensten *et al.* (1991), esto puede favorecer el derrame de mitocondrias paternas (*paternal leakage*) produciendo crías heteroplásmicas. Habría que determinar si el derrame de mitocondrias paternas tuvo lugar recientemente o en generaciones previas y la heteroplasmia resultante se transmitió vía materna. Sería necesario entonces realizar estudios complementarios dirigidos a corroborar o descartar esta última hipótesis como causa de la heteroplasmia detectada en la familia *camelidae*

5.3- Análisis genético de las poblaciones de guanacos con marcadores microsatélites y de ADN mitocondrial

En esta sección discutiremos la diversidad y diferenciación genética existente en 4 poblaciones o unidades de manejo de guanacos recientemente establecidas en la Patagonia argentina con fines comerciales para producción sustentable de fibra. Las muestras tomadas provienen de los animales que conforman el núcleo fundador de tales unidades. Dado que estos animales fueron colectados en la naturaleza siendo muy jóvenes y al momento del estudio no habían alcanzado la edad reproductiva, los datos de variabilidad genética obtenidos y presentados en esta Tesis representan la diversidad existente en una región de aproximadamente 100.000 km² de la Patagonia argentina. Los marcadores moleculares corresponden a 14 loci microsatélites específicos de camélidos sudamericanos, y a datos de secuencia del fragmento hipervariable de la Región Control del ADN mitocondrial de Camélidos Sudamericanos, todos aislados y caracterizados en nuestro laboratorio (Bustamante *et al.* 2003; Maté *et al.* 2004, Bustamante *et al.*, en preparación). La combinación de ambos marcadores constituye una estrategia altamente informativa dado que combina el alto polimorfismo de los microsatélites, su velocidad de mutación y resolución, en pequeña escala, de eventos demográficos, con la identificación de linajes mitocondriales los cuales se utilizan a menudo en análisis de eventos filogeográficos ocurridos mucho tiempo atrás (Feulner *et al.* 2004). Además, la estructura genética de las poblaciones naturales depende tanto de su historia (procesos de colonización, aislamiento

geográfico) como de ciertos factores relacionados a la especie en particular tales como organización social, flujo génico y hábitos de cruzamiento. Debido a que esos procesos afectan diferencialmente la variabilidad de los genes heredados uniparentalmente o biparentalmente, la estimación de la estructura poblacional con los dos tipos de marcadores utilizados aporta información sobre los procesos evolutivos y ecológicos que afectan a las poblaciones naturales actuales (Slatkin 1994).

5.3.1- Marcadores de ADN microsatélite

Diversidad genética y heterocigosidad

El análisis realizado con 14 marcadores de ADN microsatélite específicos de camélidos muestra que todos los loci analizados son polimórficos en las 4 poblaciones. Encontramos una alta variabilidad alélica ya que detectamos 162 alelos diferentes en los 133 animales analizados; también resultó alta la variabilidad genética de los guanacos de esta región, medida en términos de Número Medio de Alelos por Locus (NMA), Heterocigosidad Esperada y Observada promedio (H_e y H_o), con valores de 7,39, 0,70 y 0,48, respectivamente. Este nivel de variabilidad es comparable al observado por Sarno *et al.* (2001, 2004) en poblaciones de guanacos de Chile localizados en la zona del Paine, y en vicuñas bolivianas y chilenas de la subespecie *mensalis*, respectivamente. Asimismo, la variabilidad de los guanacos aquí analizados es apreciablemente mayor que la variabilidad genética encontrada en poblaciones de vicuñas de Perú (Wheeler *et al.* 2001), en vicuñas bolivianas de la subespecie *vicugna* (Sarno *et al.* 2004) y en los dromedarios kenianos analizados por Mburu y colaboradores (2003), los cuales poseen valores promedios de NMA y H_e que varían entre 4,1 - 4,5 y 0,48 - 0,62 respectivamente. El nivel de diversidad genética es un parámetro muy importante en la determinación de la viabilidad de las poblaciones a largo plazo, ya que la adaptación individual, la resistencia a enfermedades, y la habilidad de las poblaciones de responder a los cambios ambientales puede disminuir como consecuencia de una reducida variabilidad genética (Lacy 1997).

Finalmente, en las 4 poblaciones analizadas, el valor de H_e resultó mayor que el de H_o , evidenciando un alto número de individuos heterocigotos. Una de las causas posibles para explicar este hallazgo es la presencia de estructuras familiares adentro de cada

población, cada una de ellas con una distribución de frecuencias alélicas y genotípicas particulares; este hecho se discute con más detalle a continuación.

Equilibrio de Hardy – Weinberg (EHW)

Los camélidos sudamericanos poseen ciertas características en su estructura social y comportamiento que permiten predecir la existencia de altos niveles de desequilibrio de Hardy-Weinberg. Este principio establece que en una población lo suficientemente grande, con apareamientos al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación, una vez alcanzado el equilibrio, que en loci autosómicos se alcanza en una generación.

En las 4 poblaciones analizadas en este trabajo observamos un alto número de loci fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que 40 de las 56 pruebas exactas poseen valores de probabilidad inferiores al 5 %. El ajuste de la prueba exacta con las hipótesis alternativas "déficit o exceso de heterocigotos" nos permitió identificar que la causa de los desvíos se debió en 30 de las 56 pruebas a déficit de individuos heterocigotos, y solo en un caso se debió a exceso de heterocigotos. La prueba global para todos los loci en las 4 poblaciones arrojó resultados de desequilibrio en todas ellas, mientras que en la prueba global de todas la poblaciones tomadas en conjunto para cada locus, todos, excepto el locus *GLM7*, se mostraron fuera del EHW. El desequilibrio de Hardy-Weinberg debido a exceso de homocigotos, como el encontrado en las poblaciones aquí analizadas, fue reportado en estudios previos realizados sobre otras poblaciones de camélidos sudamericanos, como guanacos de Chile (Sarno *et al.* 2001), y vicuñas de Perú, Chile y Bolivia (Wheeler *et al.* 2001).

Existen diversas causas que pueden motivar desviaciones del equilibrio en ambas direcciones, ya sea por exceso o defecto de individuos heterocigotos. Entre las posibles causas de desequilibrio dado por exceso de homocigotos como el encontrado en este trabajo podemos mencionar: 1) subdivisión poblacional (Efecto Wahlund), 2) consanguinidad, 3) selección contra heterocigotos, 4) alelos nulos, y 5) apareamiento selectivo positivo, es decir tendencia de los individuos del mismo genotipo a aparearse entre si (Cavalli-Sforza *et al.* 1981). Por tratarse de poblaciones naturales descartamos la consanguinidad y el apareamiento selectivo entre individuos de igual genotipo por

tratarse de poblaciones naturales en las que la selección natural establece las condiciones adecuadas para el éxito reproductivo y la sobrevivencia de la especie.

Con el objeto de investigar la existencia de alelos nulos, diseñamos primers diferentes para amplificar los loci *LAB7* y *LAB13* valiéndonos de la secuencia de los clones a partir de los cuales aislamos originalmente estos microsatélites. Con las nuevas combinaciones de primers volvimos a tipificar las poblaciones de guanacos. Los genotipos obtenidos coincidieron en todos los casos con los previamente obtenidos, volviendo a encontrar exceso de homocigotas. Este resultado nos llevaría a descartar la existencia de alelos nulos como posible causa del desequilibrio encontrado.

Como dijimos previamente los grupos familiares constituyen uno de los tres grupos que se distinguen en la organización social del guanaco. Debido al carácter poligínico (un macho con varias hembras) de los mismos, las poblaciones silvestres de guanacos estarían formadas por diferentes grupos de familias las cuales constituirían subpoblaciones dentro de la población. Teniendo en cuenta que el núcleo fundador de las unidades de manejo aquí analizadas se formó con animales jóvenes provenientes de diferentes grupos familiares, consideramos que el desequilibrio de Hardy-Weinberg con exceso de homocigotos encontrado para varios loci es una consecuencia de esta subdivisión poblacional (Wahlund, 1928). Es esperable que en este caso, como las generaciones se solapan en el tiempo, el equilibrio se alcance gradualmente, y no en una generación como ocurriría en una población ideal que cumple con las condiciones del modelo de Hardy-Weinberg (Cavalli-Sforza *et al.* 1981).

Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento es la asociación no al azar entre alelos de diferentes loci. Se entiende por ello que las combinaciones de varios loci ("multilocus") se alejan en forma significativa de lo esperado según el producto de las frecuencias alélicas de cada locus por separado. El desequilibrio de ligamiento puede deberse a procesos que restringen la recombinación entre loci, tales como el ligamiento físico de los genes en la misma región del cromosoma, la subdivisión poblacional y la selección a favor de una combinación de alelos en particular. (Avice 1994).

La ubicación cromosómica de los marcadores microsatélites desarrollados y utilizados durante este trabajo, al igual que la del resto de marcadores de ADN microsatélite

descriptos hasta el momento en camélidos sudamericanos (Lang *et al.* 1996; Obreque *et al.* 1998; Penedo *et al.* 1998,1999; Samo *et al.* 2000) es desconocida, por lo cual verificamos la falta de ligamiento entre loci con el Método de Cadena de Markov (Raymond *et al.* 1997). Veintiuno de 364 combinaciones de loci mostraron desequilibrio de ligamiento significativo ($p < 0,05$) en las 4 poblaciones estudiadas (Tabla 9). Este resultado menor al 5% es esperable por azar, de manera que no tiene significado estadístico, aunque debemos destacar que los loci *LAB1* y *LAB3* aparecen ligados en las 4 poblaciones analizadas. Podríamos afirmar entonces la segregación independiente de los microsatélites utilizados en este trabajo, y descartar el ligamiento entre loci como causa del desequilibrio de Hardy – Weinberg detectado.

Estructura y diferenciación poblacional

El análisis de subdivisión poblacional se realizó mediante el cálculo de los índices de fijación o estadísticos F_{ST} (Weir *et al.* 1984), Rho_{ST} (Slatkin 1995) y el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992). El valor de F_{ST} calculado para todos los loci y todas las poblaciones fue del 7,1% ($p = 0,0000$) mostrando una diferenciación genética entre poblaciones moderada pero altamente significativa, similar a la encontrada en los guanacos chilenos por Samo y colaboradores (2001) aunque mucho menor a la de las vicuñas peruanas descritas por Wheeler (2001). A diferencia de estas últimas, las cuales poseen una larga y conocida historia de aislamiento geográfico, la moderada diferencia genética existente entre las poblaciones de guanacos de la patagonia podría atribuirse a factores tales como la falta de barreras geográficas que separen estas poblaciones, así como a las migraciones estacionales causadas por factores climáticos (Cajal y Ojeda 1994); factores éstos que sin duda afectan la organización social y por lo tanto el flujo genético entre las poblaciones, el cual ha sido estimado en 6 animales por generación. El número de migrantes por generación (Nm) se define como el número de animales que por generación se mueven de una población a otra (Cañon *et al.* 2000). Este intercambio de animales de una población a otra con el consecuente aporte de variantes alélicas, contrarresta la pérdida de variabilidad por deriva genética (Nei 1987; Cavally-Sforza 1994). Un valor de flujo genético mayor de 1 disminuye esta pérdida de variabilidad genética por deriva, y por lo tanto tiende a minimizar las diferencias genéticas entre las poblaciones. Por el contrario, un valor de

N_m menor de 1 no alcanza a contrarrestar la pérdidas de variabilidad por deriva y por lo tanto permite que las poblaciones se diferencien (Slatkin 1994). En nuestras poblaciones el poder de diferenciación genética entre poblaciones varía según el loci considerado, siendo mínimos para los loci LAB 6 y 13 ($F_{ST} = 0,010$) y máximo para el locus GLM6 que posee un valor de $F_{ST} = 0,216$.

El índice Rho_{ST} tuvo un valor moderado de 8,3%, pero altamente significativo ($p = 0,0000$). Este parámetro también compara genéticamente las poblaciones y además de tener en cuenta la frecuencia de los alelos considera el tamaño de los mismos. En un análisis reciente de poblaciones de guanacos y vicuñas peruanas con dos marcadores microsatélites, Kadwell et al. (2001) mostraron que la distribución de tamaños alélicos encontrados en ambas especies no se superpone. Este hallazgo condujo a los autores a sugerir que los alelos actuales se originaron después de la divergencia de ambas especies. Por el contrario, los datos de F_{ST} y Rho_{ST} obtenidos en el presente trabajo exhiben valores semejantes debido a la superposición de los tamaños alélicos en las poblaciones, por lo tanto podría asumirse que estos alelos existían antes de la separación de los animales en las diferentes zonas de recolección.

El análisis molecular de varianza (AMOVA), cuya finalidad es partir la varianza genética total en componentes de diferencias entre individuos dentro de cada población y entre poblaciones, en nuestras poblaciones arrojó valores de diferenciación genética similares a los observados con el F_{ST} y el Rho_{ST} .

La Figura 4 muestra un mapa con las áreas de recolección de los animales fundadores de cada una de las unidades de cría estudiadas en este trabajo. En la figura se ve un solapamiento de Río Mayo y Las Heras que explica el bajo grado de diferenciación genética exhibido por ambas poblaciones como así también la asignación incorrecta del 18,75 % de los animales de Río Mayo a la población de Las Heras. Contrariamente, la mayor diferenciación existente entre las demás poblaciones proporciona un alto porcentaje de animales correctamente asignados a su población.

5.3.2 - Región Control del ADN mitocondrial

Diversidad nucleotídica y haplotípica

Sarno y colaboradores (2004) analizaron la diversidad genética existente en poblaciones chilenas y bolivianas de vicuñas, utilizando un fragmento de ADN mitocondrial de alrededor de 400 pb, de los cuales 190 corresponden a la Región Control (RC). Los valores de diversidad haplotípica observados en este trabajo son comparables a los observados por nosotros en los guanacos de la Patagonia. Los valores de diversidad nucleotídica de estos animales varían entre $0,1 \pm 0,1$ % y $0,5 \pm 0,3$ %, y también son semejantes a los exhibidos por las subespecies *mensalis* y *vicugna* de vicuñas, cuyos valores son de $0,2 \pm 0,2$ % y $0,8 \pm 0,5$ %, respectivamente (Sarno *et al.* 2004). De igual modo un fragmento de la RC de los elefantes de la India (Vidya *et al.* 2005) presenta valores de diversidad nucleotídica semejantes a los aquí hallados ($0,36 \pm 0,22$). Por el contrario, los ciervos de los cárpatos (Feulner *et al.* 2004), las gazelas africanas (Arctander *et al.* 1996), y los elefantes africanos (Nyakaana *et al.* 2002) presentan en todos los casos valores mayores de diversidad en su RC mitocondrial, con cifras que oscilan entre 0,5 y 10,9 %.

Los resultados anteriormente expuestos nos permitirían concluir que los valores de diversidad tanto haplotípica como nucleotídica observados en las poblaciones de guanaco analizadas en este trabajo estarían en los límites inferiores de diversidad mitocondrial exhibidos por diferentes especies de mamíferos en diferentes lugares del mundo.

El presente trabajo de Tesis constituye el primer estudio genético para analizar poblaciones de guanacos de la Patagonia argentina combinando marcadores uniparentales y biparentales. Los resultados muestran discrepancias entre ambos tipos de marcadores, hallazgo que ha sido previamente detectado en otras especies (Nyakaana *et al.* 1999, 2002; Feulner *et al.* 2004; Roca *et al.* 2005; Vidya *et al.* 2005). Diferencias entre velocidades de mutación, modelos de herencia y tamaños poblacionales efectivos entre ambos tipos de marcadores son las principales causas de estas discrepancias (Zuckerland *et al.* 1965).

Las 4 poblaciones de guanacos aquí analizados presentan una baja diversidad génica con solo tres haplotipos mitocondriales. Esta baja diversidad génica mitocondrial se contrapone con los altos niveles de variabilidad genética nuclear medida en términos de diversidad alélica y genotípica. Esta aparente contradicción en la variabilidad de ambos genomas sugiere un mecanismo de cuello de botella reciente. Debido a que el tamaño poblacional efectivo del genoma mitocondrial es solo el 25 % del genoma nuclear (solo las hembras transmiten el ADNmt y en copia única, a diferencia del nuclear que se transmite biparentalmente y por duplicado), un cuello de botella reciente podría haber reducido fácilmente la variabilidad mitocondrial sin afectar apreciablemente el genoma nuclear (Nyakaana *et al.* 1999). La alta variabilidad existente a nivel de los loci microsatélite convierte a estos segmentos de ADN en una herramienta que tiende a minimizar la pérdida de variabilidad genética durante un cuello de botella, de manera que ésta sólo se podría apreciar en caso de contar con restos de animales anteriores al cuello de botella. La mayor susceptibilidad del genoma mitocondrial a la pérdida de variabilidad por deriva genética (los cuellos de botella son casos extremos de deriva genética) en comparación con el genoma nuclear, nos obliga a considerar con mucha cautela la estructura genética de una población inferida a partir de un solo sistema genético. Los guanacos sufrieron una drástica reducción numérica, estimándose que antes de la colonización española existían en Sudamérica entre 30 y 50 millones de cabezas (Raedeke 1979) mientras que en la actualidad existen alrededor de 600.000 animales en todo su rango de distribución, de los cuales aproximadamente el 80- 90 %, se encuentra en territorio Argentino (Montes *et al.* 2000; Amaya *et al.* 2001). La falta de haplotipos mitocondriales intermedios entre los aquí observados nos permitiría pensar que algunos de ellos se hubieran perdido durante este acontecimiento de colonización; por el contrario los marcadores microsatélites fallarían en señalar esta pérdida de variabilidad genética debido al desconocimiento de la variabilidad prehispánica con la cual comparar.

Por otro lado, el muestreo de los guanacos analizados, realizado en una superficie de alrededor de 100.000 km² constituye un rango de hábitat reducido en comparación con el área de distribución de esta especie en la República Argentina. Probablemente, el estudio de animales procedentes de otras regiones permita detectar nuevos haplotipos mitocondriales incluyendo aquéllos intermedios entre los aquí descritos.

A diferencia de los datos mitocondriales que muestran una significativa y alta diferenciación genética entre pares de poblaciones medida en términos de F_{ST} , sugiriendo un flujo de hembras restringido entre poblaciones, los resultados de microsatélites muestran una moderada diferencia genética entre ellas, no existiendo diferenciación entre los individuos de Las Heras y Río Mayo. Estas discrepancias entre ambos tipos de marcadores indican un flujo genético a través de los machos, muy probablemente a través de los machos solitarios, conformados por machos adultos y juveniles sin grupo familiar ni territorio establecido. Este grupo se caracteriza por ser migratorio y desde el punto de vista genético serían los encargados de diseminar la diversidad genética entre diferentes poblaciones, ya que cada uno de los miembros del grupo está en busca de la conformación de su propia familia y el establecimiento de su territorio. Este flujo de genes a través de los machos puede llevar a la homogenización de alelos nucleares mientras que los marcadores mitocondriales heredados a través de las hembras pueden quedar restringidos a localidades o poblaciones individuales. La organización social de los guanacos en grupos familiares (Franklin 1982) sería consistente con este patrón de intercambio genético.

En el presente trabajo de Tesis expusimos brevemente la situación actual de los camélidos sudamericanos, haciendo hincapié en la especie guanaco por tratarse del objeto central de la misma. Esta especie adquirió recientemente cierta importancia económica en el sur de país, debido al alto valor de su fibra en los mercados internacionales. Esto llevó a que un grupo de productores patagónicos, asesorados por profesionales de INTA Bariloche, inicie proyectos de explotación sustentable del recurso, de manera de conservar la diversidad genética, la viabilidad a largo plazo del recurso, y del ecosistema que lo sustenta. Para desarrollar un plan de manejo sustentable es de gran importancia conocer la diversidad genética existente en los animales que constituyen los núcleos fundadores de las estaciones de cría, además de la variabilidad existente en la naturaleza ya que posee los animales de reserva y reposición. Nuestro trabajo consistió en el desarrollo de marcadores de ADN nucleares y mitocondriales específicos de camélidos sudamericanos, y su aplicación en el estudio genético de poblaciones de guanacos de la patagonia argentina. Los resultados indican una alta variabilidad nuclear y mucho menor variabilidad mitocondrial, debido probablemente al intenso cuello de botella sufrido por estos animales y el resto de las especies de camélidos durante y después de la colonización española, aunque no

descartamos el tamaño muestral insuficiente como causa probable de esta baja diversidad mitocondrial. Otro hallazgo remarcable a nivel poblacional es la mayor estructuración poblacional evidenciada por el marcador mitocondrial en comparación con los nucleares, lo cual sería compatible con la organización social del guanaco y el flujo genético debido al intercambio de machos entre las distintas poblaciones.

La generación de conocimientos y el diseño de tecnologías mejoradas de crianza a base de ellos, no tiene efecto alguno sobre la producción a menos que la información sea llevada hasta el productor y las técnicas adoptadas por él. Es por ello que el objetivo final de nuestro trabajo consiste en la transferencia de resultados a los asesores y responsables de los proyectos de explotación racional de guanacos, para que los mismos desarrollen en base a éstos metodologías de aprovechamiento económico y conservación del guanaco de la patagonia argentina. De esta manera se asegurará el cuidado y protección de esta especie silvestre por parte de los ganaderos de la zona, que verán transformarse a un competidor por sus pasturas en una valiosa alternativa.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- Los 5 marcadores de ADN microsatélite aislados y caracterizados resultaron variables e informativos tanto en la especie *guanaco* de la cual fueron aislados, como en llama
- Estos 5 marcadores conjuntamente con los producidos previamente en nuestro laboratorio (LAB1, LAB3, LAB6, LAB7, LAB13, Bustamante *et al.* 2003, y LAB14, LAB15, LAB16 y LAB17 con acceso al GenBank AY661538 - AY661541) conforman una batería de 14 marcadores recomendables para análisis de identificación genética de individuos, establecimiento de registros de genealogías, asignación de individuos a poblaciones y cuantificación de parámetros de genética poblacional
- La Región Control del ADN mitocondrial en las 4 especies de camélidos consta de 982 pares de bases distribuidos en: Bloques de Secuencia Conservada (CSB) 1, 2 y 3 próximos al ARNt de fenilalanina, un Dominio Central conservado (CD) y el dominio Extendido de Secuencia Asociada a la Terminación (ETAS) próximo al ARNt de prolina. Entre los CSB 1 y 2 detectamos un repetido de 26 pb que produce variaciones en la longitud de la RC mitocondrial de acuerdo al número de veces que se encuentre el mismo
- La RC de los camélidos presenta en su extremo 5' próximo al gen ARNt^{phe} un fragmento de 337 pb de longitud que concentra el mayor número de sitios polimórficos, por lo cual proponemos a este fragmento como el más informativo para analizar la diversidad genética en poblaciones
- Las 4 especies de camélidos presentan heteroplasma debido a sustituciones nucleotídicas puntuales que diferencian los haplotipos
- Detectamos polimorfismos de longitud en la RC del ADNmt en muy baja frecuencia, ya que sólo 1 de los 20 animales analizados presentó una delección de 26 pb correspondiente a una unidad de repetición

- La aplicación de ambos tipos de marcadores moleculares nos permitió detectar una alta variabilidad genética nuclear que se contrapone a la baja diversidad mitocondrial, probablemente causada por el intenso cuello de botella sufrido por los CS durante y después de la colonización española
- El flujo genético entre las poblaciones de CS mediado por machos explicaría la mayor estructuración poblacional evidenciada por el ADN mitocondrial en comparación con los marcadores nucleares

Bibliografía

7- BIBLIOGRAFIA

1. Abbott C., Double M., Trueman J., Robinson A. y Cockburn A. (2005) An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control region in *Thalassarche albatrosses*. *Molecular Ecology* 14, 3605-3613.
2. Amaya J., von Thüngen J. y De Lamo D. (2001) Densidad de guanacos (*Lama guanicoe*) en la Patagonia. INTA Comunicación Técnica nº 9, 13 pág.
3. Aquadro C. y Avise J. (1982a) Evolutionary genetics of birds. VI. A reexamination of protein divergence using varied electrophoretic conditions. *Evolution* 36, 1003-1019.
4. -Aquadro C. y Greenburg B. (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103, 287-312.
5. Arctander 1996
6. Avise J. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapter 3: Molecular Tools. Chapman & Hall eds. One Penn Plaza, New York, NY 10119.
7. Ayala F. (1980) Evolución Molecular. Editor: F.J. Ayala. Ed. Omega.
8. Ayala F. (1982b) Genetic variation in natural populations: problem of electrophoretically cryptic alleles. *Proc. Natl. Ac. Sci USA* 79, 550-554.
9. Bandelt H.J., Forster P. y Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37-48.
10. Banks M. y Eichert W. (2000) WHICHRUN (versión 3.2): a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *Journal of Heredity* 91, 87-9.
11. Beaumont M.A. y Bruford M.W. (1999) Microsatellites in conservation genetics. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.G, Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp. 165-182.
12. Bendall K. y Sykes B. (1995) Length Heteroplasmy un the First Hipervariable Segment of the Human mtDNA Control Region. *American Journal of Human Genetics* 57, 248-56.
13. Bernstein S., Thockmorton L. y Hubby J. (1973) Still more genetic variability in natural populations. *Proc. Natl. Ac. Sci USA* 70, 3928-3931.
14. Bianchi N., Larramendy M., Bianchi S. y Cortés L. (1986) Karyological conservatism in South American camelids. *Experientia* 42, 622.
15. Botstein D., White R., Skolnick M. y Davis R. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.
16. -Bruford M., Bradley D. y Luikart G. (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews, Genetics* 4, 900-10.

17. Bustamante A., Zambelli A., De Lamo D., von Thungen J. y Vidal-Rioja L. (2002) Genetic variability of guanaco and llama populations in Argentina. *Small Ruminant Research* 44, 97-101.
18. Bustamante A., Maté M.L., Zambelli A. y Vidal-Rioja L. (2003) Isolation and characterization of 10 polymorphic dinucleotide microsatellite markers for llama and guanaco. *Molecular Ecology Notes* 3, 68-69.
19. Cajal J. y Ojeda A. (1994) Camélidos silvestres y mortalidad por tormentas de nieve en la cordillera frontal de la provincia de San Juan, Argentina. *Mastozoología Neotropical* 1, 81-8.
20. Cañón J., Checa M.L., Carleos C., Vega- Pla J.L., Vallejos M. y Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31, 39- 48.
21. Capanna E. y Civatelli M. (1965) The Chromosomes of Three Species of Neotropical Camelidae. *Mammalian Chromosomes Newsletter* 17, 75.
22. Casamiquela R. (1983) La significación del guanaco (*Lama guanicoe*) en el ámbito pampeano-patagónico: Aspectos cronológicos, ecológicos, etológicos y etnográficos. *Mundo Ameghiniano* 4, 21-46.
23. Castella et al. 2001
24. Catanesi C. I. (2001) Análisis de marcadores microsatélites en poblaciones Humanas. Tesis doctoral. Facultad de Cs. Naturales y Museo, UNLP, La Plata Argentina: 118pp.
25. Cavalli- Sforza L.L. y Bodmer W.F (1981). Poblaciones Mendelianas. En: *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega S.A 1981. Imprenta Juvenil S.A, Barcelona, pp. 42-73.
26. Cavalli- Sforza L.L., Menozzi P. y Piazza A. (1994) *The history and geography of human genes*. Princeton, N.J. Princeton University Press.
27. Cavalli-Sforza L.L. y Cavalli-Sforza F. (1996) *The Great Human Diasporas. The history of Diversity and Evolution*. Addison-Wesley Publishing Company. Inc, USA.
28. Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P. y Piazza A. (1996) *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
29. Cockerham C.C. (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* 23, 72-83.
30. Cockerham C.C. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74, 679-700.
31. Cook C., Yin W. y Sensabaugh G. (1999) A Mitochondrial Control Region and Cytochrome b Phylogeny of Sika Deer (*Cervus nippon*) and Report of Tandem Repeats in the Control Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12 (1), 47-56.
32. Crochet P.A. y Desmarais E. (2000) Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of gulls (Aves: Laridae). *Mol. Biol. Evol.* 17, 1797-1806.
33. Cunazza C., Puig S. y Villalba L. (1995) Situación actual del guanaco y su ambiente. En: *Técnicas para el manejo del guanaco* (Puig S. ed.) UICN. Cap. 2, 27-50.

34. De Lamo D. (1997) Estado actual y perspectivas sobre el uso sustentable de poblaciones de Camélidos Silvestres. Guanaco (*Lama guanicoe*). Actas del 2do Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos 37-44.
35. Desjardins P. y Morais R. (1991) Nucleotide sequence and evolution of coding and non coding regions of a quail mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 32, 153-161.
36. Di Mauro S. y Schon E.A. (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Genet.* 106:18-26. Hauswirth, W. W., and P. J. Laipis. 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4686-4690.
37. Doda J., Wright C. y Clayton D. (1981) Elongation of displacement-loop strand in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78, 6116-6120.
38. Eisen J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp 34-48.
39. Ellegren H., Primmer C. y Sheldon B. (1995) Microsatellite "evolution": directionality or bias ?. *Nature Genetics* 11, 360-362.
40. Estoup A. y Cornuet J.M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp. 49-64.
41. Excoffier L., Smouse P. y Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-91.
42. Fernández-Baca S. (1971) La Alpaca, Reproducción y Crianza. Lima, Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura, Boletín de Divulgación 7.
43. Fernández-Silva P., Enriquez J. y Montoya J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* 88.1, 41-56.
44. Feulner P., Bielfeldt W., Zachos F., Bradvarovic J., Eckert I. y Hartl G. (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity* XXX, 1-8.
45. Flores Ochoa J. (1982). Causas que Originaron la Actual Distribución Espacial de las Alpacas y Llamas. Páginas 63-92 en : *El Hombre y su Ambiente en los Andes Centrales*, eds. L. Millones y H. Tomoeda, Museo Nacional de Etnología, Osaka, *Estudios Etnológicos Senri* 10, 63-92.
46. Franklin W. (1982) Biology, Ecology, and Relationship to Man of the South American Camelids. En: M. Mares y H. Genoways, *Compiladores, Chemicals signals: Vertebrates and Aquatic Invertebrates*, pp. 53-66. New York, Plenum Press.
47. Gemmel N.J., Western P.S., Watson J.M. y Marshal Graves J.A. (1996) Evolution of the mammalian mitochondrial control region —comparisons of control region sequences

- between Monotreme and Therian mammals. *Molecular Biology and Evolution* 13 (6), 798-808.
48. Gentz E. y Yates L. (1986) Genetic Identification of Híbridos Camelids. *Zoo Biology* 5, 349-354.
 49. Gray A. (1954) *Mammalian Híbridos*. Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux.
 50. Grzybowski T. (2000) extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. *Electrophoresis* 21, 548-553.
 51. Guo S.W. y Thompson E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
 52. Gyllensten U., Wharton D., Josefson A. y Wilson A. (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255-257.
 53. Hammond K. (1994) Proc. of the 5th. Congress on Genetics Applied to Livestock production 21, 423-439.
 54. Hancock J. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.G., Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp. 1-9.
 55. Harrison J. (1979) Revision of the Camelidae (Artiodactyla, Tylopoda) and description of the new genus *Alforjas*. *Paleont. Contr.* 95, 1-20. University of Kansas.
 56. Hartl D.L. y Clark A.G. Genetic and statistical background. En: *Principles of Population Genetics*, Ed. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, Third edition (1997), pag. 1-37.
 57. Hartl D.L. y Clark A.G. Organization of genomic variation. En: *Principles of Population Genetics*, Ed. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, Third edition (1997), pag. 72-111.
 58. Hartl D.L. y Clark A.G. Population Substructure. En: *Principles of Population Genetics*, Ed. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, Third edition (1997), pag. 111-163.
 59. Hauswirth W., Van De Walle M., Laipis P. y Olivo D. (1984) Heterogeneous Mitochondrial DNA D-Loop Sequences in Bovine Tissue. *Cell* 37, 1001-7.
 60. Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R. y Janke A. (1998) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *Journal of Molecular Evolution* 47, 441-8.
 61. Higgins D. y Sharp PM (1998) CLUSTAL V: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 475-493.
 62. IUCN (1990) IUCN Bulletin Special Repor. Using Wildlife Wisely.
 63. IUCN (1992a) Criteria and requirements for sustainable use of wild species.
 64. IUCN (1992b) Sustainable use of wildlife programm prospects.

65. Jackson D., Bartlett J. y Cook P. (1996) Sequences attaching loops of nuclear and mitochondrial DNA to underlying structures in human cells: The role of transcription units. *Nucleic Acids Research* 24, 1212-1219.
66. Jamieson A. (1994) The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics* 1(25), 37-44.
67. Jeffreys A.J., Wilson V. y Thein S.L. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314, 67- 73.
68. Jianglin H. (2004) Camelids. *Encyclopedia of Animal Science*.
69. Kadwell M., Fernandez M., Stanley H., Baldi R., Wheeler J., Rosadio R. y Bruford M. (2001) Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B Biology Sciences* 268, 2575-2584.
70. Kashi Y. y Soller M. (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.G., Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp. 10-23.
71. Kimura M. y Ohta T. (1971) *Theoretical aspects of population genetics*. Princeton, New Jersey.
72. Kimura M. (1983) *The neutralist theory of molecular evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
73. Kittles R., Perola M., Peltonen L., Bergen W., Aragon R., Virkkunen M., Linnoila M., Goldman D. y Long J. (1998) Dual Origins of Finns Revealed by Y Chromosome Haplotype Variation. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1171-1179.
74. Kondo R., Satta Y., Matsuura E., Ishiwa H., Takahata N. y Chigusa S. (1990) Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126:657-663.
75. Krumbiegl I. (1944). Die neuveltlichen tylopoden. *Zoologischer Anzeiger* 14, 45-70.
76. Kvist L., Martens J., Nazarenko A.A. y Orell M. (2003) Paternal Leakage of Mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus major*). *Mol. Biol. Evol.* 20, 243-247.
77. Lacy 1997
78. Lang K., Wang Y. y Plante Y. (1996) Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Animal Genetics* 27, 293.
79. Linn S. y Arber W. (1968) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 1300-1306.
80. Linnaeus C. (1758) *Systema Naturae per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Editio Decima, reformata. Holmiae, Laurentii Salvii.
81. Litt M. y Luty J. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.

82. Lönnberg E. (1913) Notes on Guanacos. *Arkiv. för Zoologi* 8 (19), 1-8.
83. -MacDonagh E. (1949) Los guanacos de Curámala. *Notas del Museo de La Plata, Zoología* 14 (129), 505-537.
84. Marshall T., Slate J., Kruuk L. y Pemberton J. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5), 639-655.
85. Maté M.L., Di Rocco F., Zambelli A. y Vidal-Rioja L. (2004) Mitochondrial DNA structure and organization of the control region of South American camelids. *Molecular Ecology Notes* 4, 765-767.
86. Maté M.L., Bustamante A., Giovambattista G., De Lamo D., von Thüngen J., Zambelli A. y Vidal-Rioja L. (2005) Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 36, 316-321.
87. Maté M.L., Di Rocco F., Zambelli A. y Vidal-Rioja L. (2006) Mitochondrial heteroplasmy in Control Region DNA of South American Camelids. *Small Ruminant Research*. En prensa.
88. Mburu D., Ochieng J., Kuria S., Kaufmann B., Rege J. y Hanotte O. (2003) Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Animal Genetics* 34, 26-32.
89. McPartland H., Matthews M. y Robinson N. (1998) Alpaca microsatellites at the VIAS A1 and VIAS A2 loci. *Animal Genetics* 29, 158-159.
90. Mengoni G. (1995) Importancia socio-económica del guanaco en el período precolombino. En: *Técnicas para el manejo del guanaco* (Puig S. ed.) UICN. Cap. 1, 13-26.
91. *Microsatellites, Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.G, Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., Glossary, pp. 331-341.
92. Miller G. (1924) A Second Instance of the Development of Rodent-like Incisors in an Artiodactyl. *Proceedings of the United States National Museum* 66 (8), 1-4.
93. Molina J. (1782) *Saggio Sulle Storia Naturale del Chile*. Bologna.
94. Montes C., De Lamo D. y Zavatti J. (2000). Distribución de abundancias de guanacos (*Lama guanicoe*) en los distintos ambientes de Tierra del Fuego, Argentina. *Mastozoología Neotropical / J. Neotrop. Mammal.* 7(1), 23-31.
95. Montgelard C., Catzeflis F. y Douzery E. (1997) Phylogenetics relationships of Artiodactyls and Cetaceans as deduced from the comparison of cytochrome b and 12 rRNA mitochondrial sequences. *Mol Bio Evol.* 14, 550-559.
96. Moum T. y Bakke I. (2001) Mitochondrial control region structure and single site heteroplasmy in the razorbill (*Alca torda*; Aves). *Curr. Genet.* 39, 198-203.
97. Müller P. (1776) *Natursystem*
98. Nagata J., Masuda R., Tamate H., Hamasaki S., Ochiai K., Asada M., Tatsuzawa S., Suda K., Tado H. y Yoshida M. (1999) Two Genetically Distinct Lineages of the Sika Deer, *Cervus*

- nippon, in Japanese Islands: Comparison of Mitochondrial D-Loop Region Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (3), 511-9.
99. Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 70 (12), 3321-3323.
 100. Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
 101. Nesbø C.L., Arab M.O. y Jakobsen K.S. (1998) Heteroplasmy, length and sequence variation in the control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics* 148, 1907-1919.
 102. Nicholas K. y Nicholas H. (1997) GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
 103. Nyakaana S. y Arctander P. (1999) Balancing Population genetic structure of the African elephant in Uganda based on variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male-biased gene flow. *Molecular Ecology* 8, 1105-1115.
 104. Nyakaana S., Arctander P. y Siegmund H. (2002) Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity* 89, 90-98.
 105. Obreque V., Coogle L., Henney P.J., Bailey E., Mansilla R., García Huidobro J., Hinrichsen P. y Cothran E. (1998) Characterisation of ten polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Animal Genetics* 29, 461.
 106. Obreque V., Mancilla R., García Huidobro J., Cothran E. y Hinrichsen P. (1999) Thirteen new dinucleotide microsatellites in alpaca. *Animal Genetics* 30, 397-398.
 107. Ojala D., Montoya J. y Attardi G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.
 108. Park S. (2001) MStools v 3 (Excel spreadsheet toolkit for data conversion) Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 2, Ireland.
 109. Penedo M., Caetano A. y Cordova K. (1998) Microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics* 29, 411-412.
 110. Penedo M., Caetano A. y Cordova K. (1999a) Eight microsatellite markers for South American Camelids. *Animal Genetics* 30, 166-167.
 111. Penedo M., Caetano A. y Cordova K. (1999) Six microsatellite markers for South American Camelids. *Animal Genetics* 30, 399.
 112. Puig S. y Videla F. (1995) Comportamiento y organización social del guanaco. In: *Técnicas para el manejo del guanaco*, (S. Puig, ed.) Capítulo 7, pp 97- 118. UICN, Gland, Switzerland.
 113. Raedeke K. (1978) El guanaco de magallanes. Chile. Su distribución y biología. CONAF Publicación Técnica N° 4. 182 pp.

114. Raedeke K. (1979) Population dynamics and Socioecology of the Guanaco (Lama guanicoe) of Magallanes, Chile. Ann Arbor, University Microfilms International.
115. Raymond M. y Rousset F. (1995) GENEPOP (v. 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Heredity* 86, 248-249.
116. Raymond M. y Rousset F. (2000) GENEPOP versión 3.2a: An updated versión of GENEPOP (versión 1.2); (originally published as) Population genetic software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
117. Rice J.A. (1995) *Mathematical statistics and Data analysis*. 2nd ed. Duxbury Press: Belmont, CA
118. Roca A., Georgiadis N. y O'Brien S. (2005) Cytonuclear genomic dissociation in African elephant species. *Nature Genetics* 37, 96-100.
119. Rozen S. y Skaletsky H. (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
120. Saccone C., Attimonelli M. y Sbisà E. (1987) Structural Elements Highly Preserved During the Evolution of the D-Loop-Containing Region in Vertebrate Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 26, 205-211.
121. Saluda-Gorgul A., Jaworsky J. y Greger J. (1990) Nucleotide séquence of satellite I and II DNA from alpaca (*Lama pacos*) genome. *Acta Biochim. Pol.* 37(2), 283-297.
122. Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd.
123. Sarno R., David V., Franklin W., O'Brien S. y Johnson W. (2000) Development of microsatellite markers in the guanaco, *Lama guanicoe*: utility for South American camelids. *Molecular Ecology* 11, 19-22.
124. Sarno R., Franklin W., O'Brien S. y Johnson W. (2001) Patterns of mtDNA and microsatellite variation in an island and mainland population of guanacos in southern Chile. *Animal Conservation* 4, 93-101.
125. Sarno R., Villalba L., Bonacic C., Gonzalez B., Zapata B., Mac Donald D., O'Brien S. y Johnson W. (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.
126. Sasse J., Mariasegaram M., Babu R., Kinne J. y Wernery U. (2000) South American camelid microsatellite amplification in *Camelus dromedaries*. *Animal Genetics* 31, 75-76.
127. Savolainen P., Arvestad L. y Lundeberg J. (2000) mtDNA tandem repeats in dogs and wolves: mutation mechanism studied by analysis of the sequence imperfect repeats. *Mol. Biol. Evol.* 17,474-488.
128. Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G. y Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial d-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205, 125-140.

129. Schlötterer C. y Wiehe T. (1999) Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. Oxford University Press, N.Y., pp 238-248.
130. Schneider S., Kueffer J.M., Roessli D. y Excoffier L. (1997) Arlequin ver. 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
131. Schneider S., Roessli D. y Excoffier L. (2999) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
132. Schwartz M. y Vissing J. (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347:576–580. Lunt, D. H., L. E. Whipple, and B. C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol Ecol.* 7, 1441–1455.
133. Slatkin M. (1994) Gene flow and population structure. En: *Ecological Genetics*. Editado por L. Real. Princeton.
134. Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457-62.
135. Slatkin M. (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genetics Research* 68, 259-60.
136. Solignac M., Monnerot M. y Mounolou J.C (1983) Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6942–6946.
137. Stanley H., Kadwell M. y Wheeler J. (1994) Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc. R. Soc. Lond. B* 256, 1-6.
138. Stormont C. y Cumley R. (1943) Cellular antigens in cattle blood. *Journal Heredity* 34, 35-41.
139. Taylor K., Hungerford D., Snyder R. y Ulmer F. (1968) Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetics* 7, 8-15.
140. Torres H. (1985) Guanaco. *Distribución y Conservación del Guanaco*. UICN/CSE Grupo Especialista en Camélidos Sudamericanos, Informes Especial No. 2. Cambridge, Cambridge University Press.
141. Torres H (1995). Criterios IUCN para el manejo sustentable de especies silvestres. En: *Técnicas para el manejo del guanaco* (Puig S. ed.) UICN. Pág. 51-53.
142. Vidal-Rioja L., Semorile L., Bianchi N. y Padrón J. (1987) DNA composition in South American camelids. Characterisation and in situ hybridization of satellite DNA fractions. *Genetica* 72, 137-142.
143. Vidal-Rioja L. y Laramendy M. L. (1989) *Genetica*
144. Vidal-Rioja L., Zambelli D. y Semorile L. (1994)

145. Vidya T., Fernando P., Melnick D. y Sukumar R. (2005) Population differentiation within and among Asian elephant (*Elaphus maximus*) populations in southern India. *Heredity* 94, 71-80.
146. Wahlund S. (1928) Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11, 65-106. In: *Molecular Evolution and Phylogenetics* (eds. Nei and Kumar), pp. 236-238. Oxford University Press, New York.
147. Walberg M. y Clayton D. (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* 9, 5411-5421.
148. Webb S. (1974) Pleistocene Llamas of Florida, with a brief review of the Lamini. En *Pleistocene mammals of Florida* (Ed. S. Webb), pág. 170-214. Gainesville: University Press of Florida.
149. Weber J. y May P. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.
150. Weir B.S. y Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358- 1370.
151. Wheeler J.C. (1982) Aging Llamas and Alpacas by their teeth. *Llama World* 1(2), 12-17.
152. Wheeler J.C. (1984a) On the origin and Early Development of Camelid Pastoralism in the Andes. En: J. Clutton-Brock y C. Grigson, *Compiladores, Animals and Archaeology*, Vol 3, Early Herders and Their Flocks, pp. 395-410. Oxford, BAR International Series 202.
153. Wheeler J.C. (1984b) La domesticación de la alpaca (*Lama pacos* L.) y la llama (*Lama glama* L.) y el desarrollo temprano de la ganadería autóctona en los Andes Centrales. *Boletín de Lima* 36, 74-84.
154. Wheeler J.C. (1991) Los camélidos sudamericanos: origen, evolución y estatus actual. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*, Fernández -Baca S., ed. Pp. 11-48. Santiago de Chile. FAO.
155. Wheeler, J.C. (1995) Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol. J. Linnean Soc.* 54, 271-295.
156. Wheeler J., Fernandez M., Rosadio R., Hoces D., Kadwell M. y Bruford M. (2001) Diversidad genética y Manejo de Poblaciones de Vicuñas en el Perú. *RIVEP*, 1 (suppl.), 170-83.
157. Wheeler, J.C. (2003) Evolution and Origin of the Domestic Camelids. *ILR Report Vol. 8 Issue #2*.
158. Wilkinson G.S. y Chapman A.M. (1991) Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics* 128, 607-617.
159. Wilson A. (1985) The molecular basis of evolution. *Sci. Amer.* 253 (4), 164-173.

160. Wright S. (1978) Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2. The Theory of Genes Frequencies. University of Chicago Press. Chicago.
161. Wright S. (1921) Systems of mating. *Genetics* 6, 111-178.
162. Wyman A. y White R. (1980) A Highly Polymorphic Locus in Human DNA. *PNAS* 77 (11), 6754-6758.
163. Xu X. y Amason U. (1994) The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus* : extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148, 357-62.
164. Zhao X., Li N., Guo W., Hu X., Liu Z., Gong G., Wang A., Feng J. y Wu C (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* 93, 399-403.
165. Zouros E., Freeman K., Ball A. y Pogson G. (1992) Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359 (6394), 412-414.
166. Zuckerkland E. y Pauling L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. Pág. 97-166 en: *Evolving Genes and Proteins*, V. Bryson y H. Vogel (eds.), Academic Press, New York.

Tabla 1 Frecuencias alélicas de los 14 marcadores microsatélites en las 4 poblaciones de guanacos analizadas.

LOCUS	PILCANIYEU	RIO MAYO	LAS HERAS	LA ESPERANZA
LAB 1				
155	1,72	-	-	2,00
161	1,72	-	-	-
163	3,45	-	8,93	12,00
165	1,72	-	-	2,00
167	3,45	6,38	-	8,00
169	34,48	15,96	16,07	12,00
171	20,69	40,43	23,21	34,00
173	20,69	11,70	30,36	16,00
175	10,34	6,38	7,14	8,00
177	1,72	4,26	1,79	-
179	-	3,19	3,57	6,00
181	-	4,26	-	-
183	-	3,19	7,14	-
185	-	3,19	1,79	-
189	-	1,06	-	-
LAB 3				
109	1,85	-	-	2,00
111	-	-	-	2,00
115	-	-	-	2,00
117	-	-	1,85	4,00
119	1,85	-	3,70	20,00
121	3,70	2,17	-	4,00
123	1,85	-	3,70	12,00
125	3,70	10,87	25,93	22,00
127	38,89	26,09	20,37	10,00
129	25,93	30,43	22,22	8,00
131	1,85	8,70	3,70	10,00
133	7,41	6,52	5,56	4,00
135	9,26	3,26	-	-
137	1,85	2,17	9,26	-
139	-	3,26	3,70	-
141	1,85	5,43	-	-
143	-	1,09	-	-
LAB 6				
160	-	2,27	-	-
162	8,93	2,27	-	-
164	12,50	7,95	14,29	6,25
166	8,93	6,82	10,71	8,33
170	3,57	-	14,29	4,17
172	1,79	1,14	-	-

Anexo
Material suplementario

174	16,07	2,27	-	12,50
176	8,93	18,18	17,86	12,50
178	10,71	12,50	12,50	31,25
180	21,43	25,00	17,86	8,33
182	-	15,91	10,71	12,50
184	5,36	4,55	1,79	4,17
186	1,79	1,14	-	-

LAB 7

141	1,79	1,04	-	8,70
143	-	-	-	2,17
145	-	1,04	-	-
149	85,71	66,67	81,03	84,78
151	5,36	-	-	-
153	7,14	27,08	18,97	4,35
155	-	4,17	-	-

LAB 13

168	-	1,09	-	-
184	1,72	-	-	-
188	-	2,17	-	-
190	-	9,78	1,85	-
194	-	4,35	5,56	-
196	1,72	2,17	-	-
198	5,17	3,26	9,26	10,42
200	10,34	8,70	3,70	18,75
202	3,45	8,70	7,41	20,83
204	17,24	6,52	14,81	4,17
206	12,07	8,70	14,81	27,08
208	15,52	20,65	16,67	16,67
210	17,24	11,96	9,26	-
212	5,17	4,35	1,85	2,08
214	6,90	3,26	-	-
216	3,45	4,35	11,11	-
218	-	-	3,70	-

LAB 14

142	-	-	1,85	-
144	-	2,44	11,11	-
146	-	1,22	42,59	56,00
148	41,38	10,98	-	4,00
150	6,90	9,76	22,22	6,00
152	3,45	8,54	22,22	32,00
154	27,59	28,05	-	2,00
156	10,34	31,71	-	-
158	10,34	7,32	-	-

Anexo
Material suplementario

LAB 15				
204	-	4,35	10,00	19,23
206	3,57	6,52	18,33	9,62
208	3,57	14,13	3,33	11,54
210	32,14	10,87	10,00	28,85
212	21,43	16,30	23,33	28,85
214	21,43	14,13	25,00	1,92
216	12,50	16,30	6,67	-
218	5,36	6,52	3,33	-
220	-	6,52	-	-
222	-	2,17	-	-
224	-	2,17	-	-
LAB 16				
133	1,72	-	-	-
135	-	1,09	5,00	18,75
137	44,83	20,65	-	-
139	3,45	-	-	33,33
141	1,72	9,78	41,67	10,42
143	8,62	9,78	-	-
145	12,07	10,87	10,00	20,83
147	5,17	9,78	11,67	4,17
149	1,72	5,43	5,00	2,08
151	10,34	10,87	10,00	2,08
153	8,62	14,13	11,67	-
155	-	3,26	-	8,33
157	-	3,26	3,33	-
159	1,72	-	-	-
161	-	-	1,67	-
163	-	1,09	-	-
LAB 17				
151	4,00	-	-	-
161	26,00	65,85	67,24	72,00
163	28,00	2,44	1,72	-
165	12,00	4,88	-	-
167	-	1,22	8,62	8,00
169	-	8,54	1,72	2,00
171	2,00	6,10	12,07	8,00
173	22,00	6,10	-	-
175	-	3,66	6,90	8,00
177	6,00	1,22	-	2,00
181	-	-	1,72	-
GLM 2				
127	10,71	1,35	-	-
129	3,57	-	-	-
131	28,57	-	-	8,00

Anexo
Material suplementario

133	3,57	-	-	12,00
135	23,21	40,54	36,21	28,00
137	-	-	5,17	2,00
139	30,36	58,11	58,62	50,00

GLM 4

181	-	1,67	-	-
185	-	-	-	4,17
187	5,56	-	3,45	2,08
189	40,74	40,00	32,76	4,17
191	18,52	10,00	34,48	64,58
193	14,81	16,67	8,62	-
195	20,37	15,00	8,62	10,42
197	-	3,33	3,45	12,50
199	-	3,33	-	-
201	-	-	-	2,08
203	-	-	1,72	-
205	-	5,00	-	-
207	-	5,00	6,90	-

GLM 5

133	22,50	12,50	5,17	-
135	-	7,50	12,07	8,33
143	10,00	16,25	12,07	25,00
145	-	3,75	3,45	2,08
147	2,50	32,50	36,21	16,67
149	35,00	18,75	18,97	29,17
151	2,50	5,00	6,90	6,25
153	10,00	-	-	8,33
155	2,50	-	-	4,17
157	5,00	-	-	-
161	5,00	-	1,72	-
163	5,00	2,50	-	-
165	-	1,25	1,72	-
167	-	-	1,72	-

GLM 6

148	3,57	26,39	31,67	32,00
150	14,29	4,17	-	-
152	12,50	56,94	63,33	66,00
154	62,50	11,11	3,33	2,00
156	7,14	1,39	-	-
158	-	-	1,67	-

GLM 7

195	12,00	17,19	21,43	23,08
197	2,00	4,69	5,36	-
199	86,00	53,13	69,64	76,92

201	-	14,06	-	-
203	-	3,13	-	-
205	-	7,81	3,57	-

- Alelos modales
- Alelos privados

Tabla 2 Estadísticos Rho y F

	Rho(is)	Rho(st)	Rho(it)
LAB 1	0,2298	0,0752	0,2877
LAB 3	0,0382	0,2120	0,2421
LAB 6	0,5336	0,0220	0,5439
LAB 7	0,2543	0,1100	0,3363
LAB 13	0,4494	0,0235	0,4623
LAB 14	0,0058	0,4032	0,4067
LAB 15	0,3915	0,1494	0,4824
LAB 16	0,0877	0,0814	0,1619
LAB 17	-0,0438	0,0002	-0,0436
GLM 2	0,4309	0,2238	0,5583
GLM 4	0,0811	0,0142	0,0941
GLM 5	0,3592	-0,0033	0,3571
GLM 6	0,1165	0,2042	0,2969
GLM 7	0,0338	0,0311	0,0638
Total	0,2604	0,0831	0,3219
	Fis	Fst	Fit
LAB 1	0,2044	0,0217	0,2217
LAB 3	0,2387	0,0367	0,2667
LAB 6	0,6965	0,0101	0,6996
LAB 7	0,0687	0,0486	0,1139
LAB 13	0,5570	0,0095	0,5612
LAB 14	0,1523	0,1943	0,3171
LAB 15	0,3791	0,0320	0,3990
LAB 16	0,1349	0,1057	0,2263
LAB 17	0,1722	0,0983	0,2535
GLM 2	0,3259	0,0537	0,3620
GLM 4	0,4382	0,0952	0,4917
GLM 5	0,3643	0,0306	0,3838
GLM 6	0,1681	0,2158	0,3476
GLM 7	0,0886	0,0447	0,1294
Total	0,3113	0,0706	0,3600

Tabla 3 Distribución de alelos privados por Locus y por Población

Locus	Pilcaniyeu	Río Mayo	Las Heras	La Esperanza	Total
LAB1	1	2	-	-	3
LAB3	-	1	-	2	3
LAB6	-	1	-	-	1
LAB7	1	1	-	-	2
LAB13	1	2	1	-	4
LAB14	-	-	1	-	1
LAB15	-	3	-	-	3
LAB16	2	1	1	-	4
LAB17	1	-	1	-	2
GLM2	1	-	-	-	1
GLM4	-	3	1	2	6
GLM5	1	-	1	-	2
GLM6	-	-	1	-	1
GLM7	-	2	-	-	2
Total	8	16	7	4	35

Tabla 4 a) Equilibrio de Hardy- Weinberg, Prueba exacta, Probability Test

Población Loci	Pilcaniyeu		Río Mayo		Las Heras		La Esperanza	
	P	DS	P	DS	P	DS	P	DS
LAB1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LAB3	0,2749	0,0289	0,0005	0,0003	0,0000	0,0000	0,0733	0,0158
LAB6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LAB7	0,1465	/	0,0273	0,0034	1	/	0,0000	/
LAB13	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LAB14	0,4160	0,0129	0,0057	0,0022	0,0628	0,0044	0,0795	0,0050
LAB15	0,0038	0,0017	0,0059	0,0028	0,0000	0,0000	0,0004	+0,322
LAB16	0,3650	0,0304	0,0703	0,0137	0,0068	0,0024	0,0000	0,0000
LAB17	0,0000	0,0000	0,0169	0,0069	0,6653	0,0222	0,6848	0,0169
GLM2	0,0038	0,0010	0,1173	/	0,0000	/	0,1032	0,0057
GLM4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0247	0,0059
GLM5	0,3240	0,0241	0,0036	0,0018	0,0000	0,0000	0,0020	0,0010
GLM6	0,0000	0,0000	0,0082	0,0018	0,1141	/	1	/
GLM7	1	/	0,0002	0,0002	0,1644	/	1	/

Tabla 4 b) Equilibrio de Hardy-Weinberg , Hipótesis alternativa "Déficit de heterocigotas".

Población Loci	Pilcaniyeu		Río Mayo		Las Heras		La Esperanza	
	P	DS	P	DS	P	DS	P	DS
LAB1	0,9714	0,0078	0,0089	0,0031	0,0022	0,0011	0,0000	0,0000
LAB3	0,3205	0,0327	0,0015	0,0007	0,0000	0,0000	0,0132	0,0041
LAB6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LAB7	0,0555	/	0,9233	0,0105	0,6888	/	0,0000	/
LAB13	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LAB14	0,2797	0,0110	0,0113	0,0036	0,0527	0,0038	0,0078	0,0017
LAB15	0,0049	0,0017	0,0010	0,0009	0,0000	0,0000	0,0033	0,0009
LAB16	0,2285	0,0243	0,0000	0,0000	0,0945	0,0106	0,0101	0,0028
LAB17	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000	0,1009	0,0129	0,3172	0,0135
GLM2	0,1604	0,0095	0,0735	/	0,0000	/	0,0024	0,0006
GLM4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0281	0,0046
GLM5	0,0157	0,0053	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
GLM6	0,0202	0,0026	0,0167	0,0022	0,0715	/	0,4722	/
GLM7	1	/	0,0144	0,0020	0,0342	/	0,8083	/

Tabla 4 c) Equilibrio de Hardy-Weinberg , Hipótesis alternativa "Exceso de heterocigotas".

Población Loci	Pilcaniyeu		Río Mayo		Las Heras		La Esperanza	
	P	DS	P	DS	P	DS	P	DS
LAB1	0,0405	0,0085	0,9776	0,0056	0,9915	0,0030	1	0,0000
LAB3	0,6831	0,0320	0,9882	0,0042	1	0,0000	0,9682	0,0100
LAB6	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000
LAB7	0,9845	/	0,1339	0,0143	0,7616	/	1	/
LAB13	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000
LAB14	0,7498	0,0096	0,9940	0,0024	0,9436	0,0044	0,9941	0,0017
LAB15	0,9973	0,0010	0,9989	0,0008	1	0,0000	0,9956	0,0015
LAB16	0,7273	0,0278	1	0,0000	0,9414	0,0078	0,9796	0,0043
LAB17	0,9999	0,0001	1	0,0000	0,9188	0,0100	0,7592	0,0145
GLM2	0,8309	0,0095	0,9598	/	1	/	0,9968	0,0011
GLM4	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000	0,0011	0,0054
GLM5	0,9962	0,0019	1	0,0000	1	0,0000	1	0,0000
GLM6	0,9840	0,0021	0,9860	0,0020	0,9603	/	0,7461	/
GLM7	0,6160	/	0,9887	0,0023	0,9732	/	0,6134	/

Tabla 5: Prueba global de desequilibrio de Hardy- Weinberg

a- Por población (test multi-locus)

Población	P	DE
PIL	0,0000	0,0000
RM	0,0000	0,0000
LH	0,0000	0,0000
LE	0,0000	0,0000

b- Por locus (test multi-población)

Locus	P	DE
LAB1	0,0000	0,0000
LAB3	0,0000	0,0000
LAB6	0,0000	0,0000
LAB7	0,0011	0,0004
LAB13	0,0000	0,0000
LAB14	0,0015	0,0015
LAB15	0,0000	0,0000
LAB16	0,0000	0,0000
LAB17	0,0000	0,0000
GLM2	0,0000	0,0000
GLM4	0,0000	0,0000
GLM5	0,0000	0,0000
GLM6	0,0007	0,0003
GLM7	0,0063	0,0032

c- Para todos los loci y todas las poblaciones

P	DE
0,0000	0,0000

Tablas 6a, 6b, 6c y 6d Distribución de haplotipos mitocondriales en los 72 clones correspondientes a los 20 animales clonados

Tabla 6a				Tabla 6b			
Especie	Clon	Patrón SSCP	Haplotipo	Especie	Clon	Patrón SSCP	Haplotipo
Llama1(8)	A	P1	H1	Guanaco1(328)	A	P1	H1
	B	P1	H1		C	P1	H1
	C	P1	H1		D	P1	H1
	D	P1	H1	E	P2	H3	
	E	P1	H1	Guanaco2(418)	A	P1	H1
	F	P1	H1		B	P1	H1
Llama2(7)	A	P1	H1	Guanaco3(323)	A	P2	H3
	B	P1	H1		B	P2	H3
	C	P1	H1	Guanaco4(331)	A	P2	H3
	D	P1	H1		B	P2	H3
Llama3(6)	A	P3	H4	Guanaco5(326)	C	P2	H3
	B	P2	H3		D	P4	H5
	C	P4	H5	B	P1	H1	
Llama4(9)	A	P1	H1	C	P2	H3	
	B	P1	H1	D	P2	H3	
	C	P1	H1	E	P2	H3	
	D	P1	H1				
Llama5(10)	A	P2	H3				
	B	P2	H3				

Tabla 6c

Especie	Clon	Patrón SSCP	Haplotipo
Alpaca1 (271)	A	P2	H2
	B	P2	H3
	C	P2	H3
	D	P2	H3
Alpaca2(273)	A	P4	H5
	B	P4	H5
	C	P4	H5
	D	P4	H5
Alpaca3(229)	A	P4	H5
	B	P2	H3
	C	P2	H3
Alpaca4(267)	A	P2	H3
Alpaca5(269)	A	P2	H3
	B	P2	H3
	C	P2	H3
	D	P5	H6

Tabla 6d

Especie	Clon	Patrón SSCP	Haplotipo
Vicuña1 (RP)	A	P1	H1
	B	P1	H1
	C	P1	H1
	D	P1	H1
Vicuña2(262)	A	P2	H3
	B	P5	H6
	C	P5	H6
Vicuña3(7)	A	P6	H7
	B	P6	H7
	C	P6	H7
	D	P6	H7
	E	P6	H7
Vicuña4(8)	A	P2	H3
	B	P3	H4
	C	P3	H4
	D	P7	H8
	E	P2	H3
Vicuña5(9)	A	P5	H6
	B	P2	H3
	C	P2	H3
	D	P2	H3