



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



RELACIONES FILOGENÉTICAS DE CÁVIDOS
SUDAMERICANOS BASADAS EN LA REGIÓN CONTROL
DEL DNA MITOCONDRIAL

CRISTIÁN ANDRÉS BARILARI SANTANDER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUIA: ANGEL SPOTORNO OYARZÚN

SANTIAGO – CHILE
2005



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



RELACIONES FILOGENÉTICAS DE CÁVIDOS
SUDAMERICANOS BASADAS EN LA REGIÓN CONTROL
DEL DNA MITOCONDRIAL

CRISTIÁN ANDRÉS BARILARI SANTANDER

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ANGEL SPOTORNO
PROFESOR CONSEJERO : EDUARDO KESSI
PROFESOR CONSEJERO : VICTOR MARTÍNEZ

SANTIAGO – CHILE
2005

Agradecimientos:

Agradezco a todas las personas que me ayudaron a sacar adelante este proyecto y a todas aquellas que confiaron en mí. Un agradecimiento muy especial a Juan Carlos Marín, quien sin su ayuda y constante apoyo, esta tesis no habría sido posible de realizar. Quisiera agradecer también a mi profesor guía, el Dr. Angel Spotorno quien siempre me brindó su apoyo y estuvo siempre dispuesto a ayudarme en lo que fuera.

También quisiera agradecer a mis profesores consejeros, el Dr. Eduardo Kessi y el Dr. Víctor Martínez.

Por último quiero agradecer a mis padres y a mis abuelos por haberme apoyado durante toda la carrera, a mi polola Carolina Ibarra por haber estado siempre ahí para darme ánimo y a mi hijo por haber sido una constante fuente de inspiración.

Dedico esta tesis a mis Abuelos.

Índice:

Resumen	1
Summary	1
Introducción	3
Revisión Bibliográfica	5
<i>Domesticación</i>	5
<i>Cavia porcellus como roedor doméstico</i>	6
<i>Características del comportamiento</i>	8
<i>Clasificación taxonómica</i>	8
<i>Relaciones filogenéticas y DNA Mitocondrial</i>	9
<i>Problema</i>	17
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Materiales y Métodos	20
1.- <i>Especímenes analizados</i>	20
2.- <i>Extracción de DNA genómico a partir de hígado y/o músculo</i>	22
3.- <i>Amplificación de DNA a partir de la técnica de PCR</i>	22
4.- <i>Secuenciación de los fragmentos de DNA</i>	23
5.- <i>Análisis de las secuencias de D-Loop</i>	24
6.- <i>Análisis de las relaciones evolutivas</i>	24
Resultados	27
1.- <i>Análisis de las secuencias de D-Loop</i>	27
2.- <i>Análisis de las relaciones filogenéticas</i>	27
2a.- <i>Máxima Parsimonia</i>	28
2b.- <i>Distancia</i>	29
2c.- <i>Máxima verosimilitud</i>	30
Discusión	41
Conclusiones	47
Bibliografía	48
Apéndice N° 1	51
Apéndice N° 2	54

Resumen:

Con el fin de conocer más sobre las relaciones filogenéticas dentro del género *Cavia*, analizamos las secuencias de la región control del DNA mitocondrial (263 pares de bases) de siete especímenes domésticos (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758; Rodentia, Caviidae), junto con cuatro muestras de las dos especies que se presumen como ancestro de la doméstica: *C. tschudii* y *C. aperea*. Todos los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud agruparon a *C. porcellus* con *C. tschudii* (distancia promedio de 14,4 cambios de nucleótidos); los mejores árboles tenían 62 pasos y un $-Ln = 637,31508$; con apoyos de remuestreo del 100%. Cuando el nodo de *C. aperea* fue forzado a unirse al de *C. porcellus*, este árbol fue consistentemente más largo, menos probable y robusto, y con menos caracteres definitorios que el óptimo. Todas las secuencias de *C. porcellus* se agruparon en un solo nodo, con apoyos de remuestreo de 92% como máximo y 61% como mínimo. Las distancias promedio entre *C. tschudii* y *C. aperea* fue de 31,5 cambios nucleotídicos, muy similar a la distancia entre *C. porcellus* con *C. aperea* (30,5 cambios). Estos resultados indican que *C. tschudii* es la especie más cercanamente relacionada con *C. porcellus*.

Summary:

With the purpose of knowing better the phylogenetic relationships of the genus *Cavia*, we analyzed the sequence of the mitochondrial DNA control region (263 base pairs) in seven domestic specimens (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758; Rodentia, Caviidae) together with four samples of the two species presumed as ancestral of the domestic one: *C. tschudii* and *C. aperea*. All maximum parsimony and maximum likelihood analyses

grouped *C. porcellus* with *C. tschudii* (average distance of 14,4 nucleotide changes); The best trees had 62 steps and a $-\text{Ln} = 637,31508$; with 100% bootstrap support. When the *C. aperea* node was forced to join *C. porcellus*, this tree was consistently longer, less likely and robust, and with less defining characters than the optimal tree. All *C. porcellus* sequences were clustered in an single node with a maximum of 92% and a minimum of 61% bootstrap support. The average distances between *C. tschudii* and *C. aperea* are 31,5 nucleotide changes, very similar to the distance between *C. porcellus* and *C. aperea* (30,5 changes). These results indicate that *C. tschudii* is the species most closely related to *C. porcellus*.

Introducción:

A pesar de ser un animal utilizado ampliamente en distintas áreas de la investigación, el cuy doméstico es un animal del cual se conoce muy poco acerca de su origen y núcleo de domesticación. Gran controversia ha generado su clasificación taxonómica y su relación con las especies silvestres hermanas, e incluso varios investigadores han cuestionado su condición de roedor. Desde épocas precolombinas se ha utilizado como fuente de alimento y en la actualidad es criado por culturas altiplánicas en donde tiene un rol socioeconómico y nutricional en la familia rural; en el área de la investigación el cuy cumple un papel muy importante como animal de laboratorio.

Es indispensable conocer y conservar la biodiversidad del cuy, ya que representa para el hombre una fuente importante de recursos y servicios, además de valores culturales y religiosos. En esta función la taxonomía juega un rol fundamental, ya que sólo conociendo a las distintas especies se podrán proponer mejores medidas de conservación.

Gracias a la utilización de marcadores moleculares hoy es posible establecer las relaciones filogenéticas de grupos de individuos muy cercanos entre sí. Es en esta área en la cual el uso del DNA mitocondrial ha cobrado gran relevancia, debido a su diversidad, su herencia uniparental materna con escasa recombinación, a que se encuentra en gran número de copias por célula, y a que su aislamiento es relativamente sencillo.

Por estas razones se ha elegido para este proyecto a la región control del DNA mitocondrial como marcador molecular para llevar a cabo un análisis filogenético del cuy doméstico (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758; Rodentia, Caviidae) con sus posibles ancestros silvestres y confirmar su relación con los demás cávidos sudamericanos.

Revisión Bibliográfica:

Domesticación:

La historia de la humanidad ha sido asistida por los animales domésticos por más de 10.000 años. Estos fueron producidos a partir de animales salvajes por medio de un proceso de transformación gradual, llamado domesticación, por muchos siglos y generaciones. La característica que define la domesticación es la condición en donde la crianza, el cuidado y la alimentación son controladas por los seres humanos durante generaciones. La domesticación, por lo tanto, implica un proceso evolutivo basado en cambios de las presiones selectivas, con el retiro de organismos de algunas presiones selectivas naturales, a una nueva selección en ambientes artificiales y a la selección artificial de los seres reproductores por parte del criador (Künzl *et al.*, 1999).

Durante su domesticación, animales originalmente salvajes tuvieron que adaptarse por un período de muchas generaciones a su nueva condición de cautiverio y cuidado humano, resultando en cambios genéticos a largo plazo, para finalmente convertirse en animales domésticos. Este proceso está acompañado por distintos cambios en la morfología, fisiología y conducta de los individuos. Por un lado, se observa un aumento en la variabilidad de algunas características (tamaño corporal, color, etc.) en la forma domesticada; por otro lado, existe una convergencia visible de caracteres entre las formas domesticadas de diversas especies, los que se designan como caracteres de domesticación (Künzl *et al.*, 1999).

A nivel conductual, los animales domesticados se caracterizan frecuentemente por una reducción en la agresividad, atención y conductas de escape, así como también por un aumento en su conducta sexual y de cortejo. En general, estas diferencias entre animales domesticados y sus ancestros salvajes resultan de cambios en las frecuencias de patrones de comportamiento basados en un cambio en sus umbrales respectivos. La pérdida de elementos conductuales o la adición de nuevos patrones de comportamiento estables, normalmente no ocurre en el proceso de la domesticación (Künzl *et al.*, 1999).

Los cuyes (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758; Rodentia, Caviidae) fueron domesticados hace 3.000 a 6.000 años atrás, en los terrenos altos de Sudamérica. Ellos cumplían un rol importante proveyendo de carne a los indígenas. Las condiciones en que los cuyes se mantienen hoy en las comunidades rurales no son muy rigurosas; los animales se dejan para limpiar en y alrededor de las chozas de los indígenas, y se puede suponer que siempre ha existido un sistema de crianza similar (Künzl *et al.*, 1999).

Cavia porcellus como roedor doméstico:

El cuy es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Chile. El cuy (cobayo, curí o conejillo de Indias) constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos.

En los países andinos existe una población estable de más o menos 35 millones de cuyes. En el Perú, país con la mayor población y consumo de cuyes, se registra una producción anual de 16.500 toneladas de carne proveniente del beneficio de más de 65

millones de cuyes, producidos por una población más o menos estable de 22 millones de animales criados básicamente con sistemas de producción familiar. La distribución de la población de cuyes en el Perú y el Ecuador es amplia; se encuentra en casi la totalidad del territorio, mientras que en Colombia y Bolivia su distribución es regional y con poblaciones menores. En Chile, se cría en la I y II Región en comunidades rurales, y en las grandes ciudades como mascota. Por su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas, los cuyes pueden encontrarse desde la costa o el llano hasta alturas de 4.500 metros sobre el nivel del mar, y en zonas tanto frías como cálidas.

Las ventajas de la crianza de cuyes incluyen su calidad como especie herbívora, su ciclo reproductivo corto, la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas, y su alimentación versátil que utiliza insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos.

Entre las especies utilizadas en la alimentación del hombre andino, sin lugar a dudas, el cuy constituye el de mayor popularidad. Este pequeño roedor está identificado con la vida y costumbres de la sociedad indígena, y es utilizado también en medicina y hasta en rituales mágico-religiosos. Después de la conquista fue exportado y ahora es un animal casi cosmopolita. En la actualidad tiene múltiples usos (mascotas, animal experimental), aunque en los Andes sigue siendo utilizado como un alimento tradicional (Chauca, 1997).

Características del comportamiento:

Por su docilidad los cuyes se crían como mascotas en diferentes países. Como productor de carne ha sido seleccionado por su precocidad y su prolificidad, e indirectamente se ha tomado en cuenta su mansedumbre. Como animal experimental, en los bioterios se aprecia por su temperamento tranquilo, que se logra con el manejo intensivo al que son expuestos; algunas líneas albinas se seleccionan por su mansedumbre (Chauca, 1997) y actualmente su uso se extiende a diversas áreas de la investigación como animal de experimentación (Aktan *et al.*, 2003; Chlopicki *et al.*, 2003; Niimi *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica:

Los cuyes son roedores histricomorfos, pertenecientes a la Subfamilia Caviinae. En Sudamérica existen cuatro géneros pertenecientes a esta Subfamilia (*Cavia*, *Galea*, *Kerodon* y *Microcavia*) representados por 12 especies, de las cuales 5 pertenecen al género *Cavia* (Wilson *et al.*, 1993): *Cavia aperrea* (Colombia, Ecuador, Venezuela, Guyanas, Brasil, norte de Argentina, Uruguay y Paraguay), *C. fulgida* (este de Brasil, entre Minas Gerais y Santa Catarina), *C. magna* (desde el Departamento de Rocha en el Uruguay hasta el norte de Brasil), *C. porcellus* (especie doméstica de distribución mundial) y *C. tschudii* (Perú, sur de Bolivia, noroeste de Argentina y el norte de Chile). A pesar de que este grupo ha sido revisado morfológicamente varias veces (Cabrera, 1953; Hückinghaus, 1961), el origen de la especie doméstica es aún desconocido, pero se cree que podría provenir de la especie silvestre *Cavia tschudii* (Woods, 1993), o de algún ancestro de ésta. Sin embargo, Hückinghaus (1961) señala que la forma doméstica del cuy provendría de la especie *C.*

aperea, denominándola *Cavia aperea f. porcellus*, basándose en la capacidad craneana y la morfología de sus molares, junto con el hecho de que la forma doméstica del cuy cruzada con *C. aperea* da híbridos fértiles (Künzl *et al.*, 1999). Sin embargo, esto también ocurre con la cruce de *C. tschudii* con *C. porcellus* (Spotorno *et al.*, 2004).

Actualmente sólo se cuenta con la clasificación taxonómica establecida por C. A. Woods en “*Mammal Species of the World*” (Wilson *et al.*, 1993), basada solamente en caracteres morfológicos. Las relaciones filogenéticas de *C. porcellus* actualmente se desconocen; incluso, en la última década, estudios moleculares aplicados al análisis filogenético (Graur *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1993; D'Erchia *et al.*, 1996), basados en comparaciones de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de unas pocas especies, han sugerido un origen parafilético del orden Rodentia, indicando también que el cuy tendría un origen evolutivo separado del resto de los roedores. Estos análisis sugieren que *C. porcellus* no corresponde a la clasificación taxonómica asignada y que los roedores caviomorfos habrían evolucionado antes de la separación de los primates y los artiodáctilos de los roedores miomorfos. Sin embargo, varios autores cuestionan la validez de dichos estudios, argumentando que se habrían cometido errores a la hora de elegir un modelo de evolución adecuado (Cao *et al.*, 1994; Sullivan *et al.*, 1997).

Relaciones filogenéticas y DNA Mitocondrial:

Estudios filogenéticos de grupos monofiléticos estrechamente relacionados son esenciales para entender los procesos evolutivos tanto a nivel molecular como de organismos. La presencia de una robusta filogenia entrega un marco de trabajo para la

interpretación de patrones evolutivos y para la identificación de linajes estables, permitiendo elaborar tanto asociaciones de caracteres (por ejemplo, cómo los cambios evolutivos entre caracteres están correlacionados a través de la historia evolutiva) como de congruencia filogenética entre diversas características biológicas (Rowe *et al.*, 2002).

Actualmente poco se sabe acerca de las relaciones entre familias y géneros de roedores cavioides. Una perspectiva filogenética más certera de esas relaciones permitirá estudios más detallados de la evolución de los distintos rasgos de la historia de vida de esta diversa superfamilia. Usando una filogenia molecular independientemente derivada, puede ser posible comprobar si ciertos rasgos morfológicos, ecológicos, o del comportamiento (o todos) que caracterizan a los linajes son el resultado de la ascendencia compartida, o que podría potencialmente ser el resultado de la evolución independiente en respuesta a condiciones ambientales similares (Rowe *et al.*, 2002).

En la literatura se pueden encontrar diversos reportes en el que se han usado marcadores moleculares con diversos fines. Por ejemplo, el DNA mitocondrial (mtDNA) se ha usado para investigar estructuras poblacionales y características filogeográficas (Watanobe *et al.*, 2003), para determinar linajes maternos (Luís *et al.*, 2002) y para establecer relaciones filogenéticas (Sakai *et al.*, 2003). Esto hace surgir la pregunta: ¿puede la filogenia de un genoma organelar reflejar fielmente la filogenia del eucarionte que lo contiene? Para el caso del genoma mitocondrial, la respuesta parece ser afirmativa. Datos actuales apuntan a un origen único de la mitocondria; más aún, no se ha visto indicio de que exista transferencia de mitocondrias entre diferentes eucariontes, incluso en los casos que han sido producto de un evento secundario de endosimbiosis. Tampoco existe

evidencia a la fecha de una substancial transferencia lateral de información genética dentro o entre mtDNAs (Lang *et al.*, 1999). Es por esto que resulta útil el uso de marcadores moleculares para establecer las relaciones de parentesco de *C. porcellus* con las especies silvestres relacionadas.

El DNA mitocondrial ha sido ampliamente utilizado en estudios genéticos de diferenciación de poblaciones. Como el mtDNA cambia más rápido que el DNA nuclear, las poblaciones a menudo muestran variaciones en el mtDNA que reflejan aspectos de la historia evolutiva y ecológica de la especie (Arctander *et al.*, 1996).

La región más variable del mtDNA mamífero es la región control (D-loop). En los humanos, esta región evoluciona tres a cinco veces más rápido que el resto del mtDNA, y aparte de bloques dispersos de secuencias conservadas entre taxa, el D-loop es caracterizado por cambios rápidos en secuencia y longitud. Esta región es, por lo tanto, muy apta para estudios genéticos de poblaciones y se ha probado útil en el trazado de diferenciaciones entre poblaciones humanas (Arctander *et al.*, 1996).

El mtDNA posee genes que codifican para 13 proteínas, 2 RNAs ribosomales (rRNAs) y 22 RNAs de transferencia (tRNAs), junto con una región (llamada región control) que, a pesar de estar desprovista de genes estructurales, contiene sitios para la replicación del mtDNA y para la transcripción de RNA. Además de estos sitios, la región control probablemente contiene otras secuencias que son importantes para la regulación de la replicación del mtDNA y la expresión génica (Brown, 1985).

El estudio molecular de genes de diferentes organismos está ayudando a los biólogos a construir árboles que relacionan esos organismos con otros. Estos árboles contienen información sobre el ordenamiento de las ramificaciones de los linajes que ligan descendientes modernos a antepasados hipotéticos y a los tiempos aproximados en que los acontecimientos de ramificación ocurren. El éxito del enfoque del árbol molecular al estudio de la evolución resulta de dos importantes hallazgos anteriores: La evolución molecular está dominada por muchas mutaciones que son neutras a la selección, y estas particulares mutaciones se acumulan en tasas bastante constantes en los linajes sobrevivientes. Quizás el mejor ejemplo del segundo punto es la demostración de que la tasa evolutiva para tales mutaciones silentes (por ejemplo, las que ocurren en la tercera posición del codón) en genes que codifican proteínas, es casi idéntica entre la mayoría de genes cromosómicos de plantas, animales y bacterias (Vigilant *et al.*, 1991)

Desde el punto de vista de su utilidad para trabajo comparativo, el mtDNA tiene la virtud de estar distribuído universalmente en el reino animal y ser marcadamente uniforme en su contenido génico (Wilson *et al.*, 1985). Esto, sumado a su herencia uniparental y a la ausencia de recombinación, hacen del mtDNA una herramienta ideal para inferir las relaciones filogenéticas entre diversos organismos eucariontes (Brown, 1985).

El DNA mitocondrial animal se ha convertido en el DNA eucarionte más estudiado, debido a que es más fácil de purificar que cualquier otro segmento específico de DNA nuclear. Esto es gracias a que se encuentra en gran número de copias por célula y a que se ubica en un organelo fuera del núcleo. Además el DNA mitocondrial es fácil de caracterizar

ya que es pequeño y carece de intrones y secuencias repetitivas (Wilson *et al.*, 1985), por lo que es bastante más conservado que el DNA nuclear.

Los cambios a nivel nucleotídico pueden ocurrir por sustitución de bases (ya sea del mismo tipo conocidas como transiciones, purina por purina o pirimidina por pirimidina, o por bases de tipo diferente, conocidas como transversiones), inserción de nucleótidos, por delección de nucleótidos, o por reordenamiento estructural. Estos tres últimos fenómenos juegan un rol relativamente pequeño en la evolución del mtDNA, a excepción del segmento D-Loop o Región Control (Aquadro *et al.*, 1984), que posee una tasa de sustitución nucleotídica relativamente alta en comparación con genes codificantes, por lo que ha sido particularmente útil, por ejemplo, al estudiar la estructura genética de una población de animales estrechamente relacionados que habitan en áreas restringidas (Watanobe *et al.*, 2003). Sin embargo, por la naturaleza conservada del DNA mitocondrial, también es útil para establecer relaciones filogenéticas entre especies cercanas sin requerirse números muestrales altos. Es por esto que se ha escogido como marcador molecular para tratar de establecer las relaciones filogenéticas entre *Cavia porcellus* y sus especies silvestres relacionadas.

Existen diversos métodos para la obtención de árboles filogenéticos, que están basados en distintos principios y algoritmos. Cada uno de estos modelos posee sus propias ventajas y limitaciones. Los principales métodos de reconstrucción filogenética se resumen a continuación (Swofford *et al.*, 1996):

– *Máxima Parsimonia*: estos métodos son más ampliamente usados cuando se usan datos con diferentes estados de carácter. Se considera la reconstrucción filogenética desde un punto de vista hipotético deductivo. El principio metodológico de la parsimonia sostiene que la hipótesis más simple es preferible a la más compleja y que otras hipótesis deben ser dejadas de lado por el momento.

En general, los métodos de parsimonia operan seleccionando los árboles (hipótesis filogenética) que minimizan el número de cambios o el largo total de los mismos. La reconstrucción filogenética se basa en los sitios que contienen información filogenética. Un sitio en una secuencia es filogenéticamente informativo sólo si es variable, y favorece un árbol sobre otros. Esto pasa si hay al menos dos nucleótidos diferentes en un sitio, y cada uno está representado en al menos dos taxones.

Por lo tanto, el árbol apoyado por el mayor número de sitios informativos es el árbol más parsimonioso (menor número de pasos) y por lo tanto es el que se debe elegir como la interpretación mas adecuada y simple.

– *Distancia*: en los métodos basados en una matriz de distancia, se computan las distancias genéticas o evolutivas para todos los pares de taxa, y se construye un árbol filogenético considerando las relaciones más cortas o cercanas entre estas distancias. Existe un gran número de cálculos de distancias y hay varios caminos o algoritmos para construir un árbol.

Estos métodos adecuan un árbol a una matriz de distancias pareadas entre taxones, por lo que debería haber una exacta relación entre las distancias observadas y un único árbol más simple o corto. Sin embargo, las distancias observadas son aproximaciones a las

distancias reales, por lo que raramente se adecuan a un árbol exactamente. Así, el mejor árbol es aquel que adecua más cercanamente las distancias génicas y es evaluado por un estadístico.

Las distancias corregidas son estimadores de la verdadera distancia evolutiva, las que reflejan el número promedio actual de cambios por sitio que han ocurrido entre un par de secuencias desde su divergencia de un ancestro común.

La reconstrucción filogenética a partir de datos de secuencias usando matrices de distancia involucran generalmente tres pasos: conversión de un grupo de secuencias alineadas en una matriz de distancia, construcción de árboles a partir de esas distancias y una evaluación del mejor árbol contra las demás topologías.

La similitud es entendida como una escala que va de 0 a 1 (0 a 100%), donde objetos idénticos son 100% similares. La distancia es considerada como sinónimo de disimilitud, el opuesto directo de similitud.

Existen dos métodos principales para construir árboles basados en distancias. Uno de ellos es “Neighbor-Joining” (Saitou *et al.*, 1987), o método del vecino mas próximo; método relacionado al análisis de agrupamiento (“cluster”), pero permite que los linajes que hayan divergido en grado desigual. Esto se logra al construir a cada paso del análisis una matriz de distancias transformada que se va ajustando al largo de las ramas entre cada par de nodos basándose en la divergencia media con los demás nodos.

Otro método usado es el que trabaja con medias aritméticas de grupos sin peso (UPGMA), metodología que construye un árbol ultramétrico donde todas las puntas son equidistantes desde la rotación del árbol.

– *Máxima verosimilitud*: este método depende de una completa especificación de los datos y del modelo probabilístico que describe los datos. Consiste en descubrir el árbol que tiene la mayor probabilidad de que los datos hayan derivado de él; no implica la probabilidad de que el árbol derive de un conjunto de datos. El procedimiento requiere uno o más árboles, un modelo probabilístico de cambios evolutivos en las secuencias y un conjunto de datos. Dado un árbol y un modelo de evolución, la probabilidad de que los datos hayan derivado de ese árbol es calculada y se escoge el árbol mas verosímil. Debe notarse que no es la probabilidad de que un árbol sea correcto.

El resultado será tan bueno como las asunciones incluidas en el modelo de cambio. El modelo debe describir la evolución de un estado de carácter a otro a través de todos los taxones. La sustitución de bases en los ácidos nucleicos, sustituciones aminoacídicas en las secuencias proteicas y cambios en las frecuencias alélicas son los únicos cambios evolutivos lo suficientemente simples como para ser modelados, mientras que no se han podido formular modelos realistas de los cambios a nivel morfológicos.

Estos métodos de reconstrucción filogenética difieren en base a sus supuestos sobre la evolución del DNA. La parsimonia muchas veces se prefiere, ya que es mucho más simple en sus supuestos acerca de la evolución de los caracteres. En cambio, el método de máxima verosimilitud está basado en modelos de evolución molecular explícitos y extensivos, y así corrige para cambios supuestos, mientras que los métodos de distancia computan las distancias evolutivas para todos los pares de taxones a través de varios algoritmos (Swofford *et al.*, 1996).

Problema:

A pesar de ser un animal utilizado ampliamente en distintas áreas de la investigación, el cuy doméstico es un animal del cual se conoce muy poco acerca de su origen y núcleo de domesticación. Gran controversia ha generado su clasificación taxonómica y su relación con las especies silvestres hermanas, e incluso varios investigadores han cuestionado su condición de roedor.

Actualmente poco se sabe acerca de las relaciones entre familias y géneros de roedores cavioides y la clasificación taxonómica actual sólo se basa en caracteres morfológicos, por lo que se hace muy relevante el estudio de las relaciones filogenéticas dentro de este grupo.

En la presente tesis se describen y comparan secuencias nucleotídicas de la región control o D-loop, con el objetivo de evaluar las relaciones filogenéticas entre las especies nominales del género *Cavia*, para establecer el grado de divergencia entre las cepas de *Cavia porcellus* y determinar cómo se agrupa filogenéticamente ésta con el resto de los cavinos silvestres.

Hipótesis:

- a) *Cavia porcellus* es el taxón hermano de *Cavia tschudii* (Hipótesis respecto de la especie silvestre del cobayo).
- b) Las distancias génicas entre *Cavia aperea* y *Cavia tschudii* son lo suficientemente grandes como para considerarlas especies distintas (Distinción entre dos especies silvestres).
- c) Las cepas domésticas y las de laboratorio de *Cavia porcellus* comparten un ancestro en común (Hipótesis respecto del origen único del cobayo).

Objetivo general:

Identificar genéticamente la(s) especie(s) silvestre(s) de los actuales cuyes domésticos documentando sus relaciones filogenéticas, su distinción y cohesión genética y proponer una filogenia molecular simple de *Cavia*, basándose en las secuencias de la región control del DNA mitocondrial.

Objetivos específicos:

- a) Describir la cuantía y calidad de las diferencias y semejanzas en las secuencias de la Región Control (D-Loop) entre *Cavia porcellus*, *C. tschudii* y *C. aperea*.
- b) Identificar la especie silvestre mas cercana filogenéticamente a *C. porcellus* por medio de la construcción y evaluación de posibles filogenias moleculares basadas en las secuencias de la región control de *C. porcellus*, *C. aperea* y *C. tschudii*.

- c) Construir las filogenias moleculares posibles según distintos métodos filogenéticos, y evaluar la más probable entre las llamadas cepas domésticas y de laboratorio de *Cavia porcellus*.

Materiales y Métodos:

1.- Especímenes analizados:

Las muestras utilizadas para la secuenciación del segmento D-Loop del mtDNA, fueron obtenidas a partir de especímenes de roedores pertenecientes a la Subfamilia Caviinae. El grupo de estudio fue constituido por 3 especies del género *Cavia*: *C. porcellus* (cepas domésticas y de laboratorio), y a las silvestres *C. aperea* y *C. tschudii*. Las muestras fueron recolectadas a partir de colecciones personales o institucionales, obtenidas de diferentes localidades de Sudamérica, junto con una secuencia previamente publicada en GENBANK. (Tabla N° 1).

Tabla N° 1: Individuos utilizados en este estudio, ordenados por especie y localidades donde se colectaron.

Taxa	Localidad	
	Nombre	País
<i>C. porcellus</i> 2308	Tacna	Perú
<i>C. porcellus</i> 2347	Tolima	Colombia
<i>C. porcellus</i> 2410	Piura	Perú
<i>C. porcellus</i> 2414	Trujillo	Perú
<i>C. porcellus</i> 2497	Puno	Perú
<i>C. porcellus</i> 3133	ISP, Santiago	Chile
<i>C. porcellus</i> GENBANK	<u>AJ222767</u>	
<i>C. aperea</i> 2556	Sta. Cruz	Bolivia
<i>C. aperea</i> 2558	Concepción	Paraguay
<i>C. tschudii</i> 2678	Chiguata, Arequipa	Perú
<i>C. tschudii</i> 2697	Chiguata, Arequipa	Perú



Figura N° 1: Mapa de localidades de captura de los especímenes de cavinós estudiados en esta Tesis.

2.- Extracción de DNA genómico a partir de hígado y/o músculo:

Se homogeneizaron 0,005 ml de hígado o músculo preservado en alcohol 70°, previamente lavado en agua estéril, en 600 µl de STE, 30 µl SDS y 4 µl de PK (20 mg/kg), se agitaron manualmente y se colocaron en un agitador orbital a 37 °C por 10 horas o toda una noche. A esta muestra se le agregó 600 µl de fenol equilibrado en EDTA, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 650 g (2500 rpm) por 10 minutos. Posteriormente se traspasó la fase acuosa a otro tubo, al que se le agregaron 600 µl de cloroformo : fenol (1:1), se agitó fuertemente y se centrifugó nuevamente a 650 g por 10 minutos. Se trasladó la fase acuosa a un nuevo tubo y se adicionaron 600 µl de cloroformo : isoamílico (24:1); se centrifugó por última vez a 650 g por 10 minutos. Luego se traspasó la fase acuosa a otro tubo y se adicionaron 2 volúmenes de etanol 95° frío (-20 °C). Se agitó por inversión y se observó la nube de DNA. La nube de DNA fue retirada en gancho pipeta de vidrio con la punta sellada; se dejó secar y se resuspendió en TE pH 8, calentando a 55 °C por 3 horas. Finalmente se conservó la muestra a 4 °C.

3.- Amplificación de DNA a partir de la técnica de PCR:

El segmento D-Loop (o región control) fue amplificado mediante “la reacción en cadena de la polimerasa” (PCR), a partir del DNA mitocondrial obtenido de las muestras de hígado o músculo. Para esto se diseñaron partidores específicos a la secuencia a partir de zonas conservadas que flanquean esta región (Citocromo b, tRNA-Pro, tRNA-Thr, tRNA-Phe, 12s rRNA). Para el diseño de los partidores se tomó como base la secuencia, publicada en GenBank por D'Erchia (1996) del genoma mitocondrial completo de *C. porcellus*, cuyo

número de acceso es AJ222767, y mediante el uso del programa Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, California, EE.UU.).

Tabla N° 2: Secuencias y T° de hibridación de cada oligonucleótido usado como partidor para la amplificación y secuenciación de la región control del DNA mitocondrial (D-loop).

Nombre del Partidor	Secuencia Nucleotídica	T° de Hibridación
LCytB1060	5' GCCTCCATCTCCTACTTC 3'	56 °C
HPhe2	5' GAGTCTATGACTCATCTACGC 3'	56 °C
LThrCuy	5' TGGGAAACAAATTCACCC 3'	55 °C

Los nombres identifican al estándar de DNA y a la zona del DNA mitocondrial a la cual se unen.

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1%, en tampón TBE 1%. Como estándar de peso molecular se utilizó un “ladder” de 100 pares de bases (pb). En un transiluminador UV se observó la fluorescencia emitida al teñir el gel con bromuro de etidio. El DNA fue purificado directamente o utilizando kits comerciales.

4.- Secuenciación de los fragmentos de DNA:

Los productos de PCR ya purificados fueron enviados a un laboratorio externo para su secuenciación en un secuenciador automático. Para esto fue necesario el diseño de un partidor específico para secuenciación, tomando como base secuencias previamente obtenidas utilizando los partidores para PCR.

Como control de secuenciación se realizaron 2 PCR de una misma muestra, que luego fueron secuenciadas y comparadas. El objetivo de esta prueba fue el de descartar algún error generado en el proceso de PCR.

5.- Análisis de las secuencias de D-Loop:

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL-X (Thompson *et al.*, 1997) y luego revisadas visualmente. El porcentaje de nucleótidos totales y por posición del codón, el número de transiciones (ts) y el número de transversiones (tv), se calcularon por medio de los programas MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2004) y PAUP versión 4.0 beta (Swofford, 1998).

6.- Análisis de las relaciones evolutivas:

Las relaciones filogenéticas fueron investigadas a partir de una matriz de estados de carácter, en donde cada posición nucleotídica representa un carácter y las cuatro bases los estados posibles. El análisis de las relaciones filogenéticas fue realizado con criterios de máxima parsimonia, máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”) y distancia incluidos en el programa PAUP 4.0.

Como el número de filogenias y sus posibles ramas es muy alto, y el parámetro es desconocido, para evaluar la robustez de diversas estimaciones se utiliza un método estadístico no paramétrico de remuestreo de los datos con reemplazo; es llamado “bootstrap”. Se expresa en el porcentaje de veces que efectivamente aparece o se repite una rama en todas las réplicas. Si este porcentaje se acerca al 100% es razonable inferir que

dicha rama no fue producida por el azar del remuestreo, sino que forma parte de una señal filogenética de la filogenia real. Si el “bootstrap” se acerca al 0% probablemente se trata del azar generado por el remuestreo azaroso.

La confiabilidad de los árboles obtenidos en los análisis de parsimonia y máxima verosimilitud, fueron estimados realizando 1.000 réplicas de “bootstrap” que, como método estadístico de remuestreo con reemplazo, estima la variación entre los árboles obtenidos a través de un cierto método. Está implementado en el programa PAUP, y se dejaron colapsar las ramas que tenían menos de un 50% de apoyo.

6.1.- Máxima Parsimonia: La búsqueda exhaustiva del árbol más corto fue realizado mediante un análisis en el cual se asigna el mismo peso a cada carácter. Con este método se realizó una búsqueda considerando sólo los caracteres en que se presente un cambio filogenéticamente informativo (se entiende como “carácter filogenéticamente informativo” un carácter compartido por al menos dos de los taxa analizados y que favorece un árbol filogenético sobre otros).

6.2.- Distancia: A través de este análisis se reconstruyó la historia filogenética de las especies en estudio, usando el algoritmo de unión del vecino más próximo (“Neighbor-Joining”) y la matriz de distancia de Kimura-2-parámetros (1980), que presume igual frecuencia para cada base, clasifica las distancias entre dos o más secuencias como transiciones y transversiones, y establece eventualmente una ponderación diferente entre ellas. Este análisis fue aplicado al conjunto de la matriz, sin ponderación, de manera que cada cambio de estado del carácter tenga el mismo peso, ya que se trata de secuencias que

no codifican proteínas y, por lo tanto, todos los caracteres (sitios) acumulan mutaciones en función del tiempo transcurrido desde el último ancestro común.

6.3.- Máxima verosimilitud (“Maximum Likelihood”): Este modelo entrega un valor probabilístico expresado en el logaritmo natural (Ln) de un número determinado de reordenamientos de los árboles posibles de generar con los caracteres disponibles y con ello determinar cuál de entre los árboles posibles tiene la máxima verosimilitud. La selección del modelo de sustitución nucleotídica que mas se ajustase a los datos se realizó con el programa MODELTEST (Posada *et al.*, 1998) el que busca entre 56 modelos de sustitución posibles. En nuestro caso el modelo seleccionado fue el HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985), que asume una frecuencia de bases desigual y le asigna distinta ponderación a transiciones y transversiones.

Resultados:

1.- Análisis de las secuencias de D-Loop:

Las secuencias de D-loop obtenidas en este estudio (Apéndice N° 1), mostraron por lo menos 263 pb. Las frecuencias de bases por sitio se muestran en la tabla N° 3. Considerando todos los taxa, 50 sitios se presentaron variables (19,01 %). Al analizar las secuencias pertenecientes a *Cavia porcellus*, se observaron 11 sitios nucleotídicos variables, siendo 1 de ellos una transversión. Al comparar las secuencias de *C. porcellus* con las de *C. tschudii*, 20 sitios se presentaron variables. Un número mayor de variaciones se encontró al comparar los especímenes domésticos con los de *C. aperea* (46 sitios), presentándose 4 transversiones. Cuando comparamos las secuencias de *C. tschudii* con las de *C. aperea* se observaron 41 sitios variables, de los cuales 6 de ellos eran transversiones.

Como control de secuenciación se realizaron 2 PCR de una misma muestra elegida al azar. En este caso se utilizó a la muestra 2414 (*C. porcellus* 2414 y *C. porcellus* 2414.b). Los productos de PCR fueron secuenciados y comparados (Apéndice N° 2). Se puede observar que en los 263 pb. obtenidos no existe diferencia entre las secuencias. El objetivo de esta prueba fue el de descartar algún error generado en el proceso de PCR. La muestra *C. porcellus* 2414.b se excluyó del análisis para evitar su influencia sobre las topologías.

2.- Análisis de las relaciones filogenéticas:

Considerando los taxa estudiados y los 263 pb analizados para la región control, 50 sitios se encontraron variables (19,01 %), de los cuales 31 (11,79 %) son filogenéticamente

informativos, contabilizándose 13 (4,9 %), 8 (3,4 %) y 10 (3,8 %) en primera, segunda y tercera posición de codón bajo el criterio de parsimonia máxima, excluyéndose 232 caracteres filogenéticamente no informativos.

2a.- Máxima Parsimonia:

Con el criterio de máxima parsimonia y a través de una búsqueda “exhaustiva”, se obtuvieron dos árboles igualmente parsimoniosos de 62 pasos cada uno, de entre 34.459.425 árboles evaluados (Figura N° 2 A y B). Las diferencias entre ambas topologías se presentan entre los especímenes pertenecientes a *C. porcellus*, en donde dos muestras, 2308 (Tacna – Perú) y 2497 (Puno – Perú), en un caso aparecen como un grupo monofilético; mientras que en el otro caso se muestra a *C. porcellus* 2308 como el primero en divergir del grupo. En ambos árboles *C. porcellus* y *C. tschudii* formaron grupos monofiléticos, a cada uno de los cuales los une un ancestro común; esto último es fuertemente apoyado por el alto valor de “bootstrap” (100) obtenido en el árbol de consenso (Figura N° 3).

Una búsqueda exhaustiva es aquella que evalúa todos los árboles posibles de obtener en base a los datos, en la búsqueda de él o los árboles óptimos. En contraste, una búsqueda heurística, en vez de probar todas las alternativas posibles, se concentra en aquellas que nos acercan al óptimo. Este tipo de búsqueda se utiliza cuando la cantidad de datos es tan grande que no es posible realizar una búsqueda exhaustiva; tiene la desventaja de que no es posible saber con certeza que el o los árboles óptimos están o no dentro de los evaluados por este método. Afortunadamente, los métodos de búsqueda heurística

utilizados en PAUP son bastante efectivos en entregar resultados que se aproximan al óptimo (Swofford, 1998).

2b.- Distancia:

Las topologías obtenidas con el algoritmo de unión del vecino más próximo (“Neighbor-Joining”) y usando la distancia de Kimura-2-parámetros (1980), fueron en general similares a las obtenidas bajo los mismos criterios de análisis por máxima parsimonia (Figura N° 4). Al realizar una búsqueda “heurística” bajo el criterio de distancia se puede observar que los especímenes de *C. porcellus* forman un grupo monofilético, fuertemente apoyado por altos valores de “bootstrap” (92). A pesar de esto, las relaciones dentro de ese grupo no están muy definidas debido a los bajos valores de “bootstrap” de cada nodo (Figura N° 5). Sin embargo, las topologías encontradas son muy similares a las obtenidas por el método de máxima parsimonia.

En las tablas 4 y 5 se presentan la matriz de distancia corregida según Kimura-2-parámetros y la matriz de distancias (“p”) no corregidas en la región control del DNA mitocondrial, respectivamente; mientras que en la tabla N° 6 se muestra una matriz con el número de diferencias entre las distintas secuencias. Al analizar las distancias promedio entre los distintos taxa (Tabla N° 7) observamos que la distancia entre *C. porcellus* y *C. aperea* es de 30,5 cambios nucleotídicos en promedio. Algo similar sucede entre *C. tschudii* y *C. aperea* con una distancia de 31,5 cambios nucleotídicos en promedio, mientras que la distancia promedio entre *C. porcellus* y *C. tschudii* es de 14.4.

2c.- Máxima verosimilitud:

Al realizar la búsqueda del árbol mas verosímil, incluyendo los 236 caracteres en su totalidad mediante el uso del programa PAUP, se obtuvo una topología algo distinta a la observada mediante los análisis de máxima parsimonia y de distancia (Figura N° 6). En este caso la gran diferencia se observa dentro del grupo de *C. porcellus*, donde no se logra apreciar una clara definición de las relaciones entre los especímenes. Sin embargo, éste se mantiene formando un grupo monofilético, unido por un ancestro común a *C. tschudii*. Esta relación se encuentra fuertemente apoyada por un alto valor de “bootstrap” (Figura N° 7).

El árbol que entregó éste análisis tiene un valor de verosimilitud de 637,31508, que es un valor logarítmico que nos indica la probabilidad de que los datos (caracteres de la secuencia) hayan resultado del árbol propuesto.

Tabla N° 3: Composición nucleotídica por taxón y por posición de codón para la región control del DNA mitocondrial.

Taxón	Posición de nucleótidos en tripletes												Total			
	Primera				Segunda				Tercera							
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
<i>C. porcellus</i> 3133	25	22,7	44,3	8	34,1	21,6	33	11,4	27,6	26,4	34,5	11,5	28,9	23,6	37,3	10,3
<i>C. porcellus</i> GENBANK	25	22,7	44,3	8	34,1	21,6	33	11,4	27,6	25,3	35,6	11,5	28,9	23,2	37,6	10,3
<i>C. porcellus</i> 2347	23,9	23,9	44,3	8	34,1	21,6	33	11,4	27,6	26,4	34,5	11,5	28,5	24	37,3	10,3
<i>C. porcellus</i> 2410	23,9	23,9	44,3	8	35,2	20,5	33	11,4	27,6	26,4	34,5	11,5	28,9	23,6	37,3	10,3
<i>C. porcellus</i> 2414	22,7	25	43,2	9,1	36,4	19,3	33	11,4	27,6	26,4	34,5	11,5	28,9	23,6	36,9	10,6
<i>C. porcellus</i> 2308	22,7	25	44,3	8	35,2	20,5	34,1	10,2	27,6	26,4	34,5	11,5	28,5	24	37,6	9,9
<i>C. porcellus</i> 2497	22,7	22,7	46,6	8	35,2	20,5	33	11,4	27,6	26,4	34,5	11,5	28,5	23,2	38	10,3
<i>C. tschudii</i> 2678	26,1	21,6	44,3	8	37,5	18,2	34,1	10,2	31	21,8	36,8	10,3	31,6	20,5	38,4	9,5
<i>C. tschudii</i> 2697	26,1	21,6	44,3	8	37,5	18,2	34,1	10,2	31	21,8	36,8	10,3	31,6	20,5	38,4	9,5
<i>C. aperea</i> 2558	23,9	26,1	39,8	10,2	38,6	17	35,2	9,1	31	20,7	39,1	9,2	31,2	21,3	38	9,5
<i>C. aperea</i> 2556	26,1	21,6	43,2	9,1	35,2	18,2	37,5	9,1	29,9	24,1	34,5	11,5	30,4	21,3	38,4	9,9
Promedio	24	23	44	8,4	36	20	34	11	29	25	35	11	30	23	38	10
Desviación estándar	1,37	1,55	1,62	0,74	1,55	1,64	1,40	0,94	1,61	2,26	1,53	0,78	1,30	1,41	0,53	0,40

Tabla N° 4: Matriz de distancia corregida según Kimura 2 parámetros en la región control del DNA mitocondrial.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>C. aperea</i> 2558	-										
2 <i>C. aperea</i> 2556	0.08528	-									
3 <i>C. porcellus</i> 2308	0.10322	0.15340	-								
4 <i>C. porcellus</i> 2347	0.10780	0.14849	0.01938	-							
5 <i>C. porcellus</i> 2410	0.10322	0.14364	0.01545	0.00382	-						
6 <i>C. porcellus</i> 2414	0.10780	0.15340	0.02735	0.01545	0.01154	-					
7 <i>C. porcellus</i> 2497	0.10723	0.14364	0.01537	0.01928	0.01537	0.02321	-				
8 <i>C. porcellus</i> 3133	0.11243	0.15340	0.02335	0.00382	0.00766	0.01938	0.02321	-			
9 <i>C. porcellus</i> GENBANK	0.10813	0.14886	0.02725	0.00764	0.01151	0.02327	0.02713	0.00381	-		
10 <i>C. tschudii</i> 2678	0.11278	0.15378	0.05607	0.06032	0.05607	0.06032	0.06419	0.05607	0.05205	-	
11 <i>C. tschudii</i> 2697	0.11278	0.15378	0.05607	0.06032	0.05607	0.06032	0.06419	0.05607	0.05205	0.00000	-

Tabla N° 5: Matriz de distancias (“p”) no corregidas en la región control del DNA mitocondrial.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>C. aperea</i> 2558	-										
2 <i>C. aperea</i> 2556	0.07985	-									
3 <i>C. porcellus</i> 2308	0.09506	0.13688	-								
4 <i>C. porcellus</i> 2347	0.09886	0.13308	0.01901	-							
5 <i>C. porcellus</i> 2410	0.09506	0.12928	0.01521	0.00380	-						
6 <i>C. porcellus</i> 2414	0.09886	0.13688	0.02662	0.01521	0.01141	-					
7 <i>C. porcellus</i> 2497	0.09886	0.12928	0.01521	0.01901	0.01521	0.02281	-				
8 <i>C. porcellus</i> 3133	0.10266	0.13688	0.02281	0.00380	0.00760	0.01901	0.02281	-			
9 <i>C. porcellus</i> GENBANK	0.09886	0.13308	0.02662	0.00760	0.01141	0.02281	0.02662	0.00380	-		
10 <i>C. tschudii</i> 2678	0.10266	0.13688	0.05323	0.05703	0.05323	0.05703	0.06084	0.05323	0.04943	-	
11 <i>C. tschudii</i> 2697	0.10266	0.13688	0.05323	0.05703	0.05323	0.05703	0.06084	0.05323	0.04943	0.00000	-

Tabla N° 6: Matriz de número total de diferencias nucleotídicas entre las secuencias en la región control del DNA mitocondrial.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>C. aperea</i> 2558	-										
2 <i>C. aperea</i> 2556	21	-									
3 <i>C. porcellus</i> 2308	25	36	-								
4 <i>C. porcellus</i> 2347	26	35	5	-							
5 <i>C. porcellus</i> 2410	25	34	4	1	-						
6 <i>C. porcellus</i> 2414	26	36	7	4	3	-					
7 <i>C. porcellus</i> 2437	26	34	4	5	4	6	-				
8 <i>C. porcellus</i> 3133	27	36	6	1	2	5	6	-			
9 <i>C. porcellus</i> GENBANK	26	35	7	2	3	6	7	1	-		
10 <i>C. tschudii</i> 2678	27	36	14	15	14	15	16	14	13	-	
11 <i>C. tschudii</i> 2697	27	36	14	15	14	15	16	14	13	0	-

Tabla N° 7: Distancias promedio entre los distintos taxa, según número de cambios, distancias no corregidas (“p”) y corregidas según Kimura-2-parámetros, en la región control del DNA mitocondrial.

	Nº de cambios	Distancias no corregidas	Kimura-2-parámetros
<i>C.porcellus</i> v/s <i>C.aperea</i>	30,5	0,116	0,128
<i>C.porcellus</i> v/s <i>C.tschudii</i>	14,4	0,055	0,058
<i>C.tschudii</i> v/s <i>C.aperea</i>	31,5	0,120	0,133

Máxima Parsimonia:

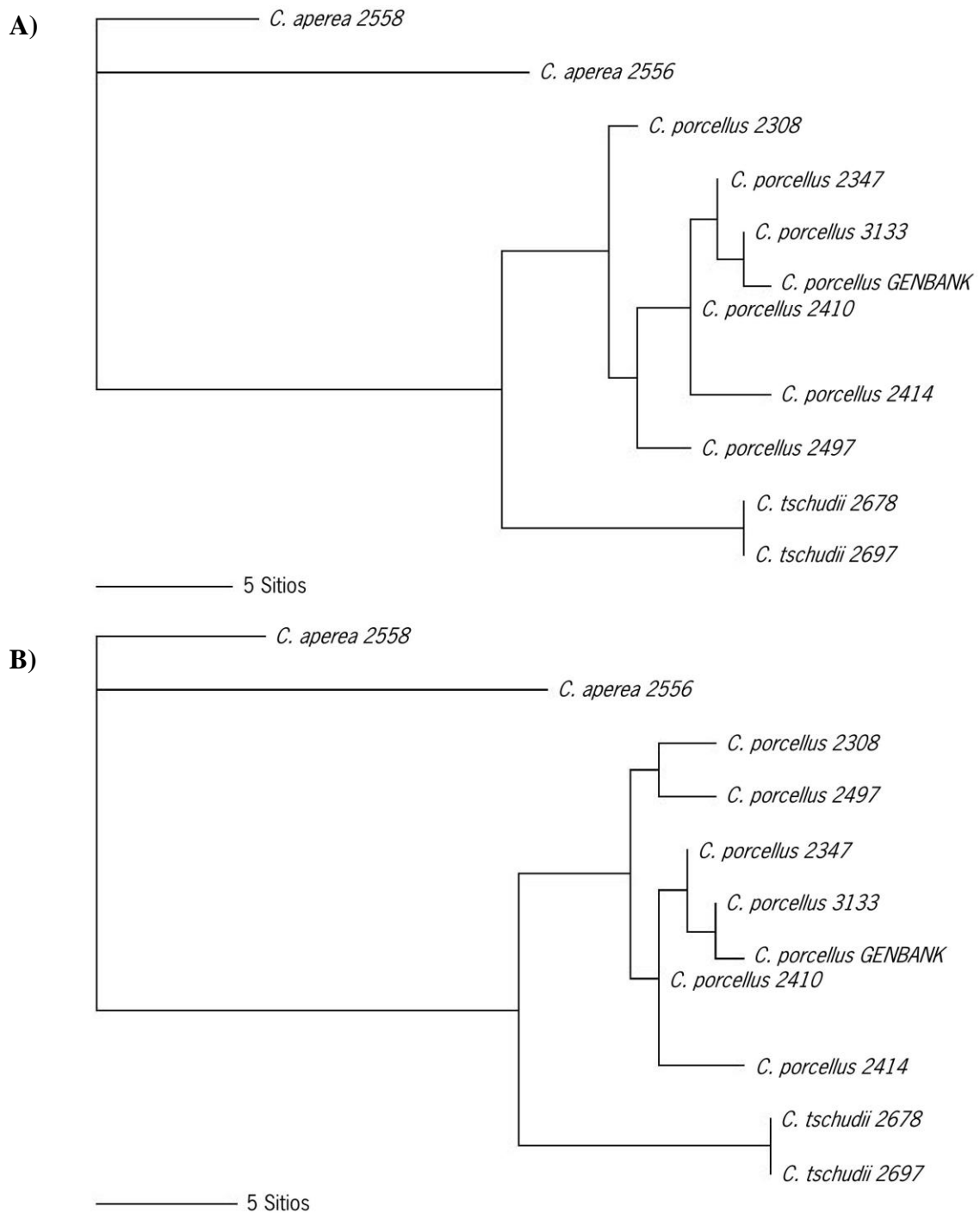


Figura N° 2: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. **A** y **B**, árboles igualmente parsimoniosos obtenidos mediante una búsqueda exhaustiva, bajo el criterio de máxima parsimonia.

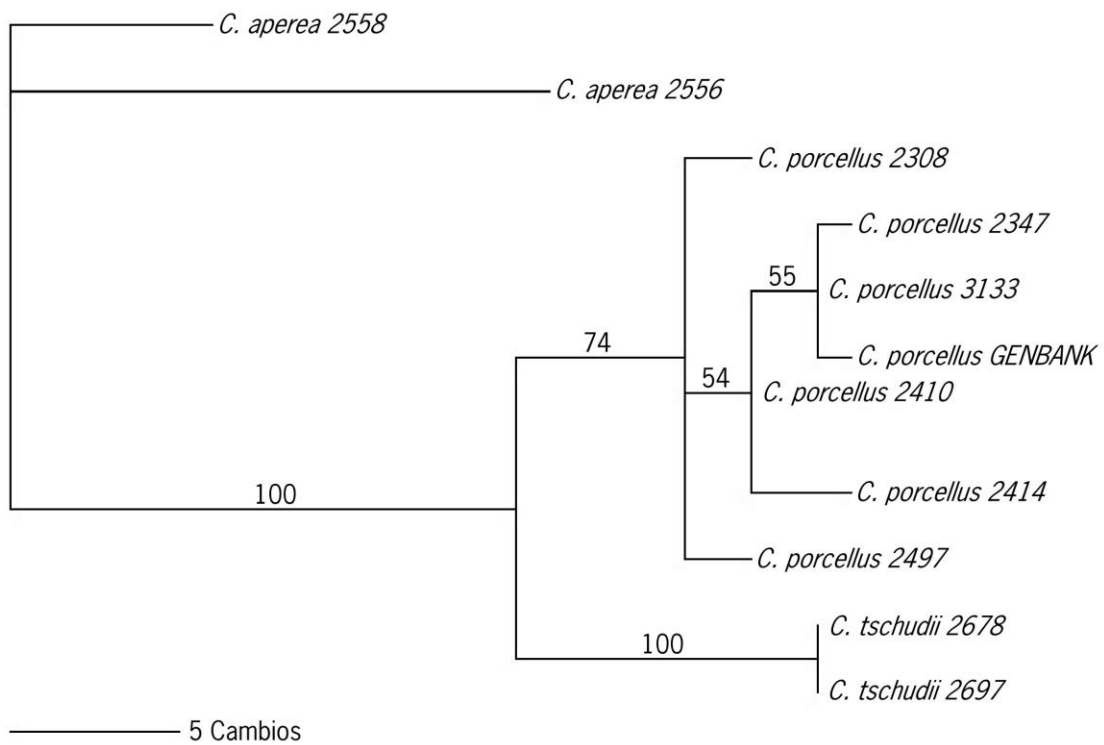


Figura N° 3: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Árbol de consenso obtenido bajo el criterio de máxima parsimonia. Los números sobre los nodos representan los valores (en porcentaje) del “bootstrap” de 1000 réplicas, usando el criterio de regla mayoritaria que muestra los nodos mayores al 50%.

Distancia:

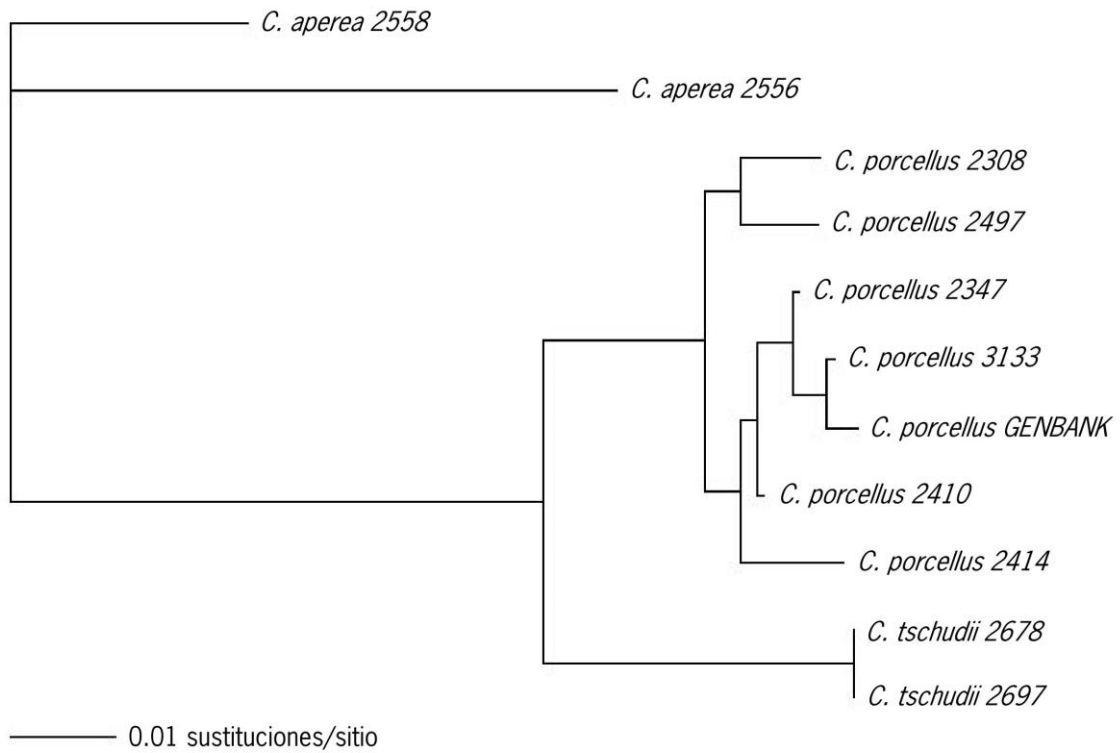


Figura N° 4: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo de unión del vecino mas próximo “Neighbor-Joining” con el estimador del número de sustituciones de Kimura-2-parámetros, analizando todos los caracteres.

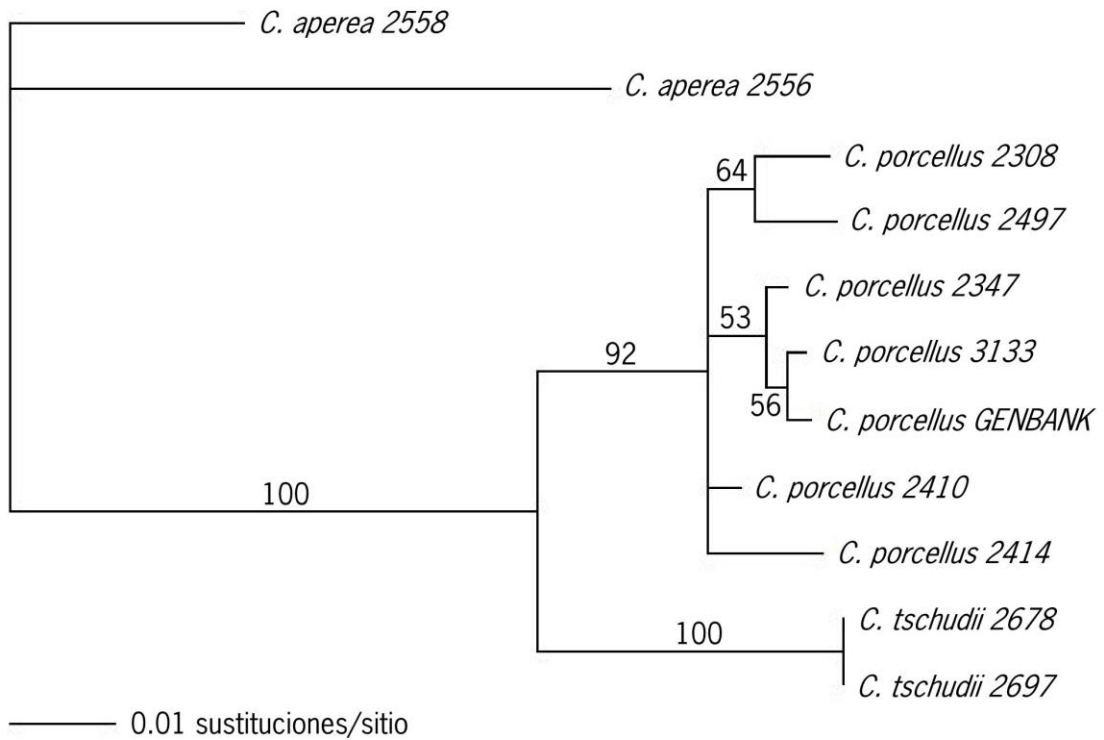


Figura N° 5: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenidos mediante una búsqueda heurística bajo el criterio de distancia. Los números sobre los nodos representan los valores (en porcentaje) del “bootstrap” de 1000 réplicas, usando el criterio de regla mayoritaria que muestra los nodos mayores al 50%.

Máxima verosimilitud:

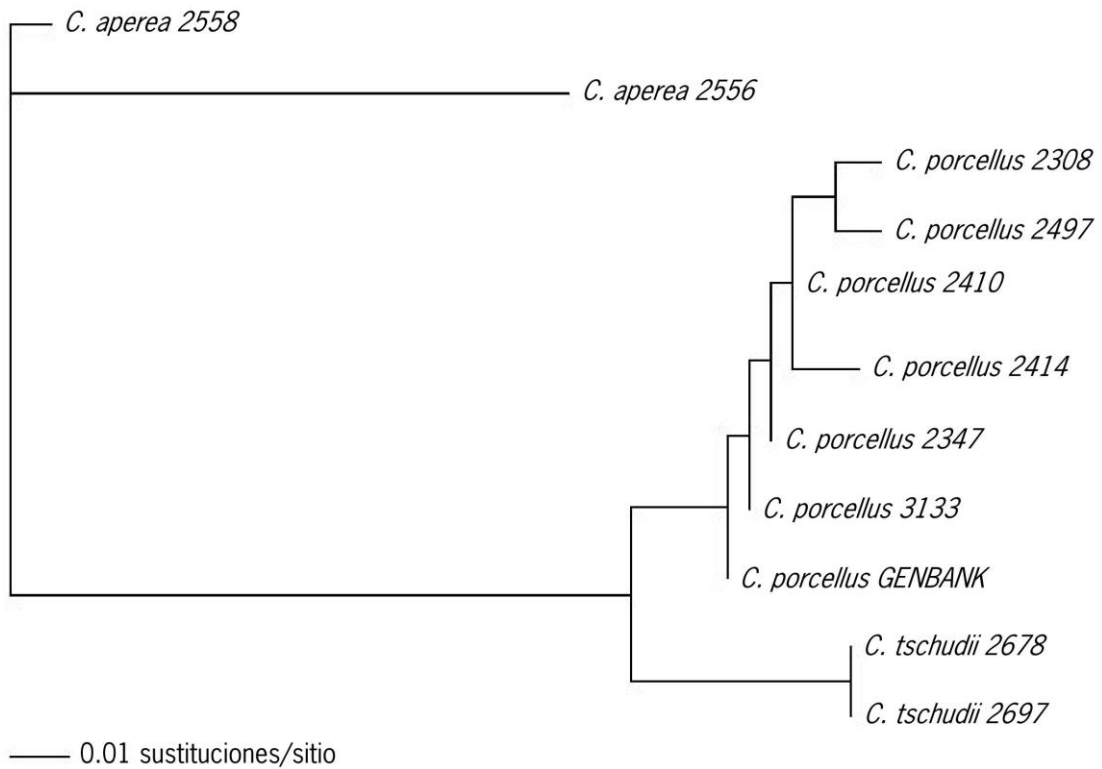


Figura N° 6: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenidos mediante una búsqueda heurística bajo el criterio de máxima verosimilitud.

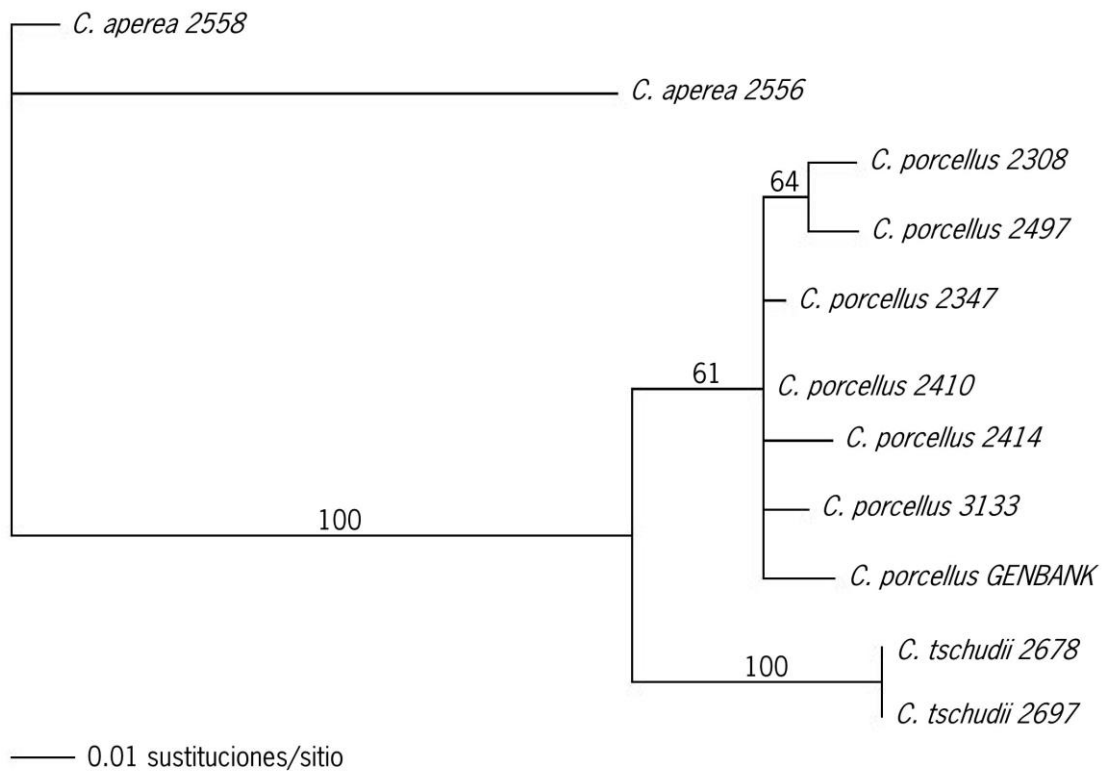


Figura N° 7: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenidos mediante una búsqueda heurística bajo el criterio de máxima verosimilitud. Los números sobre los nodos representan los valores (en porcentaje) del “bootstrap” de 1000 réplicas, usando el criterio de regla mayoritaria que muestra los nodos mayores al 50%.

Discusión:

En todas las topologías generadas en este estudio y bajo los tres métodos de reconstrucción filogenética, aparecen los especímenes de *Cavia porcellus* formando un solo clado y por lo tanto un grupo monofilético. Se observó en general una alta resolución de este nodo (con altos valores de “bootstrap”) a excepción del análisis de máxima verosimilitud, en el cual se observó un valor de “bootstrap” relativamente bajo (61). Sin embargo las relaciones entre los especímenes de *Cavia porcellus* no están del todo claras. En todas las topologías generadas mediante los análisis de máxima parsimonia y distancia se ve que las muestras 2347, 3133 y GENBANK forman un solo clado, pero débilmente apoyado por bajos valores de “bootstrap” (53-55). Sin embargo, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que tanto las cepas de laboratorio, como las cepas domésticas de *Cavia porcellus* comparten un ancestro en común.

Con respecto a la primera hipótesis que dice relación con la búsqueda de la especie silvestre del cobayo, se puede observar que en todas las topologías generadas por todos los métodos de reconstrucción filogenética, los individuos de *Cavia porcellus* y *Cavia tschudii* forman un solo clado, fuertemente apoyado por un valor de “bootstrap” de 100, lo que estaría validando la hipótesis de que *Cavia tschudii* es el taxón hermano de *Cavia porcellus*, tal como lo sugiere Woods (1993). Para someter a prueba esta hipótesis (hipótesis clásica) se construyó un árbol en el cual se forzó la unión entre *C. aperea* con *C. porcellus*, para luego someterlo a un análisis de máxima verosimilitud con el fin de obtener un valor de verosimilitud, para posteriormente evaluar cual de las dos hipótesis representa mejor la historia evolutiva.

Al comparar ambos árboles (hipótesis clásica v/s hipótesis alternativa) se puede ver que la topología obtenida en este nuevo análisis (figura N° 8) no sólo es menos consistente (CI: 0,68) sino que también tiene un número mayor de pasos (76) al compararlo con el árbol de la hipótesis clásica (Figura N° 9). Además, el nodo que une a *C. porcellus* con *C. aperea* está sustentado por solo dos cambios en la secuencia, mientras que el nodo *C. porcellus* – *C. tschudii*, de la hipótesis clásica, está sustentado por 15 cambios.

Cabe destacar que para poder realizar este nuevo análisis, fue necesaria la utilización de un “falso” grupo externo; para esto se decidió tomar como grupo externo al espécimen de *Cavia aperea* que tuviese mayores diferencias en la secuencia con el resto de las muestras, en este caso, la muestra 2556. Asimismo fue necesaria la duplicación de la muestra 2558 con el fin de que ambas (2558 y 2558.2) formasen un solo nodo y pudiese ser realizable la unión forzada a *Cavia porcellus*. Esto se debió principalmente a la ausencia de grupos externos “verdaderos” en nuestros análisis, principalmente por los resultados negativos de poder amplificar secuencias de estos individuos (*Microcavia niata* y *Galea musteloides*). Sin embargo, los datos entregados por nuestros análisis nos permiten descartar la hipótesis alternativa, ya que ésta se muestra como una solución menos consistente y mucho menos parsimoniosa que la hipótesis clásica. Ambas hipótesis en conjunto se sometieron a la prueba de Shimodaira y Hasegawa (1999), con un “bootstrap” de 1000 réplicas, con el fin de determinar cual de las dos hipótesis era mas verosímil. Este análisis dio como resultado que el árbol filogenético más verosímil corresponde a la hipótesis clásica (P = 0,007) descartando de esta manera a la hipótesis alternativa, la que postula la unión de *Cavia porcellus* con *Cavia aperea* (Tabla N° 8).

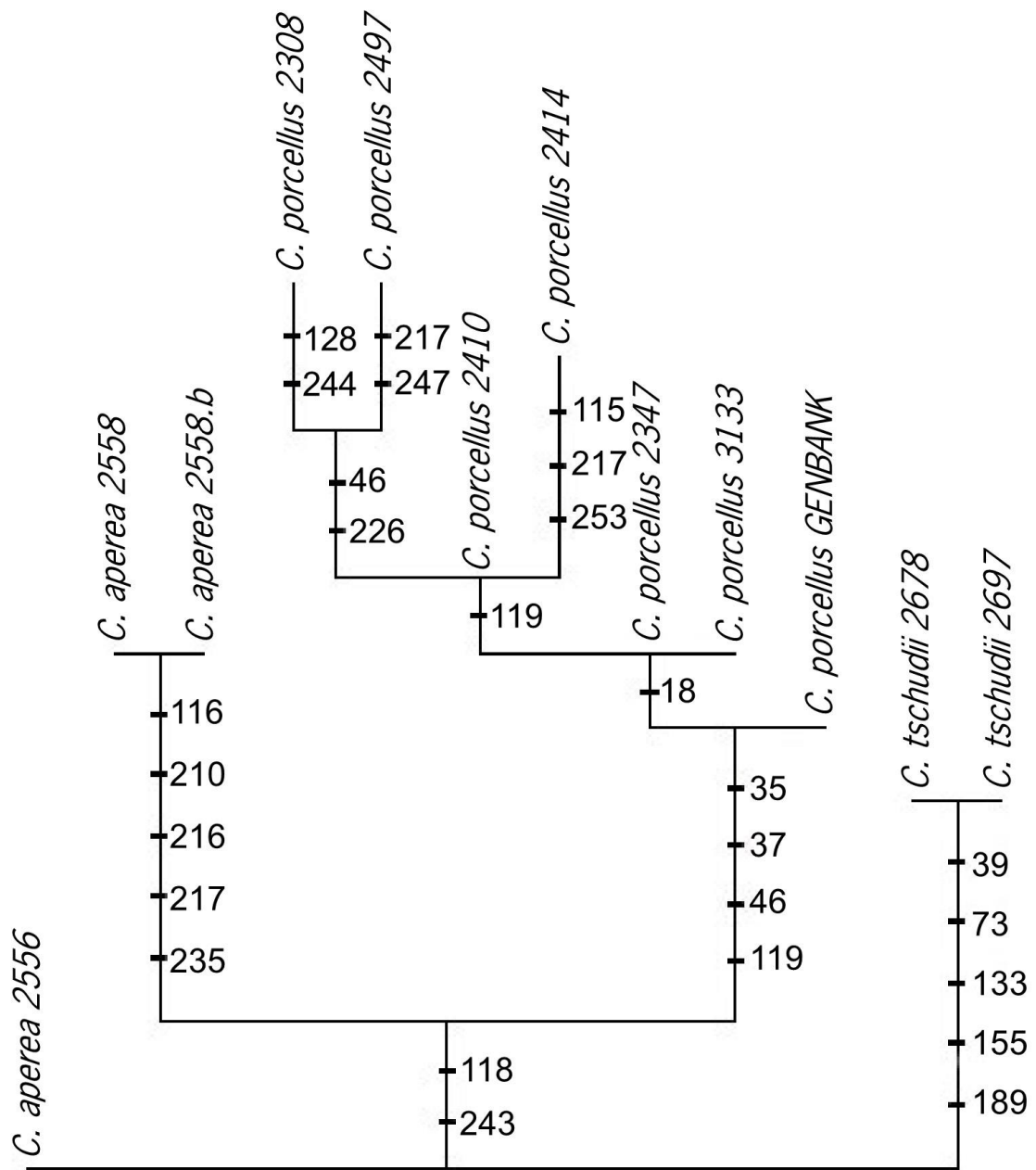
Al analizar las matrices de distancia obtenidas en nuestro estudio, podemos apreciar que al comparar el número de diferencias entre las distintas secuencias (Tabla N° 6) podemos ver que la distancia promedio (en base al número de cambio entre las secuencias) entre las secuencias de *C. porcellus* y *C. aperea* es de 30,5 sustituciones nucleotídicas. Un valor similar se obtiene al comparar el grupo de *C. tschudii* con *C. aperea*, obteniéndose un valor de 31,5. Sin embargo, cuando comparamos las secuencias de *C. porcellus* con *C. tschudii*, la distancia entre ambos es de prácticamente la mitad, con un valor de 14,4 sustituciones nucleotídicas (Tabla N° 7). A la luz de estos resultados, no podemos afirmar o rechazar completamente la hipótesis de que *C. aperea* y *C. tschudii* son especies distintas; sin embargo, estos resultados sugieren que existe una distinción entre estos dos grupos, debido a que la menor distancia encontrada se encuentra entre *C. porcellus* y *C. tschudii*. Junto con esto, la distancia que separa a *C. aperea*, tanto de *C. porcellus* como de *C. tschudii*, es similar en magnitud y corresponde al doble de la que existe entre estos dos últimos grupos.

Tabla N° 8: Test de Shimodaira y Hasegawa. Test realizado utilizando “bootstrap” de 1000 réplicas.

Árbol	-ln L	Diff -ln L	SH-test P
Clásica	637,31508	(mejor)	
Alternativa	658,33205	21,01698	0,007*

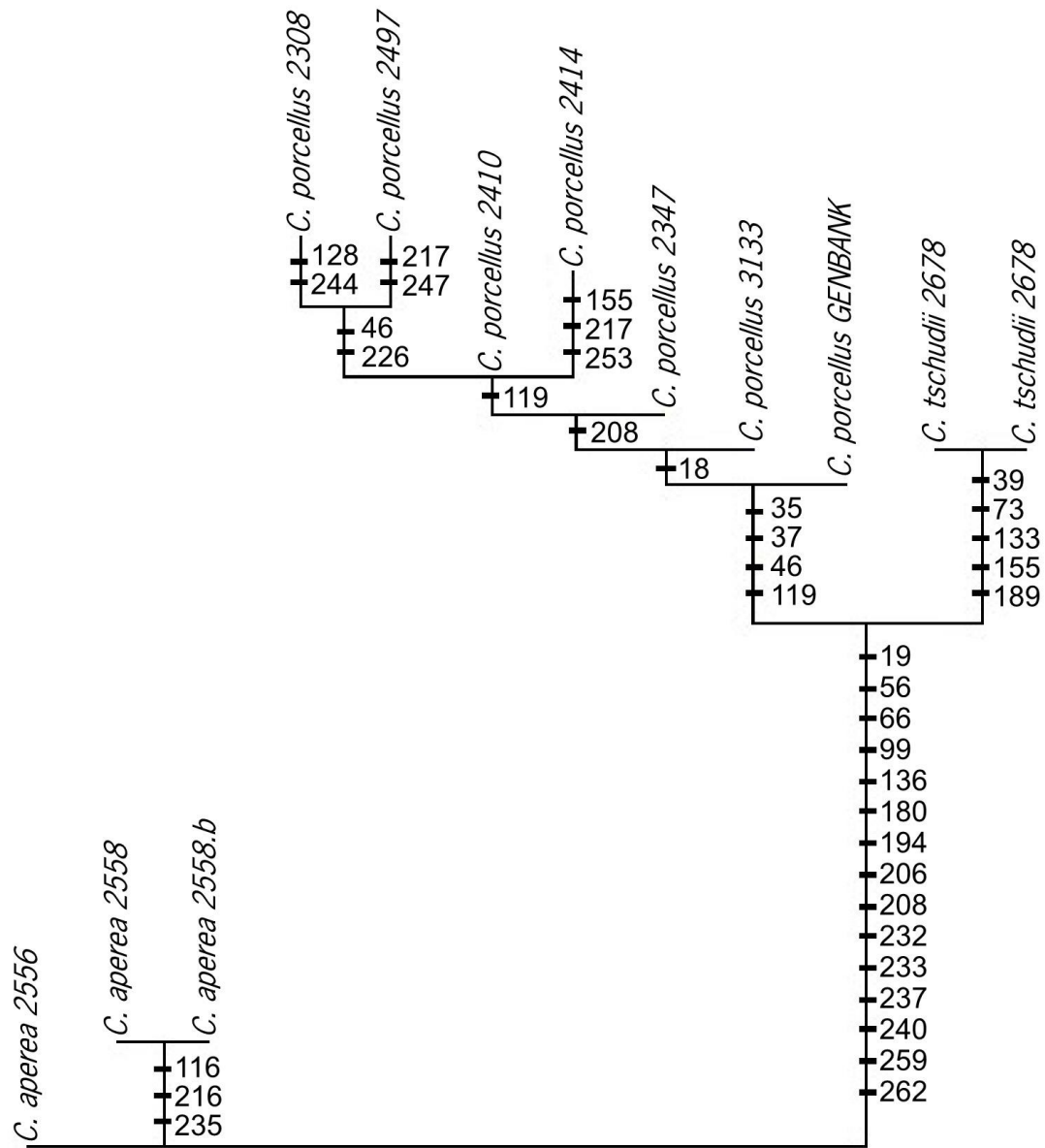
* P < 0,05

Los resultados obtenidos en este estudio han permitido clarificar en parte las relaciones filogenéticas dentro del género *Cavia*. Sin embargo, quedan puntos aún por resolver, por ejemplo, el determinar si *Cavia tschudii* y *Cavia aperea* conforman dos especies distintas. Para ello, sería recomendable el perfeccionar este estudio incluyendo en él especímenes de otras especies externas que conforman esta subfamilia, como son *Microcavia* o *Galea*, junto con un mayor número de muestras de las especies silvestres de *Cavia*. También sería de gran utilidad el poder contar con secuencias más completas por individuo, lo que permitiría, junto con lo anterior, realizar un estudio más completo de este grupo, y poder responder a las preguntas que aún quedan pendientes.



Largo del árbol: 76
 CI: 0,68
 RI: 0,68
 RC: 0,47

Figura N° 8: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenidos mediante una unión forzada de *Cavia aperea* con *Cavia porcellus* (hipótesis alternativa). Los números en los nodos indican los sitios en que ocurren los cambios en la secuencia y que apoyan dicho nodo. CI = índice de consistencia; RI = índice de retención; RC = índice de consistencia reescalado.



Largo del árbol: 63
 CI: 0,83
 RI: 0,85
 RC: 0,70

Figura N° 9: Relaciones filogenéticas de cávidos Sudamericanos basados en la secuencia de la región control del DNA Mitocondrial. Topología del árbol filogenético obtenidos mediante una búsqueda heurística bajo el criterio de máxima verosimilitud (*hipótesis clásica*). Los números en los nodos indican los sitios en que se observan los cambios en la secuencia y que apoyan dicho nodo. CI = índice de consistencia; RI = índice de retención; RC = índice de consistencia reescalado.

Conclusiones:

- Bajo los tres métodos de reconstrucción filogenética se muestra a las secuencias de los individuos de *Cavia porcellus* y *Cavia tschudii* formando un solo clado, lo que apoya la teoría de que esta última es la especie silvestre del cuy doméstico.

- Al realizar la unión forzada de las secuencias de *C. porcellus* con *C. aperea* se obtiene un árbol filogenético que, no sólo es menos consistente y más largo, sino que también es menos verosímil, descartándose esta hipótesis alternativa.

- Los distintos especímenes de *Cavia porcellus* constituyen un grupo monofilético, pero el ordenamiento dentro del grupo varía en los distintos análisis.

- Las distancias entre los tres grupos en estudio, en base al número de cambios en las secuencias, evidencian una distinción entre *C. aperea* y *C. tschudii*, pero de momento no es posible afirmar o rechazar el que estos dos grupos son especies diferentes.

Bibliografía:

- AKTAN, B.; TAYSI, S.; GUMUSTEKIN, K.; UCUNCU, H.; MEMISOGULLARI, R.; SAVE, K.; BAKAN, N. 2003. Effect of macrolide antibiotics on nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities, and malondialdehyde level in erythrocyte of the guinea pigs with experimental otitis media with effusion. *Pol J Pharmacol* 55: 1105-1110.
- AQUADRO, C. F.; KAPLAN, N.; RISKO, K. J. 1984. An analysis of the dynamics of mammalian mitochondrial DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1: 423-434.
- ARCTANDER, P.; KAT, P. W.; AMAN, R. A.; SIEGISMUND, H. R. 1996. Extreme genetic differences among populations of *Gazella granti*, Grant's gazelle in Kenya. *Heredity* 76 (Pt 5): 465-475.
- BROWN, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. **In:** R. MacIntyre (Ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press, Ney York, EE. UU. 95-130.
- CABRERA, A. 1953. Los roedores Argentinos de la familia Caviidae. 6° Ed. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Univ. de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 11-63
- CAO, Y.; ADACHI, J.; YANO, T.; HASEGAWA, M. 1994. Phylogenetic place of guinea pigs: no support of the rodent-polyphyly hypothesis from maximum-likelihood analyses of multiple protein sequences. *Mol Biol Evol* 11: 593-604.
- CHAUCA, L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Roma. Italia.
- CHLOPICKI, S.; KOZLOVSKI, V. I.; GRYGLEWSKI, R. J. 2003. Clonidine-induced coronary vasodilatation in isolated guinea pig heart is not mediated by endothelial α_2 adrenoceptors. *J Physiol Pharmacol* 54: 511-521.
- D'ERCHIA, A. M.; GISSI, C.; PESOLE, G.; SACCONI, C.; ARNASON, U. 1996. The guinea-pig is not a rodent. *Nature* 381: 597-600.
- GRAUR, D.; HIDE, W. A.; LI, W. H. 1991. Is the guinea-pig a rodent? *Nature* 351: 649-652.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22: 160-174.
- HÜCKINGHAUS, F. 1961. Vergleichende Untersuchungen über die Formenmannigfaltigkeit der Unterfamilie Caviinae Murray 1886. (Ergebnisse der Südamerikaexpedition Herre/Röhrs 1956-1957). *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 166: 1-98.

- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- KÜNZL, C.; SACHSER, N. 1999. The behavioral endocrinology of domestication: A comparison between the domestic guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*) and its wild ancestor, the cavy (*Cavia aperea*). *Horm Behav* 35: 28-37.
- LANG, B. F.; GRAY, M. W.; BURGER, G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 351-397.
- LI, W. H.; HIDE, W. A.; GRAUR, D. 1992. Origin of rodents and guinea-pigs. *Nature* 359: 277-278.
- LUÍS, C.; BASTOS-SILVEIRA, C.; GUS COTHRAN, E.; MAR OOM, M. 2002. Variation in the mitochondrial control region sequence between the two maternal lines of the Sorraia horse breed. *Genetics and Molecular Biology* 25: 309-311.
- MA, D. P.; ZHARKIKH, A.; GRAUR, D.; VANDEBERG, J. L.; LI, W. H. 1993. Structure and evolution of opossum, guinea pig, and porcupine cytochrome b genes. *J Mol Evol* 36: 327-334.
- NIIMI, Y.; HINO, N.; OCHI, R. 2003. Diltiazem facilitates inactivation of single L-type calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Jpn Heart J* 44: 1005-1014.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- ROWE, D. L.; HONEYCUTT, R. L. 2002. Phylogenetic relationships, ecological correlates, and molecular evolution within the cavioidae (mammalia, rodentia). *Mol Biol Evol* 19: 263-277.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- SAKAI, T.; MIHARA, M.; SHITARA, H.; YONEKAWA, H.; HOSOYA, K.; MIYAZAKI, J. 2003. Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes). *Zoolog Sci* 20: 501-514.
- SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1114-1116.

- SPOTORNO, A.E.; VALLADARES, J.P.; J.C., MARÍN; ZEBALLOS, H. 2004. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationships with the Andean wild species *Cavia tschudii*. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 243-250.
- SULLIVAN, J.; SWOFFORD., D. L. 1997. Are Guinea Pigs Rodents? The Importance of Adequate Models in Molecular Phylogenetics. *J. Mamm. Evol.* 4: 77-86.
- SWOFFORD, D. L. 1998. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) Version 4 beta. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WALDDELL, P.; HILLS, D. 1996. Phylogenetic Inference. **In:** D. HILLS; C. MORITZ; B. MABLE (Eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 407-514.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HARPENDING, H.; HAWKES, K.; WILSON, A. C. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503-1507.
- WATANOBE, T.; ISHIGURO, N.; NAKANO, M. 2003. Phylogeography and population structure of the Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax*: mitochondrial DNA variation. *Zoolog Sci* 20: 1477-1489.
- WILSON, A.; CANN, R.; CARR, S.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U.; HELM-BYCHOWSKI, K.; HIGUCHI, R.; PALUMBI, S.; PRAGER, E.; SAGE, R.; STONEKING, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.
- WILSON, D.E.; REEDER, D.M. 1993. *Mammal species of the world: A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Inst Press, Washington, DC, EE.UU.771-789
- WOODS, C. 1993. Suborder Hystricognathi. **In:** D. E. R. Wilson, D.M. (Ed.). *Mammal Species of the World: A taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Inst Press, Washington, DC, EE.UU. 771-806.
- YOSHIDA, L. S.; NISHIDA, S.; SHIMOYAMA, T.; KAWAHARA, T.; KONDO-TESHIMA, S.; ROKUTAN, K.; KOBAYASHI, T.; TSUNAWAKI, S. 2004. Superoxide generation by Nox1 in guinea pig gastric mucosal cells involves a component with p67(phox)-ability. *Biol Pharm Bull* 27: 147-155.

Apéndice N° 1

Secuencias para la región control del DNA mitocondrial (D-loop). Los puntos representan igualdad de nucleótidos respecto a la primera secuencia que corresponde a *Cavia aperea* 2558.

				111	111	111	122	222	222	223	333	333	333
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
<i>C. aperea</i> 2558	AAA	CTG	AAA	TTC	TTA	TTA	TAC	TAT	TCC	CTG	AAA	GTT	TAC
<i>C. aperea</i> 2556
<i>C. porcellus</i> 2308C	A..C.	C..
<i>C. porcellus</i> 2347C	A..C.	C..
<i>C. porcellus</i> 2410C	A..C.	C..
<i>C. porcellus</i> 2414C	A..C.	C..
<i>C. porcellus</i> 2437C	A..C.	C..
<i>C. porcellus</i> 3133C	A..C.	C..
<i>C. tschudii</i> 2678	A..T
<i>C. tschudii</i> 2697	A..T
<i>C. porcellus</i> GENBANK	A..C.	C..

				444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777
	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678			
<i>C. aperea</i> 2558	AAT	TCA	CAT	TCA	TAT	AAT	GTA	AAA	AAA	ATT	ATC	TTT	TAT			
<i>C. aperea</i> 2556	..C			
<i>C. porcellus</i> 2308	..CGC			
<i>C. porcellus</i> 2347	..C	...	T..GC			
<i>C. porcellus</i> 2410	..C	...	T..GC			
<i>C. porcellus</i> 2414	..C	...	T..GC			
<i>C. porcellus</i> 2437	..CGC			
<i>C. porcellus</i> 3133	..C	...	T..GC			
<i>C. tschudii</i> 2678GC	C..	...			
<i>C. tschudii</i> 2697GC	C..	...			
<i>C. porcellus</i> GENBANK	..C	...	T..GC			

								111	111	111	111	111	111
	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111
	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567
<i>C. aperea</i> 2558	GTA	ATT	CGT	GCA	TTA	ATG	CTT	GCC	CAC	ATT	AAT	AAT	GCA
<i>C. aperea</i> 2556	.C.T.
<i>C. porcellus</i> 2308CT.
<i>C. porcellus</i> 2347CT.
<i>C. porcellus</i> 2410CT.
<i>C. porcellus</i> 2414CT.
<i>C. porcellus</i> 2437CT.
<i>C. porcellus</i> 3133CT.
<i>C. tschudii</i> 2678CT.
<i>C. tschudii</i> 2697CT.
<i>C. porcellus</i> GENBANKCT.

	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
	112	222	222	222	333	333	333	344	444	444	445	555	555	
	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	
C. aperea 2558	CTA	GTA	CAT	AAT	ATG	CAT	GAT	AGT	ACA	TAG	ACC	ATT	ACA	
C. aperea 2556	T..G.
C. porcellus 2308	A..
C. porcellus 2347	.C.G.	A..
C. porcellus 2410G.	A..
C. porcellus 2414G.	A..T.
C. porcellus 2437G.	A..
C. porcellus 3133	.C.G.	A..
C. tschudii 2678	T..	T..	A..T.
C. tschudii 2697	T..	T..	A..T.
C. porcellus GENBANK	.C.G.	A..

	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
	555	666	666	666	677	777	777	778	888	888	888	999	999	
	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	
C. aperea 2558	TGT	ATA	ATC	AAC	ATT	AGA	AGA	TTA	CCC	CCA	TGG	ATA	TTA	
C. aperea 2556AG	...	A..
C. porcellus 2308GC.	...
C. porcellus 2347GC.	...
C. porcellus 2410GC.	...
C. porcellus 2414GC.	...
C. porcellus 2437GC.	...
C. porcellus 3133GC.	...
C. tschudii 2678GAC.	...
C. tschudii 2697GAC.	...
C. porcellus GENBANKGC.	...

	111	122	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
	999	900	000	000	001	111	111	111	222	222	222	233	333	
	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	
C. aperea 2558	AGC	ACG	CAC	CTA	CAT	CTC	TTA	CCG	AGC	ATA	CAC	CAT	CTA	
C. aperea 2556	T..C	T..	..G	A..
C. porcellus 2308C.	..AG	T..	T..	...	TC.	...
C. porcellus 2347C.	..AG	T..	TC.	...
C. porcellus 2410C.	..AG	T..	TC.	...
C. porcellus 2414C.	..AG	TC.	...
C. porcellus 2437C.	..AG	A..	T..	...	TC.	...
C. porcellus 3133C.	T.AG	T..	TC.	...
C. tschudii 2678C.	T.AG	T..	TC.	...
C. tschudii 2697C.	T.AG	T..	TC.	...
C. porcellus GENBANKC.	T.AG	T..	TC.	...

	222	222	222	222	222	222	222	222	222	22
	333	334	444	444	444	555	555	555	566	66
	567	890	123	456	789	012	345	678	901	23
C. aperea 2558	GAT	CTA	AAC	TCA	CAT	AAA	ATC	CTA	CCA	TA
C. aperea 2556	A..	.C.	..TC.	.AC	.AC	..
C. porcellus 2308	A.C	..T	...	C..	A..	C.
C. porcellus 2347	A.C	..T	A..	C.
C. porcellus 2410	A.C	..T	A..	C.
C. porcellus 2414	A.C	..T	G..	...	A..	C.
C. porcellus 2437	A.C	..T	A..	A..	C.
C. porcellus 3133	A.C	..T	A..	C.
C. tschudii 2678	A.C	..T	..T	A..	C.
C. tschudii 2697	A.C	..T	..T	A..	C.
C. porcellus GENBANK	A.C	..T	A..	C.

Apéndice N° 2

Secuencias para la región control del DNA mitocondrial (D-loop). Los puntos representan igualdad de nucleótidos respecto a la primera secuencia que corresponde a *Cavia porcellus* 2414. Secuencias utilizadas como control.

					111	111	111	122	222	222	223	333	333	333
		123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
<i>C. porcellus</i>	2414	AAA	CTG	AAA	TTC	TTA	TTC	AAC	TAT	TCC	CTG	AAA	GCT	CAC
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777
		012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678
<i>C. porcellus</i>	2414	AAC	TCA	TAT	TCA	TAT	AGT	GTA	AAA	AAC	ATT	ATC	TTT	TAT
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		788	888	888	889	999	999	999	111	111	111	111	111	111
		901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567
<i>C. porcellus</i>	2414	GTA	ATT	CGT	GCA	TTA	ATG	CTC	GCC	CAC	ATT	AAT	AAT	GTA
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
		112	222	222	222	333	333	333	344	444	444	445	555	555
		890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456
<i>C. porcellus</i>	2414	CTA	GTA	CAT	AGT	ATG	CAT	AAT	AGT	ACA	TAG	ACC	ATT	ATA
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
		555	666	666	666	677	777	777	778	888	888	888	999	999
		789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345
<i>C. porcellus</i>	2414	TGT	ATA	ATC	AAC	ATT	AGA	AGA	TTG	CCC	CCA	TGG	ATA	TCA
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		111	122	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
		999	900	000	000	001	111	111	111	222	222	222	233	333
		678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234
<i>C. porcellus</i>	2414	AGC	ACG	CAC	CCA	CAA	CTC	TTG	CCG	AGC	ATA	CAC	CAT	TCA
<i>C. porcellus</i>	2414.b
		222	222	222	222	222	222	222	222	222	22			
		333	334	444	444	444	555	555	555	566	66			
		567	890	123	456	789	012	345	678	901	23			
<i>C. porcellus</i>	2414	AAC	CTT	AAC	TCA	CAT	AAA	GTC	CTA	ACA	CA			
<i>C. porcellus</i>	2414.b			