



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA  
DEL CHIGÜIRO *Hydrochoerus hydrochaeris*  
(RODENTIA: HYDROCHOERIDAE) EN LOS  
LLANOS ORIENTALES DE COLOMBIA**

**Yenni Lizeth Alonso Moreno**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área curricular Biología  
Bogotá, Colombia  
2017



**FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA  
DEL CHIGÜIRO *Hydrochoerus hydrochaeris*  
(RODENTIA: HYDROCHOERIDAE) EN LOS  
LLANOS ORIENTALES DE COLOMBIA**

**Yenni Lizeth Alonso Moreno**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Biología**

Director:

PhD. Luis Fernando García Pinzón

Línea de Investigación:

Manejo y conservación de vida silvestre

Grupo de Investigación:

Grupo de biodiversidad y ecología molecular GBEM

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área curricular de Biología

Bogotá, Colombia

2017



## **Agradecimientos**

A mi familia, especialmente a mi hermano John por el apoyo brindado durante este tiempo.

Al profesor Luis Fernando García por todas las enseñanzas y colaboración durante todo este proceso.

Al profesor Hugo Fernando López y su equipo de trabajo por las muestras proporcionadas para este estudio.

A Miguel Novoa por su colaboración y enseñanzas en el laboratorio.

A la Facultad de Ciencias por otorgarme la beca de auxiliar docente.

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la Republica por la financiación para la realización del proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia por los recursos físicos y espacios de aprendizaje utilizados durante mis estudios.

Finalmente, a Juan David González, a mis amigos y a todos aquellos que de alguna manera estuvieron presentes durante este proceso.



## Resumen

Este estudio evaluó la estructura de la población de *Hydrochoerus hydrochaeris* en los llanos orientales colombianos y evaluó si las características geográficas de la región influyen la estructura observada. El estudio incluyó 104 secuencias de fragmentos de genes mitocondriales de chigüiro (67 secuencias del gen D-loop y 37 de citocromo B) y un conjunto de 8 microsatélites para 34 muestras de los departamentos de Arauca, Casanare y Meta. El uso conjunto de marcadores mitocondriales y nucleares permitió observar que las poblaciones de *H. hydrochoerus* presentan una diversidad genética baja y no presentan estructura genética a lo largo de la región. Al comparar con otras poblaciones suramericanas, se encontró que la población colombiana es la que presenta menor estructuración genética y la menor diversidad genética después de las poblaciones venezolanas. Los resultados sugieren que la población colombiana pasó recientemente por un evento de cuello de botella y que en los llanos venezolanos existe un mayor efecto de la cacería furtiva sobre la estructura poblacional de la especie. Sin embargo, para comprobarlo es necesario realizar un análisis de estas poblaciones con marcadores microsatelitales que permitan obtener información de la historia reciente de la población. Finalmente, recientes eventos de expansión de poblaciones fueron observados en poblaciones colombianas. Eventos similares han sido observados también en Paraguay y la especie *H. isthmus*, los cuales parecen estar asociados a eventos climáticos.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, Chigüiro, diversidad genética Poblaciones, Microsatélites.

## Abstract

This study aimed to characterize the population structure of *Hydrochaeris hydrochaeris* in the Eastern plains of Colombia, and to evaluate whether the geographical characteristics of the region influence the observed structure. The study included 104 mitochondrial sequences (67 of Dloop and 37 of cytochrome B) and a set of 8 microsatellites for 34 individuals from Arauca, Casanare, and Meta (Colombia). Overall, using this set of mitochondrial and nuclear genes, populations exhibited a low genetic diversity and did not show a genetic structure across the region. Colombian populations have the lowest genetic structure and the second lowest genetic diversity in South America, and the Venezuelan populations are the least diverse. These results suggest a greater effect of furtive hunting on the genetic structure of capybara populations from Colombia and Venezuelan plains. Nevertheless, further studies of Venezuela populations using microsatellites are required to better understand the actual effect of this anthropic activity. Finally, recent events of population expansion were observed in Colombian populations. Similar events have been also observed in Paraguay and *H. isthmius* populations; these events seem to be associated to past climatic events.

**Keywords:** Capybara, gene diversity, microsatellites, mitochondrial DNA, populations



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
1.1 Contexto taxonómico .....	5
1.2 Aspectos ecológicos .....	6
1.3 Distribución y dinámica poblacional .....	7
1.4 Estado de conservación de la especie .....	9
1.5 Estudios Genéticos.....	10
1.6 Filogeografía y marcadores moleculares.....	12
<b>2. Metodología .....</b>	<b>17</b>
2.1 Área de estudio y procedencia de las muestras .....	17
2.2 Selección de secuencias y <i>loci</i> .....	18
2.2.1 Secuencias mitocondriales .....	18
2.2.2 Microsatélites .....	19
2.3 Extracción de ADN.....	19
2.4 Amplificación y purificación de genes mitocondriales .....	20
2.5 Amplificación de los marcadores microsatélites .....	21
2.6 Análisis de datos .....	23
2.6.1 Genes mitocondriales .....	23
2.6.2 Microsatélites: .....	26
<b>3. Resultados.....</b>	<b>29</b>
3.1 Extracción de ADN .....	29
3.2 Validación de las amplificaciones.....	29
3.3 Análisis filogenéticos .....	33
3.3.1 Gen citocromo B.....	33
3.3.2 Gen Dloop.....	35
3.4 Análisis poblacionales .....	37
3.4.1 Gen citocromo B.....	37
3.4.2 Gen Dloop.....	40
3.4.3 Locus microsatelitales .....	44
3.5 Análisis filogeográfico .....	50

<b>4. Discusión.....</b>	<b>53</b>
4.1 Eficiencia de los marcadores para el análisis poblacional .....	53
4.2 Diversidad genética.....	54
4.3 Estructura poblacional .....	56
4.4 Expansión demográfica .....	58
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>61</b>
<b>A. Anexo: Frecuencias absolutas de haplotipos del marcador citocromo B .....</b>	<b>63</b>
<b>B. Anexo: Frecuencias absolutas de haplotipos del marcador D-loop .....</b>	<b>65</b>
<b>C. Frecuencias alélicas reportadas en cada población.....</b>	<b>67</b>
<b>D. Matriz de asignación de muestras a poblaciones .....</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>69</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1</b> Distribución de <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> e <i>Hydrochoerus isthmius</i> (Tomado de López-Arévalo <i>et al.</i> 2014)-----	7
<b>Figura 2-1.</b> <i>Primers</i> utilizados en el ensamblaje de secuencias “cytb” de las muestras de los departamentos de Meta y Arauca. -----	20
<b>Figura 3-1.</b> Amplificación secuencias mitocondriales A. Amplificación del gen D-loop a partir de muestras de pelo. B. Amplificación del gen citocromo B a partir de muestras de hígado. -----	30
<b>Figura 3-2.</b> Gel de agarosa 2%, usado para verificar el éxito de PCR algunos sistemas con dificultades en el éxito de la amplificación.-----	30
<b>Figura 3-3.</b> Sección de genotipificaciones obtenidas a partir de distintos tipos de muestras para cuatro sistemas microsatelitales. A. muestra de hígado. B. muestra de pelo. Se observa que en este segundo caso el primer Capy 26 no se visualizó.-----	32
<b>Figura 3-4.</b> Árbol filogenético obtenido con el método de bayesiano a partir de secuencias de citB, en negro probabilidades a posteriori del análisis bayesiano, en rojo el soporte bootstrap del análisis de parsimonia. Con el método de parsimonia las muestras colombianas forman un clado, con 100% de soporte. -----	34
<b>Figura 3-5.</b> Árbol filogenético por inferencia bayesiana a partir de secuencias del gen Dloop. en negro probabilidades a posteriori del análisis bayesiano, en rojo el soporte bootstrap del análisis de parsimonia., en éste se forma un solo grupo que excluye kerodon con un 100% de soporte. -----	36
<b>Figura 3-6.</b> Red de haplotipos obtenidos para citocromo B. Usando método de parsimonia en el programa TCS V. 1.2.1 -----	38
<b>Figura 3-7.</b> Red de haplotipos obtenidos parel gen Dloop. Usando método de parsimonia en el programa TCS V. 1.2.1 -----	41
<b>Figura 3-8.</b> Correlograma de Mantel para el gen Dloop. -----	43
<b>Figura 3-9.</b> Comportamiento de los alelos en distintas poblaciones. Azul Na, Rojo Ne, Verde Índice de Shannon, Morado No de alelos privados, Azul claro N de alelos comunes 50% y naranja heterocigosidad esperada. -----	46
<b>Figura 3-10</b> Estructura poblacional de chigürio en los llanos orientales colombianos. Estimado a partir de los microsatelites 4, 7, 11 y 25. -----	47
<b>Figura 3-11.</b> Correlograma de Mantel elaborado a partir de marcadores microsatelitales usando el programa GENALEX V. 6.5 -----	49
<b>Figura 3-12.</b> Análisis discriminante (DAPC) elaborado a partir de marcadores microsatelitales. -50	
<b>Figura 3-13.</b> Análisis de distribución mismatch A. Gen citocromo B ( $\theta= 1,003$ T=1,166) B. Gen Dloop ( $\theta= 2,774$ T=2,611). -----	51



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> .....	5
<b>Tabla 2-1.</b> Localidades y número de muestras incluidas en el estudio. ....	18
<b>Tabla 2-2.</b> Tabla de microsatélites seleccionados e información reportada para los mismos (Herrera <i>et al.</i> 2004) Ta°: temperatura de anillamiento H <sub>E</sub> : heterocigosidad esperada H <sub>O</sub> : Heterocigosidad observada.....	19
<b>Tabla 2-3.</b> <i>Primers</i> utilizados en la amplificación de la secuencia Citocromo B. ....	20
<b>Tabla 2-4.</b> Conjunto de sistemas seleccionados y los correspondientes primers para su amplificación en este estudio. En azul se resaltan los sistemas incluidos en la multiplex 1 y en verde aquellos incluidos en la multiplex 2. ....	22
<b>Tabla 2-5</b> Haplotipos de Venezuela y Paraguay incluidos en la red de haplotipos. Ve: venezuela, Pa: paraguay.....	24
<b>Tabla 3-1.</b> Frecuencias de bases de cada matriz incluyendo el grupo externo. ....	31
<b>Tabla 3-2.</b> Transiciones y transversiones de las distintas localidades establecidas para citocromo B. ....	37
<b>Tabla 3-3.</b> Medidas de diversidad para cada localidad con el marcador citocromo B. ....	39
<b>Tabla 3-4.</b> Resultados obtenidos en el Análisis de varianza molecular (AMOVA) con el marcador citocromo B. P- valor: 0,2583.....	39
<b>Tabla 3-5.</b> Transiciones y transversiones de las distintas localidades establecidas para el gen Dloop.....	40
<b>Tabla 3-6.</b> Número y diversidad de haplotipos para las distintas localidades establecidas para el gen Dloop.....	42
<b>Tabla 3-7.</b> Medidas de diversidad para cada localidad con el gen Dloop. Para las poblaciones de Meta Puerto Rico y Maní Casanare no se presentan resultados ya que poseen solo un individuo. .	42
<b>Tabla 3-8.</b> Resultados obtenidos en el análisis de varianza molecular AMOVA con el gen Dloop. P-valor: 0,00426 .....	43
<b>Tabla 3-9.</b> Número de alelos obtenidos para cada loci. AraPR: Puerto Rondón, Ara CN: Cravo Norte, Cas Ma: Maní, Cas Aur: Aurora, Cas Vi: Victoria, Cas Mi: Miramar, Cas Co: Corozal, Cas Tr: Trinidad, Cas Or: Orocué.....	44
<b>Tabla 3-10.</b> Número de alelos y rangos de los microsatélites incluidos en este estudio. Nr numero de alelos reportados por Herrera (2004) N número de alelos obtenidos. ....	45
<b>Tabla 3-11.</b> Parámetros de diversidad para cada locus. ....	45
<b>Tabla 3-12.</b> Análisis de varianza molecular AMOVA a partir de marcadores microsatelitales. P-valor: 0,0299. ....	48

<b>Tabla 3-13.</b> Valores de $F_{st}$ obtenidos para la comparación de las poblaciones con loci microsatelitales.....	48
<b>Tabla 4-1.</b> Heterocigosidad observada y esperada promedio para las poblaciones incluidas en este estudio y la población del Hato el Cedral en Venezuela. ....	58







## Introducción

El chigüiro (*H. Hydrochaeris*) es considerado como un recurso económico importante en la región de los Llanos Orientales de Colombia tanto por su consumo local como por su exportación a Venezuela donde el consumo de carne es aún mayor (Aldana-Domínguez *et al.*, 2007). Debido a su importancia y potencial, en años recientes se han venido estudiando aspectos poblacionales de la especie con el fin de establecer escenarios que permitan su conservación, manejo y uso sostenible a corto y largo plazo (López Arévalo *et al.* 2014, Tiboche García 2016). Algunos estudios demográficos y de dinámica poblacional sugieren que la especie tiene un gran potencial de ser aprovechada de manera sostenible soportando tasas de extracción de hasta el 30% y que además pueden recuperar su densidad poblacional inicial aún después de eventos de mortandad de gran magnitud (e.g. fuerte sequía del 2014; Tiboche García, 2016). A pesar de esta capacidad de recuperación, estudios realizados en algunas localidades de Casanare sugieren que a nivel genético el panorama es diferente.

A nivel genético algunos estudios desarrollados en el departamento de Casanare sugieren que la diversidad genética es baja y que la posible causa de ello son eventos de cuello de botella generados por la extensa cacería realizada en años recientes en la región (Maldonado - Chaparro *et al.*, 2011; Correa y García, 2014). En Venezuela se ha encontrado igualmente una baja diversidad genética, ligada posiblemente a eventos de

cuello de botella, y una relación fuerte entre la distancia genética y geográfica (Borges-Lanáez *et al.* 2012). Además de la cacería para consumo de carne, se considera que la expansión de la barrera agrícola ha generado conflicto por los recursos con el ganado y conflictos con las poblaciones humanas, en conjunto, estos factores son considerados como los posibles causantes de los eventos de cuello de botella.

Los chigüiros no poseen glándulas de sudor bien desarrolladas y necesitan sumergirse varias horas diarias para lograr regular su temperatura corporal; por tanto, el agua juega un rol de gran relevancia en la historia de vida y distribución de la especie (Herrera 1986, 2012). El área de acción de las poblaciones se ve fuertemente influenciada por la disponibilidad de cuerpos de agua; por ejemplo, se ha observado que en época seca los animales tienden a buscar otros cuerpos de agua únicamente cuando en el que se encuentran desaparece. Durante la época de lluvias, por el contrario, su rango de acción aumenta considerablemente al no ser el agua un factor limitante (Camargo-Sanabria *et al.*, 2014).

La incidencia que tiene la disponibilidad de cuerpos de agua sobre la dinámica poblacional de los chigüiros ha llevado a proponer que el paisaje fluvial puede influir fuertemente sobre la estructura y diversidad genética de sus poblaciones: los ríos y humedales, junto a sus dinámicas de sequía-inundación, pueden representar barreras y corredores para el flujo genético entre poblaciones. Por ejemplo, Byrne *et al.* (2015) encontraron que los ríos y zonas inundables permiten la migración de individuos y aumentan el flujo genético en poblaciones que habitan en Argentina y el Orinoco venezolano, en estos casos las poblaciones no presentaron estructura genética marcada. Por el contrario, en Paraguay, donde se carece de este tipo de “corredores”, las poblaciones demostraron estar estructuradas genéticamente (Campos Krauer y Wisely 2011)

En Colombia, se ha observado que la densidad de las poblaciones está fuertemente influenciada por las características climáticas de los Llanos Orientales (ICN, 2002; Oikos 2003). En los llanos orientales colombianos, las poblaciones se encuentran en dos regiones geográficas divididas por el paso del río Meta (Rippstein *et al.*, 2001): al sur del río se

encuentra la Altillanura, una región caracterizada por una baja precipitación, vegetación de sábana, y suelos muy erosionados y con alto potencial de drenaje que no permiten la acumulación de grandes extensiones de agua. Al norte, se encuentra la planicie inundable o la “llanura mal drenada”. Éstas, al recibir grandes cargas de sedimentos y aguas de los Andes durante la época de lluvias, tienden a inundarse y crear grandes extensiones de cuerpos de agua que podrían funcionar como corredores de flujo e intercambio genético entre poblaciones.

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la dinámica poblacional y demografía de la especie, en la actualidad no se tiene certeza de si las características de las dos regiones de los Llanos Orientales también pueden influir sobre la estructura genética de las poblaciones de Chigüiro. Un estudio reciente realizado en el Casanare sugiere que el río Meta representa una barrera geográfica que promueve la diferenciación genética entre poblaciones (Correa y García, 2014), lo cual parece contradictorio de acuerdo a lo reportado en Argentina y Paraguay por Byrne et al. (2015). Por lo anterior es importante determinar si realmente existe una diferenciación poblacional entre las dos regiones y cuáles son los factores que contribuyen a la misma.

Este estudio evalúa la estructura genética de la especie en la región de los llanos orientales, y estudia el contexto evolutivo que ha moldeado la actual distribución geográfica de los linajes intraespecíficos. Para ello se utilizan los marcadores mitocondriales citocromo B y HVI del gen Dloop en comparación con ocho de los marcadores microsatélites formulados previamente por Herrera (2004) mediante *screening* de librerías genómicas. Para lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Determinar si la estructura genética de las poblaciones de chigüiro de los llanos orientales de Colombia obedece o no a sus patrones de distribución geográfica.

**Objetivos específicos:**

- Identificar los posibles linajes evolutivos intraespecíficos de la especie *Hydrochoerus hydrochaeris* en la región de los llanos orientales colombianos.
- Relacionar la distribución de linajes existentes con la distribución actual de las poblaciones.
- Hacer inferencias acerca de los tiempos de divergencia de los linajes existentes y los procesos históricos que explican la distribución actual de los mismos.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Contexto taxonómico

El Chigüiro pertenece al género *Hydrochoerus*, descrito por primera vez por Brisson en 1762. Aunque como tal, el nombre fue aceptado sólo hasta 1998 cuando la comisión internacional en nomenclatura zoológica lo reglamentó como nombre válido para el género (Woods y Kilpatrick, 2005). Este género posee dos especies: *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) e *Hydrochoerus ithsmius* (Goldman, 1912). Algunas diferencias entre las dos especies incluyen que *H. ithsmius* posee un hueso frontal más ancho y grueso, el pterigoides más corto y grueso y el diastema más largo que *H. hydrochaeris* (Trapido, 1949). Adicionalmente, ambas especies se diferencian a nivel citogenético; *H. hydrochaeris* tiene 66 cromosomas (FN= 102) (Saez *et al.*, 1971) mientras que *H. ithsmius* posee 64 cromosomas (FN= 104) (Peceño, 1983).

**Tabla 1-1.** Clasificación taxonómica de *Hydrochoerus hydrochaeris*

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Clase</b>	Mammalia
<b>Orden</b>	Rodentia
<b>Suborden</b>	Hystricognathi
<b>Familia</b>	Caviidae
<b>Género</b>	<i>Hydrochoerus</i>
<b>Especie</b>	<i>H. hydrochaeris</i>

*Hydrochoerus hydrochaeris* es el roedor viviente más grande del mundo, puede alcanzar 1.5 m de largo y 0.65 m de altura. Son animales digitígrados que presentan cuatro dedos en las extremidades anteriores y tres en las posteriores, poseen una membrana interdigital

basal relacionada con sus hábitos semi-acuáticos (Calderón *et al.*, 1975). Tienen un pelaje largo y aplanado que varía en coloración desde el parduzco amarillento pasando por castaño rojizo hasta el castaño muy oscuro (Cruz, 1974).

## 1.2 Aspectos ecológicos

Los chigüiros son principalmente diurnos, aunque bajo presión de cacería suelen aumentar su actividad en las noches. Son animales sedentarios por lo que pasan la mayor parte del tiempo descansando (Jorgenson, 1986) y viven en manadas familiares que varían de tamaño de acuerdo a múltiples factores, como la temporada hidrolimática, la calidad del agua, la presión de cacería, entre otras (Quintana y Rabinovich, 1993). Por ejemplo, el número de individuos de una manada es de 7.69 - 8.32 individuos en temporada de lluvias, mientras que en temporada seca aumenta a 16.17 - 18.3 individuos (Maldonado-Chaparro y Sánchez, 2010). Este cambio se debe principalmente a que en temporada seca al estrés producido por la falta de agua y la baja disponibilidad de zonas aptas para forrajeo genera una disminución en los niveles de agresión permitiendo que las manadas se fusionen en torno a los cuerpos de agua y zonas de forrajeo remanentes. Bajo estas condiciones suelen presentarse intercambios de individuos de distintas unidades familiares, y en general, una reorganización de las manadas (Ojasti, 1973; Jorgenson, 1986; INDERENA y CORPOS, 1994).

La madurez sexual en esta especie es alcanzada al año y medio o dos años de vida, edad a la cual se desarrolla completamente una protuberancia negra y grasosa en la cabeza llamada “morillo”, “comején” o “pipirro”, que consiste en una aglomeración de glándulas sebáceas hipertrofiadas que segregan un líquido blanco usado para marcar territorio (Perea y Ruiz, 1977; González-Jiménez, 1995; Nogueira-Filho, 1996). Los chigüiros no tienen una diferenciación sexual visible ya que no presentan un dimorfismo notorio y los órganos sexuales se encuentran cubiertos por dos pliegues laterales de piel que forman una especie de bolsillo (Calderón *et al.*, 1975).

Los chigüiros son animales polígamos. Aunque varios machos pueden copular con distintas hembras, es el macho dominante quien obtiene la mayor cantidad de cópulas (Herrera, 1992). El apareamiento, aunque puede presentarse todo el año, es más frecuente al inicio de la temporada de lluvias y suele darse en aguas poco profundas (Ojasti, 1973; Perea y Ruiz, 1977; Mones y Ojasti, 1986; Herrera y MacDonald, 1989). Por otro lado, pueden presentarse casos en que algunas hembras dominantes inhiben la reproducción de las de menor rango en la manada (Maldonado-Chaparro y Blumstein, 2008).

### 1.3 Distribución y dinámica poblacional

La distribución de *H. hydrochaeris* comprende desde las sabanas de los Llanos colombianos y venezolanos hasta la boca del río de la Plata en la zona norte de Argentina, siempre del lado oriental de la cordillera de Los Andes (Figura 1). La altura máxima a la que se ha registrado la especie es a 1.500 msnm. En Colombia, la especie se encuentra en los Llanos Orientales y la selva amazónica, siendo las poblaciones de los llanos las que presentan una mayor densidad de individuos (Aldana-Domínguez *et al.*, 2002).



**Figura 1-1** Distribución de *Hydrochoerus hydrochaeris* (gris oscuro) e *Hydrochoerus isthmius* (gris claro) (Tomado de López-Arévalo *et al.* 2014).

Los chigüiros no poseen glándulas de sudor bien desarrolladas y necesitan sumergirse varias horas diarias para lograr regular su temperatura corporal; por tanto, el agua juega un rol de gran relevancia en la historia de vida y distribución de la especie (Herrera 1986, 2012). El área de acción de las poblaciones se ve fuertemente influenciada por la disponibilidad de cuerpos de agua; por ejemplo, se ha observado que en época seca los animales tienden a buscar otros cuerpos de agua únicamente cuando el cuerpo en el que se encuentran desaparece. Durante la época de lluvias, por el contrario, su rango de acción aumenta considerablemente al no ser el agua un factor limitante (Camargo-Sanabria *et al.*, 2014).

La incidencia que tiene la disponibilidad de cuerpos de agua sobre la densidad poblacional de los chigüiros puede apreciarse de forma marcada en los Llanos Orientales colombianos. La evolución tectónica de la zona ha conllevado a que en la actualidad puedan observarse dos grandes regiones divididas por el río Meta (Rippstein *et al.*, 2001). Al sur del río Meta se encuentra la Altillanura, una región caracterizada por una baja precipitación, vegetación de sábana, y suelos muy erosionados y con alto potencial de drenaje que no permiten la acumulación de grandes extensiones de agua. Al norte del río Meta se encuentra la planicie inundable o la “llanura mal drenada”. Éstas, al recibir grandes cargas de sedimentos y aguas de los Andes durante la época de lluvias, tienden a inundarse y crear grandes extensiones de cuerpos de agua que pueden ser de alta importancia en el hábitat de la especie. Es precisamente en la llanura inundable donde se encuentran las mayores poblaciones de chigüiros en Colombia, principalmente en el Departamento de Casanare (ICN, 2002; Oikos 2003). En Arauca, donde también debería presentarse una alta densidad poblacional, la especie ha sido cazada exhaustivamente llevándola casi a la extinción local (ICN, 2002).



## 1.4 Estado de conservación de la especie

A nivel mundial la especie se encuentra en la categoría de preocupación menor según la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (UICN). Esta categorización se otorga ya que la especie posee una amplia distribución dentro de la cual se encuentran varias áreas protegidas y la presión por cacería se da solo en algunas regiones.

Los chigüiros son cazados principalmente por su carne, pero su piel y grasa son también utilizadas. En Colombia se presenta un consumo local de carne y otra gran cantidad del producto es exportado a Venezuela donde la demanda anual, se ha estimado entre 120.000 y 150.000 individuos. La elevada demanda conllevó a que las poblaciones de este país se encuentren fuertemente diezmadas en la actualidad. En ese país, la carne es especialmente apetecida en semana santa como parte de una tradición religiosa; sólo en marzo del año 2000 se exportaron ilegalmente a Venezuela 100.000 kg de carne de chigüiro silvestre a través de un falso zoo-criadero, cantidad que correspondió a más de 10.000 individuos (Aldana-Domínguez *et al.*, 2007). Además de la caza, también se ha identificado como amenaza la pérdida de territorio disponible para el forrajeo por la alta carga de ganado, lo que lleva a los chigüiros a introducirse en cultivos y pastos cultivados generando conflictos con las poblaciones humanas (Aldana-Domínguez *et al.*, 2007).

Varias estrategias han sido implementadas para promover el uso sostenible de la especie. En Casanare los estudios realizados sobre calidad de hábitat y dinámica poblacional, han sido utilizados en el desarrollo de un modelo que permitió observar el comportamiento de las poblaciones a determinadas tasas de extracción, como resultado se observó que las poblaciones de Casanare pueden no recuperarse de una extracción igual o superiores al 30%, por lo que se deben contemplar tasas de extracción menores. También se observó que al analizar dos localidades diferentes dentro del mismo departamento estas pueden responder de manera distinta a la extracción por lo que incluso dentro de las llanuras inundables se presentan diferencias ambientales que influyen sobre las poblaciones (Mesa y López 2014).

## 1.5 Estudios Genéticos

A nivel citogenético se han desarrollado varios estudios, de los cuales tres concluyen que el número diploide de cromosomas es de 66 y dos de ellos concuerdan en que el número funcional (NF) es igual a 102 (González-Jiménez, 1995; Saez *et al.*, 1971) en el tercero se reporta un NF de 108 (Sánchez-Isaza y Jiménez-Robayo, 2013), también se sugiere la existencia de un arreglo cromosómico de 10 pares de cromosomas sub-metacéntricos, 10 pares de cromosomas metacéntricos, 2 pares de cromosomas acrocéntricos y 10 pares de cromosomas telocéntricos. El cromosoma X es metacéntrico y el más grande del conjunto, el cromosoma Y es telocéntrico y pequeño (Saez *et al.*, 1971, Sánchez-Isaza y Jiménez-Robayo 2014).

Una librería genómica de 14 microsatélites fue desarrollada a partir de 17 individuos colectados en 1997 en Hato el Cedral (Venezuela), con el objetivo de proveer herramientas que permitieran evaluar hipótesis acerca del comportamiento social y reproductivo de la especie. De los 14 microsatélites, cinco locus resultaron monomórficos y nueve polimórficos, en los cuales se observaron valores de heterocigocidad entre 0.063 y 0.800. Como resultado, dicho trabajo sugiere que los nueve microsatélites polimórficos tienen potencial para ser utilizados en estudios de relaciones entre individuos y de éxito reproductivo (Herrera, 2004).

Con base en cinco de los microsatélites desarrollados por Herrera (2004), Maldonado - Chaparro *et al.* (2011) evaluaron la estructura genética de un grupo de 31 individuos de Hato Corozal (Casanare, Colombia). Los autores encontraron una diversidad genética de 0,62 y un número promedio de alelos de 5,2 caracterizado como medianamente bajo. Por lo anterior, se sugirió que la población había pasado por un evento de cuello de botella causado posiblemente por la extensa cacería en la región (Maldonado-Chaparro et al 2011)

En Venezuela un estudio de caracterización poblacional que incluyó un total de 153 muestras que abarcaban la mayor parte del territorio de los llanos venezolanos, encontró

que la especie presentaba una diversidad genética baja y la ausencia de una estructura poblacional marcada. Aun así, los resultados permitieron sugerir una relación directa entre distancia génica y geográfica, y la existencia de eventos recientes de cuello de botella. Este estudio fue realizado usando la región HV1 del gen mitocondrial D-Loop (Borges-Lanáez *et al.* 2012). Con este marcador molecular se realizó la caracterización poblacional de Casanare con 86 muestras recolectadas en distintas zonas del departamento (Correa y García, 2014). Correa y García (2014) encontraron niveles de diversidad considerados de moderados a bajos que pueden atribuirse en parte por el tamaño del territorio muestreado.

En 2016 se llevó a cabo un estudio poblacional y filogeográfico a gran escala empleando secuencias de la región HV1 del gen D-Loop y citocromo B de Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Ruiz-García *et al.* 2015). En este estudio se evidenció que a esta escala la especie posee una diversidad genética alta y una relación positiva entre la distancia geográfica y genética; resaltando la importancia de los ríos como barreras geográficas para la dispersión de la especie. En este estudio se reporta también que sólo la población de Casanare ha tenido eventos de cuello de botella, aunque el muestreo para otras localidades puede ser considerado bajo.

Un estudio posterior, que empleó las mismas secuencias, identificó cinco unidades evolutivamente significativas: una de ellas constituida por muestras de Casanare y Guainía. Este estudio sugiere además un origen amazónico para la especie y distintos eventos de dispersión a lo largo del mioceno y hasta el pleistoceno que parecen coincidir con varias teorías evolutivas como la hipótesis de refugio del pleistoceno y la hipótesis paleogeográfica del mioceno (Ruiz-García *et al.* 2016).

## 1.6 Filogeografía y marcadores moleculares

La filogeografía se enmarca actualmente dentro de un área de estudio conocida como ecología molecular, la cual explora preguntas en ecología y evolución a través del uso de marcadores moleculares. La filogeografía abarca componentes tanto espaciales como temporales en el sentido que se busca determinar los factores históricos que influyen en la distribución actual de los linajes de genes de interés, principalmente entre y dentro de especies relacionadas (Vásquez-Domínguez *et al.*, 2009). Basados en estudios filogeográficos es posible probar hipótesis biogeográficas, describir el proceso de evolución entre poblaciones aisladas reproductivamente, e indagar sobre la influencia de los factores históricos que generan determinada estructura poblacional o que mantienen la biodiversidad (Beheregaray, 2008).

El rápido desarrollo e implementación de la filogeografía como área de investigación ha sido posible debido a dos factores: el primero es el acelerado desarrollo científico y tecnológico en marcadores moleculares, especialmente los relacionados al ADN mitocondrial ya que estos son los más empleados para este tipo de estudios, y el segundo es el desarrollo de métodos estadísticos aplicados a dicho campo (Vásquez-Domínguez *et al.*, 2009). Beheregaray (2008), reporta que en años recientes el 77% de los estudios filogeográficos han sido realizados en el hemisferio norte del planeta, mientras que sólo un 15% provienen del hemisferio sur.

Estudios filogeográficos pueden ser desarrollados a través de distintas metodologías que van desde los métodos filogenéticos tradicionales hasta complejos parámetros demográficos basados en la teoría de coalescencia. Entre algunas de las herramientas gráficas encontramos el reloj molecular, que permite observar las relaciones entre genealogías, pero no permite observar pasos mutacionales y su precisión está atada a los tiempos de divergencia establecidos, mientras que una red de haplotipos permite observar las relaciones entre haplotipos y además observar los pasos mutacionales entre ellos. Otra

herramienta visual ampliamente utilizada son las gráficas de linajes a través del tiempo basadas en la teoría de la coalescencia, las cuales permiten además inferir cambios históricos del tamaño poblacional, la sensibilidad de esta prueba está determinada por la resolución genética y el tamaño poblacional del muestreo. El análisis de clados anidados es sensible a la resolución genética y al tamaño de muestra. pero identifica si el muestreo es apropiado o no para determinar factores demográficos históricos (Vázquez Domínguez *et al.* 2009).

Otros métodos son conocidos como estadísticos de resumen, dentro de estos encontramos la distribución de diferencias pareadas y los parámetros demográficos basados en coalescencia. Las distribuciones de diferencias pareadas tienen en cuenta la tasa mutacional y permiten inferir tamaños poblacionales, pero no consideran la estructura genealógica de los datos. Por último, los parámetros demográficos basados en coalescencia permiten determinar parámetros como la tasa de migración, el crecimiento poblacional e identificar el ancestro común más cercano, entre otros; la desventaja principal de este método radica en el fuerte esfuerzo computacional requerido (Vázquez Domínguez *et al.* 2009)

### *Marcadores moleculares*

El ADN mitocondrial es una molécula circular y cerrada de aproximadamente 16.5 Kb, conformada por un total de 37 genes y una pequeña región llamada región control, de aproximadamente 1 Kb, que controla la replicación de la molécula. Su alta tasa de sustitución nucleotídica, niveles muy bajos (casi nulos) de recombinación, alta variación intraespecífica y herencia netamente materna en animales, hacen de esta una herramienta útil en estudios filogeográficos, filogenéticos y de estructura poblacional. Ya que en algunos casos hembras y machos pueden poseer patrones de dispersión diferentes, la herencia netamente materna puede sesgar las reconstrucciones filogenéticas, para resolver este inconveniente suele contrastarse el resultado con reconstrucciones hechas a partir de genes nucleares (Vásquez-Domínguez *et al.*, 2009). El ADN mitocondrial es usado en

cerca del 72% de las publicaciones en filogeografía entre los años 1987 y 2006 (Beheregaray, 2008).

Por otra parte, los microsatélites son secuencias de 2 a 6 nucleótidos de longitud repetidas en tándem, conocidas también como STR o SSR por sus siglas en inglés “*Short Tandem Repeats*” y “*Simple Sequence Repeats*” respectivamente. Se conocen por ser altamente polimórficos y por tener una tasa de acumulación de mutaciones relativamente constante (Schlötterer, 1998). Este tipo de marcadores empezaron a ser utilizados en estudios de filogeografía desde 1997 (Beheregaray, 2008).

Los microsatelites se encuentran distribuidos más o menos uniformemente a lo largo de todo el genoma de los eucariotas, aunque con baja frecuencia en regiones codificantes (Armour et al., 1994). Su función específica es aún desconocida, aunque se presume que pueden relacionarse con el empaquetamiento y condensación del ADN en los cromosomas (Vanhala et al., 1998). Además de ser utilizados en estudios poblacionales y filogeográficos, estos marcadores tienen un papel muy importante en pruebas de identificación de individuos, mapas genéticos y pruebas de paternidad (Aranguren-Méndez et al. 2005). Otra característica importante de estos marcadores corresponde a su tipo de herencia mendeliana donde uno de los alelos observados en un individuo proviene del padre y el otro de la madre (Aranguren-Méndez et al. 2005).

El patrón de mutación, la probabilidad de alelos nulos y la homoplasia son algunos factores que podrían poner en desventaja el uso de marcadores microsatelitales, ya que pueden ser fuentes de error y a su vez disminuir su utilidad de estos en estudios genéticos. Los alelos nulos son conocidos como aquellos que no se amplifican dado un error o mutación en el punto de hibridación de los cebadores, como resultado se puede asumir como homocigoto a un individuo que no lo es. Se consideran alelos homoplásicos a aquellos que poseen el mismo estado, aunque este no sea dado por su descendencia (Aranguren-Méndez et al. 2005).







## 2. Metodología

### 2.1 Área de estudio y procedencia de las muestras

El presente estudio consideró muestras provenientes de las regiones al Norte y Sur del río Meta. Específicamente, fueron incluidas un total de 81 muestras de los departamentos del Meta, Arauca y Casanare (Tabla 2-1). Estas muestras corresponden a tejido hepático y pelos colectados en el marco de diferentes proyectos que han venido llevándose a cabo desde el año 2005.

Las muestras del Casanare (n=69) provienen de tejido hepático conservado en alcohol absoluto y pelos con folículo conservados en sobres de aluminio colectados entre octubre de 2005 y julio de 2006 en el marco del convenio 298 entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia, componente 4: "Evaluación de algunos parámetros poblacionales de la especie *Hydrochoerus hydrochaeris*, en la llanura aluvial de los departamentos del Meta, Casanare y Arauca, con el objeto de implementar medidas de manejo que permitan dinamizar la cadena de valor comercial derivada del aprovechamiento y el convenio interadministrativo 200-15-15-022 entre Corporinoquia y la Universidad Nacional de Colombia, con el fin de: "Evaluar el estado actual de las poblaciones de Chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y su hábitat bajo escenario de intervención antrópica y cambio climático en los departamentos de Casanare y Arauca". Del último proyecto provienen también las muestras del departamento de Arauca (n=9). Las muestras de pelo del departamento del Meta (n=3) fueron colectadas en zocriaderos comerciales de la región. Dado que la inmovilización de los individuos no era factible y que no se encontraron más pelos sobre las zonas de cría de los chigüiros, no fue posible obtener un mayor número de muestras para este departamento.

**Tabla 2-1.** Localidades y número de muestras incluidas en el estudio. La columna sigla indica el nombre que recibirá cada localidad en las gráficas y tablas de la sección de resultados.

Departamento	Municipio	Localidades	Sigla	Nº de muestras	Tipo de tejido
Meta	Granada	Puerto Caldas	MG	2	Pelos
	Puerto rico	La sultana	MPR	1	Pelos
Arauca	Puerto Rondón	La correa	APR	8	Pelos
	Cravo norte		ACN	1	Pelos
Casanare	Paz de Ariporo	La victoria	CPAv	25	Hígado
		Miramar	CPAm	14	Pelos
		Aurora	CPAa	2	Pelos
	Maní	Gaviotas	CM	1	Pelos
	Corozal	Andalucía	CC	5	Pelos
	Orocué		CO	11	Pelos
	Trinidad		CT	11	Pelos

## 2.2 Selección de secuencias y *loci*

### 2.2.1 Secuencias mitocondriales

Inicialmente este trabajo contempló solamente utilizar secuencias de citocromo B. Sin embargo, un estudio realizado a gran escala (Colombia, Perú, Ecuador y Brasil) demostró que, aunque ambos genes son eficientes para análisis poblacionales, el gen D-loop parecía mostrar mejores resultados (Ruíz - García *et al.*, 2015). Por este motivo, se optó por incluir los dos marcadores. El gen citocromo B es una de las 13 secuencias codificantes para proteínas presentes en el ADN mitocondrial y la más usada como herramienta en el análisis de diversidad genética de familias, géneros y especies a través de todo el reino animal (Arif y Khan, 2009). Por otra parte, el gen D-loop es una secuencia de aproximadamente 1 Kb de longitud que, por no ser un gen codificante, posee una alta variabilidad frente a otros marcadores mitocondriales. Ambos genes han sido ampliamente usados como herramienta en análisis poblacionales de distintos mamíferos mostrando siempre buenos resultados (Arif y Khan, 2009).

### 2.2.2 Microsatélites

Los microsatélites son marcadores co-dominantes que pueden estar presentes en regiones codificantes o no codificantes. Al ser altamente polimórficos y abundantes, constituyen una herramienta útil en estudios de paternidad, comportamientos reproductivos y análisis poblaciones (Arif y Khan, 2009). Dentro del conjunto de 14 microsatélites publicados por Herrera (2004), se seleccionaron ocho que presentaban mayor número de alelos y alta heterocigocidad. La fabricación y marcaje de los *primers* con fluorocromos 6-FAM Y HEX se realizó teniendo en cuenta los rangos alélicos y temperaturas de anillamiento reportados por Herrera (Tabla 2-2). Se buscó incluir todos los microsatélites en una PCR multiplex que facilitara el análisis de información.

**Tabla 2-2.** Tabla de microsatélites seleccionados, e información reportada para los mismos (Herrera *et al.* 2004) Ta°: temperatura de anillamiento H<sub>E</sub>: heterocigocidad esperada H<sub>O</sub>: Heterocigocidad observada.

Nombre	Ta° reportada	N° de alelos	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>
<b>Capy4</b>	60	2	0,401	0,412
<b>Capy7</b>	60	4	0,768	0,412
<b>Capy9</b>	60	6	0,837	0,8
<b>Capy11</b>	58	5	0,69	0,588
<b>Capy14</b>	61	2	0,444	0,5
<b>Capy24</b>	54	7	0,717	0,529
<b>Capy25</b>	54	3	0,5	0,5
<b>Capy26</b>	61	2	0,259	0,294

### 2.3 Extracción de ADN

En este trabajo se emplearon distintos métodos de extracción de acuerdo al tipo de muestra y el tipo de preservación que presentaban. Para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de tejido hepático se utilizó el PureLink® Genomic Kit de invitrogen siguiendo paso a paso las indicaciones dadas por la casa comercial y dejando en digestión las muestras por un promedio de 16 horas. Para muestras de pelo se implementó la extracción

de ADN con el kit *Tissue and Hair Extraction Kit + DNA IQ System* de Promega, ya que éste presentó mejores resultados que el método de Chelex 100. Las muestras fueron dejadas en digestión 1 hora de acuerdo a lo establecido para este kit.

Los resultados del proceso de extracción fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. Adicionalmente, se realizó la cuantificación del ADN a través de un NanoDrop Lite Spectrophotometer, con el fin de determinar la calidad del ADN obtenido.

## 2.4 Amplificación y purificación de genes mitocondriales

La amplificación del gen completo de citocromo b se realizó usando los *primers* reportados inicialmente por Smith y Patton (1993) (Tabla 2-3). Para las muestras de tejido hepático fue posible obtener la secuencia completa usando solamente los *primers* 05 y 14, mientras que para las muestras de pelo fue necesario obtener fragmentos realizando combinaciones con los demás *primers* incluidos en el estudio (Figura 2-1).

**Tabla 2-3.** *Primers* utilizados en la amplificación de la secuencia Citocromo B.

Región	Nombre	Secuencias 5' a 3'	Fuente
Cit b	MVZ 05	CGAAGCTTGATATGAAAAAACCATCGTTG	Smith y Patton (1993)
	MVZ 14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC	
	MVZ 04	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	
	MVZ 11	CCTCCGTAGCCCACAYLTGYCG	
	MVZ 16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	



**Figura 2-1.** *Primers* utilizados en el ensamblaje de secuencias “cytb” de las muestras de los departamentos de Meta y Arauca.

La amplificación de la región HV1 del gen D-loop se realizó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dado que se contaba con un banco de 53 secuencias provenientes del proyecto de evaluación del estado de las poblaciones de Chigüiro desarrollado por Corpoorinoquia y la Universidad Nacional de Colombia (Mesa y López 2014), sólo se realizó la amplificación del gen a 14 muestras que fueron colectadas en salidas posteriores (3 de Casanare, 3 de Meta y 8 de Arauca). Para amplificar una secuencia de 530 pb del gen D-loop se utilizaron los *primers* HV1-F (5' L CCCACCATCAGTACCCAAAA -3' L) y HV1-R (5' LCGAGATGTCTTATTTAAGGGGAAC-3' L), *primers* que han sido utilizados anteriormente para esta especie (Perdomo, 2005; Correa-García, 2014).

Las condiciones establecidas para ambas amplificaciones corresponden a 94°C por tres minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 50°C por 45 segundos y extensión a 72°C por un minuto; por último 72°C por cuatro minutos. Las concentraciones de reactivos en ambos casos corresponden a 20 ng de ADN aproximadamente, en una reacción total de 25 µL conformados por 0.3 µm cada primer, 0.3 mm dNTP, 1× Taq buffer (1.5 mm MgCl<sub>2</sub>, 10 m mTris-HCl, 50 mm KCl) y 0.75 unidades de Taq polimerasa. Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

Una vez amplificadas, las secuencias completas fueron purificadas con PureLink™ PCR Purification Kit de INVITROGEN™ mientras que las obtenidas en fragmentos fueron purificadas por el método de precipitación con acetato de amonio, finalmente las muestras fueron concentradas con la ayuda de una centrifuga de vacío (*speedback*) MiVac para el posterior envío a Macrogen Corea para su secuenciación.

## 2.5 Amplificación de los marcadores microsatélites

Con el objetivo de verificar el éxito de la amplificación con los *primers* diseñados, se realizaron amplificaciones individuales para cada sistema a partir de tejido hepático siguiendo los protocolos de PCR establecidos por Herrera (2004). Los resultados fueron

visualizados en geles de agarosa al 2%. En casos donde el resultado no fue exitoso se procedió a cambiar las condiciones de la PCR y las concentraciones de reactivos hasta encontrar las más convenientes. En este proceso se pudo observar que la mayoría de los *sistemas* seleccionados salían de sus rangos alélicos reportados, sobreponiéndose en algunos casos entre ellos, lo que impidió realizar una única multiplex. Como consecuencia, fue necesario realizar dos multiplex teniendo en cuenta los rangos alélicos reportados y observados (Tabla 2-4). Una vez definidas las dos multiplex, se procedió a su estandarización ajustando una temperatura de anillamiento y concentración óptima de reactivos para todos los sistemas. La temperatura de anillamiento usada para ambas PCR multiplex fue de 57°C.

**Tabla 2-4.** Conjunto de sistemas seleccionados y las correspondientes secuencias de los *primers*. En azul se resaltan los sistemas incluidos en la PCR multiplex 1 y en verde aquellos incluidos en la PCR multiplex 2.

Nombre	Primers (5'-3')	Rango alelos reportado	Rango alelos observado	Marcaje
Capy4	ACACAGGTGCATTTGGCATA	190-192	188-196	FAM
	ATGAGGATGTGGCAGAAAGG			
Capy7	CCTCAACATCCGTTTTCTC	272-278	224-238	HEX
	CCCAAGGGTTGAAACACAGT			
Capy9	TGCCATTCTTGTAAGGTG	152-162	160-170	HEX
	TGCCCCGTTTCAGTGTACT			
Capy11	AAAGTCGGTTCCCTGTTCCA	226-232	219-234	FAM
	GAGGCGGAAGATATTGTCATT			
Capy14	TCATAAAGCTGTCCCACTCTGC	285-287	268-282	FAM
	GCTGGAAAGCATAGCTCAAACG			
Capy24	TGCAGGGAGCACTTTATCCA	145-157	147-164	FAM
	CAAGCTGGGCACAAAAGGA			
Capy25	CAAGCATGTTCTTTCCCTTA	260-264	257-264	FAM
	TGGAGAGCAGAGGATTAAGCA			
Capy26	TCTGCTTGGTCCTTCTGTTTGA	274-276	268-279	FAM
	TCGCAAGGGGACTCTAGTGTTA			

Las condiciones finales para la PCR corresponden a una desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguida de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C (T° de anillamiento) por 1 minuto y 72°C (T de extensión) por 1 minuto; y finalmente, una extensión a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones óptimas de reactivos se establecieron como 20ng de ADN aproximadamente, en un volumen total de reacción de 25mL, que consistió de 0.3mM de cada primer, 0.3mM dNTP, 1 x *Taq* buffer (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl) y 0.75 unidades de *Taq polimerasa*. Los productos obtenidos fueron verificados en un gel de agarosa al 2% y posteriormente enviados a MACROGEN COREA solicitando la adición del estándar de tamaño que correspondió a Liz 500 (picos establecidos en pares de bases: 50 - 75 - 100 - 139 - 150 - 160 - 200 - 300 - 340 - 350 - 400 - 450 - 490 - 500).

## 2.6 Análisis de datos

### 2.6.1 Genes mitocondriales

La edición y ensamblaje de las secuencias obtenidas y su alineamiento se realizó en los programas *Sequencher* (Gene Codes) y *Clustal X* versión 2 (Larkin *et al.*, 2007), respectivamente. Ya que citocromo B es un gen codificante, se tradujeron las secuencias obtenidas a proteínas usando el programa *MacClade* 4,08 (Maddison y Madisson, 2005) para verificar el correcto marco de lectura y descartar la presencia de codones de parada.

La diversidad genética fue estimada de dos maneras, la primera a través de la diversidad nucleotídica o promedio de diversidad genética de cada gen, y la segunda, a través del número de haplotipos. Estos análisis fueron realizados en el programa Arlequin V.3.5 (Excoffier *et al.* 2010). Una vez identificados los patrones haplotípicos, se realizó una red de haplotipos con la ayuda del programa TCS V 1.21 (Clement *et al.* 2000) la cual fue editada posteriormente en el programa Adobe Illustrator. Para la red realizada con el gen Dloop se incluyeron además haplotipos de Venezuela y Paraguay obtenidos en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (Tabla 2-5).

**Tabla 2-5** Haplotipos de Venezuela y Paraguay incluidos en la red de haplotipos. Ve: venezuela, Pa: paraguay.

Haplotipo	numero Gi	Código de acceso	Tamaño de secuencia
Ve hap10	157696062	EU149776.1	545 pb
Ve hap9	157696061	EU149775.1	545 pb
Ve hap8	157696060	EU149774.1	545 pb
Ve hap7	157696059	EU149773.1	545 pb
Ve hap6	157696058	EU149772.1	545 pb
Ve hap5	157696057	EU149771.1	545 pb
Ve hap4	157696056	EU149770.1	545 pb
Ve hap3	157696055	EU149769.1	545 pb
Ve hap2	157696054	EU149768.1	545 pb
Ve hap1	157696053	EU149767.1	545 pb
Pa hap14	289547405	GU456376.1	386 pb
Pa hap13	289547404	GU456375.1	386 pb
Pa hap12	289547403	GU456374.1	386 pb
Pa hap11	289547402	GU456373.1	386 pb
Pa hap10	289547401	GU456372.1	386 pb
Pa hap9	289547400	GU456371.1	386 pb
Pa hap8	289547399	GU456370.1	386 pb
Pa hap7	289547398	GU456369.1	386 pb
Pa hap6	289547397	GU456368.1	386 pb
Pa hap5	289547396	GU456367.1	386 pb
Pa hap4	289547395	GU456366.1	386 pb
Pa hap3	289547394	GU456365.1	386 pb
Pa hap2	289547393	GU456364.1	386 pb
Pa hap1	289547392	GU456363.1	386 pb

La estructura poblacional fue evaluada mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin V 3.5. Para éste se establecieron 10.000 permutaciones y los modelos evolutivos de Tajima y Nei y Tamura y Nei para los genes D-loop y Citocromo B, respectivamente. Estos modelos fueron escogidos teniendo en cuenta los parámetros de los modelos evolutivos obtenidos a partir del software Jmodeltest v.2.1.4 (Posada 2008). Adicionalmente, para observar la relación entre la distancia



genética y geográfica, se realizó un correlograma de mantel entre las distancias obtenidas por  $F_{st}$  y la distancia en kilómetros entre cada localidad, para esto se utilizó el programa GENALEX V. 6.5 (Peakall y Smouse 2012). Por último, se evaluó el flujo génico entre poblaciones y el número de migrantes ( $N_m$ ) a través del estadístico  $G_{st}$  y el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.* 2010).

El análisis filogenético por el método de máxima parsimonia se realizó en el programa PAUP versión 4 beta 10 (Swofford 2003), para esto, se procedió a desarrollar una búsqueda heurística en la cual todos los caracteres fueron tratados como no ordenados y se excluyeron aquellos no informativos bajo parsimonia. Los parámetros de búsqueda se definieron con un límite de 10000 árboles, los gaps fueron tratados como datos faltantes y todos los caracteres informativos tuvieron el mismo peso. De los árboles obtenidos se generó un árbol consenso aplicando la regla de la mayoría. Las mismas condiciones fueron utilizadas para evaluar el soporte de los diferentes nodos usando remuestreo por *bootstrap* de 1000 replicas. Los valores  $\geq 80\%$  fueron considerados como buen soporte.

La determinación de los modelos evolutivos de los dos genes mitocondriales para el análisis de inferencia bayesiana se realizó en el programa jModelTest v.2.1.4 (Posada 2008); se establecieron un total de 88 modelos bajo el parámetro de Akaike. Posteriormente, se ejecutó el análisis en el programa MrBayes v. 3.1.2. (Ronquist y Huelsenbeck 2003), en este se establecieron dos corridas independientes con cuatro cadenas de Markov y 20 millones de generaciones muestreando cada 1000. Se estableció una zona de descarte o *burn-in* del 10% del total de los arboles obtenidos. Los arboles filogenéticos obtenidos a través de los tres métodos de análisis, fueron visualizados y editados en el programa FigTree v. 1.4.0 (Rambaut 2014).

Para el estudio filogeográfico se realizó un análisis de clados anidados para el cual fue necesario desarrollar de una red de haplotipos con la ayuda del programa TCS v. 1.21. (Clement *et al.* 2000). Posteriormente se incluyeron las coordenadas geográficas en decimales y la determinación de los clados en el programa Geodis v. 2.6., (Posada *et al.*

2000) para su respectivo análisis. Los resultados obtenidos fueron interpretados usando la clave establecida por este mismo programa.

La historia demográfica de toda la población fue analizada implementando el análisis de distribuciones mismacth (*mismatch analysis*). Este análisis permite establecer si las poblaciones han sido estables durante el tiempo o si han pasado por eventos recientes de expansión demográfica (Excoffier 2004). Este análisis se realizó en el programa Arlequin V 3.5 (Excoffier *et al.* 2010) a partir de diferencias pareadas con un total de 5000 réplicas de bootstrap. Las pruebas de neutralidad con el gen D-loop fueron realizadas usando el programa Arlequin V.3.5 (Excoffier *et al.* 2010).

### **2.6.2 Microsatélites:**

La lectura de los electroferogramas obtenidos para cada multiplex fue realizada en el programa STRand Analysis software (Toonen RJ y Hughes 2001). En este programa se diseñaron pruebas con cada conjunto de loci a ser analizados y se establecieron *a priori* los rangos alelicos de cada uno al igual que el fluoromarcaje de cada primer. Los datos obtenidos fueron organizados en una base de datos en Microsoft Excel® para posteriores análisis.

La diversidad genética de las poblaciones fue estimada calculando el número de alelos por locus (N), índice de Simpson, heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), y el contenido de información polimórfica (Botstein *et al.*, 1980). Se evaluó el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) de cada locus y el desequilibrio de ligamiento entre locus usando el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.* 2010). La presencia de alelos nulos para cada locus fue evaluada usando el software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Para determinar la presencia de eventos de cuello de botella recientes, se evaluó el exceso de heterosigocidad con el Software BOTTLENECK V.1.2.02 (Cornuet y Luikart 1996) usando solo los loci en equilibrio y bajo el modelo TPM (two phase mutation model).

Se determinó el número de poblaciones presente en la zona estudiada con la ayuda del programa STRUCTURE 2.3.2. (Pritchard et al. 2000) e incluyendo únicamente los loci que se encontraban en equilibrio. Para esto se establecieron un periodo de *burnin* de 100.000 y 200.000 MCMC y se corrieron diferentes análisis cambiando el valor de *K*. El modelo determinado fue Admixture model y la frecuencia alélica se estableció como correlacionada.

Se realizó una prueba de distancias con el estadístico F (Fst) para evaluar la estructura entre las poblaciones estudiadas (Weir y Cockerham, 1984). Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10000 permutaciones. Posteriormente, se realizó un correlograma de mantel entre las distancias obtenidas por Fst y la distancia en Kilómetros entre cada localidad. Por último, se determinó el número de migrantes entre poblaciones (Nm). Todos los análisis anteriormente nombrados fueron realizados en el programa GENALEX V 5.6 (Peakall y Smouse 2012) y Arlequin v3.5 (Excoffier et al. 2010).

Se realizó un análisis discriminante de componentes principales (“DAPC”). El DAPC es en realidad un análisis discriminante realizado con las componentes principales obtenidas de una matriz de distancias genéticas, en este caso, obtenida a partir de los datos de los haplotipos. Este análisis se realizó únicamente con los locus que se encontraban en equilibrio y permitió evaluar gráficamente la relación existente entre poblaciones establecidas *a priori* de acuerdo a la localidad geográfica: Arauca, Casanare, Meta. Adicionalmente, este análisis permitió determinar la probabilidad que tenía cada muestra de pertenecer a la población de donde fue obtenida.



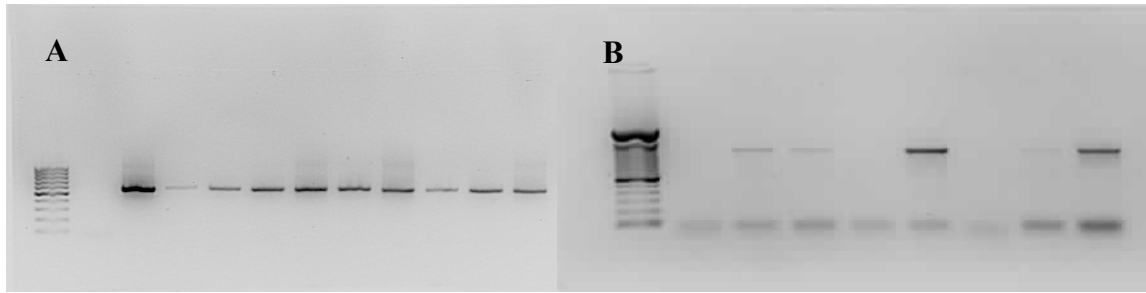
## **3. Resultados**

### **3.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN fueron usados dos métodos diferentes de extracción: el PureLink® Genomic Kit de Invitrogen fue implementado en las muestras de tejido hepático almacenado en alcohol absoluto y el kit *Tissue and Hair Extraction Kit + DNA IQ System* de Promega fue implementado para muestras de pelos almacenados en sobres de aluminio. Los valores de cuantificación de las muestras de hígado oscilaron entre 20 ng y 200 ng mientras que para las muestras de pelo se encontraron valores de 8 ng – 105 ng. A pesar de que las muestras de pelos provenían de cuatro años diferentes (2005, 2006, 2015 y 2016) no se observaron diferencias importantes en las concentraciones de ADN, este comportamiento también se observó en la relación de absorbancias 260/280.

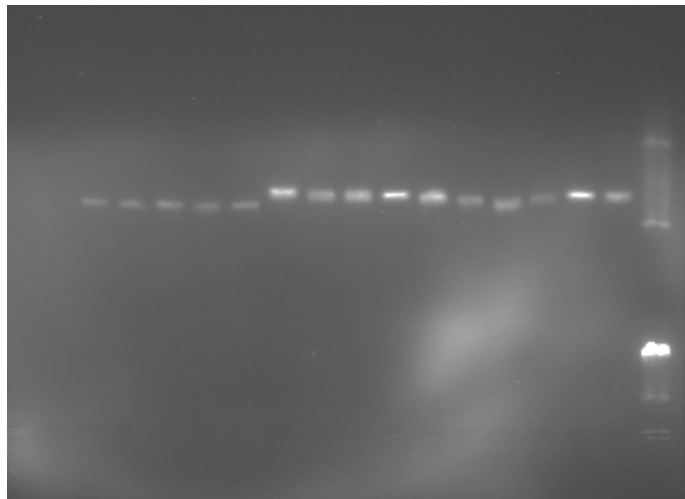
### **3.2 Validación de las amplificaciones**

El gen Dloop, presentó un mejor rendimiento en las amplificaciones de ADN obtenidos de pelos que el gen citocromo B de ADNs obtenidos de muestras de hígado, esto se debe a que el gen Dloop es una secuencia más corta (530pb) y los *primers* utilizados son específicos para esta especie. Se observó que en la amplificación del gen Dloop se generaron menos dímeros de *primer*. Esto se debió principalmente a que la especificidad del *primer* permitió utilizar una mayor temperatura de anillamiento inhibiendo así que el *primer* se amplificara a sí mismo (Figura 3-1).



**Figura 3-1.** Amplificación secuencias mitocondriales A. Amplificación del gen D-loop a partir de muestras de pelo. B. Amplificación del gen citocromo B a partir de muestras de hígado.

En cuanto a los sistemas microsatélites las PCR multiplex presentaron amplificaciones limpias para las muestras de hígado, lo cual también se vio reflejado en genotipificaciones con picos claros para la mayoría de los loci. Las muestras de pelo presentaron también bandas claras en los geles de agarosa, pero al revisar los electroferogramas correspondientes (Figura 3-3), se observó que algunos no presentaban picos legibles. En este último caso, se debió realizar una PCR única para cada *sistema* faltante. Luego de verificar su correcta amplificación, (Figura 3-2) fueron enviados para su correspondiente genotipificación



**Figura 3-2.** Gel de agarosa 2%, usado para verificar el éxito de PCR algunos sistemas con dificultades en el éxito de la amplificación.

En el caso del gen citocromo B, se obtuvo una matriz de 37 secuencias correspondientes a: 27 secuencias del departamento de Casanare, 6 del departamento de Arauca, 3 del departamento del Meta y 1 de la especie *Kerodon acróbata*. La última, utilizada como grupo externo, fue obtenida en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, número de acceso GU477346.1). La longitud total de la matriz incluye 809 caracteres de los cuales 163 resultaron polimórficos y 88 de estos fueron informativos bajo el método de parsimonia. Sin tener en cuenta el grupo externo, el total de caracteres polimórficos es de 18 de los cuales 13 son informativos bajo el criterio de parsimonia.

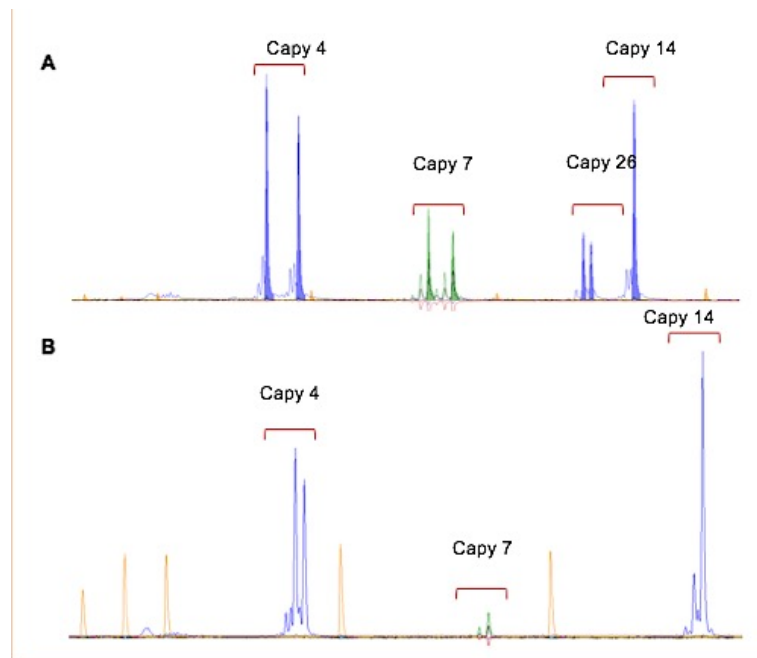
**Tabla 3-1.** Frecuencias de bases de las matrices de secuencias mitocondriales. Incluye grupo externo.

	Frecuencias de bases			
	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<b>Citb</b>	27,58%	12,72%	31,9%	27,8%
<b>Dloop</b>	29,39%	11,32%	25,52%	33,77%

En el caso del fragmento HV1 del gen D-Loop sólo se realizó la amplificación de las 14 muestras colectadas durante los años 2015 y 2016 ya que se contaba con 53 secuencias provenientes del proyecto convenio 298 entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia, componente 4: "Evaluación de algunos parámetros poblacionales de la especie *Hydrochoerus hydrochaeris*, en la llanura aluvial de los departamentos del Meta, Casanare y Arauca, con el objeto de implementar medidas de manejo que permitan dinamizar la cadena de valor comercial derivada del aprovechamiento (Mesa y López 2014). Como resultado se obtuvo una matriz compuesta de 69 secuencias que corresponden a: 56 muestras del departamento de Casanare, 8 del departamento de Arauca, 3 del departamento del Meta, 1 de Paraguay y 1 secuencia del género *Cavia* usada como grupo externo, estas dos últimas descargadas de la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (números de acceso: GU456375.1 y NC\_000884). La longitud total de la matriz incluye 518 caracteres de los cuales 291 resultaron polimórficos y 33 de estos fueron informativos bajo el método de

parsimonia. Para los análisis poblaciones fueron excluidas las secuencias provenientes de Paraguay y la de *Cavia* como grupo externo, para una matriz de 500 pares de bases y un total de 41 caracteres polimórficos de los cuales 28 son informativos bajo el criterio de parsimonia.

Por último, para el análisis poblacional realizado con marcadores microsatelitales, se logró obtener una matriz con un total de 34 muestras distribuidas de la siguiente manera: 23 para el departamento de Casanare, 8 del departamento de Arauca y 3 del departamento del Meta. El número promedio de individuos amplificados para los 8 microsatélites fue de 31.5 individuos.



**Figura 3-3.** Sección de genotipificaciones obtenidas a partir de distintos tipos de muestras para cuatro sistemas microsatelitales. A. muestra de hígado. B. muestra de pelo. En naranja se observa los picos del marcador Liz500.

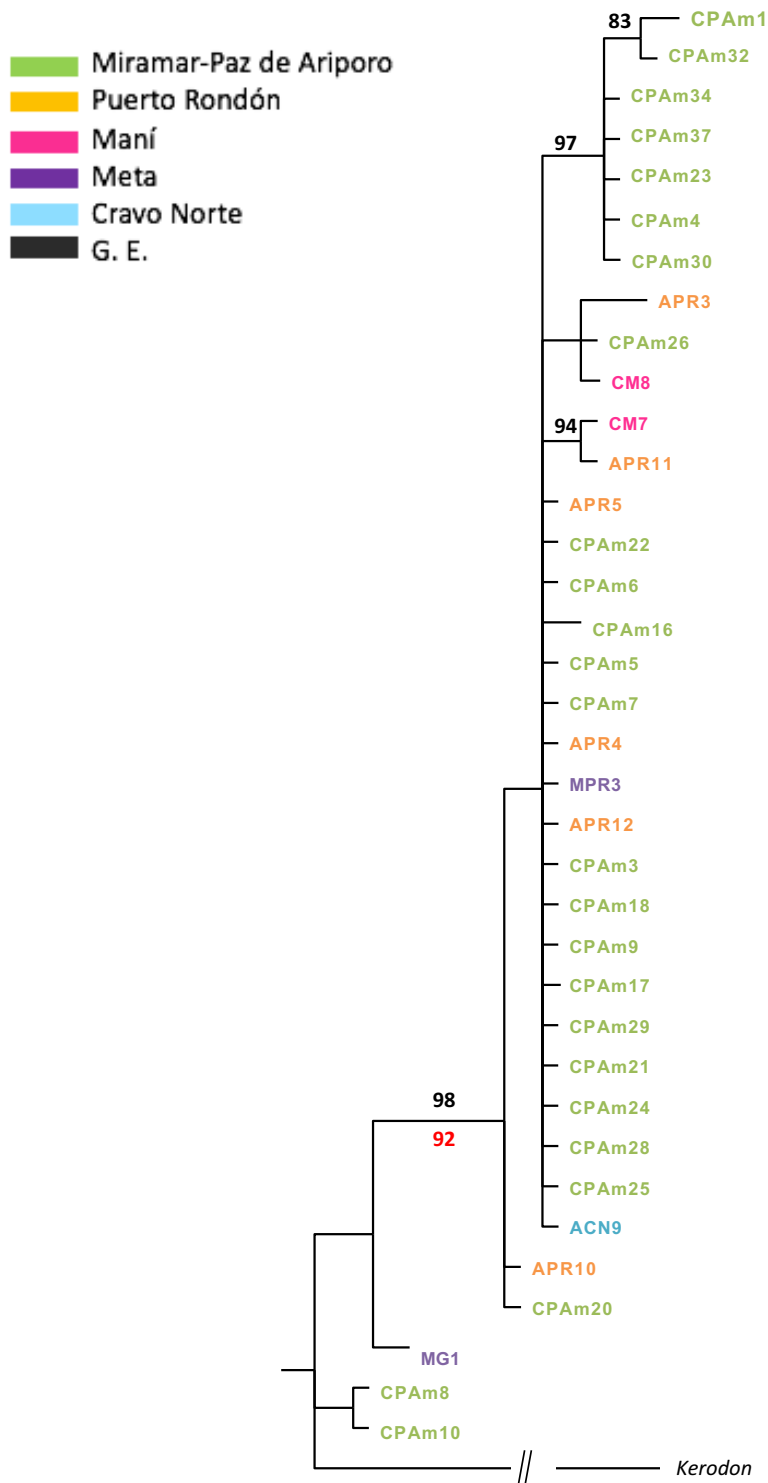


### 3.3 Análisis filogenéticos

#### 3.3.1 Gen citocromo B

Dado que ambos métodos empleados para las reconstrucciones filogenéticas generaron agrupamientos similares o idénticos, se presenta solo uno de los árboles en el cual se indican los soportes (probabilidades superiores al 80% para el análisis bayesiano y porcentaje de bootstrap  $> 80\%$  para el análisis de máxima parsimonia) de las ramas obtenidas en ambos métodos. El árbol seleccionado fue el obtenido por el método bayesiano ya que presentó mayor número de ramas soportadas que el del método de parsimonia (Figura 3-4). Por el método de máxima parsimonia se obtuvo una topología con una longitud de 94 pasos, índice de consistencia (CI) de 0,936 e índice de retención (RI) de 0,951. Para el análisis bayesiano el valor de verosimilitud obtenido fue de -1639,714.

La monofilia de las muestras colombianas de chigüiro no fue soportada por el método bayesiano realizado con el marcador citocromo B, pero si fue soportada por el método de máxima parsimonia (porcentaje del *bootstrap* de 100%). Este marcador mostró un agrupamiento de muestras no concordante con su localización geográfica; en cada agrupación se observan muestras de distintas localidades. La única excepción a esta observación es el agrupamiento de 7 muestras provenientes de Miramar Casanare, sin embargo, al notar que el resto de las muestras de Miramar se agrupan con individuos de otros departamentos, no es posible asumir que este clúster corresponda a una población diferente. Los bajos valores de soporte obtenidos, especialmente con el método de máxima parsimonia, muestran que la ubicación y conformación de las ramas varió bastante a lo largo de las 1000 replicas. Esto sugiere que con el gen citocromo B no es posible conformar agrupaciones significativas entre muestras provenientes de localidades cercanas geográficamente.

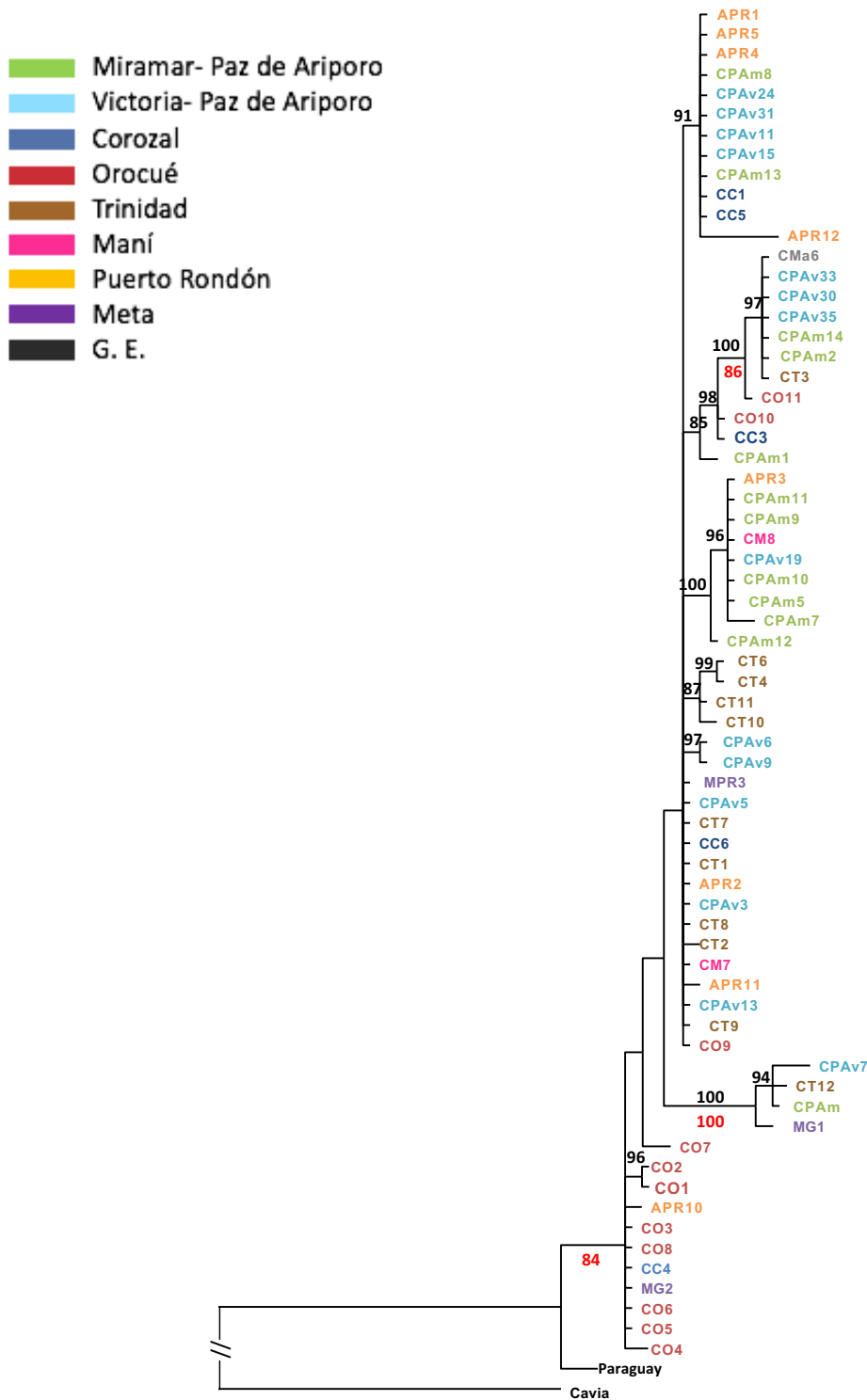


**Figura 3-4.** Árbol filogenético obtenido con el método de bayesiano a partir de secuencias de *citB*, en negro probabilidades a posteriori del análisis bayesiano, en rojo el soporte bootstrap del análisis de parsimonia. Con el método de parsimonia las muestras colombianas forman un clado, con 100% de soporte.

### 3.3.2 Gen Dloop

Al igual que con el gen citocromo B, se presenta un árbol filogenético considerando que ambos métodos empleados para las reconstrucciones presentaron agrupaciones similares o idénticas de las secuencias incluidas. En este caso, el árbol seleccionado fue el obtenido en el método bayesiano ya que presentó mayores ramas soportadas (probabilidades a posteriori >80%) que el método de máxima parsimonia (porcentaje de *bootstrap* > 80%) (Figura 3-5). Por el método de máxima parsimonia se obtuvo una topología con una longitud de 58 pasos, índice de consistencia (CI) de 0,724 e índice de retención (RI) de 0,901. Para el análisis bayesiano el valor de verosimilitud obtenido fue de -1678,405.

Con este marcador es posible observar que solo el método de parsimonia soporta la monofilia de las muestras colombianas (84%). Aunque no cuenta con un soporte superior al 80%, la secuencia de Paraguay se encuentra basal respecto a las muestras de chigüiro colombianas. Con el gen Dloop se observa una mejor resolución evidenciada por mayor número de clústeres y mejor soportados que con el gen citocromo B. La reconstrucción filogenética con el método bayesiano dio valores de probabilidad altos para la mayoría de las agrupaciones mientras que con el método de parsimonia el número de ramas con porcentajes mayores al 80% fue más bajo. Las agrupaciones obtenidas están compuestas por muestras de distintas localidades, y en algunos casos, de distintos departamentos.



**Figura 3-5.** Árbol filogenético por inferencia bayesiana a partir de secuencias del gen Dloop. en negro probabilidades a posteriori del análisis bayesiano, en rojo el soporte bootstrap del análisis de parsimonia, en éste se forma un solo grupo que excluye *Cavia* con un 100% de soporte.

### 3.4 Análisis poblacionales

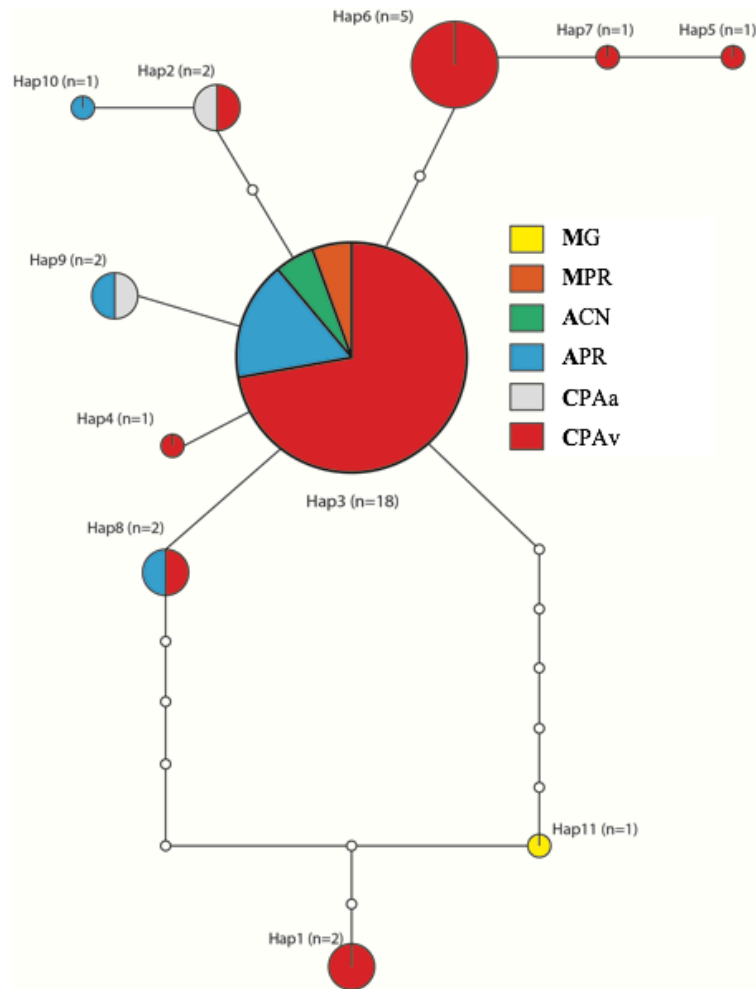
#### 3.4.1 Gen citocromo B

La matriz utilizada para los análisis poblacionales incluyó un total de 37 secuencias excluyendo la muestra de *Kerodon* usada como grupo externo en los análisis filogenéticos, para esta matriz se encontraron un total de 16 sustituciones que corresponden a 11 transiciones y cinco transversiones. En este caso es importante destacar que tres de las seis localidades poseen sólo un individuo. Las tres localidades con más de un individuo mostraron tanto transiciones como transversiones con excepción de la población de Aurora Casanare que solo presenta transiciones (Tabla 3-2). Al traducir las secuencias de nucleótidos a aminoácidos se observó que ninguna de las sustituciones presentes en la matriz generó codones de parada al interior del gen, lo que sugiere que no se estaba secuenciando un pseudogen.

**Tabla 3-2.** Transiciones y transversiones de las distintas localidades incluidas en el análisis del gen citocromo B. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula(s) sin negrilla inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	<b>CPAm</b>	<b>CPAa</b>	<b>APR</b>	<b>ACN</b>	<b>MPR</b>	<b>MG</b>
Transiciones	9	2	4	-	-	-
Transversiones	5	0	1	-	-	-
Sustituciones	14	0	5	-	-	-

Se obtuvieron un total de 11 haplotipos de los cuales cuatro se encuentran en más de una localidad y los otros siete son únicos para las localidades respectivas. El haplotipo de mayor frecuencia es el Hap 3 que se encuentra presente en cuatro de las seis localidades y en los tres departamentos. Las localidades de Puerto Rondón (Arauca), Miramar (Casanare) y Granada (Meta) fueron las que presentaron haplotipos únicos (Figura 3-6).



**Figura 3-6.** Red de haplotipos obtenidos para citocromo B, usando método de parsimonia en el programa TCS V. 1.2.1. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

La diversidad nucleotídica obtenida con el marcador citocromo B fue de 0,0036. Dentro de las localidades muestreadas, se encontró que las muestras de Miramar (Casanare) poseen el mayor número de sitios polimórficos (14), seguidas de Puerto Rondón (Arauca), y luego de Aurora (Casanare) (Tabla 3-3). Este orden se mantiene al observar la diversidad nucleotídica por localidad, se observó también que la diversidad nucleotídica posee valores cercanos entre Miramar y Aurora, a pesar de que el número de secuencias es más alto para la primera (27) que para la segunda (2). Para las localidades de Cravo Norte, Puerto Rico y Granada no fue posible determinar valores de diversidad dado el bajo número de secuencias (Tabla 3-3).

**Tabla 3-3.** Medidas de diversidad para cada localidad con el marcador citocromo B. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	CPAm	CPAa	APR	ACN	MPR	MG
Sitios polimórficos	14	2	5	-	-	-
Diversidad nucleotídica	0.003390 +/- 0.002098	0.003059 +/- 0.003745	0.002170 +/- 0.001698	-	-	-

### Estructura poblacional

Para los análisis de estructura poblacional se estableció que todas las localidades pertenecen a una misma población de acuerdo con los resultados obtenidos en las reconstrucciones filogenéticas. El AMOVA indicó que hay una mayor variación dentro de cada localidad y que la divergencia entre poblaciones es muy baja. Esta tendencia se vio también reflejada por el bajo valor de índice de fijación ( $F_{st}$ ) para toda la población (0,09301 - Tabla 3-4). El P-valor para esta prueba no fue significativo.

**Tabla 3-4.** Resultados obtenidos en el Análisis de varianza molecular (AMOVA) con el marcador citocromo B. P- valor: 0,2583

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre localidades	5	7,718	0,11657	9,3
Dentro de localidades	30	34,104	1,13680	90,7
	35	41,822		FST: 0,09301

El número de migrantes entre localidades fue de 6,1 lo cual refleja una alta conectividad entre localidades. El correlograma de mantel fue descartado para este marcador molecular dada la diferencia en el número de individuos entre poblaciones.

### 3.4.2 Gen Dloop

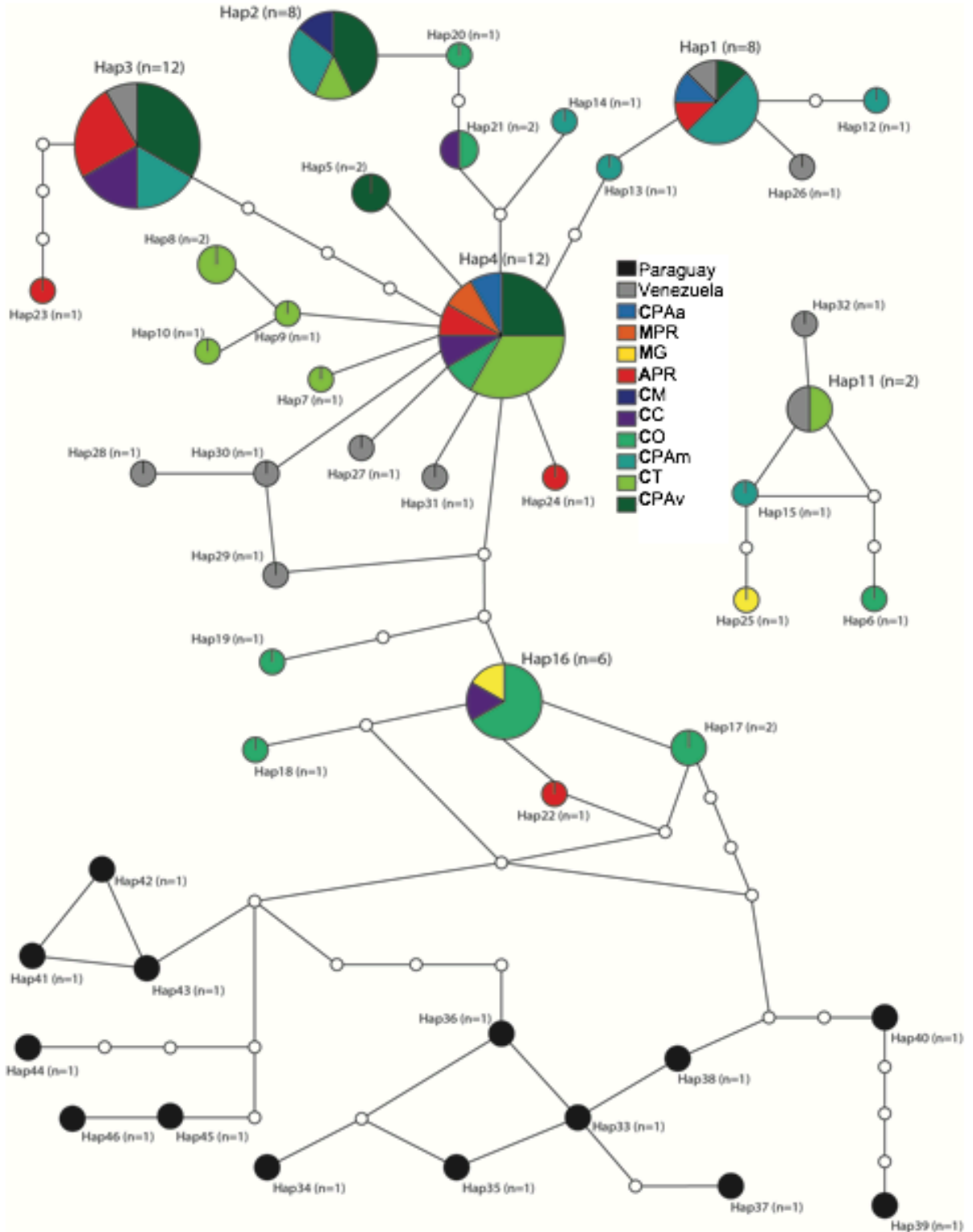
La matriz utilizada para los análisis poblacionales incluyó un total de 67 secuencias excluyendo las secuencias de Paraguay y *Cavia* usadas como grupo externo en los análisis filogenéticos. Para esta matriz se encontraron un total de 42 sustituciones que corresponden a 29 transiciones y 13 transversiones. El número de transiciones y transversiones para cada localidad se observa en la tabla 3-5, con excepción de las localidades de Puerto Rico - Meta y Maní - Casanare ya que estas poseen un único individuo.

**Tabla 3-5.** Transiciones y transversiones presentes en la matriz del gen Dloop para las distintas localidades incluidas. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	CPAv	CT	CPAm	CO	CC	APR	CPAa	MG
Transiciones	18	15	18	7	6	11	3	9
Transversiones	3	4	3	3	0	4	0	2
Sustituciones	21	19	21	10	6	15	3	11

Un total de 46 haplotipos fueron encontrados para la matriz del gen Dloop incluyendo los 14 correspondientes a las poblaciones de Paraguay y siete haplotipos únicos de Venezuela, los otros tres haplotipos de Venezuela también se encontraron presentes en poblaciones colombianas. De los 25 haplotipos encontrados en Colombia siete se comparten entre distintas localidades y 18 son únicos para su respectiva localidad. Los haplotipos de mayor frecuencia son el haplotipo 3 y 4 (n=12) seguidos de los haplotipos 1 y 2 (n=8). La mayor cantidad de haplotipos únicos se encontró en Venezuela (7). En las poblaciones colombianas Orcoué (5) presentó la mayor cantidad de haplotipos únicos (Figura 3-7).





**Figura 3-7.** Red de haplotipos obtenidos para el gen Dloop mediante el método de parsimonia en el programa TCS V. 1.2.1. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

La diversidad de haplotipos más alta se presentó en la localidad de Corozal (Casanare) (0,9), seguida de Puerto Rondon (Arauca) (0,89) y Miramar (Casanare) (0,88). Para todas las localidades se considera que la diversidad genética encontrada es alta con excepción de las localidades de Trinidad (0,62) y Victoria (0,79) las cuales fueron consideradas moderadas (Tabla 3-6).

**Tabla 3-6.** Número y diversidad de haplotipos obtenidos con el gen D-loop, para las distintas localidades incluidas. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	CPAv	CT	CPAm	CO	CC	APR	CM	CPAa	MPR	MG
Número de haplotipos	5	5	7	7	4	6	1	2	1	2
Diversidad de haplotipos	0,79121	0,61818	0,87879	0,87273	0,9	0,89286	1	1	1	1

La diversidad nucleotídica obtenida con el Gen Dloop fue 0,010 para toda la población. La localidad con mayor número de sitios polimórficos es Victoria (21) seguida por Miramar (20) y Trinidad (19). Al observar la diversidad nucleotídica, estas tres localidades se mantuvieron como las más diversas; aunque la localidad de Trinidad presentó el valor más alto (3,66), seguida de Miramar y Victoria. En general se considera que la diversidad nucleotídica reportada es baja para todas las localidades, lo que sugiere que la mayoría de los haplotipos se da por pocas sustituciones nucleotídicas.

**Tabla 3-7.** Medidas de diversidad obtenidas con el gen D-loop para cada localidad. Para las poblaciones de Meta Puerto Rico y Maní Casanare no se presentan resultados ya que poseen solo un individuo. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	CPAv	CT	CPAm	CO	CC	APR	CPAa	MG
sitios polimórficos	21	19	20	10	6	14	3	11
diversidad nucleotídica	0.0091 +/- 0.005	3.664 +/- 2.01	0.0115 +/- 0.007	0.006 +/- 0.004	0.0050 +/- 0.004	0.008 +/- 0.0054	0.006 +/- 0.007	0.022 +/- 0.023

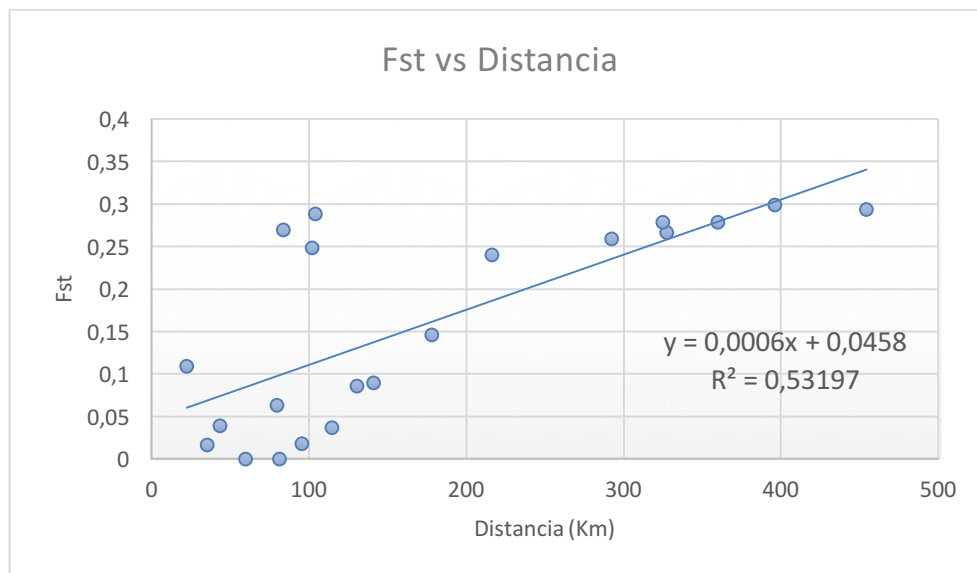
## Estructura poblacional

El estadístico F obtenido a través de la prueba AMOVA ( $F_{st} = 0,1279$ ) es ligeramente superior al obtenido para el marcador citocromo B. Aun así, este resultado sugiere nuevamente que la divergencia poblacional es baja. Esto se debe a que la mayor cantidad de la variación se encuentra dentro de las localidades (87,21%) y no entre éstas (Tabla 3-8). Por otra parte, el número de migrantes obtenido a partir del  $G_{st}$  es de 6,53 sugiriendo nuevamente un alto flujo génico entre poblaciones.

**Tabla 3-8.** Resultados obtenidos en el análisis de varianza molecular AMOVA con el gen Dloop. P-valor: 0,00426

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre localidades	9	38,832	0,32852	12,79
Dentro de localidades	57	127,684	2,24008	87,21
	66	166,684	2,5686	FST: 0,1279

En el análisis espacial de la diversidad (Correlograma de Mantel) se encontró una relación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética para este marcador molecular (Figura 3-8).



**Figura 3-8.** Correlograma de Mantel para el gen Dloop. En el eje X se observa la distancia en Kilómetros y en el eje Y la distancia genética obtenida por el método  $F_{st}$ .

### 3.4.3 Locus microsatelitales

En este análisis, los tres individuos del departamento del Meta fueron incluidos como una sola población y las localidades de Maní - Casanare y Cravo Norte - Arauca tuvieron un sólo individuo. Los loci contaron con representación de todas las localidades con excepción de los loci 9, 24, 25 y 26 de la localidad de Maní. En la localidad de Victoria (Casanare) para el locus 7 se obtuvieron todos los alelos posibles, esto ocurre también con el locus 4 para la localidad del Meta (Tabla 3-9).

**Tabla 3-9.** Número de alelos obtenidos para cada loci. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

<b>Locus</b>	<b>MG</b>	<b>APR</b>	<b>ACN</b>	<b>CPAm</b>	<b>CPAa</b>	<b>CPAv</b>	<b>CPAm</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>CO</b>
CAP 4	5	4	2	2	2	5	2	3	3	2
CAP 7	3	6	1	2	1	8	2	4	2	3
CAP 9	3	5	1	0	1	4	4	2	2	2
CAP 11	5	6	2	2	4	7	4	4	3	5
CAP 14	3	4	2	2	3	4	2	2	3	3
CAP 24	2	5	2	0	2	3	3	3	3	3
CAP 25	4	3	2	0	3	4	3	4	3	3
CAP 26	3	3	1	0	1	5	2	2	3	2

Al comparar con lo reportado por Herrera (2004) para una población de 17 individuos del Hato el Cedral en Venezuela encontramos que en todos los casos se amplió número de alelos obtenidos y el rango de los mismos. Para el locus 24 se obtuvo el mismo número de alelos, pero para ambos estudios se presentan alelos únicos. Para los loci 7 y 14 encontramos que los alelos obtenidos no se sobreponen a los reportados por Herrera (2004). La diferencia entre los rangos reportados para el locus 7 entre la población de Venezuela y las incluidas entre estudio es de 34 pb, lo que sugiere que en poblaciones intermedias pueden presentarse otros alelos no reportados hasta el momento (Tabla 3-10).

**Tabla 3-10.** Número de alelos y rangos de los microsátelites incluidos en este estudio. Nr número de alelos reportados por Herrera (2004) N número de alelos obtenidos.

	Nr	N	Rango de alelos reportados		Rango de alelos obtenidos	
			Min	Max	Min	Max
CAP 4	2	5	190	192	188	196
CAP 7	4	8	272	278	224	238
CAP 9	6	9	152	162	154	172
CAP 11	5	10	226	232	220	238
CAP 14	2	6	285	287	269	281
CAP 24	7	7	145	157	147	165
CAP 25	3	7	260	264	258	274
CAP 26	2	6	274	276	268	282

Para los loci 4 y 14 se obtuvieron alelos de todas las 34 muestras incluidas, los loci 7 y 9 fueron los que presentaron menor éxito en la obtención de alelos contando sólo con 29 y 28 muestras respectivamente. El índice informativo de Shannon fue mayor para los loci 11 (2,09), 7 (1,88) y 9 (1,83). Los valores de heterocigosidad esperada fueron mayores a la observada para todos los loci con excepción del locus 4 indicando un exceso de individuos homocigotos (Tabla 3-11). La prueba de exceso de heterocigosidad sugiere la presencia de eventos de cuello de botella recientes ( $P=0,0312$ ).

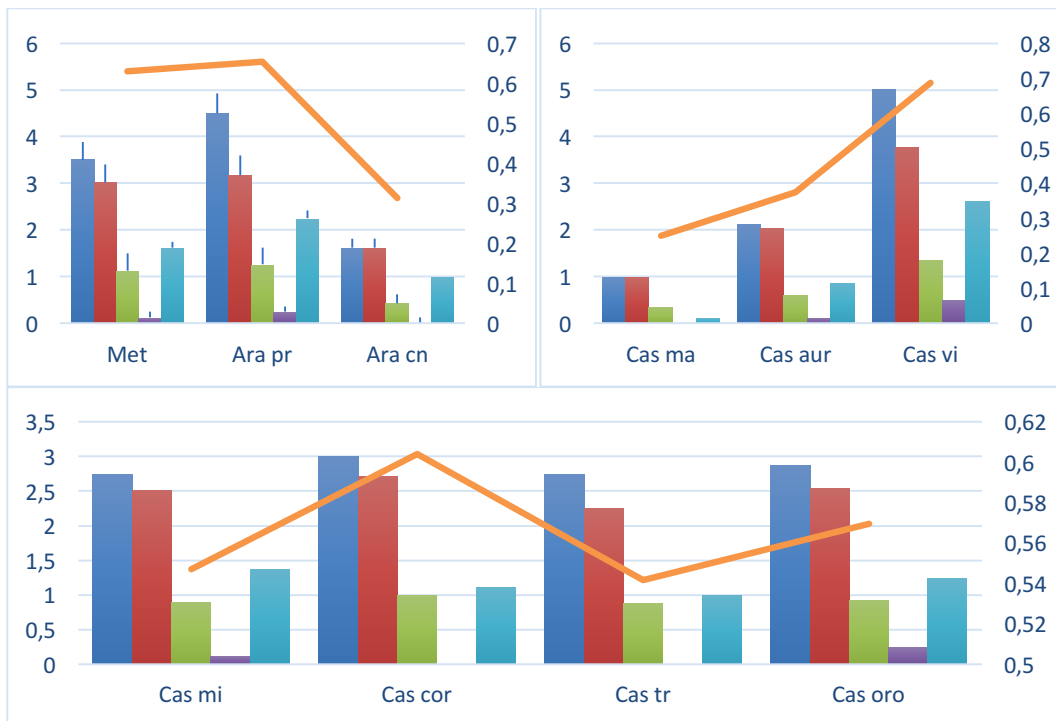
**Tabla 3-11.** Parámetros de diversidad para cada locus. N: número de individuos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, F: Índice de fijación.

Locus	N	I	Ho	He	F
CAP 4	34	1,430	0,765	0,741	-0,032
CAP7	29	1,885	0,621	0,828	0,250
CAP9	28	1,832	0,357	0,807	0,557
CAP11	32	2,095	0,844	0,863	0,022
CAP14	34	1,483	0,500	0,749	0,333
CAP24	31	1,767	0,516	0,812	0,364
CAP25	33	1,779	0,576	0,811	0,290
CAP26	31	1,196	0,355	0,590	0,399

Con excepción de Cap 4, Cap 7 y Cap 25, fue posible encontrar algunos alelos únicos en cada locus para determinadas localidades. En el caso de Cap 26 se encontró que tres de los

seis alelos corresponden únicamente a la localidad de Victoria (Casanare) y además que aproximadamente la mitad de los alelos corresponden al alelo 270 (Anexo 5).

Las localidades de Meta, Puerto Rondón, Aurora, Victoria, Miramar y Orocué presentaron alelos privados, la localidad de Victoria es la que presenta mayor número de alelos, esta localidad fue también la que presentó un mayor número de alelos compartidos y la heterocigosidad más alta. La heterocigosidad fue igual en las poblaciones de Cravo Norte (Arauca) y Maní (Casanare) y fue la más baja (0.3), estas dos poblaciones cuentan con sólo individuo cada una (Figura 3-9).



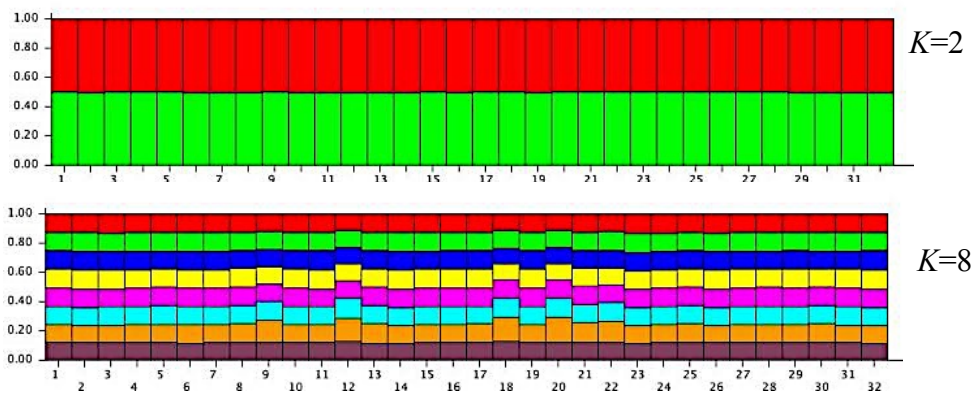
**Figura 3-9.** Comportamiento de los alelos en distintas poblaciones. Azul Número de alelos, Rojo Número efectivo de alelos, Verde Índice de Shannon, Morado Número de alelos privados, Azul claro Número de alelos comunes (presentes en más del 50% de las localidades) y naranja heterocigosidad esperada. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

Cuatro de los ocho loci difieren significativamente del equilibrio Hardy – Weinberg (9, 14, 24, 26) después de aplicar la corrección de Bonferroni (0,0063). No se encontró desequilibrio de ligamiento entre ninguno de los pares de loci. Para tres de los cuatro loci

en desequilibrio se reporta la posibilidad de presentar alelos nulos (14, 24 y 26), lo cual explicaría el patrón reportado. Al no reportarse la posible presencia de alelos nulos en el locus 9, la presencia de desequilibrio debe tener una explicación diferente.

### Estructura poblacional

Teniendo en cuenta los parámetros y requisitos establecidos por el programa a Structure (Pritchard *et al.* 2000), se realizó el análisis usando solamente los 4 loci que se encuentran bajo equilibrio Hardy – Weinberg. Bajo ninguno de los k establecidos se encontró agrupamiento de las muestras por lo que se asume que todos los individuos muestreados pertenecen a una misma población.



**Figura 3-10** Estructura poblacional de chigüiro en los llanos orientales colombianos. Estimado a partir de los microsatélites 4, 7, 11 y 25. K=2: dos poblaciones, K8= 8 poblaciones.

El análisis de varianza molecular fue realizado con todos los loci y con los loci en equilibrio. El valor obtenido para  $F_{st}$  correspondió a 0,083 con todo los loci y 0,089 con los loci en equilibrio, lo que indica que la variación entre localidades es bastante baja al igual que con citocromo B y Dloop. Aunque los valores de  $F_{st}$  obtenidos en ambos conjuntos de datos son muy similares, el P- valor solo fue significativo para los loci en equilibrio (Tabla 3-12).

La mayor variación fue observada dentro de localidades. El Fis obtenido a partir de los marcadores microsatelitales corresponde a 0,233 y puede indicar un exceso de homocigotos. Por último, el número de migrantes de 2,96 es más bajo que el obtenido con los marcadores mitocondriales, pero sigue mostrando una conexión entre las poblaciones establecidas (Tabla 3-12).

**Tabla 3-12.** Análisis de varianza molecular AMOVA a partir de marcadores microsatelitales. P-valor: 0,0299.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre localidades	7	13.203	0.10550	8.86
Dentro de localidades	56	60.782	108.539	91.14
				<b>FST: 0,08859</b>

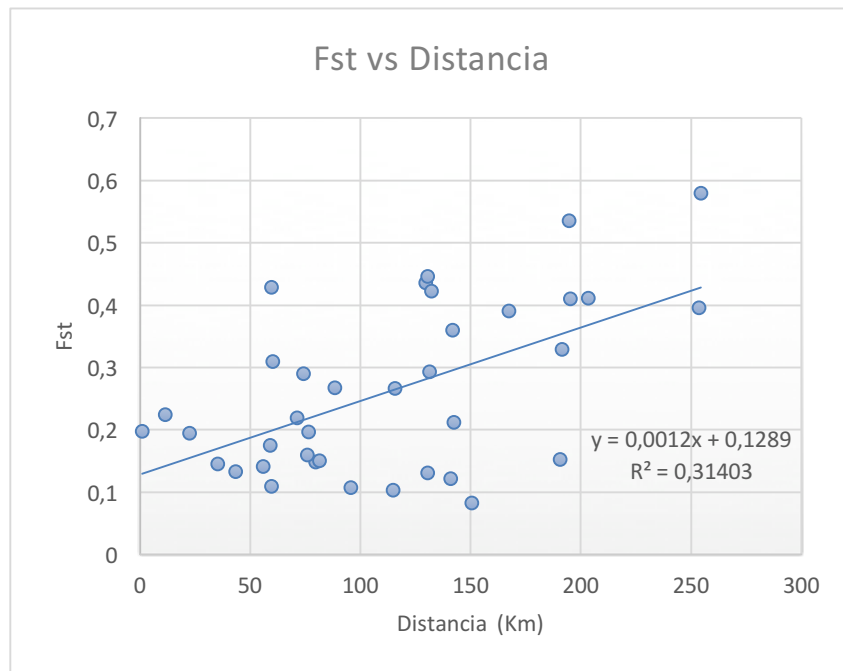
Los valores de Fst más bajos se presentan entre las localidades de Puerto Rondón con Meta y Corozal con Orocué, mientras que los valores más altos los presenta la población de Maní Casanare con Aurora, Cravo Norte y Orocué (Tabla 3-13).

**Tabla 3-13.** Valores de Fst obtenidos para la comparación de las distintas localidades con loci microsatelitales. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

	MG	APR	ACN	CM	CPAa	PAv	CPAm	CC	CT	CO
<b>MG</b>	*									
<b>APR</b>	0,089	*								
<b>ACN</b>	0,259	0,197	*							
<b>CM</b>	0,411	0,395	0,579	*						
<b>CPAa</b>	0,242	0,175	0,428	0,535	*					
<b>CPAv</b>	0,078	0,103	0,266	0,390	0,219	*				
<b>CPAm</b>	0,122	0,131	0,293	0,436	0,290	0,133	*			
<b>CC</b>	0,118	0,109	0,309	0,410	0,224	0,150	0,148	*		
<b>CT</b>	0,111	0,121	0,360	0,422	0,267	0,145	0,194	0,107	*	
<b>CO</b>	0,136	0,152	0,329	0,446	0,212	0,159	0,196	0,082	0,141	*

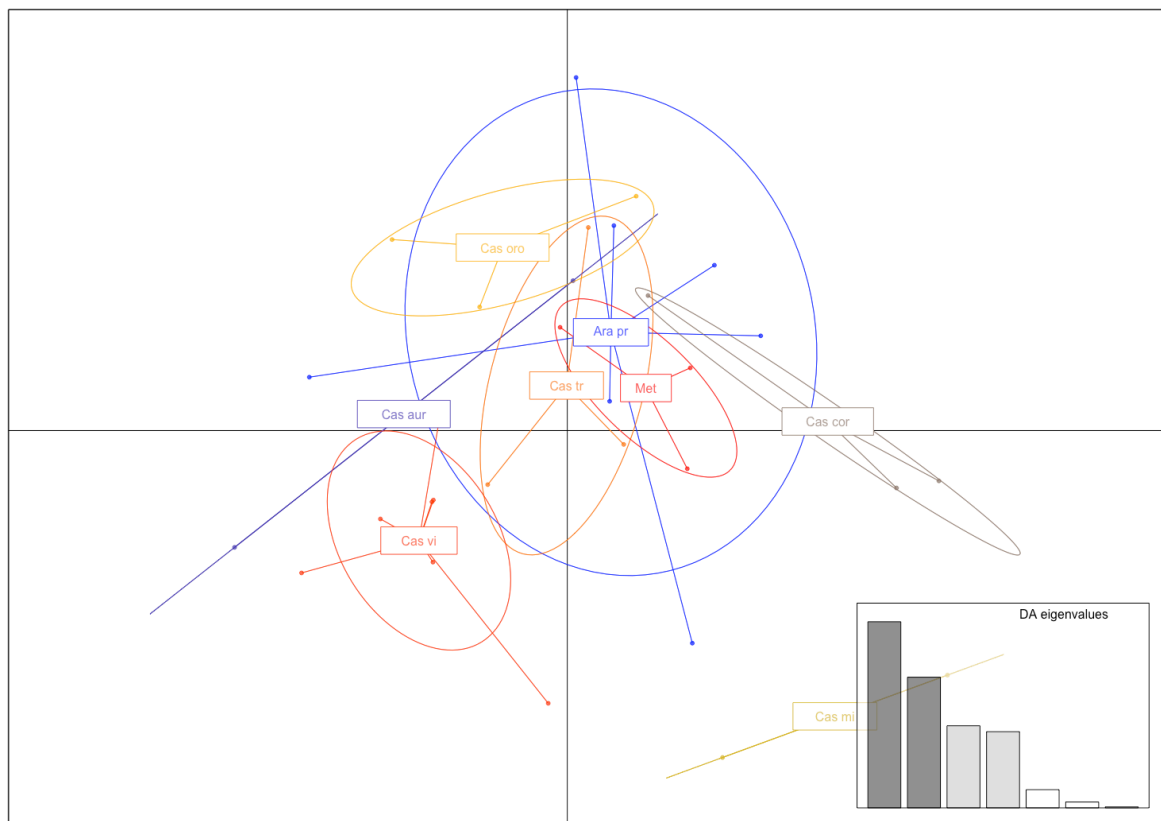


En un primer análisis espacial de la diversidad (Correlograma de mantel), se encontró que las muestras del departamento del Meta a pesar de estar alejados por la distancia geográfica, genéticamente no se separaban de los demás individuos incluidos. En un segundo análisis, excluyendo esta localidad, se observó una relación directa entre la distancia genética y geográfica (Figura 3-11).



**Figura 3-11.** Correlograma de Mantel elaborado a partir de marcadores microsatelitales usando el programa GENALEX V. 6.5. En el eje X se observa la distancia en Kilómetros y en el eje Y la distancia genética obtenida por el método Fst.

El DCPA muestra cómo se relacionan las poblaciones establecidas entre sí, en este caso se observa que, con excepción de la localidad de Miramar, todos presentan algún grado de solapamiento entre sí.



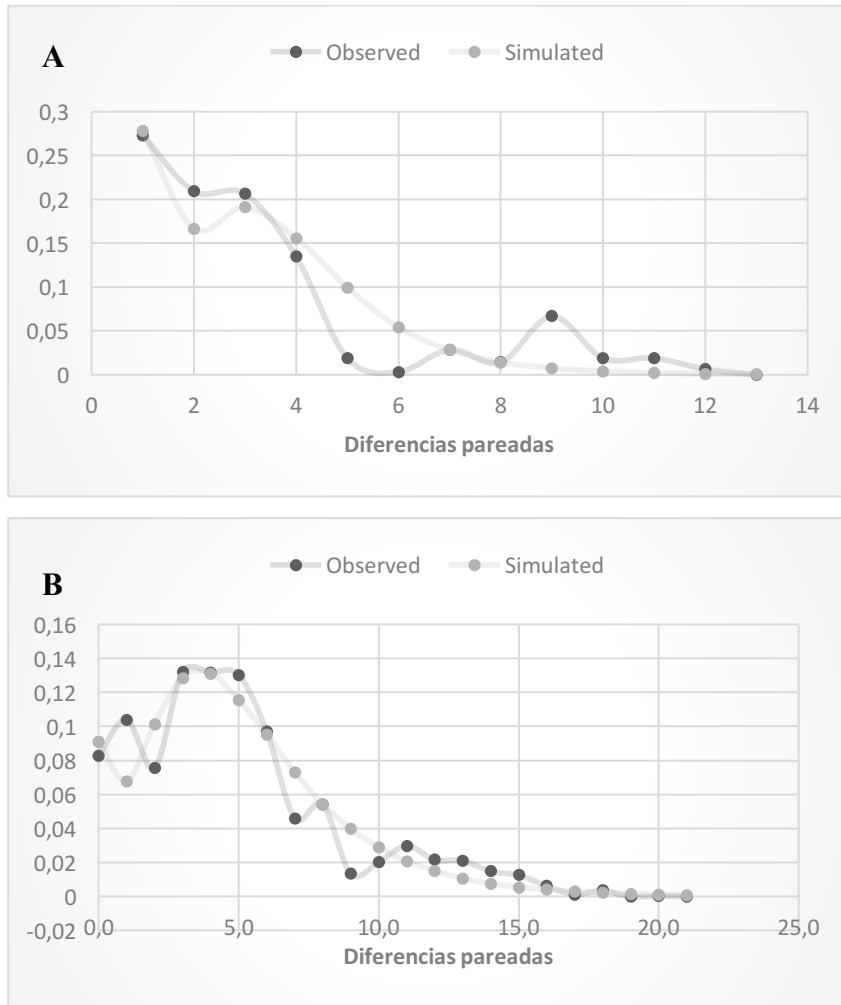
**Figura 3-12.** Análisis discriminante (DAPC) elaborado a partir de marcadores microsatelitales.

### 3.5 Análisis filogeográfico

El análisis de clados anidados fue realizado con los genes mitocondriales de manera individual, para el caso de citocromo B no fue posible obtener resultados significativos en la prueba, probablemente porque el rango geográfico y el número de haplotipos no fue suficiente para probar la hipótesis establecida. Con el gen Dloop se obtuvieron algunos valores significativos, por lo cual fueron analizados a través de la clave establecida por el mismo autor. Como resultado se evidenció que la información obtenida proporciona una salida inconclusa relacionada posiblemente con que el rango geográfico no es lo suficientemente amplio para establecer los posibles eventos históricos.

La prueba de distribución *mismatch* realizada con ambos genes mitocondriales de manera separada muestra resultados contrastantes: por un lado, con el marcador citocromo B se

encontró que no se evidencia una expansión poblacional. Por otra parte, el gen Dloop si sugiere la existencia de una expansión poblacional la cual a la vez puede verse soportada por los resultados obtenidos en las pruebas de neutralidad (Tajima's  $-1,28462$  P-valor  $0,0836$  y Fu's  $-25,559$  P-valor  $0$ ).



**Figura 3-13.** Análisis de distribución mismatch A. Gen citocromo B ( $\theta= 1,003$   $T=1,166$ ) B. Gen Dloop ( $\theta= 2,774$   $T=2,611$ ).



## **4. Discusión**

A la fecha, la mayoría de estudios de la genética poblacional de *H. hydrochoerus* han sido realizados con el gen mitocondrial Dloop. El uso de tres marcadores, dos de herencia uniparental y uno de herencia biparental en el presente estudio permitió, además de comparar su efectividad para el análisis poblacional, confrontar algunos patrones de diversidad genética de las poblaciones distribuidas a nivel continental. En esta sección se procede en primer lugar a discutir la efectividad de cada uno de los marcadores para los análisis poblacionales. En segundo lugar, se comparan la diversidad genética y estructura poblacional observadas para las poblaciones colombianas con aquellas reportadas en otros estudios. Finalmente, se discute la expansión demográfica inferida a partir de una aproximación filogeográfica.

### **4.1 Eficiencia de los marcadores para el análisis poblacional**

La diversidad genética y nucleotídica calculada con los marcadores mitocondriales fue mayor para Dloop que para citocromo B, lo cual se debió principalmente a que Dloop es un gen no codificante con una tasa de variabilidad mayor (Arif y Khan, 2009). Cabe denotar que este resultado no representa una generalidad; en un estudio filogeográfico del *Pecari tajacu* que usó ambos marcadores, el gen citocromo B presentó un mayor número de haplotipos y una mayor diversidad nucleotídica y haplotípica que el gen Dloop en algunas de las localidades muestreadas (Sabogal Rodríguez 2011).

Las distancias genéticas estimadas a partir de los marcadores mitocondriales no fueron concordantes entre sí. Las localidades que fueron similares entre sí a nivel genético con

citocromo B (valores bajos de  $F_{st}$ ), no lo hicieron con el gen Dloop (valores altos de  $F_{st}$ ) y viceversa (e.j. Miramar - Aurora). Sin embargo, considerarlos en conjunto puede ser útil para contrastar y explicar algunos de los patrones observados a nivel de diversidad genética o estructura poblacional (ver secciones siguientes). Además, estas distancias no mostraron tener relación alguna con la separación geográfica de las localidades. Los microsatélites, por otra parte, mostraron que las localidades comparten los alelos encontrados y que los loci analizados presentan una diversidad alta dentro de cada una de las mismas. Estos marcadores proporcionaron valores de diferenciación bajos entre las localidades estudiadas y además soportaron una relación lineal entre la distancia genética y la distancia geográfica. Considerando que su variabilidad fue mayor dentro de las localidades estudiadas y no entre ellas, los microsatélites podrían tener una resolución adecuada para realizar comparaciones entre individuos de una misma población para esta especie (ej. estudios de parentesco).

## 4.2 Diversidad genética

Si se define la diversidad genética como el número de sitios polimórficos y de haplotipos, es posible afirmar que la población colombiana es de las más diversas de Suramérica (39 sitios polimórficos y 25 haplotipos). Sin embargo, debe considerarse que estas dos variables pueden verse afectadas por la longitud de las secuencias obtenidas que para este estudio incluyen valores desde 245 pb (Argentina) hasta 545pb (Venezuela). Por ejemplo, aunque se observa un menor número de haplotipos y sitios polimórficos en las poblaciones de Argentina (8 y 10) (Byrne *et al.* 2015) comparando con Paraguay (21 y 12) (Campos Krauer y Wisely 2011) y Venezuela (23 y 10) (Borges Landáez *et al.* 2012), si se reduce la longitud de los haplotipos de Paraguay y Venezuela a la misma longitud que las de Argentina (245pb) el número de haplotipos se reduciría a 8 y 5 respectivamente (Byrne *et al.* 2015). En las poblaciones de Venezuela y Argentina se observa además que más del 50% del total de los individuos corresponden a sólo dos haplotipos, en Colombia los dos haplotipos más frecuentes suman el total del 35% de los individuos.

La diversidad nucleotídica observada en la población colombiana puede considerarse baja si se compara con otros estudios de poblaciones en Suramérica. La diversidad nucleotídica reportada para Paraguay (0,016) (Campos Krauer y Wisely 2011) es ligeramente más alta a la reportada en este estudio (0,010). Una población del occidente amazónico (muestras de Ecuador, Brasil y Perú) presentó valores de diversidad nucleotídica de 0,018 y haplotípica de 0,97 (Ruíz García *et al.* 2015), que nuevamente son superiores a los observados. Adicionalmente, en esta población amazónica, se observó el mismo patrón con el marcador citocromo B: la diversidad haplotípica del occidente amazónico fue igual a 0,90 y nucleotídica igual a 0,0079, mientras que para los llanos colombianos fue de 0,78 y 0,0036, respectivamente.

En los llanos venezolanos es donde se observan unas condiciones ambientales más similares a las de la región de este estudio. De hecho, con esta región se comparten las presiones por cacería y conflictos con poblaciones humanas. La diversidad haplotípica reportada para esta región es de 0,76 y la nucleotídica de 0,0065 (Borges Landáez *et al.* 2012), las cuales resultan más bajas que las de los llanos colombianos. Sin embargo, al considerar datos de todo el continente, es posible observar que las poblaciones de Colombia y Venezuela poseen los valores más bajos.

Los marcadores microsatelitales demostraron que la población colombiana y venezolanas presentan un grado de diferenciación a nivel genético. La heterocigosidad observada para la mayoría de los loci fue mayor en las poblaciones colombianas (0,355 – 0,844) que en las venezolanas (0,294 – 0,8) siendo la excepción los loci 9 y 24 presentando valores menores (0,357 y 0,516 para las poblaciones colombianas y 0,8 y 0,524 para las venezolanas respectivamente) y el locus 14 (0,5) que presentó el mismo valor. En las localidades colombianas encontramos un mayor número de alelos por cada loci. Al comparar los alelos de la localidad venezolana con la localidad colombiana más cercana geográficamente (Cravo Norte, Arauca), se observa que seis de los trece alelos se encontraron dentro del rango reportado por Herrera (2004), por lo que se asumen que son alelos compartidos. Por otra parte, se encontró que los loci 7 y 14 no presentaron para ninguna localidad colombiana (incluyendo Cravo Norte) un alelo compartido con la localidad venezolana.

Para las localidades colombianas, la heterocigosidad observada fue inferior a la esperada en todos los loci con excepción del locus 4, indicando que para esta población se presenta un exceso de homocigotos. Este resultado puede ser atribuido a la existencia de eventos recientes de cuello de botella, lo cual es soportado por la prueba de exceso de heterocigosidad.

### 4.3 Estructura poblacional

Similar a lo encontrado a nivel de diversidad, la población colombiana presentó una menor estructuración poblacional ( $F_{st}=0,13$   $N_{m_{Dloop}}=6,53$   $N_{m_{cib}}=6,1$ ) que aquellas de Venezuela ( $F_{st}=0,28$ ), Paraguay ( $F_{st}=0,38$ ), y Argentina ( $F_{st}=0,43$ , entre poblaciones de una misma cuenca). A pesar de tener condiciones ambientales y área de muestreo similares, en la región de los llanos venezolanos se observó una mayor estructuración poblacional. Este resultado contradictorio podría estar relacionado con una mayor restricción en el flujo génico ocasionada por la presión más fuerte de cacería furtiva e ilegal que se presenta en la región (Borges Landáez *et al.* 2012).

Los resultados indicaron que el río Meta puede no ser una barrera para el flujo genético como se había propuesto anteriormente (Correa y García *et al.* 2014). Las localidades de Granada y Puerto Rico (Cuenca del río Ariarí) resultaron ser tan diferentes genéticamente entre sí, como genéticamente diferentes de otras localidades al Norte del río Meta (Casanare y Arauca). A pesar de que la parte sur de los llanos orientales no presenta periodos de inundación marcados como en la parte norte (Rippstein *et al.*, 2001), los ríos grandes a lo largo de todo el territorio (como el Ariarí, Manacacias, Yucao, Tomo, entre otros) podrían estar sirviendo como corredores de flujo genético.

La ausencia de estructura poblacional fue soportada por el DAPC y su correspondiente matriz de correcta asignación. Este análisis mostró que la mayoría de los individuos



incluidos en el estudio pueden ser asignados a una localidad diferente a la que pertenecen sin importar incluso la distancia entre localidades.

Al encontrar haplotipos compartidos con localidades venezolanas es posible asumir que la población se extiende también hasta ese territorio. Igualmente, al observar que los haplotipos de Paraguay si difieren de los colombianos y venezolanos podría sugerirse la región de todos los llanos orientales como una sola unidad evolutiva.

Aunque en general no se observó una estructuración, los marcadores microsatelitales mostraron que existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica ( $R^2=0,314$ ). Una relación más fuerte entre estas dos variables fue encontrada con el gen Dloop para la población de los llanos venezolanos ( $R^2 = 0,778$ ) que para la población colombiana ( $R^2=0,532$ ). En el estudio de las poblaciones venezolanas se interpreta esta relación desde dos perspectivas: la primera, que es que es una evidencia de que los factores naturales están influyendo sobre la estructura poblacional encontrada. Y, la segunda, que la relación sugiere que las restricciones ejercidas por la cacería entre los hatos estudiados podrían estar actuando de forma proporcional a la distancia, quedando su influencia enmascarada con la influencia de los factores ambientales (Borges Landáez *et al.* 2012). Realizar este mismo análisis con marcadores microsatelitales en los llanos venezolanos podría determinar finalmente la causa de la estructura genética encontrada en las poblaciones que allí habitan.

La diversidad genética de las localidades colombianas muestra patrones diferentes al observar los distintos marcadores utilizados. La diversidad haplotípica encontrada en los llanos orientales colombianos con el gen Dloop es considerada de moderada a alta siendo la más alta la de la localidad de Corozal (0,9) y la más baja la de Trinidad (0,62). Por otra parte, la diversidad nucleotídica sólo fue alta en la localidad de Trinidad (3,664) mientras que para las demás localidades fue bastante baja (0,005-0,012). Al comparar la heterocigosidad de los loci microsatelitales de las poblaciones colombianas con la venezolana se encontró que cuatro de las diez poblaciones (Meta, Cravo Norte, Corozal y Orocué) poseen heterocigosidades mayores, también es posible afirmar que en estas cuatro

localidades la heterocigosidad observada es mayor a la esperada como también ocurre en la población venezolana. Las poblaciones Victoria, Trinidad y Puerto Rondón por lo contrario presentan heterocigosidades observadas más bajas que las esperadas.

**Tabla 4-1.** Heterocigosidad observada y esperada promedio para las poblaciones incluidas en este estudio y la población del Hato el Cedral en Venezuela. En mayúscula y negrilla inicial del departamento, en mayúscula inicial(es) municipio, en minúscula localidad.

Pop	Ho	Sd	He	Sd
<b>MG</b>	0,729	0,126	0,630	0,048
<b>APR</b>	0,551	0,073	0,654	0,043
<b>ACN</b>	0,625	0,183	0,313	0,091
<b>CM</b>	0,500	0,189	0,250	0,094
<b>CPAa</b>	0,375	0,157	0,375	0,113
<b>CPAv</b>	0,545	0,098	0,687	0,046
<b>CPAm</b>	0,563	0,113	0,547	0,058
<b>CC</b>	0,625	0,117	0,604	0,040
<b>CT</b>	0,417	0,077	0,542	0,031
<b>CO</b>	0,604	0,099	0,569	0,044
<b>Venezuela</b>	0,577	0,204	0,504	0,149

#### 4.4 Expansión demográfica

Las poblaciones de la especie *H. hydrochoerus* a lo largo de Suramérica, han presentado procesos de expansión reciente. En el presente estudio se encontró que el gen Dloop proporciona evidencia de un evento de expansión poblacional reciente en la región de los llanos orientales colombianos, mientras que el gen citocromo B sugiere que no. En Paraguay al igual que en el occidente amazónico y *H. isthmius* en el noroccidente colombiano, el gen Dloop proporciona evidencia que coincide con lo obtenido para la población colombiana ya que en este caso también se observó una expansión reciente de la especie en el análisis de mismatch (Campos-Krauer y Wisely 2011; Ruíz García *et al.* 2015).

Ruiz García et al. (2015) sugieren que la expansión poblacional observada en distintas poblaciones a lo largo de Suramérica podría coincidir con el periodo de glaciación de Mindel-Kansas (0.5-0.25 MA) en el cual los bosques tropicales fueron transformados en sabanas que facilitaron la expansión de las poblaciones de chigüiro, en la actualidad la transformación de bosques en sabanas parece propiciar la expansión de las poblaciones de chigüiro en el Gran Chaco Paraguay (Campos-Krauer y Wisely 2011).

Por otra parte, al observar la red de haplotipos encontramos que algunos haplotipos de la región de los llanos orientales (Hap 6, 11, 15, 25 y 32) se encuentran más separados del resto que incluso los haplotipos paraguayos, igualmente el haplotipo 12 que es uno de los que presenta mayor abundancia, se encuentra distante del otro haplotipo más abundante (Hap 4). Una posible explicación a este patrón es el surgimiento de distintos arcos geológicos que han aparecido en distintos momentos en la formación de la cuenca amazónica como se conoce hoy día, estos arcos han funcionado como barreras geográficas temporales aislando distintos territorios de la cuenca amazónica y del Orínoco. Un ejemplo de estos es el arco del Vaupés que ocurrió hace aproximadamente 8-10 MA (Mioceno) aislando territorios entre la amazonia y el Orinoco que hoy se encuentran conectados (Ruiz García et al. 2016).

#### **4.5 Consideraciones para la conservación de la especie**

Aunque las poblaciones parecen recuperarse rápidamente después de fuertes eventos de mortandad, una comparación temporal muestra una disminución en el tamaño de la población en el municipio de Paz de Ariporo – Casanare (Tiboche-García 2016). Como resultado de las características reproductivas propias de la especie y otras posibles variables, las poblaciones de chigüiro parecen recuperarse rápidamente después de un evento fuerte de mortandad como el reportado en el año 2014 (Paz de Ariporo Casanare), un análisis comparativo entre la misma temporada climática del 2005 y el 2015 permitió observar una disminución poblacional pasando de 12802 individuos a 12407 individuos.

Entre las causas mencionadas se incluyen la expansión de los cultivos de arroz, palma de aceite y la extracción petrolera que se han venido intensificando en la región desde el año 2007 (Tiboche-García 2016).

La implementación de marcadores microsatelitales permite evaluar el efecto de eventos de mortandad como los registrados para el año 2014 en Paz de Ariporo. La presencia de eventos de cuello de botella, previamente sugeridos por distintos estudios (Correa- García 2014 y Maldonado - Chaparro *et al.* 2011) y confirmada en este estudio a partir de marcadores microsatelitales, evidencia el efecto provocado por la caza indiscriminada de la especie, el uso de estos mismos marcadores podría contribuir de igual manera al entendimiento de los efectos de eventos de mortandad como el mencionado previamente para el año 2014 y ayudaría a un mejor entendimiento de la recuperación de las poblaciones previamente nombradas.

Por otra parte, este estudio permitió establecer la conectividad no solo entre las distintas localidades colombianas sino también con el territorio venezolano, lo cual es de utilidad al momento de plantear y ejecutar posibles translocaciones de individuos con el objetivo de aumentar la diversidad genética de la especie o fortalecer poblaciones debilitadas por la cacería extensiva, otros factores a considerar en la viabilidad de estos planes de manejo es un estudio de la localidad receptora de individuos en aspectos como la disponibilidad y calidad de hábitat y la viabilidad del proyecto a futuro (Atuesta-Dimian *et al.* 2014).

Por último, se considera que la información obtenida en este trabajo, provee herramientas de seguimiento a futuro y un mayor conocimiento sobre la especie, lo cual puede ser valioso a la hora de determinar si la especie *Hydrochoerus hydrochaeris* debería ser incluida en la lista de especies amenazadas para el país, pues a la fecha no se encuentra incluida (resolución 1912 de septiembre 2017).

## 5. Conclusiones y recomendaciones

El uso conjunto del gen Dloop y los marcadores microsatelitales permitió un mejor entendimiento de la estructura poblacional de la especie *H. hydrochoerus* en los llanos orientales colombianos. Se recomienda su uso conjunto en futuros estudios poblacionales de otras regiones del continente.

Los individuos de los llanos venezolanos y colombianos deben ser considerados como una sola población al compartir caracteres nucleares y mitocondriales que indicarían la conectividad entre toda la región.

Se encontró una diversidad y estructura genética baja en las poblaciones estudiadas que podría estar asociada a eventos de cuello de botella. Este resultado podría estar asociado a los efectos de la caza furtiva y desplazamiento por ganado.

No se identificaron barreras geográficas que estén influyendo sobre la estructura genética de la especie en la actualidad. Por otra parte, se encontró una relación directa entre la distancia genética y geográfica que podría indicar la influencia de factores naturales sobre las poblaciones. Aunque en la zona sur del río Meta no se presentan inundaciones periódicas que faciliten la conectividad entre poblaciones, la presencia de ríos de gran tamaño y sus afluentes podrían ser los corredores causantes del patrón observado.

Eventos de expansión reciente se registran no sólo para la población colombiana sino en las poblaciones de otras regiones de Suramérica. Estos eventos pueden estar asociados a condiciones climáticas dadas en la formación de la actual cuenca amazónica, que favorecieron la dispersión de la especie por hábitats transformados de bosques a sabanas.

Aunque los estudios realizados en los llanos venezolanos hasta el momento no son suficientes para descartar si la menor diversidad genética y mayor estructura poblacional de esta región son causadas por un mayor efecto de la cacería furtiva, un análisis poblacional con marcadores microsatelitales podría confirmar el efecto de la caza en la estructura poblacional.

## A. Anexo: Frecuencias absolutas de haplotipos del marcador citocromo B

	Cas Miramar	Cas Paz de Aiporo	Ara Puerto Rondón	Ara Cravo Norte	Met Puerto Rico	Met Granada
1	2	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0
3	13	0	3	1	1	0
4	1	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	5	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	0	0
9	0	1	1	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	1

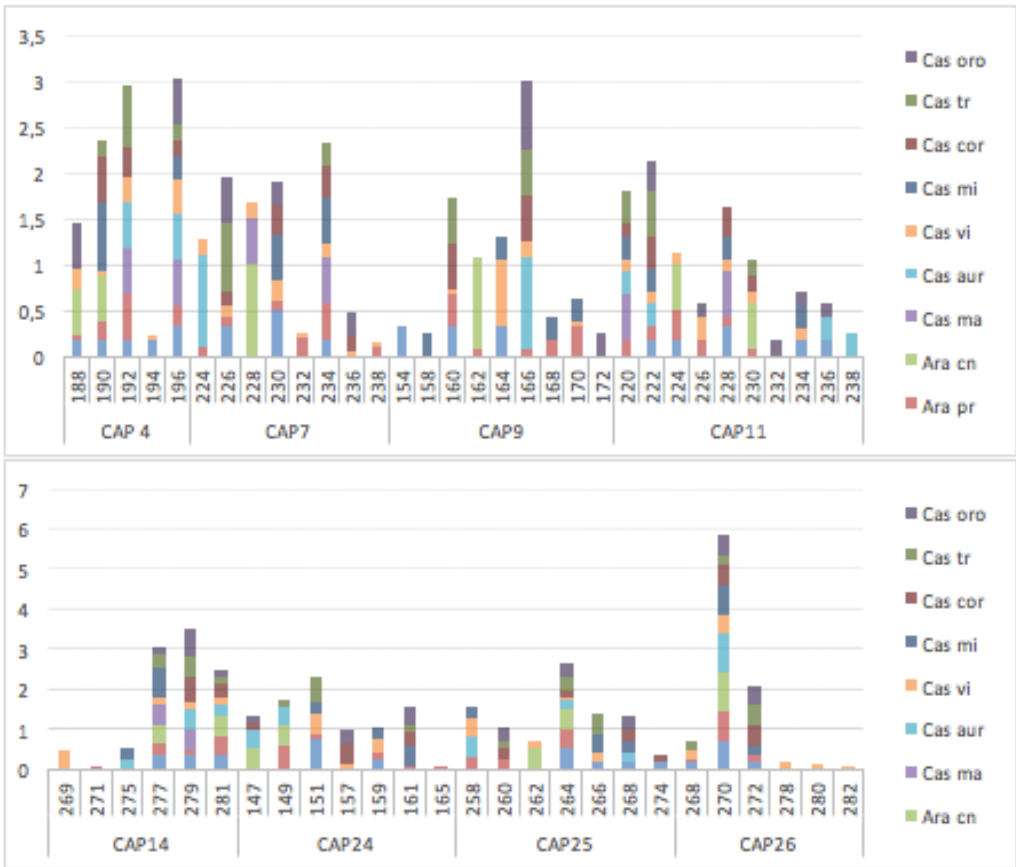




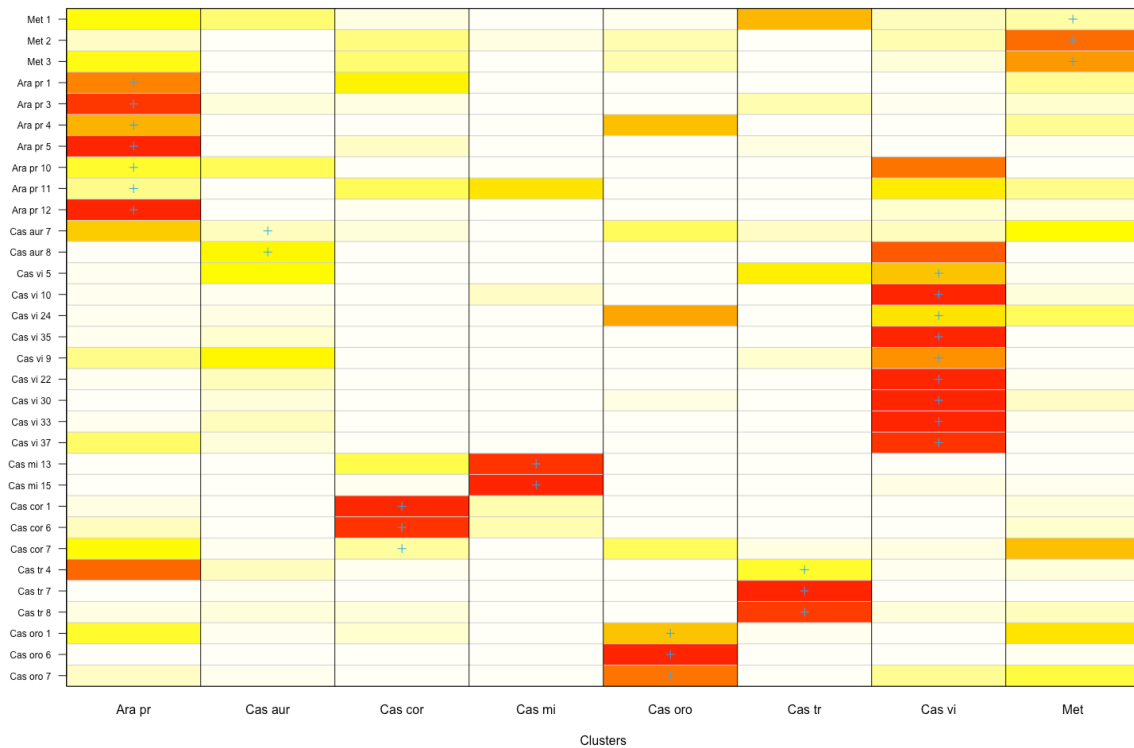




### C. Frecuencias alélicas reportadas en cada población.



## D. Matriz de asignación de muestras a poblaciones



Entre más intenso el color, más alta la probabilidad de que la muestra sea asignada a la respectiva población.

## Bibliografía

- Aldana-Domínguez, J. & D. C. Angel-Escobar. 2007. Evaluación del tamaño y densidad de poblaciones silvestres de chigüiros en el departamento del Casanare. Pp. 33-48, en Aldana-Domínguez J., M. I Vieira-Muñoz & D. Ángel-Escobar (eds.). *Estudios sobre la ecología del chigüiro (hydrochoerus hydrochaeris), enfocados a su manejo y uso sostenible en Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C.-Colombia.
- Aldana-Domínguez, J., Forero, J., Betancur, J. y Cavellier, J. (2002). Dinámica y estructura de la población de chigüiros (*Hydrochaeris hydrochaeris* Rodentia: Hydrochaeridae) de Caño Limón, Arauca, Colombia. *Caldasia*, 24(2): 445-458.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).
- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9-17.
- Armour, J. A., R. Neumann, S. Gobert y A. J. Jeffreys. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*. 3: 599-605.
- Beheregaray, L. B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*.
- Borges-Landáez P., Perdomo G., Herrera E. 2012. Estructura y diversidad genética en poblaciones manejadas de chigüire en los llanos venezolanos. *Interciencia*. VOL. 37 No 3. pp. 227-233, Asociación Interciencia Venezuela.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Byrne, M. S., Quintana, R. D., Bolkovic, M. L., Cassini, M. H., & Túnez, J. I. (2015). The role of river drainages in shaping the genetic structure of capybara populations. *Genetica*, 143(6), 645-656.
- Calderón, H., E. Castilla & F. Lozano. 1975. Aspectos fisiológicos y sanitarios del chigüiro. *Cespedesia* 4(13):15-44.
- Camargo-Sanabria, A., Pardo, L., López Arévalo H., Montenegro O., Sánchez-Palomino P. 2014. Área de acción y movimientos del chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en el municipio de Paz de Ariporo, Casanare, Colombia: Algunas consideraciones para su manejo . En: El

chigüiro *Hydrochoerus hydrochaeris* en la Orinoquía colombiana: Ecología, manejo sostenible y conservación. López, H.F., Sánchez-Palomino, P., Montenegro, O.L.(eds). Biblioteca José Jerónimo Triana No. 25 del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Campos-Krauer, J. M., & Wisely, S. M. (2011). Deforestation and cattle ranching drive rapid range expansion of capybara in the Gran Chaco ecosystem. *Global Change Biology*, 17(1), 206-218.

Clement M, Posada D and Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.

Correa, C., García, L.F. 2014. Caracterización genética de poblaciones silvestres de chigüiro en el Casanare. En: El chigüiro *Hydrochoerus hydrochaeris* en la Orinoquía colombiana: Ecología, manejo sostenible y conservación. López, H.F., Sánchez-Palomino, P., Montenegro, O.L.(eds). Biblioteca José Jerónimo Triana No. 25 del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.

Cruz, C.A. (1974). Notas sobre el comportamiento del chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en confinamiento. En Primer simposio internacional sobre chigüiro y babilla. Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables- INDERENA.

Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13(4), 853-864.

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

González-Jiménez, E. (1995). El capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Estado actual de su producción. Serie FAO Producción y Sanidad Animal 122. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/004/V4590S/V4590S00>.

Herrera, E.A. (1986). Vida en grupos y ecología del capibara. En Memorias X Congreso Latinoamericano de Zoología. Programa Científico. Viña del Mar, Chile.ok

Herrera, E.A. (1992). Growth and dispersal of capybaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* in the Llanos of Venezuela. *Journal of Zoology*, 228: 307-316.

- Herrera, E.A. (2012). Capybara social behavior and use of space: patterns and processes. En J.R. Moreira, K. Ferraz, E.A. Herrer y D.W. Macdonald (Eds) *Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species*. New York: Springer.
- Herrera, E.A. y MacDonald, D.W. (1989). Resource utilization and territoriality in group-living capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Journal of Animal Ecology*, 58: 667-679.
- Herrera, E.A., Chemello, M.E., Lacey, E.A., Salas, V. y Sousa, B.F. (2004). Characterization of micro-satellite markers from capybaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochoeridae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 541-543.
- ICN (Instituto de Ciencias Naturales). 2002. Implementación de la fase inicial del programa de manejo del chigüiro (*Hydrochaeris hydrochaeris*) en semicautiverio, como estrategia de conservación de la biodiversidad en la Orinoquía colombiana y acopio de información complementaria, en Instituto de Ciencias Naturales. Implementación del plan estratégico nacional para la conservación y recuperación de especies de flora y fauna silvestre terrestre y acuática continental amenazadas de extinción. Convenio de Cooperación Científica y Tecnológica No. 085. Ministerio del Medio Ambiente - Universidad Nacional de Colombia. Informe final. Bogotá.
- Instituto Nacional de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente (INDERENA) y Corporación Colombiana de Proyectos Sociales (CORPOS). (1994). Informe final.
- Jorgenson, J. P. (1986). Notes on the ecology and behavior of capybaras in northeastern Colombia. *Vida Silvestre Neotropical*, 1(1): 31-40.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown N. P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson T.J., y Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- López-Arévalo, H. F., P. Sánchez-Palomino & O. L. Montenegro-Díaz (eds.). 2013. El chigüiro *Hydrochoerus hydrochaeris* en la Orinoquía colombiana: Ecología, manejo sostenible y conservación. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Maddison, D. R. and W. P. Maddison, 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a. <http://macclade.org>.
- Maldonado-Chaparro, A. y Blumstein, D. T. (2008). Management implications of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) social behavior. *Biological Conservation*, 141: 1945-1952.
- Maldonado-Chaparro, A. y Sánchez, P. (2010). Seasonal spatial distribution patterns of a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) population in the flooded savannas of Colombia. *Mastozoología Neotropical*, 17(2): 287-294.

- Maldonado-Chaparro, A., Bernal-Parra L.M., Forero G. y Ruiz-García M. (2011). Estructura genética de un grupo de capibaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochoeridae) en los Llanos orientales colombianos. *Revista Biología Tropical*, 59(4): 1777-1793.
- Mesa-González, E., López-Arévalo, H., 2014. Modelo de simulación de la dinámica de poblaciones silvestres de chigüiros *Hydrochoerus hydrochaeris* en el departamento de Casanare. En: El chigüiro *Hydrochoerus hydrochaeris* en la Orinoquía colombiana: Ecología, manejo sostenible y conservación. López, H.F., Sánchez-Palomino, P., Montenegro, O.L.(eds). Biblioteca José Jerónimo Triana No. 25 del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- Mones, A. y Ojasti J. (1986). *Hydrochaeris hydrochaeris*. Mammalian Species Vol. 264.
- Nogueira-Filho, S.L.G. (1996). Criação de capivara. Volume 5. Centro de Produções Técnicas, Viços CPT, M. G. Brasil.
- Oikos. (2003). Caracterización de las poblaciones silvestres de chigüiro y sus hábitats en las sabanas anegables del departamento de Casanare con miras a formular una propuesta de conservación y uso sostenible. Informe final. Gobernación de Casanare-Grupo de Estudios Ecológicos Oikos. Bogotá.
- Ojasti, J. (1973). Estudio biológico del chigüiro capibara. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuaria. FONAIAP. Editorial Sucre: Caracas.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Peceño, M.C. (1983). *Estudio citogenético y genético-evolutivo del "chigüiro", género Hydrochaeris*. (Tesis de pregrado inédita). Licenciatura en Biología, Universidad Simón Bolívar. Caracas.
- Pedro A. Borges Landáez, Giselle Perdomo, Emilio A. Herrera (2012) Estructura y diversidad genética en poblaciones manejadas de chigüire en los llanos venezolanos
- Perdomo, G. 2005. Estructura genética en tres poblaciones de chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de los llanos venezolanos. Tesis de Grado. Universidad Simón Bolívar. Caracas.
- Perea, J. y S. Ruiz. (1977). *Organización social y hábitos territoriales del chigüiro*. (Tesis inédita de pregrado). Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia.ok
- Posada D, Crandall KA and Templeton AR. (2000). GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Molecular Ecology* 9(4):487-488.



- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Quintana, R. y Rabinovich, J. (1993). Assessment of *capybara* (*Hydrochaerus hydrochaeris*) populations in the wetlands of Corrientes Argentina Wetlands. *Ecology and Management*, 2(4): 223-230.
- Rambaut, A. (2014). Figtree, Tree figure drawing tool version 1.4.2. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburg, Germany
- Rippstein, G., Escobar, G., & Motta, F. M. (2001). *Agroecología y biodiversidad de las sabanas en los Llanos Orientales de Colombia*. Cali, Colombia: CIAT.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Ruiz García M., Luengas Villamil K., Leal L., Bernal Parra L., Shostel J.M. (2015). Advances in Genetics Research, Volume 16. Chapter 9. Editor Kevin V. Urbano. ISBN: 978-1-63484-262-4.
- Ruiz-García, M., Luengas-Villamil, K., Pinedo-Castro, M., Leal, L., Bernal-Parra, L. M., & Shostell, J. M. (2016). Continuous Miocene, Pliocene and Pleistocene Influences on Mitochondrial Diversification of the Capybara (*Hydrochoerus Hydrochaeris*; Hydrochoeridae, Rodentia): Incapacity to Determine Exclusive Hypotheses on the Origins of the Amazon and Orinoco Diversity for This Species. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*.
- Sabogal Rodríguez, Sandra Patricia (2011) Filogeografía y conservación genética del pecarí de collar, Pecarí tajacu en cuatro departamentos de Colombia / Phylogeography and conservation genetics of collared peccari, Pecarí tajacu in four Colombian departments. Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Saez, F.A., Drets, M.E. y Brum-Zorilla, N. (1971). Karyotype of the “Carpincho” *Hydrochaeris hydrochaeris uruguayensis* (Rodentia Hydrochaeridae). *Experientia*, 27:5 84–585.
- Sánchez-Isaza, C.A. y Jiménez-Robayo L.M. 2013. Estudio citogenético del chigüiro de la Orinoquía colombiana (*Hydrochoerus hydrochaeris*). En H.F. López-Arévalo, P. Sánchez-Palomino y O. L. Montenegro-Díaz (Eds.), *El chigüiro Hydrochoerus hydrochaeris en la Orinoquía Colombiana: Ecología, manejo sostenible y conservación*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Schlötterer, C. (1998). Microsatellites. En A.R. Hoelzel (Ed.), *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. Oxford: IRL Press.

- Smith, M. F. y Patton, J. L. 1993. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South América: Evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution* 6:89-128.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4.
- Tiboche García, Arlensiu (2016) *Análisis de los cambios en el tamaño, densidad y estructura poblacional del chigüiro (Hydrochoerus hydrochaeris), como herramienta para el establecimiento de una unidad de manejo sostenible en Paz de Ariporo, Casanare*. Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.
- Toonen RJ and Hughes S, (2001) Increased Throughput for Fragment Analysis on ABI Prism 377 Automated Sequencer Using a Membrane Comb and STRand Software, *Biotechniques*, 31:1320-1324.
- Trapido, H. (1949). Gestation period, young, and maximum weight of the isthmian capybara. *Hydrochoerus isthmius* Goldman. *J Mammal*, 30: 433.
- Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilkki y A. MakiTanila. (1998). Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*. 77: 783-790
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. y Gutiérrez-García, T.A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82: 277-297.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-1370.
- Woods, Ch.A y Kilpatrick, W. (2005). Infraorder Hystricognathi Brandt, 1855. En D.E. Wilson y D.M. Reeder (eds.), *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference* (pp. 1538-1600). Washington: Smithsonian Institution Press.