

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio de diversidad genética en *Callithrix pygmaea* mediante el uso de
marcadores microsatélites (SSR)**

CAMILA ACOSTA LÓPEZ

Venancio Arahana, PhD, Director de Tesis

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en

Procesos Biotecnológicos

Quito, Enero 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Estudio de diversidad genética en *Callithrix pygmaea* mediante el uso de
marcadores microsatélites (SSR)**

Camila Acosta López

Venancio Arahana, Ph.D.

Director de la tesis y

Miembro de Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, enero del 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de propiedad intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la política.

Así mismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Camila Acosta López

C.I.: 1721644076

Fecha: Quito, enero del 2014

DEDICATORIA

A mis papás y hermano,
Por ser siempre la fuerza, el apoyo y el amor en mi vida

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres y hermano, por apoyarme en cada paso del camino. Por representar siempre la fuerza, dedicación y amor para hacer las cosas. Por ser mi centro y empujarme a ser mejor cada día. Por enseñarme a aprender de los errores y reconocer lo que más importa en la vida, la familia.

A mis abuelas por ser un ejemplo en mi vida, por ser mujeres fuertes, amorosas y entregadas. A mi abuelo por ser la mejor persona que se puede ser y enseñarme a querer. A mis tíos, tías, primos y primas (Todos) por ser en más de una ocasión padres y hermanos, por estar siempre presentes, por todo el apoyo y creer en mí siempre.

A mis bebés; Rafa, Dieguito, Manu, Martín, Sofí, Azrael y Martina, por ser la alegría en mi vida y recordarme siempre lo que valen las cosas pequeñas.

A mis amigas y amigos a lo largo de mi vida, por todas las experiencias, los consejos, la compañía, la vida.

A todos los profesores y personal administrativo del COCIBA de la USFQ por sus enseñanzas y vivencias, especialmente a Lourdes, Stella y Venancio, por su apoyo y contribuciones en la realización de este trabajo.

A todos en el Laboratorio de biotecnología Vegetal; especialmente Vivi, Bernardo, Cris, Jenny y Estefi por ayudarme en todo lo que pudieron y todos los demás por ser más amigos que compañeros.

Resumen

El tití pigmeo (*Callithrix pygmaea*) es la especie más pequeña de primate platirrino existente, se distribuye a lo largo de la Amazonia en Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Su hábitat generalmente comprende bosque cercano a las orillas de un río, por lo que incluye también bosques inundados. Se alimenta de exudados de especies específicas de árboles mayormente, aunque puede consumir también, flores, néctar e insectos. Vive en grupos pequeños (2-9 individuos) conformados por una pareja dominante que es la única que se aparea y sus crías de diferentes edades, la producción de gemelos es común. Las poblaciones de leoncillos se han visto afectadas por la fragmentación del hábitat, la misma que se considera la mayor causa de pérdida de biodiversidad. Para evaluar el estado de la variabilidad genética en las poblaciones de leoncillos de la Amazonía Ecuatoriana, se evaluaron 15 marcadores moleculares microsátélites heterólogos en la población de Tiputini, conformada por 3 grupos (T1, T2 y T3). Esta población se considera menos impactada que las estudiadas previamente por Nieto et al. (2010) (San Pablo) y Terán et al. (2013) (Sacha y Sehuaya). Al comparar las cuatro poblaciones estudiadas se busca encontrar evidencia del impacto humano y evaluar el estado de conservación de la especie. Se logró la transferibilidad de 7 de los 15 pares de primers evaluados. Los loci presentaron de 2 a 5 alelos cada uno. La heterocigocidad tanto observada como esperada mostró valores considerados altos para primates, evidenciando la existencia de variabilidad genética. El análisis de AMOVA encontró la mayor varianza dentro de los grupos (55%), más que entre ellos (44%), corroborando la existencia de una alta variabilidad genética. La distancia genética de Nei y el estadístico F_{st} de Wright, evidencian una relación entre ellos y las distancias geográficas entre los grupos. Existe una mayor distancia genética y diferencia en las frecuencias alélicas, en los grupos que se encuentran más alejados geográficamente (T2 y T3). Al comparar los datos de la población de Tiputini con los existentes para las poblaciones de San Pablo, Sacha y Sehuaya se encontró que la heterocigocidad es casi el doble para Tiputini que para San Pablo. Se evidencia una posible pérdida de la variabilidad genética en la población de San Pablo; posiblemente debida a los impactos humanos. Las poblaciones de Sacha y Sehuaya no presentaron alelos únicos, San Pablo y Tiputini sí. Los alelos compartidos entre poblaciones sugieren que existe todavía flujo génico y posibles migraciones entre las distintas poblaciones. Sin embargo, el análisis de AMOVA ubica el mayor porcentaje de varianza entre las poblaciones (67%). La distancia genética de Nei indica una mayor distancia de todas las poblaciones con relación a la de Tiputini, esto puede deberse a la falta de datos en varios loci para las poblaciones de Sacha y Sehuaya. Las barreras y distancias geográficas respaldan los resultados del análisis de distancia genética de Nei. Los resultados del presente estudio indican un posible efecto negativo de las actividades humanas en las poblaciones de leoncillos, apuntando a la necesidad de realizar acciones en pro de la conservación de la especie.

Abstract

The pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*) is the smallest known plathyrrini primate species. It is distributed through the Amazonian Basin along Bolivia, Colombia, Ecuador, Peru and Brazil. Its habitat generally comprises forests near river banks, which include flooded forests. The individuals feed mainly from exudates from specific tree species, although they may consume flowers, nectar and insects as well. They live in small groups (2-9 individuals) formed by a dominant couple, which is the only one that mates, and their offspring from different ages. The production of twins is common. Pygmy marmoset populations have been affected by habitat fragmentation, which is considered the major cause for loss of biodiversity. In order to evaluate the genetic variability of Pygmy marmoset populations in the Ecuadorian Amazonia, 15 SSR heterologous primers were evaluated in the Tiputini population, formed by three different groups (T1, T2 and T3). This population is considered to be less affected by human activities than the ones studied previously by Nieto et al. (2010) (San Pablo) and Terán et al. (2013) (Sacha and Sehuaya). By comparing four studied populations, we intend to find evidence of human impact and evaluate the conservation state of the species. Seven primers out of the original 15 were successfully transferred. The loci presented a total of 2 to 5 alleles each. Heterozygosity both observed and expected showed values that are considered high for primates, indicating the existence of genetic variability in the Tiputini population. The AMOVA analysis found higher variance within the groups rather than between them (44%) confirming the existence of high genetic variability. Nei's genetic distance and Wright's F_{st} statistic show a relation between them and the geographic distances between the groups. There is a greater genetic distance and difference in allele frequencies between the groups which are more geographically distant from each other (T2 and T3). When comparing all the data generated for Tiputini with the existent data for the San Pablo, Sacha and Sehuaya populations, we found that the heterozygosity for the Tiputini population is twice the value than the one for the San Pablo population. This shows a possible loss of genetic variability in the latter. Probably due to human impacts. Sacha and Sehuaya populations did not present unique alleles, San Pablo and Tiputini did. These shared alleles between populations suggest that gene flow and migrations exist between them. In spite of that the AMOVA analysis locates most of the variance (67%) between the 4 populations. Nei genetic distance indicates a greater distance from every population in relation to Tiputini, this could be an artifact caused by the missing data for several loci for the Sacha and Sehuaya populations. Geographic barriers and distances support the results from the genetic distance analysis. The results from the present study indicate a possible negative effect of human activities on pygmy marmoset populations. Actions to preserve the species are necessary.

Tabla de Contenido

1	Introducción	16
1.1	Especie en estudio	16
1.2	Posibles impactos humanos.....	18
1.3	Diversidad genética.....	20
1.4	Marcadores moleculares (Microsatélites).....	21
2	Objetivos	23
2.1	Objetivo general.....	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	Área de estudio.....	23
4	Justificación.....	24
5	Materiales	26
5.1	Extracción de ADN a partir de muestras de heces de leoncillos.....	26
5.2	Cuantificación de ácidos nucleicos	26
5.3	Electroforesis en geles de agarosa al 1,5%	26
5.4	Amplificación de regiones microsatélite (SSR)	27
5.5	Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida al 6%	27
5.6	Toma de datos y análisis estadísticos	29
6	Métodos.....	29
6.1	Población de <i>C. pygmaea</i> en estudio	29
6.2	Recolección de muestras de heces.....	30
6.3	Extracción de ADN a partir de muestras de heces	30
6.4	Cuantificación de ADN.....	31
6.5	Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1,5%	32
6.6	Amplificación de regiones microsatélite (SSR)	32
6.7	Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida al 6%	33
6.8	Toma de datos y análisis estadísticos	34
6.9	Análisis global	36

7	Resultados.....	36
7.1	Población de Tiputini.....	36
7.1.1	Transferibilidad de primers	36
7.1.2	Frecuencias alélicas	37
7.1.3	Heterocigocidad.....	38
7.1.4	Equilibrio de Hardy y Weinberg	38
7.1.5	Análisis de varianza Molecular (AMOVA)	38
7.1.6	Distancia genética de Nei	39
7.1.7	Estadístico Fst de Wright.....	39
7.1.8	Análisis de Dispersión (PCoA).....	39
7.2	Análisis global de las 4 poblaciones (Tiputini, San Pablo, Sehuaya, Sacha)	40
7.2.1	Frecuencias alélicas	40
7.2.2	Heterocigocidad.....	41
7.2.3	Equilibrio de Hardy y Weinberg	42
7.2.4	Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	43
7.2.5	Distancia genética de Nei	43
7.2.6	Estadístico Fst de Wright.....	43
7.2.7	Análisis de dispersión (PCoA)	44
8	Discusión	44
8.1	Población Tiputini.....	46
8.2	Análisis global (Sacha, Sehuaya, San Pablo, Tiputini).....	49
9	Conclusiones	52
10	Recomendaciones	53
11	Bibliografía	55
12	Tablas	60
13	Figuras	67
14	Anexos	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Caracterización de los microsatélites utilizados para evaluar la diversidad genética en la población de <i>Callithrix pygmaea</i> ubicada en Tiputini. Donde T_a es la temperatura de annealing, N el número de alelos encontrados y bp el rango de tamaño en el que se evidenciaron los alelos; para este estudio.....	46
Tabla 2. Frecuencias alélicas por locus para cada grupo (T1, T2 y T3) perteneciente a la población de Tiputini.....	46
Tabla 3. Heterocigocidad observada y esperada por locus para la población de Tiputini. Donde N es el tamaño de la muestra, N_a número de alelos, N_e número de alelos efectivos, I es el índice de información, H_o es la heterocigocidad observada, H_e heterocigocidad esperada, uH_e heterocigocidad imparcial y F el índice de fijación.....	47
Tabla 4. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para la población de Tiputini. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$	47
Tabla 5. Análisis AMOVA para la población de Tiputini. Donde df son los grados de libertad, SS es la suma de los cuadrados, MS es la media de SS, Est. Var. es la variación estándar y % es el porcentaje que representa la Est. Var.....	47
Tabla 6. Matriz de distancia genética de Nei entre los tres grupos que conforman la población de Tiputini (T1, T2 y T3).....	47
Tabla 7. Matriz del estadístico F_{st} entre los grupos que conforman la población de Tiputini (T1, T2 y T3).....	48

- Tabla 8.** Frecuencias alélicas por locus para cada población. Donde * indica los alelos fijados para una población y ** indica los alelos únicos para una población.....48
- Tabla 9.** Heterocigocidad observada y esperada por locus para cada población. Donde N es el tamaño de la muestra, Na número de alelos, Ne número de alelos efectivos, I es el índice de información, Ho es la heterocigocidad observada, He heterocigocidad esperada, uHe heterocigocidad imparcial y F el índice de fijación.....49
- Tabla 10.** Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para cada de población estudiada de *Callithrix pygmaea*. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$50
- Tabla 11.** Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para la población generalizada de *Callithrix pygmaea*. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$51
- Tabla 12.** AMOVA para las poblaciones estudiadas de *Callithrix pygmaea*. Donde df son los grados de libertad, SS es la suma de los cuadrados, MS es la media de SS, Est. Var. es la variación estándar y % es el porcentaje que representa la Est. Var.....51
- Tabla 13.** Matriz de distancia genética de Nei entre las 4 poblaciones (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini) de *Callithrix pygmaea*.51
- Tabla 14.** Matriz de estadístico Fst entre las 4 poblaciones (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini) de *Callithrix pygmaea*.....51

Índice de Figuras

Figura 1. AMOVA para los diferentes grupos de la población de Tiputini (T1, T2 y T3).....	52
Figura 2. Análisis de coordenadas principales para la población de Tiputini. Existe una separación mayor del grupo T3, que se encuentra todo hacia el lado derecho de la gráfica, mientras que los grupos T1 y T2 están hacia el lado izquierdo de la gráfica y se solapan.....	52
Figura 3. AMOVA entre las distintas poblaciones de <i>Callithrix pygmaea</i> (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini).....	53
Figura 4. Análisis de coordenadas principales para las diferentes poblaciones estudiadas (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini). Se evidencia una separación clara de la población de Tiputini en relación con las demás poblaciones, es la única hacia el lado izquierdo de la gráfica. La población de San Pablo a pesar de encontrarse del mismo lado de la gráfica que las poblaciones de Sacha y Sehuaya, muestra una separación de las mismas. Las poblaciones de Sacha y Sehuaya se encuentran muy cercanas.....	53
Figura 5. Ubicación de las distintas poblaciones de <i>Callithrix pygmaea</i> en un mapa del Ecuador, donde P es San Pablo (3 grupos), SA es Sacha (2 grupos), SE es Sehuaya (1 grupo) y T es Tiputini (3 grupos). Ampliación de la ubicación de las distintas poblaciones estudiadas, evidenciando las barreras y distancias existentes.....	54
Figura 6. Ampliación de la población de Tiputini, se observa las posibles distancias y barreras entre los grupos conformantes (T1, T2 y T3).....	55

Índice de Anexos

Anexo 1. Tomada de Nievergelt et al. 1998, los 9 primeros marcadores fueron los usados en las diferentes poblaciones.....	56
Anexo 2. Tomada de Grativol et al. 2001, se ensayaron los marcadores Lr.P2BH6, Lr. P3AF1 y Lr. P5BE6.....	56
Anexo 3. Tomada de Galbusera y Gillemot (2008), se ensayaron los marcadores Lchu01, Lchu05 y Lchu08.....	57
Anexo 4. Número de muestras de heces provenientes de <i>Callithrix pygmaea</i> para la población de Tiputini.....	57
Anexo 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de ADN extraído a partir de muestras de heces de <i>Callithrix pygmaea</i> . Carril 1: ladder 100bp, Carriles 2 – 9: muestras T1.7 – T1.14.....	57
Anexo 6. Concentración y volúmenes para la reacción de PCR.....	58
Anexo 7. Ciclaje del PCR para la amplificación de regiones microsátélites, 40 ciclos (CJ1 como ejemplo).....	58
Anexo 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ7 para T2, donde el carril 1: ladder 10 bp, del carril 2 al 25se encuentran los productos de PCR para CJ7 pertenecientes al grupo 2 (T2.5, T2.9-T2.31), del carril 26 al 32 se encuentran productos de PCRpara CJ7 del grupo T1 utilizadas para solapar los alelos encontrados (T1.7, T1.10, T1.13, T1.15, T1.18, T1.23, T1.17 respectivamente) y en el carril 33 se encuentra la muestra de pelo P1 utilizada como control positivo.....	59
Anexo 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ11 para T1. Del carril 1 al 28 se encuentran los productos de PCR de las muestras T1.1-T1.28 para CJ11.....	60

Anexo 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ15 para T3.

Donde el primer carril muestra el ladder 10 bp y del carril 2 en adelante se encuentran

los productos de PCR del grupo T3 para CJ15 (T3.1-T3.32).....61

Anexo 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador P5BE6 para

T3. Donde el primer carril muestra el ladder 10 bp usado como referencia y los

siguientes son los productos de PCR para P5BE6 generados a partir de las muestras

pertenecientes al grupo T3 (T3.1-T3.32).....62

1 Introducción

1.1 Especie en estudio

Callithrix pygmaea ($2n = 44$, Soini, 1988) es una especie de primate platirrino (mono del Nuevo Mundo), conocido también como tití pigmeo, mono de bolsillo o de piel roja; pertenece a la familia Cebidae, subfamilia Callitrichinae. Está ubicado dentro del género *Callithrix* compuesto por 10 especies (Rylands y Mittermeir, 2009). Existen dos subespecies para *C. pygmaea*: *C. pygmaea pygmaea* (tití pigmeo del oeste) y *C. pygmaea nivenveintris* (tití pigmeo del este), la primera es la que se encuentra en el Ecuador (Rylands y Mittermeier, 2009). Es la especie de platirrino más pequeña, mide de 14 a 18 centímetros con una cola no prensil que supera la longitud del cuerpo. Son fácilmente reconocibles por su pelaje abundante con tonos que varían del amarillo al rojo (Moynihan, 1976). Los titíes pigmeos habitan bosques tropicales siempre verdes de la Amazonía occidental, su hábitat se compone normalmente de una región en riberas de bosques inundados (varzea e igapo) junto a un hábitat borde con un bosque de tierra firme (de la Torre et al. 2000). Se distribuye en la cuenca occidental del Amazonas, al sur del río Caquetá en Colombia, en la Amazonía del Ecuador, el oriente de Perú y norte de Bolivia y en el noreste de Brasil (Townsend, 2001). Utilizan preferentemente el estrato inferior del bosque, entre 0 a 15 m de altura (Soini, 1988).

Se alimentan principalmente de savia y exudados de ciertas especies de árboles como *Quararibea rhombifolia*, *Vochysia lomatophylla*, *Trichilia spp.*, *Cheiloclinium cognatum*, *Parkia oppositifolia* y *Spondias mombin* o similares según la región, prefieren exudados que contienen galactosa y en menor medida arabinosa; mientras que otras especies evitan estos azúcares. La preferencia de estas sustancias puede ser significativa para la repartición de recursos entre especies (Townsend, 2001). *P. oppositifolia* y *S. mombin* representan el 66% de su fuente de alimentación (Ramirez et al., 1977; Soini, 1988), los cuales

constituyen también su hábitat; por lo cual la presencia de estos árboles está directamente relacionada con la abundancia de los primates (Ramírez et al., 1977). Un estudio realizado por Yépez y colaboradores (2005) determinó que las especies más usadas como fuente de alimentación por los leoncillos en el Ecuador son: *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, *Inga marginata* y *Parkia balslevii*. Cada una de estas fue específica para cada una de las poblaciones estudiadas por Yépez y colaboradores (Sacha, San Pablo, Amazoónico y Zancudococha) (2005). El estudio mostró además que las especies utilizadas no eran necesariamente las más comunes en el área. Los leoncillos pueden alimentarse también de frutas e insectos, así como néctar, flores y capullos en menor medida. Debido a estas últimas características son importantes polinizadores lo cual resalta su importancia ecológica (Janson et al., 1981; de la Torre et al., 2005). El territorio en el que habitan es de 0,15 a 1,2 ha, con una media de 0,4 ha. (Yépez et al., 2005); esto puede relacionarse de igual manera con las fuentes confiables de alimento. Dentro del área en la que habitan, el movimiento horizontal va de 280-300 m por día (Townsend, 2001).

Viven en unidades sociales de dos o más individuos adultos, acompañados por 1 o más subadultos; el tamaño de los grupos varía entre 2 a 9 individuos (Townsend, 2001, Soini, 1988). Son monógamos y solo el macho y la hembra dominantes se aparean; el cuidado parental es realizado por todos los miembros del grupo (Townsend, 2001). Se presentan dos picos gestacionales, uno en la temporada seca y uno en la lluviosa. La gestación dura alrededor de 137 días (de la Torre et al., 2000). Las hembras paren gemelos el 67-76% de los partos, tanto en cautiverio como en la selva; trillizos son muy raros (Townsend, 2001). Viven entre 10 y 12 años.

En el Ecuador se encuentran distribuidos en la Amazonía, por debajo de los 450 msnm. Se han realizado estudios de los posibles impactos de las actividades humanas, monitoreo de las densidades poblacionales y estudios de variabilidad genética (De la Torre et al.,

2000, 2005, 2009, Nieto et al. 2010, de la Torre et al. 2013), evidenciando la vulnerabilidad de esta especie frente a actividades humanas.

1.2 Posibles impactos humanos

De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), varias especies o subespecies pertenecientes a taxones cercanos a *C. pygmaea* están clasificados como en peligro crítico o en peligro como consecuencia de destrucción del hábitat, captura ilegal o caza. Siendo la destrucción del hábitat por deforestación, el factor más importante en la disminución de las poblaciones de primates (Townsend, 2001). Aunque el tití pigmeo no es cazado como alimento para humanos, puede verse afectado por la destrucción del hábitat, así como también por la captura para los mercados de mascotas e investigación. Además, pueden darse formas más sutiles de disturbios en el hábitat, como el ecoturismo (de la Torre et al., 2000).

En un estudio realizado por de la Torre y colaboradores (2000) sobre los posibles impactos del ecoturismo sobre las poblaciones de leoncillos en el oriente ecuatoriano; evaluando el uso de diferentes estratos, la observabilidad, la tasa de vocalización, el comportamiento social, el desempeño reproductivo, entre otros; se encontró que el turismo en sí mismo tiene una correlación negativa con el uso de los estratos bajos del bosque y con el tiempo dedicado al juego social. Debido a los impactos del ecoturismo los individuos utilizaron más los estratos altos y disminuyeron el tiempo dedicado al juego social. Durante este estudio se reportó además la captura de 2 individuos; los grupos que sufrieron esta captura (1 individuo de cada grupo), demostraron en conjunto con los efectos del turismo una menor tasa de vocalización (mayor tiempo en silencio), menor observabilidad, menor comportamiento social (en todas las actividades) y el aumento del territorio en el cual se desenvuelven. Todos estos impactos pueden relacionarse posteriormente con un menor desempeño reproductivo, puesto que los individuos se

dispersan en un área mayor, se comunican menos e interactúan menos. Del mismo modo, un menor comportamiento social puede causar una menor sobrevivencia de los juveniles puesto que no aprenden comportamientos necesarios para la sobrevivencia; ambos efectos podrían generar a largo plazo una disminución en las poblaciones.

La fragmentación del hábitat es otro factor que puede afectar las poblaciones de leoncillos y consiste en la transformación de un área continua en varios fragmentos aislados unos de otros (Fahrig, 2003). Se genera la reducción, fragmentación y deterioro del hábitat, ya que cada fragmento es una representación más pequeña del área original con menos heterogeneidad, pérdida de recursos, menos refugios, entre otros (Lehmkuhl y Ruggiero, 1991). Consecuentemente se generan poblaciones cada vez más pequeñas y aisladas, limitando el tamaño efectivo de la población y previniendo la migración (Ohnishi et al., 1998). Esto genera una disminución en la variabilidad genética, al prevenir el flujo génico (Stanton et al., 2009), aumentando la posibilidad de endogamia y deriva génica; lo que podría resultar en cambios en el comportamiento y esfuerzo reproductivo (Santos y Tellería, 2006). Este fenómeno se da principalmente debido a la construcción de carreteras y la explotación maderera, reduciendo el hábitat para los individuos, así como posiblemente su fuente de alimento (McGarigal, 2001). En Brasil se ha reconocido el gran impacto de la fragmentación del hábitat en especies de Callithricinae, debido a la dificultad de los individuos para migrar hacia otro fragmento (Fahrig, 2003). En el Ecuador se ha establecido que el 75 al 85% de la deforestación se genera en los bosques húmedos de la Amazonía, los mismos que se encuentran afectados por la tala y demás actividades humanas (de la Torre et al. 2005, Bonilla et al. 2012). Estudios realizados en una población de tití pigmeo en la provincia de Sucumbíos evidenciaron una pérdida de hábitat de la especie de cerca del 85% (0,5 ha. remanentes de 3 ha. iniciales) resultante en fragmentación y aislamiento de las poblaciones (de la Torre et al., 2005, 2009). Además de

los factores mencionados, la dependencia de la especie en estudio de otras especies, particularmente para su alimentación, y sus características ecológicas, la convierte en una especie susceptible a los cambios en su hábitat (Stanton et al., 2009).

1.3 Diversidad genética

La diversidad genética se define como la variabilidad de las características heredables de un organismo, entre individuos de una población y entre poblaciones de una misma especie. La existencia de uno o más alelos representantes de un gen en una población determina el polimorfismo de la especie. Mientras mayor sea el polimorfismo de una especie, mayor es su diversidad genética. Esta diversidad se reduce cuando existen cuellos de botella, es decir, la población ha sufrido un drástico descenso en el número de individuos debido a efectos medio ambientales u otros (Piñero, 2008). Una mayor variabilidad genética generará mayores posibilidades de resistir a efectos medio ambientales u otros impactos. Una mayor variabilidad genética se relaciona con la capacidad de adaptación, se ha visto que puede generar cambios en características como: eficiencia metabólica, tasa de crecimiento, tamaño adulto, fertilidad, sobrevivencia y resistencia a enfermedades, entre otras (Santos y Tellería, 2006). La fragmentación del hábitat resulta en una pérdida de la diversidad genética y de la adaptabilidad potencial de la población frente a cambios ambientales (Woodruff, 1990).

Poblaciones pequeñas tienden a tener poca diversidad genética, ya que existe un mayor porcentaje de endogamia lo cual provoca un aumento en la frecuencia de ciertos alelos y una disminución en la frecuencia de otros. Poblaciones salvajes de *C. jacchus* estudiadas por Nievergelt y colaboradores (2000) mostraron una baja variabilidad genética. Al igual que otros estudios realizados en diferentes géneros de callitrichinos, a través de fingerprinting o aloenzimas. Estableciendo que la baja variabilidad genética podría ser una condición típica de estos primates (Nievergelt et al., 2000). Poblaciones con una menor

variabilidad de alelos, van a tener menor posibilidad de sobrevivir los cambios ambientales (Frankham et al., 2002). La producción de gemelos no idénticos que nacen con quimeras de la médula ósea; es decir, presentan células de médula ósea tanto de la madre como de ambos gemelos debido a la circulación placentaria; representa un ejemplo de los efectos de una baja variabilidad genética. Se ha observado que estos gemelos son más susceptibles a distintos agentes: virales, bacterianos, protozoarios y helmintos (Antunes et al., 1998).

Nieto y colaboradores (2010) realizaron un estudio para evaluar la diversidad genética de leoncillos en la población de San Pablo, provincia de Sucumbíos, utilizando los marcadores moleculares microsatélites (CJ1, CJ6, CJ7, CJ10, CJ11, CJ12, CJ13, CJ14, CJ15). El estudio encontró una heterocigicidad alta (entre 0,556 (CJ1) y 0,750 (CJ15)) para uno de los grupos (Grupo G4) que presentó un mayor número de alelos, mientras que los demás grupos (Grupos G1, G2, G42 y G43) mostraban menor heterocigicidad relacionada con un menor número de alelos. Estos resultados pudieron deberse al tamaño de muestra utilizado y al número de loci analizados en la población. Al comparar los datos de Nieto et al. (2010) con los del estudio realizado por Terán (2013) para otras dos poblaciones de leoncillos (Sacha y Sehuaya) ubicadas también en la provincia de Sucumbíos, se evidenció que la heterocigicidad observada fue mayor en la población de San Pablo que en las de Sacha y Sehuaya. Los resultados podrían explicarse nuevamente, a través del tamaño de la muestra utilizado y a la falta de información, ya que de los 5 loci utilizados 2 fueron monomórficos.

1.4 Marcadores moleculares (Microsatélites)

La variabilidad genética puede ser monitoreada directa o indirectamente de varias maneras, una de ellas es el uso de marcadores moleculares. Un marcador molecular es un fenotipo molecular que proviene de la expresión de un gen, el cual puede detectarse y también monitorear su herencia. Un marcador molecular basado en el ADN, es un gen o

una región no codificante de ADN que puede usarse para identificar individuos o especies. Se basa en analizar las mutaciones que generan la variabilidad (polimorfismo) en las secuencias de ADN. Algunos de los marcadores moleculares basados en el ADN son los RAPD, RFLP, SSR, AFLP, entre otros (FAO). Los microsatélites o SSR (simple sequence repeats), son regiones no codificantes del ADN, conformadas por motivos repetitivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. Se encuentran tanto en los genomas eucariotas como procariotas. Se caracterizan por ser abundantes y heredarse de manera codominante (Olivieria et al., 2006). Se distribuyen de forma aleatoria a lo largo del genoma. Se utilizan como marcadores moleculares debido a su alto índice de mutación, es decir, son altamente polimórficos (Ruíz García et al., 2007). Su reproducibilidad es confiable y tienen un 3,72 % de amplificaciones erróneas (Oliveira et al., 2006). Se han utilizado para analizar estructuras sociales, realizar diagnósticos de paternidad, establecer filogenia, determinar la existencia de cuellos de botella, determinar la variabilidad genética, entre otros (Ruíz García et al., 2007).

El presente estudio determinó la diversidad genética de la población de leoncillos de Tiputini. Para ello, se ensayaron 9 marcadores moleculares microsatélites (SSR) heterólogos desarrollados por Nievergelt y colaboradores en 1998, para *Callithrix jacchus*, algunos de los cuales generaron resultados en los estudios previos realizados para las poblaciones de San Pablo, Sacha y Sehuaya por Nieto et al. (2010) y Terán (2013). Además de ello se ensayaron 3 SSR generados para *Leontopithecus rosalia* por Grativol et al. (2001) y 3 generados para *Leontopithecus chrysomelas* por Galbusera y Gillemot (2008), con la finalidad de tener una cobertura más amplia del genoma. Finalmente se comparó los resultados obtenidos con los de los estudios realizados por Nieto et al. (2010) y Terán (2013) para evaluar la existencia de posibles impactos humanos sobre la variabilidad genética de esta especie.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

- Evaluar la diversidad genética de tres grupos de *Callithrix pygmaea* de la población de Tiputini, provincia de Orellana, Ecuador; a través del uso de marcadores moleculares microsatélites SSR y comparar los resultados con los obtenidos en estudios previos de tres poblaciones de leoncillos en la provincia de Sucumbíos.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la transferibilidad de 15 pares de primers heterólogos para regiones microsatélite; 9 provenientes de *Callithrix jacchus* (Nievergelt et al., 1998), 3 provenientes de *Leontopithecus rosalia* (Grativol et al., 2001) y 3 provenientes de *Leontopithecus chrysomelas* (Galbusera y Gillemot, 2008).
- Determinar la variabilidad genética de la población de Tiputini mediante el análisis de regiones microsatélite.
- Comparar los resultados obtenidos para la población de Tiputini (Provincia de Orellana), con los obtenidos previamente para las poblaciones de San Pablo por Nieto et al. (2010) y Sacha y Sehuaya por Terán et al. (2013) para evaluar el efecto de la fragmentación del hábitat y de otras actividades humanas sobre la diversidad genética de esta especie.

3 Área de estudio

Este proyecto analiza la diversidad genética de una población de *Callithrix pygmaea* ubicada en la Amazonía norte del Ecuador en la Provincia de Orellana, a orillas del río Tiputini. Se recolectaron muestras de heces fecales de leoncillos de tres grupos para la obtención de ADN. La población fue muestreada entre mayo de 2012 y mayo de 2013. Las

muestras del grupo 1 (T1) fueron recolectadas de mayo a junio 2012, diciembre 2012, enero a marzo 2013 y mayo 2013. Las coordenadas de referencia del territorio de ese grupo fueron 9929379 N - 371669 E según el sistema de coordenadas UTM (Datum WGS84). Las muestras del grupo 2 (T2) fueron recolectadas únicamente de mayo a junio 2012. Las coordenadas de referencia del territorio de ese grupo fueron 9930965 N - 371147 E UTM (Datum WGS84); el grupo no fue encontrado en las posteriores fechas de recolección. Finalmente para el grupo 3 (T3), las muestras fueron recolectadas en diciembre 2012 y de abril a mayo 2013, las coordenadas de referencia del territorio de ese grupo fueron 9929278 N – 371986 E UTM (Datum WGS84). El grupo T3 se encuentra hacia el sur del río Tiputini; mientras que T1 y T2 se encuentran hacia el norte, separados por una distancia de alrededor de 1,67 km.

La extracción de ADN proveniente de heces y los análisis moleculares y estadísticos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), campus Cumbayá.

4 Justificación

Los primates de la especie *Callithrix pygmaea* que habitan la Amazonía ecuatoriana son importantes para mantener la estructura y dinámica de los ecosistemas en los que se encuentran, debido a sus funciones ecológicas como polinizadores y controladores de poblaciones de insectos (de la Torre et al., 2005). La especialización en su dieta junto con las características de su hábitat, hacen que esta especie sea particularmente vulnerable a actividades humanas o los resultados de las mismas; entre ellos la fragmentación y pérdida de hábitat. Por lo mismo, esta especie está incluida en la Lista II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas (CITES) y está considerada como Vulnerable en el libro rojo de mamíferos amenazados en Ecuador (Tirira, 2011). Su estado de amenaza requiere de urgentes esfuerzos para lograr su conservación.

Un análisis de la diversidad genética contribuirá a evaluar el estado de esta especie en el Ecuador. Se busca a través de este estudio encontrar diferencias en la diversidad genética, frecuencias alélicas o existencia de alelos únicos entre las poblaciones estudiadas, toda vez que éstas han sido afectadas en distintos grados por actividades humanas. La población de San Pablo, por ejemplo, ha sido una de las más afectadas. Durante un estudio en esta población del 2001 al 2005, el área remanente de los bosques de varzea, donde se encontraban los grupos de leoncillos, pasó de 3 ha. a 0,5 ha.. El bosque fue transformado en pastizales y cultivos. Esto causó una disminución en la densidad poblacional de la especie en esa área (de la Torre et al., 2009). Pudiendo generar un cuello de botella en la población (Nieto et al., 2010). Por otro lado, la población de Tiputini, vive en uno de los pocos bosques bien conservados de la Amazonía norte del Ecuador (Marsh, 2004), siendo la menos afectada por actividades humanas de las poblaciones en el estudio.

Tanto los impactos de las actividades humanas, como la disminución en la variabilidad genética influenciada por estos impactos, podrían resultar a largo plazo en una menor posibilidad de sobrevivir a cambios en el medio ambiente (Woodruff, 1990). Es por ello que es necesario conservar la variabilidad genética para permitir a la especie adaptarse y responder a las diferentes presiones ambientales. El uso de marcadores moleculares representa un método confiable para el estudio de la variabilidad genética, debido a que no se encuentran afectados por el medio ambiente y se puede seguir el linaje de los mismos a través del tiempo (Oliviera et al. 2006), a diferencia de los marcadores morfológicos. Al utilizar un mayor número de SSR que en los estudios previamente realizados por Nieto et al. (2010) y Terán et al. (2013), se busca generar información más apegada a la realidad. Finalmente con la comparación entre poblaciones, una más afectada (San Pablo) y la otra más conservada (Tiputini) se espera evidenciar el impacto de las actividades humanas

sobre la diversidad genética. De este modo se obtendrá información que permita establecer medidas en pro de la conservación de la especie.

5 Materiales

5.1 Extracción de ADN a partir de muestras de heces de leoncillos

- Muestras de heces de *Callithrix pygmaea* recolectadas en Tiputini
- QIAamp DNA Stool Mini Kit Qiagen
- Etanol absoluto Reactivos H.V.O
- Vórtex VWR®
- Cama de arena Thermo Scientific™
- Incubadora MaxQ 4000 Barnstead Thermo Scientific™
- Cámara de flujo laminar Labconco™
- Balanza analítica Sartorius™
- Microcentrífuga 5415R Eppendorf™

5.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

- Muestras de ADN extraídas de las muestras de heces de leoncillos
- Nanodrop 2000 Thermo Scientific™

5.3 Electroforesis en geles de agarosa al 1,5%

- Muestras de ADN extraídas de las muestras de heces de leoncillos
- Agarosa LE Axygen™
- Ladder 100bp Axygen™
- Tris Base Invitrogen™
- Ácido bórico Amp™
- EDTA Invitrogen™

- SYBR® Safe DNA gel stain InvitrogenTM
- Blue juice InvitrogenTM
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL LabnetTM
- Fotodocumentador Gel Doc XR Bio-RadTM

5.4 Amplificación de regiones microsatélite (SSR)

- Muestras de ADN extraídas de las muestras de heces de leoncillos
- Tubos de 1,5 mL y 0,2 mL Eppendorf
- Aguade PCR
- dNTP Mix 10 μ M InvitrogenTM
- Primers heterólogos (Nievergelt et al., 1998, Grativol et al., 2001, Galbusera y Gillemot, 2008) (Anexo 1, 2 y 3)
- Taq DNA Polimerasa Recombinante InvitrogenTM 5U/ μ L
- Buffer 10X para PCR InvitrogenTM
- Cloruro de Magnesio 50mM InvitrogenTM
- BSA
- Microcentrífuga 5415D EppendorfTM
- Termociclador T personal BiometraTM

5.5 Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida al 6%

- TBE 10x (Tris base InvitrogenTM 108g/L, Ácido bórico AmpTM 55g/L, EDTA InvitrogenTM 7.44g/L)

- Solución poliacrilamida 6% (Acrilamida InvitrogenTM 57g/L, Bisacrilamida InvitrogenTM 3g/L, TBE 1X 100 mL/L, Urea InvitrogenTM 300g/L)
- Persulfato de amonio 10% J.T. BakerTM
- Temed InvitrogenTM
- AlconoxTM
- RainXTM
- Ladder 10bp (Ladder 10bp InvitrogenTM 5mL/25mL, Bluejuice InvitrogenTM 2,5mL/25mL)
- Loading Dye (0.01% azul bromofenol, 0.01% xilencianol, urea InvitrogenTM 5M, glycerol FisherTM)
- Blue juice InvitrogenTM
- Solución alcohol-ácido acético para tratamiento del vidrio (Alcohol absoluto J.T. BakerTM, ácido acético glacial MerckTM 0.5%)
- Bind Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane) Sigma AldrichTM
- Alcohol potable al 70%
- Cámara Vertical de electroforesis Sequi-Gen GT BioRadTM
- Fuente de poder Power Pac HV BioRadTM
- Termociclador Techne (denaturación)
- Solución Fijación/Parada (Alcohol Absoluto J.T. BakerTM 10% v-v, Ácido Acético Glacial MerckTM 0.5% v-v)

- Solución de Tinción (Nitrato de Plata Fisher ScientificTM 2g/L, Formaldehído J.T.BakerTM 37% 0.00015% v-v)
- Solución de Revelado (Hidróxido de Sodio MerckTM 15g/L, Formaldehído J.T.BakerTM 37% 0.0002% v-v)

5.6 Toma de datos y análisis estadísticos

- Gel de poliacrilamida revelado
- Transiluminador de luz blanca
- Cámara de Fotos Canon EOSRebel T1iTM
- Computadora con Microsoft Office que soporte GenAlex 6.5
- GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012)

6 Métodos

Esta tesis comprende 2 partes, en la primera se analiza la diversidad genética de la población de *C. pygmaea* de Tiputini y en la segunda se integran los datos de 2 estudios previos realizados para las poblaciones de San Pablo, Sacha y Sehuaya para un análisis global.

6.1 Población de *C. pygmaea* en estudio

La población se encuentra ubicada cerca de las orillas del río Tiputini en la provincia de Orellana (Nor este ecuatoriano). Tres grupos de esta población (T1, T2 y T3) fueron estudiados; T1 y T2 se encuentran hacia el norte a una distancia lineal aproximada de 1,7 km el uno del otro y están separados de T3 por el río Tipuini. Durante el periodo de estudio de campo, el grupo T1 estuvo compuesto por 5 individuos, T2 y T3 estuvieron compuestos por 6 individuos respectivamente.

6.2 Recolección de muestras de heces

Las muestras de heces fueron recogidas in situ en una malla colocada bajo el principal árbol de exudados de cada grupo, luego de ser evacuadas por los leoncillos. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 2mL con alcohol al 96% y se mantuvieron en refrigeración (-4°C) hasta ser entregadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, donde se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Se utilizaron para el análisis 96 muestras, 32 por cada grupo (Anexo 4). Ya que fue imposible determinar exactamente qué muestras correspondían a cada individuo durante la recolección; después de los análisis moleculares y el genotipado, se asumió que las muestras con el mismo genotipo para todos los loci analizados, pertenecían a un solo individuo, identificando así los individuos pertenecientes a cada grupo.

6.3 Extracción de ADN a partir de muestras de heces

Para la extracción de ADN a partir de heces, se utilizó un protocolo modificado de QIAamp DNA Stool mini kit, presentado por Chaves, Díaz y Pomilla para el Slacker Institute of Comparative Genomics (2010). Debido a que el protocolo recomienda 200 mg de materia fecal, y que para la mayoría de las muestras no existía tal cantidad, se utilizó todo el material disponible. Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadió 1,5 mL de buffer ASL; con la ayuda de palillos y vórtex se disolvió la muestra en el buffer y se incubó la muestra a 60°C en la incubadora con agitación constante de 25 rpm durante toda la noche.

Se centrifugó durante 3 minutos a 13,200 rpm. Se transfirió 1,5 mL o menos de sobrenadante, dependiendo de la disponibilidad, a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. Se añadió la pastilla InhibitEX evitando manipularla con las manos y de acuerdo al volumen de sobrenadante rescatado; del siguiente modo 1,5 mL = 1 pastilla completa; 1 mL = 2/3 de la pastilla; 750 uL = 1/2 de la pastilla; 500 uL = 1/3 de la pastilla. Esta suspensión fue

sometida a agitación a través del vórtex por 1 minuto y centrifugada por 12 min a 13,200 rpm para sedimentar el material de la pastilla.

Se transfirieron 600 uL, o el volumen existente, a un nuevo tubo de 2 mL donde se habían colocado previamente 25 uL de proteinasa K, se mezcló suavemente hasta conseguir una solución homogénea. Se añadieron 600 uL de buffer AL y se mezcló utilizando el vórtex por 15 segundos. Después se colocó en la cama de arena a 70°C, donde se incubó por 15 minutos. Después de ello se añadió al tubo 600 uL de etanol absoluto frío y se mezcló utilizando el vórtex por 15 segundos. Posteriormente se transfirió 600 uL de la solución a una columna, QIAamp spin previamente rotulada. Se centrifugó a 13,200 rpm por un minuto y se descartó el filtrado; este proceso se repitió hasta que toda la solución había sido filtrada. Posteriormente, usando un nuevo tubo de colección para la columna se añadió 500 uL de buffer AW1 y se centrifugó a 13,200 rpm por un minuto; el proceso se repitió con el buffer AW2 centrifugando por 2 minutos. Finalmente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL previamente rotulado y se añadió 60 uL de buffer AE caliente directamente a la membrana de la columna. Se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se centrifugó por 3 minutos a 8,000 rpm. Se añadió 60 uL de buffer AE, incubando por 15 minutos y se repitió la centrifugación. Este último paso se repitió una segunda vez. Se obtuvo así, 180 uL de ADN de cada muestra.

6.4 Cuantificación de ADN

Para establecer las concentraciones de ADN obtenidas en las extracciones, se realizó la cuantificación de cada muestra mediante espectrofotometría ultravioleta utilizando el equipo Nanodrop 2000 de Thermo Scientific. Ya que el kit de extracción de ADN no es específico para la especie en estudio y las concentraciones de ADN obtenidas fueron bajas (mínimo 0,81 ng/uL T2.6, máximo 37,54 ng/uL T2.1) desconociéndose qué porcentaje del ADN es del individuo en estudio, se las utilizó directamente, sin dilución.

6.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1,5%

Para visualizar la calidad de ADN extraído y la existencia de amplificación con cada par de primers, se prepararon geles de agarosa al 1,5%. Colocando 10 mL de TBE 10X en una probeta y aforando con agua destilada hasta alcanzar 100 mL. Se disolvió 1,5 g de agarosa en este volumen. Posteriormente se colocó 3 uL de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen™. Se esperó hasta que gelifique. Se colocó 300 mL de TBE 1X en la cámara hasta dejar sumergido el gel.

Se mezcló 2 uL de buffer de carga (2X) y 8 uL de ADN de cada muestra. Luego se cargó en los pocillos del gel, se dejó correr durante 45 minutos a 90W si se trataba de ADN extraído, y 1 hora a 90W si se trataba de productos de PCR. Al finalizar, se retiró el gel de la cámara y se tomó una foto utilizando el Fotodocumentador Gel Doc XR Bio-Rad™ (Anexo 5).

6.6 Amplificación de regiones microsatélite (SSR)

Los primers utilizados fueron los desarrollados por Nievergelt y colaboradores en 1998 para *C. jacchus*, y los desarrollados por Grativol y colaboradores en 2001 para *L. rosalia*, ambas especies pertenecientes a la familia Callithricidae (Tabla 1). Se seleccionaron 15 primers en total, basándonos en la heterocigocidad encontrada por los diferentes autores. Los primers fueron sintetizados por Invitrogen. Estos fueron evaluados y se seleccionaron 7 que amplificaron para la especie en estudio. La amplificación de las regiones microsatélite del genoma de *Callithrix pygmaea* se realizó con el método previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología vegetal (Nieto et al., 2010), utilizando Taq DNA Polimerasa Recombinante Invitrogen™ 5U/μL. Se preparó un master mix para el número de muestras a procesar, en donde el volumen final de cada reacción era de 25 uL, las diferentes concentraciones de cada reactivo se muestran en el Anexo 6. Posterior a

la preparación del master mix, se lo distribuyó en los tubos de PCR y se añadió el ADN. Las mezclas de reacción fueron colocadas en el Termociclador Tpersonal BiometraTM bajo el programa de ciclaje de temperaturas indicado en el Anexo 7. La temperatura de annealing varió de acuerdo al par de primers utilizado (Tabla 1).

6.7 Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida al 6%

Para la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida se utilizó la cámara Sequi-GenBio-RadTM. En primer lugar se lavó los vidrios cuidadosamente utilizando el detergente Alconox. Se dio a cada vidrio un tratamiento especial utilizando Kinwipes para esparcir las soluciones, primero con alcohol al 70% seguido de Bind Silane (1mL ácido acético glacial + 3 μ L BindSilaneTM) al vidrio donde se pega el gel y de 3mL de RainXTM y 800 μ L de SigmacoteTM al vidrio de la cámara. Una vez tratados los vidrios se armó la cámara y se inyectó la solución de acrilamida al 6% previamente preparada junto con 545 μ L de persulfato de amonio 0.1% y 109 μ L de TemedTM. Se dejó polimerizar la acrilamida en la cámara por una hora, con el peine colocado con los dientes hacia afuera para formar el frente de corrida. Luego se ensambló la cámara en posición vertical, se agregó 1.5L de TBE 1X, previamente calentado en el microondas por 6 minutos. Se introdujo el peine con los dientes hacia adentro para formar los pocillos. Se retiró la úrea de cada pocillo con ayuda de una pipeta Pasteur y se cargó 3 μ L de buffer de corrida (loading dye) saltando un pocillo a lo largo de todo el gel.

Se realizó la precorrida a 80V y una temperatura máxima de 50°C durante 30 minutos. Luego se cargó las muestras (10 μ L de producto de PCR y 1 μ L Bluejuice10x) previamente desnaturalizadas a 96°C utilizando el termociclador TECHNE y se las corrió durante 2 horas y media a 80V y una temperatura máxima de 50°C. Al finalizar el tiempo

de corrida se llevó acabo la tinción del gel con nitrato de plata (Benbousa et al., 2006). Para ello, se desensambló la cámara, separando cuidadosamente el vidrio de la cámara. En primer lugar se colocó el vidrio con el gel en la solución fijadora, previamente refrigerada, durante 5 minutos, acto seguido se lo colocó en la solución de tinción durante 7 minutos con agitación constante y en oscuridad. Posteriormente se lavó el gel por 8 segundos con agua destilada para después colocarlo en la solución de revelado por 7 minutos con agitación constante y en oscuridad. Para finalizar se colocó al gel por 3 minutos en la solución de parada y se le dio un último lavado con agua destilada por 15 segundos. Se dejó que se seque hasta el siguiente día.

6.8 Toma de datos y análisis estadísticos

Con ayuda del transiluminador de luz blanca se evidenciaron los alelos existentes, se midió la migración de cada uno. Del mismo modo se midió la migración de cada banda del ladder 10bp (Anexos 8 al 11). Posteriormente se realizó una regresión lineal con las medidas del ladder y se utilizó la ecuación generada para encontrar el peso en pares de bases de cada uno de los alelos (Tabla 1). Finalmente se generaron los genotipos para cada muestra y se realizó una matriz de alelos para determinar los genotipos de los individuos de cada grupo. Los resultados de esta matriz fueron utilizados para realizar los diferentes análisis estadísticos a través del software GenALEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Se calcularon:

- Frecuencias alélicas: es decir, la proporción de un alelo específico respecto al conjunto de alelos que puedan ocupar un locus (Nei, 1978).
- Heterocigosis observada y esperada: heterocigocidad observada corresponde al porcentaje de individuos heterocigotos en las muestras, mientras que la esperada corresponde a lo esperado por el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1978)

- Índice de fijación: se calcula por locus ((Heterocigocidad esperada – heterocigocidad observada)/Heterocigocidad esperada). Valores cercanos a cero son normales cuando el apareamiento es aleatorio, mientras que valores positivos altos indican endogamia. Valores negativos indican un exceso de heterocigocidad por apareamiento no aleatorio (Peakall y Smouse, 2012).
- Índice de información: se calcula por locus, $I = \sum p_i \ln p_i$, donde p_i es la frecuencia del alelo i . Valores cercanos a cero se dan cuando un alelo existe más abundantemente que otros, cuando solo existe uno el índice es igual a cero (Peakall y Smouse, 2012).
- Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg: la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural, ni otro factor y no se produzcan mutaciones (Stern, 1943).
- Distancia de Nei: donde la variabilidad se atribuye a la mutación y a la deriva (Nei, 1978).
- Estadística F_{st} de Wright: Mide la fijación de un alelo diferente por cada subpoblación para estimar el déficit total de heterocigotos en la subpoblación; $F_{st} = 0$, las diferentes poblaciones se comportan como una sola población y $F_{st} = 1$, las subpoblaciones presentan diferentes alelos fijados (Holsinger, 2009).
- AMOVA: es el modelo estadístico para estimar la variación molecular dentro de una especie (Peakall y Smouse, 2012).
- PCoA: modelo matemático que convierte un set de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un set de valores lineales para visualizar las similitudes y diferencias genéticas entre las poblaciones (Peakall y Smouse, 2012).

6.9 Análisis global

Además de los análisis exclusivos para la población de Tiputini, se compararon los datos de la misma con los encontrados previamente por Nieto et al. en 2010 para la población de San Pablo (Provincia de Sucumbíos) y por Terán en 2013 para las poblaciones de Sacha y Sehuaya (Provincia de Sucumbíos) en un análisis global. Se realizaron los mismos análisis estadísticos que los mencionados en 6.8.

7 Resultados

7.1 Población de Tiputini

7.1.1 Transferibilidad de primers

Se evaluaron 9 pares de primers (CJ1, CJ6, CJ7, CJ10, CJ11, CJ12, CJ13, CJ14, CJ15), provenientes de *Callithrix jacchus* desarrollados por Nievergelt y colaboradores en 1998 (Anexo 1) y utilizados previamente por Terán (2013) y Nieto et al. (2010) para estudiar las poblaciones de San Pablo, Sacha y Sehuaya. De estos 9 pares de primers, 5 (CJ1, CJ7, CJ11, CJ14, CJ15) fueron polimórficos para la población de Tiputini (Tabla 1). Los cuatro restantes no amplificaron. Además de estos se evaluaron 6 primers que no habían sido probados previamente, 3 provenientes de *Leontopithecus rosalia* desarrollados por Grativol et al. en 2001 (P2BH6, P5BE6, P3AF1, Anexo 2) y 3 provenientes de *Leontopithecus chrysomelas* desarrollados por Galbusera y Gillemot en 2008 (Lchu01, Lchu05, Lchu08, Anexo 3). De éstos únicamente 2 provenientes de *L. rosalia* (P5BE6, P3AF1) amplificaron y fueron polimórficos para la población de Tiputini, lo que podría evidenciar una mayor distancia entre *C. pygmaea* y *L. chrysomelas*. Se utilizaron los 7 marcadores que resultaron polimórficos para evaluar las posibles diferencias y distancias existentes entre los 3 diferentes grupos (T1, T2 y T3) de la población de Tiputini. De tal manera que se obtuvo una transferibilidad de marcadores heterólogos del 47%.

El número de alelos por locus, los rangos de tamaño de los alelos y las temperaturas de annealing fueron, en varios casos, distintos a los reportados por los diferentes autores (Nievergelt et al. 1998 y Grativol et al. 2001) y se muestran en la Tabla 1 y Anexos 1 y 2. En lo que corresponde a las temperaturas, ésta se mantuvo para CJ11 (58°C), mientras que existe una diferencia de 2°C menos para CJ1, CJ7 y CJ14 y diferencias mayores (8-10°C) para los restantes (CJ15, P3AF1, P5BE6). Con respecto al número de alelos, la mayor parte de los marcadores evidenciaron un número menor al encontrado por los autores (Nievergelt et al. 1998 y Grativol et al. 2001), exceptuando CJ15 que presentó 1 alelo más del número reportado. En lo que concierne al rango de tamaño, se analizaron los alelos dentro del rango presentado por los diferentes autores (Nievergelt et al. 1998 y Grativol et al. 2001) y aquellos cuyas diferencias no sobrepasaran los 15 pares de bases con respecto al rango máximo reportado. Excepto para P5BE6 que fue tomado en cuenta a pesar de tener una diferencia de 50 pares de bases con el rango reportado, debido a la claridad de su amplificación, que daba certeza de que no se trataba de amplificación inespecífica, sino que correspondía a regiones microsatélite de *C. pygmaea* (Anexo 11).

7.1.2 Frecuencias alélicas

Finalmente se obtuvo un genotipo por cada individuo, es decir: 5 para T1, 6 para T2 y 6 para T3. El número de alelos encontrados con los 7 pares de primers evaluados va de 2 a 5, resaltando al locus CJ15 como el más informativo por la presencia de 5 alelos (Tabla 2). Al calcular las frecuencias alélicas para cada uno de los grupos se evidencian valores similares para los grupos T1 y T2, pero diferentes para el grupo T3, al menos en los loci para los que se tiene datos completos (6/7). También se observa que para los grupos T1 y T2, en los loci con dos alelos (CJ1, CJ7, CJ11), la frecuencia de cada alelo es cercana al 50% excepto para el locus P5BE6 (Frecuencia 0,2-0,8 y 0,25-0,75 respectivamente). En tanto que en loci con más de dos alelos, uno de los alelos predomina (Frecuencia entre 0,6-

0,9). En el caso del grupo T3, siempre hay un alelo que predomina (Frecuencia entre 0,6-0,9). El grupo T3 no presenta amplificación para el locus CJ1, además carece de los alelos de 141 pb y 161 pb del locus CJ15, así como el alelo de 195 pb de CJ14. Todos estos alelos estuvieron presentes tanto en T1 como en T2. Por otro lado T2 y T3 comparten el alelo de 176 pb del locus CJ14, ausente en T1. Así mismo T1 y T3 comparten el alelo de 156 pb del locus CJ15, ausente en T2. Se evidencia que el alelo de 164 pb de CJ14 es único para T2, mientras que el alelo de 147 pb de CJ15 es único para el grupo T1, no se encontraron alelos únicos en T3 (Tabla 2).

7.1.3 Heterocigocidad

Los valores de la heterocigocidad observada son muy cercanos a los valores de heterocigocidad esperada, excepto para los loci CJ7 y CJ11, en los cuales hay cierta diferencia (H_o : 0.7 vs H_e : 0.4 aprox). La heterocigocidad observada va de 0,333 para los loci CJ14 y CJ15; hasta 0,750 para el locus CJ7, mientras que la heterocigocidad esperada va 0,344 para CJ14 hasta 0,500 para CJ1 (Tabla 3). El índice de fijación (F) varía de 0.015 a 0.6. Los valores más altos corresponden a los loci CJ7 (0.6) y CJ11 (0.55), en donde predomina uno de los alelos. El índice de información (I) varía de 0,578 para P5BE6 a 0,932 para CJ15. El número de alelos efectivos para todos los locus es de 2 (CJ1) o menor.

7.1.4 Equilibrio de Hardy y Weinberg

El análisis de Hardy-Weinberg para la población de Tiputini indica que de los 7 loci analizados: CJ7, CJ11 y CJ15 se encuentran fuera del equilibrio ($P < 0,05$), mientras que los demás se encuentran en equilibrio (Tabla 4).

7.1.5 Análisis de varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de AMOVA para la población de Tiputini indicó que el 55% de la varianza se encuentra dentro de los grupos, el 44% se debe a diferencias entre los grupos y únicamente el 1% representa las diferencias entre los individuos (genotipos). Esto indica

que los grupos (T1, T2 y T3) presentan diferencias entre sí; en sus frecuencias alélicas y alelos existentes. Sin embargo dentro del mismo grupo esta diferencia es mayor (Tabla 5, Figura 1).

7.1.6 Distancia genética de Nei

La matriz de distancia genética de Nei entre los grupos de leoncillos de la población de Tiputini indica que existe una mayor distancia genética tanto de T1 como de T2 con el grupo T3 (0,11-0,166), siendo mayor con T2. Mientras que los grupos T1 y T2 son los más cercanos entre sí (0,038). A pesar de ello hay que considerar que la distancia existente entre los tres grupos de la población de Tiputini, es una distancia pequeña (Máx 0,166, Tabla 6). Esto evidencia que los grupos siguen siendo cercanos y probablemente existe flujo génico entre ellos.

7.1.7 Estadístico Fst de Wright

De la misma manera, la matriz entre los grupos (T1, T2 y T3) para el estadístico Fst, indica frecuencias alélicas similares o poca diferenciación genética entre T1 y T2 (0,022) ya que el valor encontrado es cercano a 0. Mientras que existe un mayor porcentaje de diferenciación genética entre T1 y T3 (0,137). Finalmente revela diferenciación genética algo mayor entre T2 y T3 (0,16). Esto indica una cercanía entre T1 y T2, mientras que la mayor distancia se encuentra entre T2 y T3 (Tabla 7).

7.1.8 Análisis de Dispersión (PCoA)

El análisis de coordenadas principales permite advertir un cierto nivel de estructuración de la población de leoncillos de Tiputini, pues se puede distinguir dos grupos. Todos los individuos de T3 están hacia el lado derecho de la gráfica, mientras que T1 y T2 se encuentran en el lado izquierdo con un cierto nivel de solapamiento entre ellos (Figura 2).

7.2 Análisis global de las 4 poblaciones (Tiputini, San Pablo, Sehuaya, Sacha)

Posterior al análisis realizado para la población de Tiputini, se compilaron todos los datos existentes para las diferentes poblaciones de *Callithrix pygmaea* estudiadas por Nieto et al. (2010), Terán (2013) y en la presente investigación. Se debe mencionar que las cuatro poblaciones no tienen la misma información, ya que no siempre se utilizó los mismos SSR. El marcador CJ7, amplificó para todas las poblaciones, CJ11, amplificó para Sacha, San Pablo y Tiputini, y los loci CJ1, CJ14 y CJ15 amplificaron para las poblaciones de San Pablo y Tiputini. El locus CJ12, que amplificó para San Pablo, Sacha y Sehuaya, no se utilizó ya que era monomórfico para todas y por lo tanto no informativo. Se incluyó además en los análisis a los loci P3AF1 y P5BE6, con datos únicamente para Tiputini.

7.2.1 Frecuencias alélicas

Para la población Sehuaya hay información de dos loci (CJ7, CJ13) de los cuales CJ7 tiene el alelo de 125 pb fijado (frecuencia 1). La población Sacha solo cuenta con información para tres loci (CJ7, CJ11 y CJ13), con el alelo de 122 pb de CJ11 fijado (frecuencia 1). Para San Pablo se tiene información para 6 loci y para Tiputini se tiene la información de 7 de los 9 loci considerados en el análisis global.

Las frecuencias alélicas entre las 4 poblaciones son dispares. Al comparar las frecuencias alélicas de San Pablo y Tiputini se encuentra que difieren tanto en valor como en los alelos presentes. Por ejemplo en San Pablo el locus CJ7 tiene los alelos de 118 y 123 pb con frecuencias de 0.78 y 0.21 respectivamente, en tanto que en Tiputini, el mismo locus tiene los alelos de 123 y 125 pb con frecuencias de 0.62 y 0.37 respectivamente. Algo similar ocurre en los demás loci (Tabla 8).

Adicionalmente, el análisis de frecuencias alélicas para cada población indicó que los alelos de 142 y 144 pb de CJ1 son únicos para la población de San Pablo, al igual que los alelos de 128, 130 y 132 pb de CJ15 y de 217, 237 y 243 pb de CJ10. Las poblaciones

de Sacha y Sehuaya no evidencian ningún alelo privado. Los alelos únicos de la población de Tiputini son el alelo de 132 pb de CJ11, de 164 y 195 pb de CJ14, de 142, 147, 149, 156 y 161 pb de CJ15, de 121, 124 y 126 pb de P3AF1 y de 169 y 176 pb de P5BE6. Aunque con frecuencias diferentes, las poblaciones de San Pablo y Tiputini comparten los alelos de 146 y 149 pb de CJ1, ausentes en Sacha y Sehuaya; al igual que los alelos de 123 pb de CJ7, de 136 pb de CJ11 y de 178 y 185 pb de CJ14. Por otro lado las poblaciones de Sacha y San Pablo comparten los alelos de 118 pb de CJ7 y de 122 pb de CJ11. Las poblaciones de Sacha y Sehuaya comparten los alelos de 257 y 273 pb de CJ13. Finalmente las poblaciones de Sacha, Sehuaya y Tiputini comparten el alelo de 125 pb de CJ7, con diferente frecuencia en cada población (Tabla 8).

7.2.2 Heterocigocidad

El análisis de heterocigocidad mostró que la población de Sehuaya amplificó únicamente para dos loci: CJ7 y CJ13. CJ13 presenta una heterocigocidad de 0,5. Mientras que CJ7 mostró solo un alelo por lo que su heterocigocidad es cero. La población de Sacha, solo tiene información para 3 loci (CJ7, CJ11, CJ13), fue monomórfica para el locus CJ11, mientras que para los otros 2 loci presenta 2 alelos para cada uno. La heterocigocidad observada va de 0,222 en CJ13 a 0,500 en CJ7, mientras que la esperada va de 0,209 en CJ13 a 0,395 en CJ7. Los valores encontrados de heterocigocidad esperada son menores que los de la observada, sin embargo son cercanos. La población de San Pablo tuvo amplificación para 6 loci. La heterocigocidad observada mínima fue de 0,000 en CJ14, es decir todos los individuos son homocigotos. La heterocigocidad observada máxima fue de 1 en CJ15. La heterocigocidad esperada va de 0,167 para CJ11 a 0,773 para CJ11. Se encontró un mínimo de 2 alelos y un máximo de 4 por marcador. En las poblaciones de Sehuaya, Sacha y San Pablo, los valores de heterocigocidad observada y esperada son cercanos entre sí. Finalmente para la población de Tiputini, que tuvo amplificación en 7

loci, la heterocigocidad observada va de 0,333 para los loci CJ14 y CJ15; hasta 0,750 para el locus CJ7, mientras que la heterocigocidad esperada va 0,344 para CJ14 hasta 0,524 para CJ1 y P3AF1, con un mínimo de 2 alelos y un máximo de 5 por marcador (Tabla 9). En esta población, los valores de heterocigocidad esperada son más altos que los de heterocigocidad observada, excepto para CJ7 y CJ11.

El índice de información que es más cercano a cero mientras un alelo sea más abundante que los demás (Ver sección 6.8, Peakall y Smouse 2012); es de 0,562 para CJ7 y 0,349 para CJ13 en la población de Sacha y no pudo calcularse para CJ11 ya que este locus es monomórfico. Es de 0,562 para CJ13 en la población de Sehuaya. En la población de San Pablo, el índice de información va de 0,287 en CJ11 a 1,286 en CJ1. Finalmente, en la población de Tiputini va de 0,578 en P5BE6 a 0,932 en CJ15. El índice de fijación, cuyos valores se acerca a cero cuando el apareamiento es aleatorio (Ver sección 6.8, Peakal y Smouse, 2012) es de -0,333 para CJ13 para la población de Sehuaya, no puede calcularse para CJ7 ya que es monomórfico. En Sacha varía de -0,125 de para CJ13 a -0,333 para CJ7. En la población de San Pablo varía entre -0,636 en CJ15 y 1 para CJ14. Finalmente, en la población de Tiputini varía entre -0,600 para CJ7 y 0,246 para CJ15. El número de alelos efectivos va de 1 para CJ7 a 1,6 para CJ13 en Sehuaya; 1 para CJ11 a 1,6 para CJ7 en Sacha; 1,18 para CJ11 a 3,43 para CJ1 en San Pablo y de 1,53 en CJ14 a 2 en CJ1 para Tiputini (Tabla 9).

7.2.3 Equilibrio de Hardy y Weinberg

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg mostró que los loci CJ7 y CJ13 se encuentran en equilibrio para la población de Sacha. Para la población de Sehuaya el locus CJ13 está en equilibrio. Para la población de San Pablo, los loci CJ10, CJ14 y CJ15 se encuentran fuera del equilibrio ($P < 0,05$), mientras que los demás (CJ1, CJ7, CJ11) están en equilibrio. Finalmente para la población de Tiputini los loci CJ7, CJ11 y CJ15 se

encuentran fuera del equilibrio ($P < 0,05$), mientras que los loci CJ1, CJ14, P3AF1 y P5BE6 están en equilibrio (Tabla 10). El análisis global del equilibrio de Hardy y Weinberg para las 4 poblaciones muestra que están fuera del equilibrio los loci CJ10 ($P < 0,05$), CJ1 y CJ14 ($P < 0,01$), CJ11 y CJ15 ($P < 0,001$), mientras que los loci CJ7, CJ13, P3AF1 y P5BE6 se encuentran en equilibrio (Tabla 11).

7.2.4 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

El análisis AMOVA realizado para todas las poblaciones de *Callithrix pygmaea* estudiadas evidenció que el 67% de la varianza se encuentra entre las distintas poblaciones, mientras que el 32% está dentro de las poblaciones y 1% de la varianza proviene de la relación entre individuos (Tabla 12, Figura 3).

7.2.5 Distancia genética de Nei

La matriz de distancia genética de Nei indica que las poblaciones de Sacha, Sehuaya y San Pablo tienen una distancia genética considerable con la población de Tiputini (2,391, 1,903, 1,312 respectivamente). Siendo la mayor con la población de Sacha (2,391) y la relación más cercana con la población de San Pablo (1,312). Mientras que las poblaciones de Sacha y Sehuaya son las más cercanas entre sí (0,318) (Tabla 13).

7.2.6 Estadístico F_{st} de Wright

En contraposición a lo sugerido en la distancia de Nei, la matriz del estadístico F_{st} indica que la mayor diferenciación existe entre las poblaciones de Sacha y Sehuaya (0,797). No obstante este dato puede encontrarse sesgado por la falta de datos para la población de Sehuaya y podría no ser real. De igual manera existe una diferenciación de 0,782 entre las poblaciones de Sehuaya y San Pablo, mientras que para la relación entre Sacha y San Pablo, el valor es menor (0,662). La relación más cercana, se encontró entre las poblaciones de San Pablo y Tiputini (0,503); que mantiene coherencia con los demás

parámetros analizados (frecuencia alélica, heterocigocidad, etc.). La diferenciación entre la población de Tiputini y las poblaciones de Sacha y Sehuaya es similar (Tabla 14).

7.2.7 Análisis de dispersión (PCoA)

El PCoA indica a la población de Tiputini como una población totalmente separada de las demás, consistente con la matriz de distancias. La población de San Pablo también se encuentra separada de las otras tres. Empero existen individuos que se encuentran cercanos a las poblaciones de Sacha y Sehuaya (G1-H, G1-G, G43-J). Estas dos últimas se encuentran separadas de San Pablo y Tiputini, pero muy cercanas entre sí (Figura 4).

8 Discusión

La necesidad de promover la conservación de especies ha ido aumentando, a medida que un número creciente de poblaciones de animales y plantas se ven afectadas por diferentes actividades humanas o los resultados de las mismas. Poblaciones de distintas especies han sufrido una considerable reducción en tamaño debido a los cambios en el ambiente, influenciados por las actividades humanas. Entre ellas: la introducción de especies exóticas, la destrucción del hábitat y actividades como la caza y captura de individuos con diferentes fines (Soini, 1988, de la Torre et al., 2000, Gautschi, 2001). El estudio de la diversidad genética se presenta como una medida indirecta para evaluar el estado de las poblaciones y los posibles impactos del ser humano en las mismas (Gautschi, 2001, Holsinger, 2009). Datos tanto empíricos como experimentales sugieren que poblaciones pequeñas son más vulnerables a la extinción que poblaciones grandes, debido a los diferentes factores bióticos y abióticos que pueden generar la fluctuación en el número de individuos (Gautschi, 2001). Los cambios en la genética debido a endogamia, deriva génica o efectos fundadores pueden alterar las probabilidades de reproducción y sobrevivencia de los individuos, siendo esta la importancia real del estudio de la diversidad genética referencias?.

La especie en estudio, *Callithrix pygmaea*, presenta por naturaleza grupos pequeños y baja variabilidad genética debido a su estructura social (únicamente pareja dominante se aparean, generación común de gemelos) (Soini, 1988, de la Torre et al., 2000, Townsend, 2001), siendo proclives a una mayor afectación por los diferentes factores de impacto. Estudios realizados por de la Torre et al. (2009) evidenciaron la reducción en el hábitat de la población de San Pablo (de 3 ha. a 0,5 ha.), además se reconoce que en el Ecuador el mayor porcentaje de la deforestación se encuentra en el Oriente ecuatoriano (Bonilla et al., 2012). En las provincias de Sucumbíos y Orellana el 75-85% de los bosques están afectados por la tala y la agricultura, además de la proximidad de las poblaciones a áreas de explotación petrolera y todo lo que eso conllevan (carreteras, cultivos, asentamientos) (de la Torre et al., 2006, Bonilla et al., 2012). Debido a esto y con la intención de prevenir efectos mayores y conservar la especie, se realizan estudios sobre la misma. La información existente es en su mayoría acerca de la ecología de la especie, por lo que se hace necesario realizar estudios moleculares. Al no existir primers propios de la especie *Callithrix pygmaea*, se utilizó primers heterólogos, es decir, provenientes de otras especies, todas estas cercanas; pertenecientes al mismo género o, al menos, a la misma subfamilia que *Callithrix pygmaea*. Al provenir de especies distintas pero emparentadas, existe la posibilidad que algunos parámetros, por ejemplo, tamaño de alelos, sean cercanos más no los mismos, aceptando la ampliación del rango reportado por los distintos autores (Anexos 1, 2 y 3). Incluso en los marcadores provenientes de *Callithrix jacchus*, que fueron evaluados para *C. pygmaea* por Nievergelt et al. (1998), se podía esperar una desviación del rango ya que en dicho reporte se utilizó únicamente un individuo de *C. pygmaea* para evaluar los marcadores.

8.1 Población Tiputini

Los tamaños de los alelos encontrados en este estudio para los diferentes loci, están en su mayoría dentro del rango reportado o ligeramente por encima o por debajo de los valores reportados por Nievergelt et al. (1998) y Grativol et al. (2001). Para los loci CJ1 y CJ7, los alelos están dentro del rango de tamaño reportado; para los loci CJ11 y CJ15 están por encima del mismo y en el caso de CJ14 se encuentran por debajo de éste. Todos los alelos se encuentran a un máximo de 20 nucleótidos de diferencia con el alelo más lejano. La temperatura de annealing varió 2°C con respecto a las reportadas, excepto para CJ15 donde la diferencia fue de 8°C (Nievergelt et al., 1998). Estas diferencias en el tamaño de los alelos, temperaturas de annealing y número de alelos con los reportados por Nievergelt et al. (1998) pueden deberse también a las condiciones en las que se realizó el estudio en el que se desarrollaron los marcadores. Las poblaciones estudiadas eran poblaciones controladas, en cautiverio o semi cautiverio (Nievergelt et al., 2000) y no necesariamente abarcan toda la variabilidad genética de la especie o género. Del mismo modo, en el caso del locus P3AF1, la diferencia es de 2 pares de bases con uno de los alelos reportados por Grativol et al. (2001), mientras que los demás alelos se encuentran dentro del rango reportado por estos autores. Por otro lado, para el locus P5BE6, la diferencia es mayor (50 nucleótidos); este locus fue tomado en cuenta puesto que la amplificación era clara y sin inespecificidades (Anexo 11). Esta diferencia podría explicarse en la distancia mayor que existe con la especie *L. rosalia*; considerando que el loci tendría una diferente historia evolutiva dentro de cada especie (Cheverud et al., 1994).

La predominancia de uno de los alelos, en los marcadores que presentan más de dos alelos, puede deberse a efectos de fragmentación o cuellos de botella que generan el aumento en la frecuencia de ciertos alelos (García del Valle et al., 2005). Esto es más

evidente en el grupo T3 que se encuentra separado por el río Tiputini, lo que puede indicar una posible fijación de los diferentes alelos (Peakwall y Smouse, 2012).

La heterocigocidad es de más del 30% para todos los alelos (CJ1, CJ7, CJ11, CJ4, CJ15, P3AF1 y P5BE6). Para la mayor parte de primates la heterocigocidad se encuentra entre el 2 y el 10% (Cheverud et al., 1994). La diferencia en los valores puede deberse a que las poblaciones son pequeñas, por lo que cambios en las frecuencias alélicas son más representativos y pueden tener un efecto dominante. Considerando que estudios realizados en otros países para especies mayores de primates como *A. pigra* pueden llegar a presentar 43% de heterocigocidad, podría inferirse que los resultados dependen del tamaño efectivo de la población (García del Valle et al., 2005). Especies en peligro de extinción como el guepardo *Acynonix jubatus* y el mico dorado *Leontophtecus rosalia* han llegado a mostrar 1% de heterocigocidad; en primates un 3% es considerada baja (Cheverud et al., 1994).

Como resultado del análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg se evidenció que 3 de los 7 loci estudiados para la población de Tiputini no están en equilibrio, lo que indica que presiones de selección natural y otros mecanismos de evolución, como la deriva génica, podrían estar afectando a la población. De hecho, la organización social de la especie con grupos mayoritariamente monógamos (de la Torre et al., 2006, Moynihan, 1976, Townsend, 2001), determina que no exista un apareamiento aleatorio, lo que generará una desviación del equilibrio (Stern, 1943).

Se esperaría una variabilidad genética reducida ya que los grupos están formados por una pareja y su descendencia de diferentes edades (Soini, 1988, de la Torre, 2009). El análisis AMOVA para la población de Tiputini evidenció que el mayor porcentaje de la varianza (55%) se encontraba dentro de los grupos, es decir entre los individuos de un mismo grupo, lo que podría indicar que existen individuos no relacionados dentro de los grupos. Un porcentaje no tan lejano (44%) es generado por las diferencias entre los grupos,

posiblemente porque cada grupo es una estructura sociales separadas. No obstante, los resultados indican que los individuos tienen la capacidad de sortear barreras geográficas representativas como lo son más de 1 km de tierra firme de por medio y/o un río como el Río Tiputini. De acuerdo a Grativol et al. (2001) los genes pasan de un grupo al grupo más próximo en una generación, al siguiente en la segunda y así sucesivamente; esto podría explicar tanto las diferencias como las similitudes, sin embargo no podemos reconocer cuál grupo presentaba los alelos en común primero que las demás.

Tanto la matriz de distancia genética de Nei como la del estadístico F_{st} de Wright y el análisis de PCoA corroboran la misma información. En los tres análisis existe una mayor distancia y diferenciación genética entre T2 y T3. Mientras que T1 y T2 presentan menor distancia genética y frecuencias alélicas similares, encontrándose ambos del lado izquierdo del PCoA en contraposición a T3. Los resultados podrían deberse a la cercanía geográfica y por lo mismo a una mayor posibilidad de dispersión de los individuos de los grupos T1 y T2. Por otro lado, la diferenciación de T1 y T3, se debe justamente a la existencia de la barrera, que representa el río Tiputini. Una mayor distancia al compararlo con T2, podría explicarse debido a la distancia en bosque de tierra firme excedente a la barrera ya existente que es el río Tiputini (Figura 5). No pudo realizarse una correlación de Mantel, para evidenciar si la distancia lineal está significativamente correlacionada con la distancia genética; ya que no se posee coordenadas para cada uno de los individuos estudiados. A pesar de ello puede sugerirse que si existe una correlación de acuerdo a los datos encontrados.

Encontrar 7 loci polimórficos para la población de Tiputini, así como frecuencias alélicas cercanas al 50% en los loci que presentan 2 alelos (Tabla 2), una heterocigidad mayor al 30% y la existencia de alelos únicos en los grupos T1 y T2 indican que la

población de Tiputini mantiene una variabilidad genética alta. Esto es el indicativo de un buen estado de conservación, lo que podría deberse a un menor impacto humano.

8.2 Análisis global (Sacha, Sehuaya, San Pablo, Tiputini)

Las poblaciones de Sehuaya y Sacha presentan menos información (amplificación para 2 y 3 loci respectivamente) que las de San Pablo y Tiputini (amplificación para 6 y 7 loci respectivamente), por lo cual los datos generados podrían no reflejar la realidad. Las frecuencias alélicas encontradas para las cuatro poblaciones difieren en gran medida. Los análisis sugieren que la población de Sehuaya es diferente de todas las demás poblaciones (Sacha, San Pablo y Tiputini), aunque el PCoA la ubica cercana a Sacha. Sin embargo, no puede ser analizada con confiabilidad puesto que solo presenta información polimórfica para CJ13, mientras que para el locus CJ7 presenta un solo alelo que está fijado.

Las poblaciones de Sacha y Sehuaya no presentaron alelos únicos; Sehuaya comparte los alelos existentes para CJ13 con la población de Sacha y el de CJ7 con la población de Sacha y Tiputini. Mientras que la población de Sacha presenta además de los alelos compartidos con Sehuaya un único alelo para CJ11 y un segundo alelo para CJ7 que comparte con la población de San Pablo. Los alelos encontrados para estas poblaciones son alelos reales puesto que se encuentran también en las otras poblaciones. Las frecuencias alélicas de San Pablo y Tiputini para las que se tienen datos para una mayor cantidad de loci (6 y 7 respectivamente) son diferentes tanto en valor como en presencia de alelos. Para ambas poblaciones existen además alelos únicos, aunque comparten también varios alelos (Ver sección 7.2.1). Los otros dos loci (P3AF1 y P5BE6) con alelos únicos para la población de Tiputini no fueron probados en las otras poblaciones (Sehuaya, Sacha, San Pablo), por lo que podrían generar una desviación en los datos.

La heterocigocidad es cero para la población de Sehuaya para uno de sus loci (CJ7), mientras que el otro presenta una heterocigocidad observada de 0,562 (CJ13). La población

de Sacha manifiesta una situación parecida pues es monomórfica para CJ11 y la heterocigocidad observada para el locus CJ13 es baja (0,222). No puede concluirse algo sobre el estado de conservación de estas poblaciones, basándonos solo en uno y dos loci polimórficos (Sacha y Sehuaya respectivamente). Los valores de heterocigocidad, tanto mínimo como máximo, son menores en San Pablo que en Tiputini. Siendo la mínima heterocigocidad tanto esperada como observada el doble para Tiputini que para San Pablo (Tabla 9). Estas diferencias pueden deberse a los efectos de fragmentación del hábitat en la población de San Pablo. La pérdida de heterocigocidad por deriva génica se da lentamente pero aumenta con la fragmentación pues con ella se incrementa también la probabilidad de endogamia (de la Torre et al., 2005, García del Valle et al., 2005).

En lo que corresponde al equilibrio de Hardy-Weinberg, los loci informativos (polimórficos) tanto para la población de Sacha como para la de Sehuaya se encuentran en equilibrio (Tabla 10). Al igual que lo mencionado previamente, las desviaciones en el equilibrio son esperadas debido a que el apareamiento no es aleatorio y por la acción de fuerzas evolutivas como las mutaciones, migraciones y selección natural (Stern, 1943). La desviación en loci diferentes para cada población podría indicar que las poblaciones mantienen una historia evolutiva separada la una de la otra. Al considerar las 4 poblaciones (Sacha, Sehuaya, San Pablo y Tiputini) como un todo, los loci CJ7, CJ13, P3AF1 y P5BE6 se encuentran en equilibrio, de éstos solo CJ7 está presente en todas las poblaciones. Mientras que CJ13 se encuentra únicamente en Sacha y Sehuaya y los loci P3AF1 y P5BE6 se evaluaron solo en Tiputini por lo que no representan información sobre la población global de leoncillos de la Amazonía ecuatoriana (Tabla 11).

De acuerdo a la matriz de distancia genética de Nei, las poblaciones Sacha y Sehuaya son las más cercanas entre sí (0,318). Tanto estas poblaciones como San Pablo, exponen distancias mayores con la población de Tiputini. La mayor distancia genética está entre

Sacha y Tiputini (2,391). La distancia de la población de Sehuaya con la de San Pablo no pudo calcularse ya que el único alelo existente en la población de Sehuaya para CJ7 no está presente en San Pablo, al igual que el locus CJ13 (Tabla 8). Los resultados del PCoA sugieren una diferenciación de la población de Tiputini con respecto a las demás poblaciones; mientras que Sacha y San Pablo se acercan en algunos casos. Los grupos de San Pablo (G42 y G43) se encuentran agrupados hacia arriba, mientras los otros dos están más cerca a la población de Sacha, incluyendo un individuo perteneciente a G43.

Debido a la distancia y barreras geográficas existentes entre las diferentes poblaciones (Figura 6), además de las características ecológicas de la especie (de la Torre et al., 2000; 2005; 2009; Grativol et al., 2001; Townsend 2001). Los resultados del análisis de AMOVA (67% varianza entre poblaciones), así como también los de la distancia genética de Nei y el PCoA son esperables debido a la dificultad de migración que estas representan para los individuos de la especie *C. pygmaea* (Nievergelt et al., 2000). Además debe considerarse que la población de Tiputini se encuentra separada de todas las demás por el río Napo, generando una barrera que justifica en mayor medida la diferenciación más significativa que presenta esta población con todas las demás (Figura 6).

Los valores del estadístico F_{st} de Wright no corroboran lo encontrado por la distancia de Nei, esto podría deberse a los datos faltantes que podrían generar una desviación en los resultados de este análisis que se basa en las frecuencias alélicas (Wright 1969). Esto podría estar apoyado por el hecho de que las mayores diferencias en este estadístico se obtienen al relacionar Sehuaya con cada una de las otras diferentes poblaciones (Tabla 14), mientras que la distancia entre San Pablo y Tiputini, es menor, debido a la existencia de una mayor cantidad de datos para ambas (Tabla 13).

A pesar de estas limitaciones, las diferencias encontradas entre las poblaciones de San Pablo y Tiputini sugieren que la fragmentación de hábitat que afecta a la primera (de la

Torre et al., 2005), así como la cercanía con poblaciones humanas podría estar relacionada con la pérdida de heterocigocidad y de variabilidad genética en esta población al dificultar la dispersión de los individuos (Grativol et al., 2001). Todo esto se agudiza en una especie que se presume tiene una variabilidad genética relativamente baja considerando la estructura social y bajas tasas de dispersión reportadas para otras especies de Callitrichinos (Nievergelt et al., 2000). Los datos encontrados presentan información relevante para la conservación de la especie. Lo que debe llamar nuestra atención hacia una posible disminución en la poblaciones y otros efectos a largo plazo.

9 Conclusiones

- Los marcadores moleculares microsatélites probaron ser un buen método para evaluar la diversidad genética las poblaciones de leoncillos.
- Se logró transferir 5 de los 9 marcadores desarrollados para *Callithrix jacchus* que fueron evaluados, 2 de los 3 marcadores para *Leontopithecus rosalia* que fueron evaluados y ninguno de los generados para *Leontopithecus chrysomelas* (47% transferibilidad).
- Los grupos de leoncillos pertenecientes a la población de Tiputini mantienen todavía una relación estrecha, sugiriendo posibles eventos de dispersión y flujo génico entre los grupos.
- Los valores de heterocigocidad encontrados indican que la población de Tiputini mantiene una variabilidad genética alta.
- Las distancias existentes entre los grupos de la población de Tiputini, son mayores entre T2 y T3, posteriormente entre T1 y T3 y siendo las más cercanas T1 y T2. Esto puede explicarse por las diferentes distancias y barreras encontradas entre ellas.

- La falta de datos para las poblaciones de Sehuaya y Sacha afecto a los análisis comparativos con las demás poblaciones (Figura 3).
- No pudo evaluarse la heterocigocidad en las poblaciones de Sehuaya y Sacha. Para la población de San Pablo la heterocigocidad fue un 50% menos frecuente que en la población de Tiputini, sugiriendo así posibles impactos de las actividades humanas en la variabilidad genética de la población de San Pablo.
- La población de Tiputini se encuentra bastante separada genéticamente de las demás poblaciones, mientras que Sacha y San Pablo se solapan en algunos puntos. A pesar de ser distintas, las poblaciones continúan compartiendo alelos, lo que evidencia la existencia de migración y flujo génico entre las mismas.

10 Recomendaciones

- Buscar marcadores microsatélites nuevos tanto de *Callithrix jacchus* como de *Leontopithecus rosalia*, puesto que fueron las dos especies que mostraron éxito hasta el momento, o desarrollar primers propios de la especie *C. pygmaea*.
- Utilizar un mayor número de marcadores, para cubrir una región más amplia del genoma.
- Debería intentarse muestrear nuevamente las poblaciones de Sacha y Sehuaya, para obtener una mayor cantidad de datos para las mismas y hacer una evaluación más real del estado de las poblaciones.
- Deberían evaluarse los marcadores utilizados únicamente para la población de Tiputini, en las demás poblaciones.
- Para todas las poblaciones debería buscarse realizar un muestreo constante o monitoreo cada cierto tiempo para evidenciar posibles efectos en la variabilidad genética, debido a los impactos por humanos a largo plazo.

- Debido a los datos presentados tanto en este estudio como en los realizados previamente, tanto en genética como en ecología debería realizarse campañas de educación y concientización sobre la conservación de la diversidad genética en general y esta especie en particular.
- Un programa de conservación para la especie debería concentrarse en aumentar el tamaño efectivo de la población, mantener los alelos únicos y aumentar su frecuencia; facilitando también comportamientos naturales como la dispersión y el comportamiento reproductivo y social.

11 Bibliografía

- Antunes, Susana, Natasja de Groot, Herbert Brok, Gaby Doxiadis, Alexandre Menezes, Nel Otting y Ronald Bontrop. (1998) *The common marmoset: a new world primate species with limited MHC Class II variability*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (20): 11745-11750.
- Bonilla Bedoya, S., Miguel Ángel Herrera Machuca y José Eduardo Pezzopane. (2012). *Transiciones sistemáticas y patrones de fragmentación en el alto Amazonas, Ecuador 1990-2008*. Recursos Naturales y Sostenibilidad. Universidad de Córdova. 37 p.
- Chaves, Simone Loss, Isabela Dias y Cristina Pomilla. (2010). *Extraction of genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAamp DNA Stool Mini Kit*. Disponible en: http://research.amnh.org/genomics/f/2010_stool_extraction_protocol.pdf (Acceso: Noviembre 2012)
- Cheverud, James, Eric Routman, Cashell Jaquish, Suzette Tardif, Gloria Peterson, Natasha Belfiore y Lisa Forman. (1994) *Quantitative and molecular genetic variance in captive cotton-top tamarins (Saguinus oedipus)*. Conservation Biology. 8:(1). 95-105.
- de la Torre, Stella, Charles Snowdon y Monserrat Bejarano. (2000) *Effects of human activities on wild pygmy marmosets in Ecuadorian Amazonia*. Biological conservation 94: 153-163.
- de la Torre, Stella; Yépez, Pablo; Snowdon, Charles T.; Payaguaje, Alfredo. (2005) *Ecología, comportamiento y conservación del leoncillo Callithrix (cebuella) pygmaea en tierras Secoya*.

- de la Torre, Stella, Pablo Yépez y Charles T. Snowdon. (2009) *Conservation status of pygmy marmosets Callithrix(Cebuella)pygmaea in Ecuador*. The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico radiation.
- Fahrig, Lenore. (2003) *Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity*. *Annu. Rev. Ecol. Evol.* 34:487–515
- FAO. *Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética*. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf>
- Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe, D. A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. New York.
- Galbusera, Peter y Sarah Gillemot. (2008). *Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, Leontopithecus chrysomelas (Callitrichidae)*. *Conserv. Genet* 9: 731-733.
- García del Valle, Estrada, Espinoza, Lorenzo y Naranjo. (2005) *Genética de poblaciones de monos aulladores (Alouatta pigra) en hábitat continuo y fragmentado en la selva Lacandona, México: un estudio preliminar*. *Universidad y Ciencia*. Número especial II: 55-60.
- Gautschi, Barbara Silvia. (2001). *Conservation genetics of the bearded vulture (Gypaetus barbatus)*. University of Zurich.
- Grativol, A. D., J. D. Ballou y R. C. Fleischer. (2001) *Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (Leontopithecus rosalia)*. *Conservation Genetics* 2:1 – 9.
- Holsinger, Kent E.; Bruce S. Weir (2009). *Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST*. *Nat Rev Genet* 10 (9): 639–650.

- Janson, C. H., J. Terborgh y L. H. Emmons. (1981) *Non flying mammals as pollinating agents in the Amazonian forest*. Biotropical 13: s1-s6.
- Lehmkuhl, John y Leonard Ruggiero. (1991) *Forest fragmentation in the Pacific northwest and its potencial effects on wildlife*. USDA Forest Service general technical report PNW-GTR - Pacific Northwest Research Station. 285: 35-46.
- Marsh, Laura. 2004. *Primate species at the Tiputini Biodiversity Station, Ecuador*. Neotropical primates 12 (2).
- McGarigal, Kevin; Romme, William; Crist, Michele y Roworth, Ed. (2001) *Cumulative effects of roads and logging on landscape structure in the San Juan Mountains, Colorado (USA)*. Landscape Ecology. 16: 327-349.
- Moynihan, M. (1976) *The New World primates*. Princeton University Press, New Jersey.
- Nei, Masatoshi. (1978) *Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals*. Genetics 89: 583-590.
- Nieto D., Stella de la Torre, Ana Troya, María de Lourdes Torres y Venancio Arahana. (2011) *Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo Callithrix pygmaea (Primates: Cebidae: Callitrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeat)*. Avances en ciencias e ingenierías. Vol 2. B4-B8. USFQ.
- Nievergelt, Caroline, Nicholas Mundy y David Woodruff. (1998) *Microsatellite primers for genotyping common marmosets (Callithrix jacchus) and other callitrichids*. Molecular ecology 7: 1431-1439.
- Nievergelt, Caroline, Leslie Digby, Uma Ramakrishnan y David Woodruff. (2000) *Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (Callithrix jacchus) population*. International Journal of Primatology 21.

- Ohnishi, Ishibashi, Saitoh, Abe y Yoshida. (1998) *Polymorphic microsatellite DNA markers in the Japanese Wood mouse Apodemus argenteus*. *Molecular ecology* 7: 1431-1439.
- Olivieira Eder Jorge, Gomes Pádua Juliano, Zucchi Maria Inmaculada, Vencovsky Roland y Carneiro Vieira Maria Lúcia. (2006) *Origin, evolution and genome distribution of microsatellites*. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 294-307.
- Peakall, R. y Smouse P.E. (2012) *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Piñero, Daniel et al. (2008). *La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad*. *Capital natural de México I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. 437-494.
- Ramirez, M.; Freese, C.H.; Revilla, J. (1977) *Feeding ecology of the pygmy marmoset, Cebuella pygmaea in northeastern Peru*. *The biology and conservation of the Callitrichidae* (D. G. Kleiman, ed.): 91-104. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Ruiz García, Castillo, Álvarez, Gardeazabal, Borrero, Ramírez, Carrillo, Nassar y Gálvez. (2007) *Estudio de 14 especies de primates platirrinos (Cebus, Saimiri, Aotus, Sanguinus, Lagothrix, Alouatta y Ateles), utilizando 10 loci microsatellites: análisis de la diversidad génica*. *Orinoquia*. 11 (002): 19-37.
- Rylands, Anthony B. y Russel A. Mittermeier. 2009. *The diversity of the new world primates (Platyrrhini): An annotated taxonomy*. *South American primates: Comparative perspectives in the study of behaviour, ecology and conservation*. (25-61).

- Santos, T. y J.L. Tellería. 2006. *Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies*. Ecosistemas 15 (2): 3-12.
- Soini, P. (1988) *The pygmy marmoset, genus Cebuella*. Ecology and behavior of Neotropical primates (R. A. Mittermeier, A. B. Rylands, A. Coimbra-Filho y G. A. B. Fonseca, eds.): 79-130. World Wildlife Fund, Washington, D.C.
- Stanton, Sharon, Olivier Honnay, Hans Jacquemyn e Isable Roldán-Ruiz. (2009) *A comparison of the population genetic structure of parasitic Visum album from two landscapes differing in degree of fragmentation*. Plant Syst Evol 281: 161-169.
- Stern, C. (1943). *The Hardy–Weinberg law*. Science. 97: 137–138
- Terán, Claudia. (2013). *Estudio de Diversidad Genética de Callithrix pygmaea en la Amazonía Ecuatoriana mediante el uso de Microsatélites (SSR: Short Sequence Repeats)*. USFQ.
- Tirira, D. G. (2011). Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. 2a edición. Versión 1. Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador. Quito.
- Townsend, Wendy R. 2001. *Callithrix pygmaea*. Mammalian Species 665: 1-6.
- Woodruff, David. (1990) *Genetics and demography in the conservation of biodiversity*. J. Sci. Soc. Thailand 16: 117-132.
- Wright, S. (1969) *The Theory of Gene Frequencies*. Evolution and the Genetics of Populations. 2: 2:294–295.
- Yépez, Pablo, Stella de la Torre y Charles Snowdon. 2005. *Interpopulation differences in exudate feeding of pygmy marmosets in Ecuadorian Amazonia*. American Journal of Primatology 66: 145-158.

12 Tablas

Tabla 1. Caracterización de los microsatélites utilizados para evaluar la diversidad genética en la población de *Callithrix pygmaea* ubicada en Tiputini. Donde T_a es la temperatura de annealing, N el número de alelos encontrados y bp el rango de tamaño en el que se evidenciaron los mismos alelos; para este estudio.

Locus	Motivo	T _a (°C)	N	bp	Especie de la que proviene
CJ1	(CA)21	56°C	2	146-149	<i>Callithrix jacchus</i>
CJ7	(CA)13	58°C	2	123-125	<i>Callithrix jacchus</i>
CJ11	(CA)11	58°C	2	132-136	<i>Callithrix jacchus</i>
CJ14	(TC)21(CA)5	54°C	4	164-195	<i>Callithrix jacchus</i>
CJ15	(CA)13	48°C	5	141-161	<i>Callithrix jacchus</i>
P3AF1	(CA)23	52°C	3	121-126	<i>Leontopithecus rosalia</i>
P5BE6	(CA)20	45°C	2	169-176	<i>Leontopithecus rosalia</i>

Tabla 2. Frecuencias alélicas por locus para cada grupo (T1, T2 y T3) perteneciente al a población de Tiputini.

Locus	Alelos (pb)	Grupos		
		T1	T2	T3
CJ1	146	0,400	0,583	0,000
	149	0,600	0,417	0,000
CJ7	123	0,600	0,500	0,800
	125	0,400	0,500	0,200
CJ11	132	0,600	0,500	0,833
	136	0,400	0,500	0,167
CJ14	164	0,000	0,100	0,000
	176	0,000	0,100	0,100
	185	0,900	0,600	0,900
	195	0,100	0,200	0,000
CJ15	141	0,100	0,100	0,000
	147	0,100	0,000	0,000
	149	0,600	0,700	0,900
	156	0,100	0,000	0,100
P3AF1	161	0,100	0,200	0,000
	P3AF1 121	0,300	0,333	0,300
	124	0,600	0,667	0,600
P5BE6	126	0,100	0,000	0,100
	P5BE6 169	0,800	0,750	0,667
	176	0,200	0,250	0,333

Tabla 3. Heterocigicidad observada y esperada por locus para la población de Tiputini. Donde N es el tamaño de la muestra, N_a número de alelos, N_e número de alelos efectivos, I es el índice de información, H_o es la heterocigicidad observada, H_e heterocigicidad esperada, uH_e heterocigicidad imparcial y F el índice de fijación.

	CJ1	CJ7	CJ11	CJ14	CJ15	P3AF1	P5BE6
N	11	16	17	15	15	16	17
Na	2	2	2	4	5	3	2
Ne	2,000	1,882	1,841	1,525	1,793	2,032	1,637
I	0,693	0,662	0,649	0,703	0,932	0,831	0,578
Ho	0,455	0,750	0,706	0,333	0,333	0,500	0,529
He	0,500	0,469	0,457	0,344	0,442	0,508	0,389
uHe	0,524	0,484	0,471	0,356	0,457	0,524	0,401
F	0,091	-0,600	-0,545	0,032	0,246	0,015	-0,360

Tabla 4. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para la población de Tiputini. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$.

Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
CJ1	1	0,091	0,763	Ns
CJ7	1	5,760	0,016	*
CJ11	1	5,058	0,025	*
CJ14	6	9,583	0,143	Ns
CJ15	10	20,572	0,024	*
P3AF1	3	1,280	0,734	Ns
P5BE6	1	2,203	0,138	Ns

Tabla 5. Análisis AMOVA para la población de Tiputini. Donde df son los grados de libertad, SS es la suma de los cuadrados, MS es la media de SS, Est. Var. es la variación estándar y % es el porcentaje que representa la Est. Var.

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre los grupos	2	187474,858	93737,429	6784,094	44%
Dentro de los grupos	14	239639,083	17117,077	8522,465	55%
Entre los individuos	17	1226,500	72,147	72,147	1%
Total	33	428340,441		15378,706	100%

Tabla 6. Matriz de distancia genética de Nei entre los tres grupos (T1, T2 y T3) que conforman la población de Tiputini.

T1	T2	T3
0,000		T1
0,038	0,000	T2
0,117	0,166	0,000 T3

Tabla 7. Matriz del estadístico Fst entre los grupos que conforman la población de Tiputini (T1, T2 y T3).

T1	T2	T3
0,000		T1
0,022	0,000	T2
0,137	0,160	0,000 T3

Tabla 8. Frecuencias alélicas por locus para cada población. Donde * indica los alelos fijados para un locus en una población y ** indica los alelos privados (únicos) para una población.

Locus	Alelos (bp)	Sacha	Sehuaya	San Pablo	Tiputini
CJ1	142	0,000	0,000	0,250**	0,000
	144	0,000	0,000	0,083**	0,000
	146	0,000	0,000	0,333	0,500
	149	0,000	0,000	0,333	0,500
CJ7	118	0,250	0,000	0,786	0,000
	123	0,000	0,000	0,214	0,625
	125	0,750	1,000*	0,000	0,375
CJ10	217	0,000	0,000	0,500**	0,000
	237	0,000	0,000	0,250**	0,000
	243	0,000	0,000	0,250**	0,000
CJ11	122	1,000*	0,000	0,917	0,000
	132	0,000	0,000	0,000	0,647**
	136	0,000	0,000	0,083	0,353
CJ13	257	0,111	0,250	0,000	0,000
	273	0,889	0,750	0,000	0,000
CJ14	164	0,000	0,000	0,000	0,033**
	178	0,000	0,000	0,500	0,067
	185	0,000	0,000	0,500	0,800
	195	0,000	0,000	0,000	0,100**
CJ15	128	0,000	0,000	0,167**	0,000
	130	0,000	0,000	0,500**	0,000
	132	0,000	0,000	0,333**	0,000
	141	0,000	0,000	0,000	0,067**
	147	0,000	0,000	0,000	0,033**
	149	0,000	0,000	0,000	0,733**
	156	0,000	0,000	0,000	0,067**
P3AF1	121	0,000	0,000	0,000	0,313**
	124	0,000	0,000	0,000	0,625**
	126	0,000	0,000	0,000	0,063**
P5BE6	169	0,000	0,000	0,000	0,735**
	176	0,000	0,000	0,000	0,265**

Tabla 9. Heterocigocidad observada y esperada por locus para cada población. Donde N es el tamaño de la muestra, Na número de alelos, Ne número de alelos efectivos, I es el índice de información, Ho es la heterocigocidad observada, He heterocigocidad esperada, uHe heterocigocidad imparcial y F el índice de fijación.

Población		CJ1	CJ7	CJ10	CJ11	CJ13	CJ14	CJ15	P3AF1	P5BE6
Sacha	N	0	10	0	1	9	0	0	0	0
	Na	0	2	0	1	2	0	0	0	0
	Ne	0,000	1,600	0,000	1,000	1,246	0,000	0,000	0,000	0,000
	I	0,000	0,562	0,000	0,000	0,349	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ho	0,000	0,500	0,000	0,000	0,222	0,000	0,000	0,000	0,000
	He	0,000	0,375	0,000	0,000	0,198	0,000	0,000	0,000	0,000
	uHe	0,000	0,395	0,000	0,000	0,209	0,000	0,000	0,000	0,000
	F		-0,333		#N/A	-0,125				
Sehuaya	N	0	4	0	0	2	0	0	0	0
	Na	0	1	0	0	2	0	0	0	0
	Ne	0,000	1,000	0,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
	I	0,000	0,000	0,000	0,000	0,562	0,000	0,000	0,000	0,000
	Ho	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
	He	0,000	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000	0,000	0,000	0,000
	uHe	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
	F		#N/A			-0,333				
San Pablo	N	6	7	4	6	0	4	9	0	0
	Na	4	2	3	2	0	2	3	0	0
	Ne	3,429	1,508	2,667	1,180	0,000	2,000	2,571	0,000	0,000
	I	1,286	0,520	1,040	0,287	0,000	0,693	1,011	0,000	0,000
	Ho	0,500	0,429	0,500	0,167	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	He	0,708	0,337	0,625	0,153	0,000	0,500	0,611	0,000	0,000
	uHe	0,773	0,363	0,714	0,167	0,000	0,571	0,647	0,000	0,000
	F	0,294	-0,273	0,200	-0,091		1,000	-0,636		
Tiputini	N	11	16	0	17	0	15	15	16	17
	Na	2	2	0	2	0	4	5	3	2
	Ne	2,000	1,882	0,000	1,841	0,000	1,525	1,793	2,032	1,637
	I	0,693	0,662	0,000	0,649	0,000	0,703	0,932	0,831	0,578
	Ho	0,455	0,750	0,000	0,706	0,000	0,333	0,333	0,500	0,529
	He	0,500	0,469	0,000	0,457	0,000	0,344	0,442	0,508	0,389
	uHe	0,524	0,484	0,000	0,471	0,000	0,356	0,457	0,524	0,401
	F	0,091	-0,600		-0,545		0,032	0,246	0,015	-0,360

Tabla 10. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para cada de población estudiada de *Callithrix pygmaea*. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$.

Población	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Sacha	CJ1	No amplifica			
	CJ7	1	1,111	0,292	Ns
	CJ10	No amplifica			
	CJ11	Monomórfico			
	CJ13	1	0,141	0,708	Ns
	CJ14	No amplifica			
	CJ15	No amplifica			
	P3AF1	No amplifica			
	P5BE6	No amplifica			
	Sehuaya	CJ1	No amplifica		
CJ7		Monomórfico			
CJ10		No amplifica			
CJ11		No amplifica			
CJ13		1	0,222	0,637	Ns
CJ14		No amplifica			
CJ15		No amplifica			
P3AF1		No amplifica			
P5BE6		No amplifica			
San Pablo		CJ1	6	6,667	0,353
	CJ7	1	0,521	0,471	Ns
	CJ10	3	8,000	0,046	*
	CJ11	1	0,050	0,824	Ns
	CJ13	No amplifica			
	CJ14	1	4,000	0,046	*
	CJ15	3	9,000	0,029	*
	P3AF1	No amplifica			
	P5BE6	No amplifica			
	Tiputini	CJ1	1	0,091	0,763
CJ7		1	5,760	0,016	*
CJ10		No amplifica			
CJ11		1	5,058	0,025	*
CJ13		No amplifica			
CJ14		6	9,583	0,143	Ns
CJ15		10	20,572	0,024	*
P3AF1		3	1,280	0,734	Ns
P5BE6		1	2,203	0,138	Ns

Tabla 11. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para la población generalizada de *Callithrix pygmaea*. Donde n.s. (no significativo) y * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
CJ1	6	18,964	0,004	**
CJ7	3	4,863	0,182	Ns
CJ10	3	8,000	0,046	*
CJ11	3	25,860	0,000	***
CJ13	1	0,274	0,601	Ns
CJ14	6	18,785	0,005	**
CJ15	28	80,915	0,000	***
P3AF1	3	1,280	0,734	Ns
P5BE6	1	2,203	0,138	Ns

Tabla 12. AMOVA para las poblaciones estudiadas de *Callithrix pygmaea*. Donde df son los grados de libertad, SS es la suma de los cuadrados, MS es la media de SS, Est. Var. es la variación estándar y % es el porcentaje que representa la Est. Var.

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre poblaciones	3	3040722,667	1013574,222	44816,938	67%
Dentro de las poblaciones	42	1813983,833	43190,091	21574,377	32%
Entre los individuos	46	1901,500	41,337	41,337	1%
Total	91	4856608,000		66432,652	100%

Tabla 13. Matriz de distancia genética de Nei entre las 4 poblaciones (Sacha, Sehuaya, San Pablo y Tiputini) de *Callithrix pygmaea*.

Sacha	Sehuaya	San Pablo	Tiputini
0,000			
0,318	0,000		
0,896	#¡DIV/0!	0,000	
2,391	1,903	1,312	0,000

Tabla 14. Matriz de estadístico Fst entre las 4 poblaciones (Sacha, Sehuaya, San Pablo y Tiputini) de *Callithrix pygmaea*.

Sacha	Sehuaya	San Pablo	Tiputini
0,000			
0,797	0,000		
0,662	0,782	0,000	
0,722	0,744	0,503	0,000

13 Figuras

Figura 1. AMOVA para los diferentes grupos de la población de Tiputini (T1, T2 y T3).

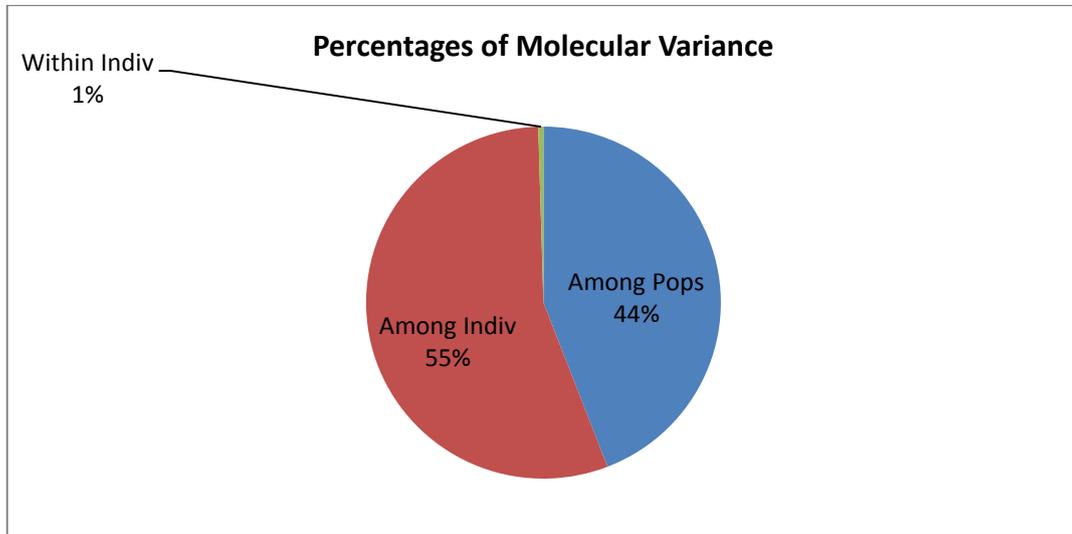


Figura 2. Análisis de coordenadas principales para la población de Tiputini. Existe una separación mayor del grupo T3, que se encuentra todo hacia el lado derecho de la gráfica, mientras que los grupos T1 y T2 están hacia el lado izquierdo de la gráfica y se solapan.

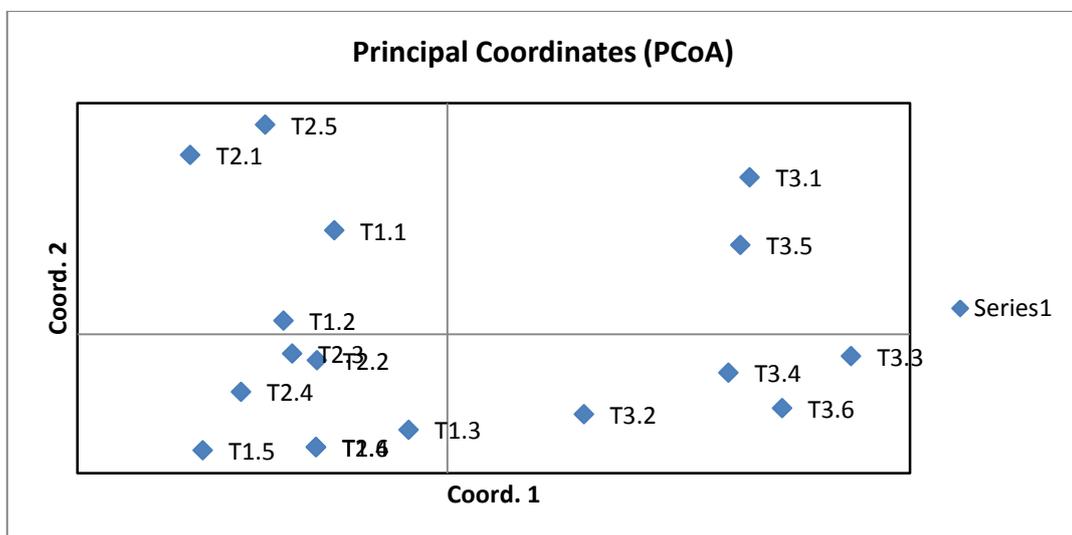


Figura 3. AMOVA entre las distintas poblaciones de *Callithrix pygmaea* (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini).

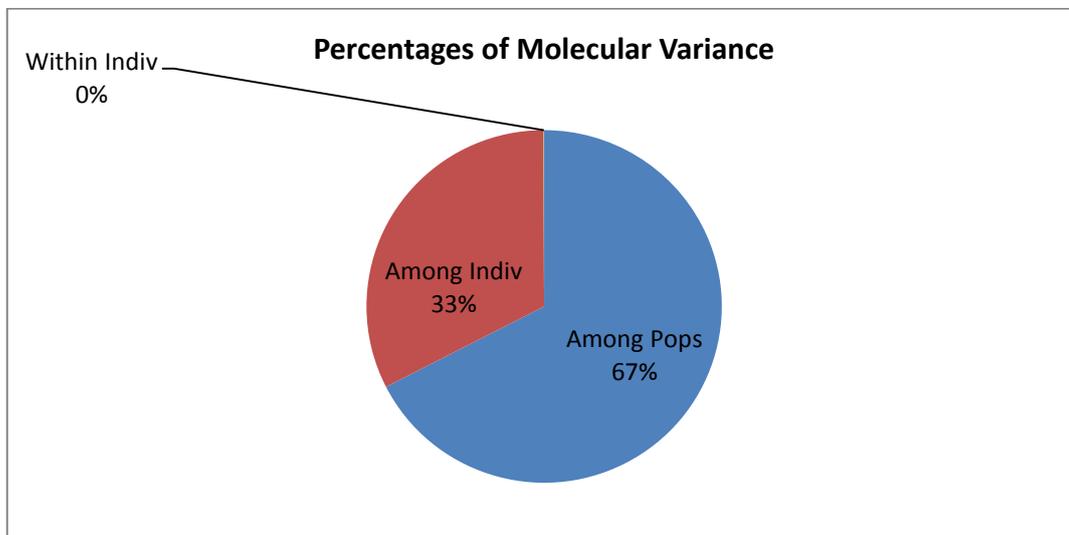


Figura 4. Análisis de coordenadas principales para las diferentes poblaciones estudiadas (Sehuaya, Sacha, San Pablo y Tiputini). Se evidencia una separación clara de la población de Tiputini en relación con las demás poblaciones, es la única hacia el lado izquierdo de la gráfica. La población de San Pablo a pesar de encontrarse del mismo lado de la gráfica que las poblaciones de Sacha y Sehuaya, muestra una separación de las mismas. Las poblaciones de Sacha y Sehuaya se encuentran muy cercanas.

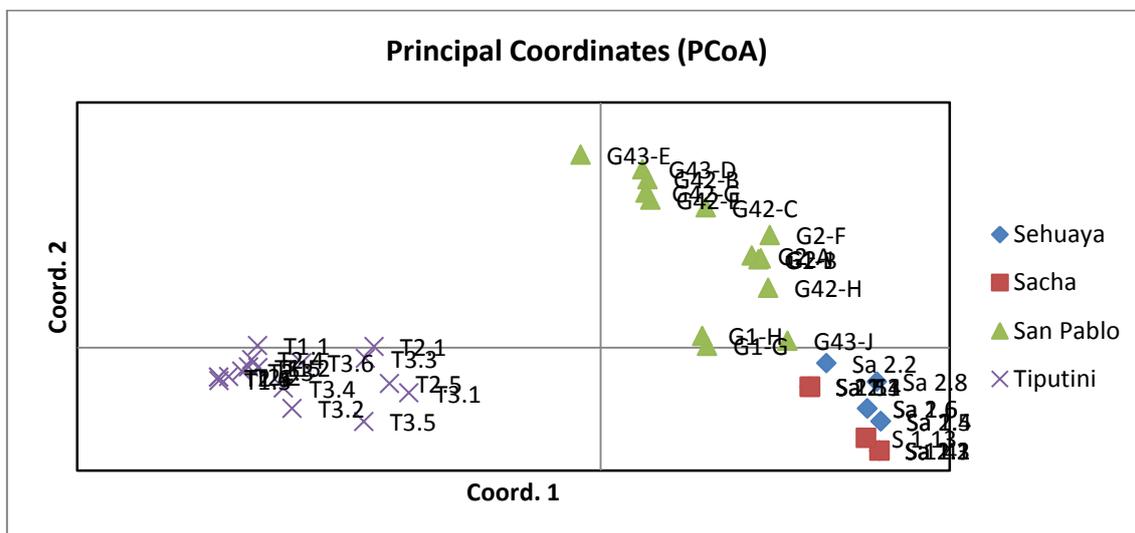
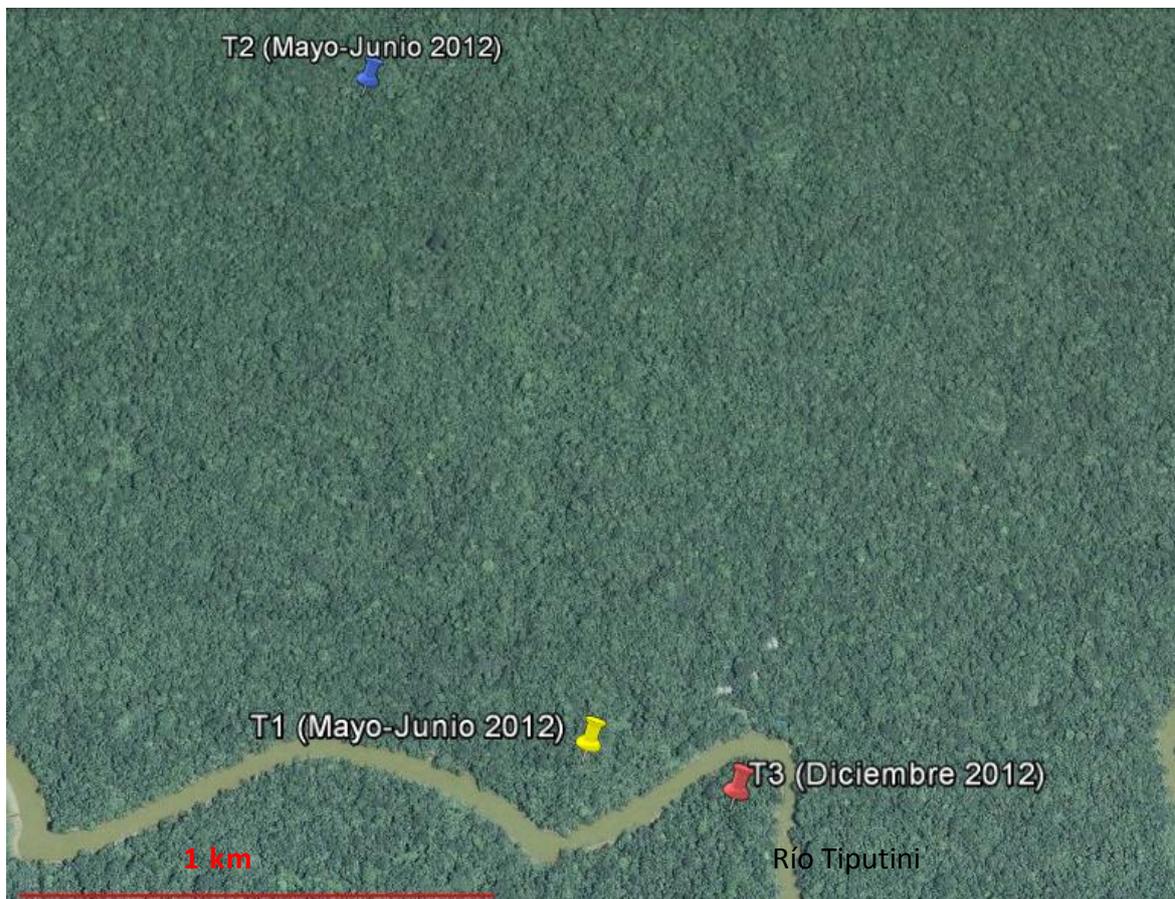


Figura 5. Ubicación de las distintas poblaciones de *Callithrix pygmaea* en un mapa del Ecuador, donde P es San Pablo (3 grupos), SA es Sacha (2 grupos), SE es Sehuaya (1 grupo) y T es Tiputini (3 grupos). Ampliación de la ubicación de las distintas poblaciones estudiadas, evidenciando las barreras y distancias existentes.



Figura 6. Ampliación de la población de Tiputini, se observa las posibles distancias y barreras entre los grupos conformantes (T1, T2 y T3).



14 Anexos

Anexo 1. Tomada de Nievergelt et al. 1998, los 9 primeros marcadores fueron los usados en las diferentes poblaciones.

Table 1 Polymorphic microsatellite loci in the common marmoset (*Callithrix jacchus*)

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	T_a (°C)	N_A	H_O	bp
CJ1	(CA) ₂₁	AGCATGGCACTTTCGTTTCT GCAACAGAGCAACTGCAT	58	7	0.70	120–148
CJ6	(CA) ₁₇	ATCATGTGCACTCTATGCATGT AGAATGAAAAACATGGAAAGGC	60	6	0.70	138–150
CJ7	(CA) ₁₃	TCTCTCCATGAAGCCTTCAA GGTTGCTATTTGCCAAGCAT	60	3	0.38	111–115
CJ10	(CA) ₁₉	GAGCCAAGATTATGCCGTT TGTGTAAGGAGGATTTGTGTTG	58	5	0.61	218–234
CJ11	(CA) ₁₁	GATCCTGGGATGCACGTG GAATGCTGCATTGATTAGGGA	58	3	0.66	117–121
CJ12	(CA) ₉	GCTCCAAGGAACTGTTAGAACC TGATGGTGCATTCTTAGAGGG	58	2	0.56	144–146
CJ13	(CA) ₁₃ (TC) ₁₄	CAAGGAAACATAAGTGTGGCTC CAGACATTTTAGCCCCCTTC	56	11	0.85	258–282
CJ14	(TC) ₂₁ (CA) ₅	CTTGTGACAGTGGGGGAGTT CAAGTGTGAACATCCATGCC	56	12	0.94	156–180
CJ15	(CA) ₁₃	CCATCCTGAGCAACAGGG GAGTGAGCTTGAATTTCAACCC	56	4	0.56	119–127
D5S111	CA	Research Genetics	52	9	0.84	156–186
D5S117	CA	Research Genetics	52	9	0.87	131–157
D8S165	CA	ResearchGenetics	52	9	0.66	133–149
D14S51	CA	Research Genetics	54	3	0.66	127–131

T_a , optimal annealing temperature; N_A , the number of alleles; H_O , observed heterozygosity; bp, product length in base pairs. Loci names beginning with CJ were isolated from common marmosets, the remaining four human loci can be traced by their catalogue numbers.

Anexo 2. Tomada de Grativol et al. 2001, se ensayaron los marcadores Lr.P2BH6, Lr. P3AF1 y Lr. P5BE6.

Table 1. Characterization of microsatellite loci. Primer sequences, repeat motif and size of amplification products from clone, amplification conditions and number of alleles for five microsatellite loci isolated from golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). Allele number was calculated based on 27 samples of golden lion tamarin from the population at the reserve and 30 samples from 5 isolated family groups.

Locus	Primer sequences (5' → 3')	Cloned repeat motif	Clone size (bp)	No. alleles	Amplification conditions	
					Anneal. temp. (°C)	MgCl ₂ conc. (mM)
Lr.P2BH6	F: tctgtttgaatccccagtc R: gcagtcctcaaggtttct	[CA]19	102	6	55	1.0
Lr.P2BA2	F: cttgatggacggacacctat R: caaaacggccacattactcc	[CA]8CG[CA]1CG[CA]3C[CA]2	156	1	55	1.5
Lr.P5BG3	F: gcgatcaacctgggcaacat R: tcccaggtagctgggactat	[CA]27	141	4	60	1.0
Lr.P5BE6	F: tgtgcatgcttgcctgtgtc R: atctcactggaccacct	[CA]20	108	5	55	1.5
Lr.P3AF1	F: ccatcctggccaacataggt R: gtagctgggattacaggcac	[CA]23	128	6	62	1.0

Genbank accession numbers are AF320577, AF320578, AF320579, AF320580, AF320581, respectively.

Anexo 3. Tomada de Galbusera y Gillemot (2008), se ensayaron los marcadores Lchu01, Lchu05 y Lchu08.

Table 1 Characterisation of 9 *Leontopithecus chrysomelas* microsatellite primer sets, including locus name, repeat array, primer sequences, Genbank Accession number, primer concentration, label, specific annealing temperature, size-range of PCR-products, expected Heterozygosity (H_e), observed Heterozygosity (H_o), and observed number of alleles (n = 29 captive individuals)

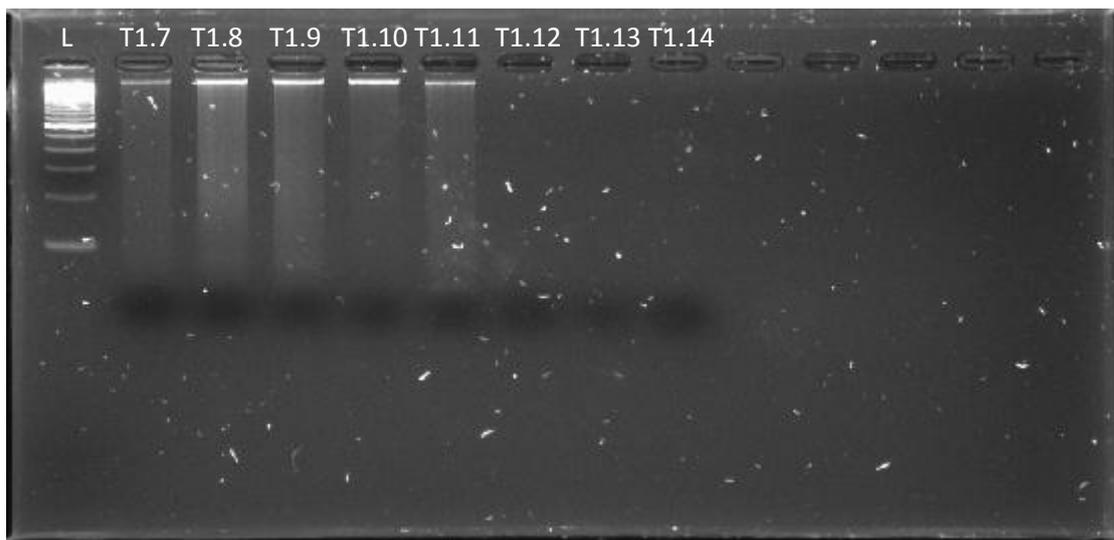
Locus	Repeat array	Primer sequences (5' 3')	Genbank Accession #	Primer concentration (pmol/1l)	ABI Label (multiplex)	Annealing temperature (°C)	Size range (bp)	Number of alleles	H_e	H_o
Lch101	TETRA	F:GCTCAGGTGTTAATTTATGTCCAAA R:GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	DQ979343	0.9	FAM (1)	58	188–196	3	0.64	0.76
Lch102	TETRA	F:AGATTCTGCCTCAAGAAATTCAGT R:GTTTCTTCTAGATCCAGGTCGGCAAT	DQ979344	1.5	FAM (1)	58	286–294	2	0.46	0.66
Lch103	TETRA	F:AAGGCATGATGTATCTTGTCTCA R:GTTTCTTATCTTTCGTATGTGTCCTCCCTGTCT	DQ979345	0.6	HEX (1)	58	298–322	6	0.65	0.64
Lch104	TETRA	F:TGACCAAAAGAAAATGCAAAA R:GTTTCTTGACAGGGTATTAGCAGGA	DQ979346	0.5	HEX	55	378–386	3	0.55	0.34
Lch105	TETRA	F:TGATGCTAAAACAGAAGCATT R:GTTTCTTGTCTGATGTTCAAAAACCT	DQ979348	1.2	HEX (2)	55	244–268	5	0.78	0.86
Lch106	DI	F:GCCTTAATTAGCACCAGAACC R:GTTTCTTACCCTCCAAGCCTTCAGTA	DQ979349	0.3	HEX (2)	55	161–171	3	0.55	0.61
Lch107	DI	F:TCTCATTCTTCTCATGGACTC R:GTTTCTTCTGACTCACAGCATGACCT	DQ979350	0.6	FAM (2)	55	319–325	3	0.59	0.69
Lch108	DI	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: GTTTCTTTTCAGTAGITGGGACTGGGATAA	EF583690	0.3	FAM (3)	58	209–219	5	0.66	0.71
Lch109	DI	F: TTCATTGATGCATTGTTGGTCAT R: GTTTCTTTGCCTCCTCATAGTTCCTCAT	EF583691	0.6	FAM (3)	58	402–408	3	0.41	0.43
Mean								3.67	0.59	0.63

Anexo 4. Número de muestras de heces provenientes de *Callithrix pygmaea* para la población de Tiputini.

Grupo	Número de muestras
Tiputini 1 (T1)	32
Tiputini 2 (T2)	32

Tiputini 3 (T3)	32
Total	96

Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de ADN extraído a partir de muestras de heces de *Callithrix pygmaea*. Carril 1: ladder 100bp, Carriles 2 – 9: muestras T1.7 – T1.14.



Anexo 6. Concentración y volúmenes para la reacción de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen
H2O		16,2 uL
Buffer 10X para PCR Invitrogen TM	1X	2,5 uL
Cloruro de Magnesio 50mM Invitrogen TM	1,5 mM	1,5 uL
BSA	1 ng/uL	1 uL
Primer Forwad	0,24 uM	0,6 uL
Primer Reverse	0,24 uM	0,6 uL
dNTP Mix 10uM Invitrogen TM	0,2 uM	0,5 uL
Taq DNA Polimerasa Recombinante Invitrogen TM 5U/μL	0,5 U/uL	0,1 uL
DNA extraído a partir de heces		2 uL
Total		25 uL

Anexo 7. Ciclaje del PCR para la amplificación de regiones microsatélites, 40 ciclos (CJ1 como ejemplo).

Paso	Tempertura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	92°C	5 min	1
Denaturación	95°C	1 min	40

Annealing	56°C	1 min	40
Extensión	72°C	1 min	40
Extensión final	72°C	5 min	1

Anexo 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ7 para T2, donde el carril 1: ladder 10 bp, del carril 2 al 25 se encuentran los productos de PCR para CJ7 pertenecientes al grupo 2 (T2.5, T2.9-T2.31), del carril 26 al 32 se encuentran productos de PCR para CJ7 del grupo T1 utilizadas para solapar los alelos encontrados (T1.7, T1.10, T1.13, T1.15, T1.18, T1.23, T1.17 respectivamente) y en el carril 33 se encuentra la muestra de pelo P1 utilizada como control positivo.

200

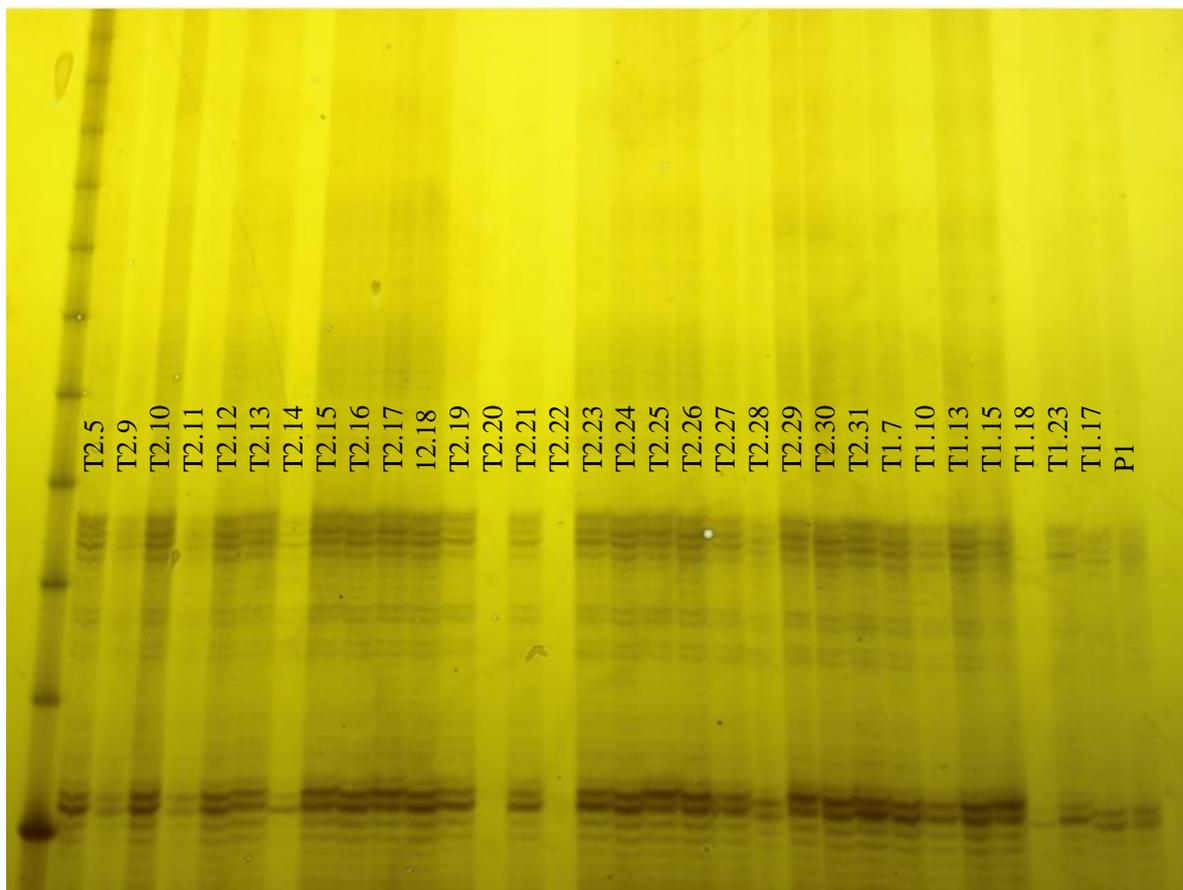
190

180

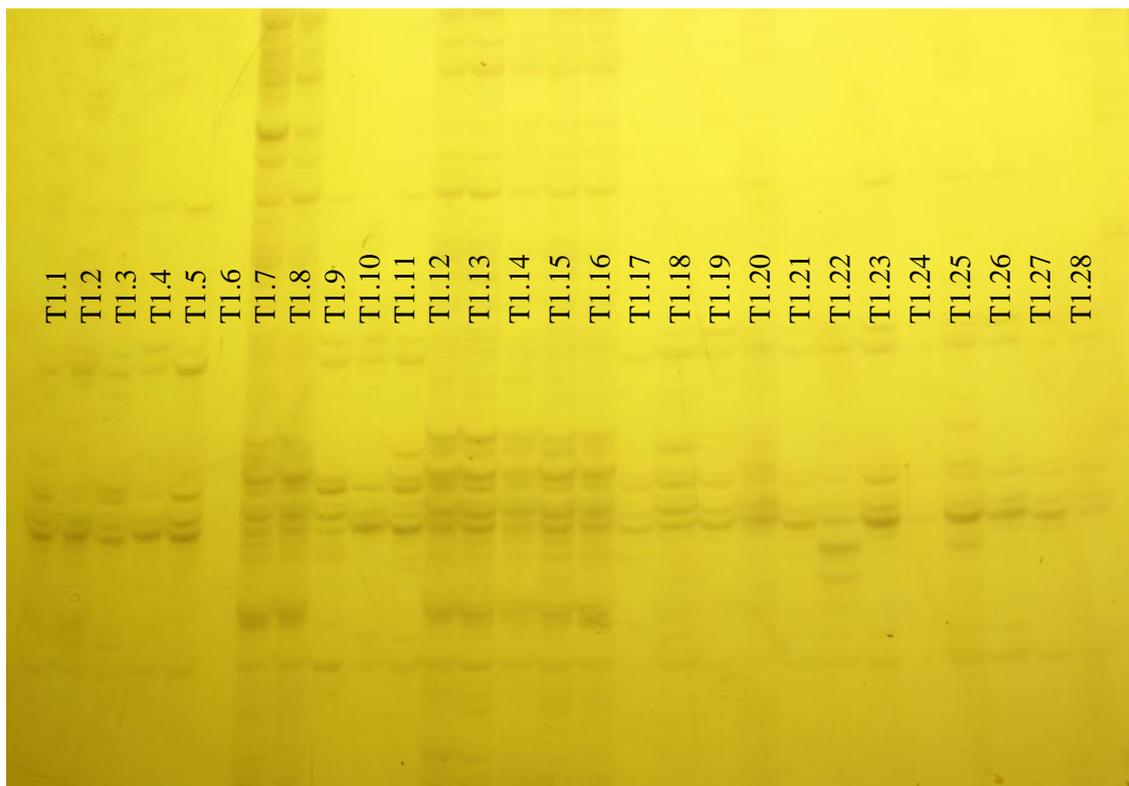
170

160

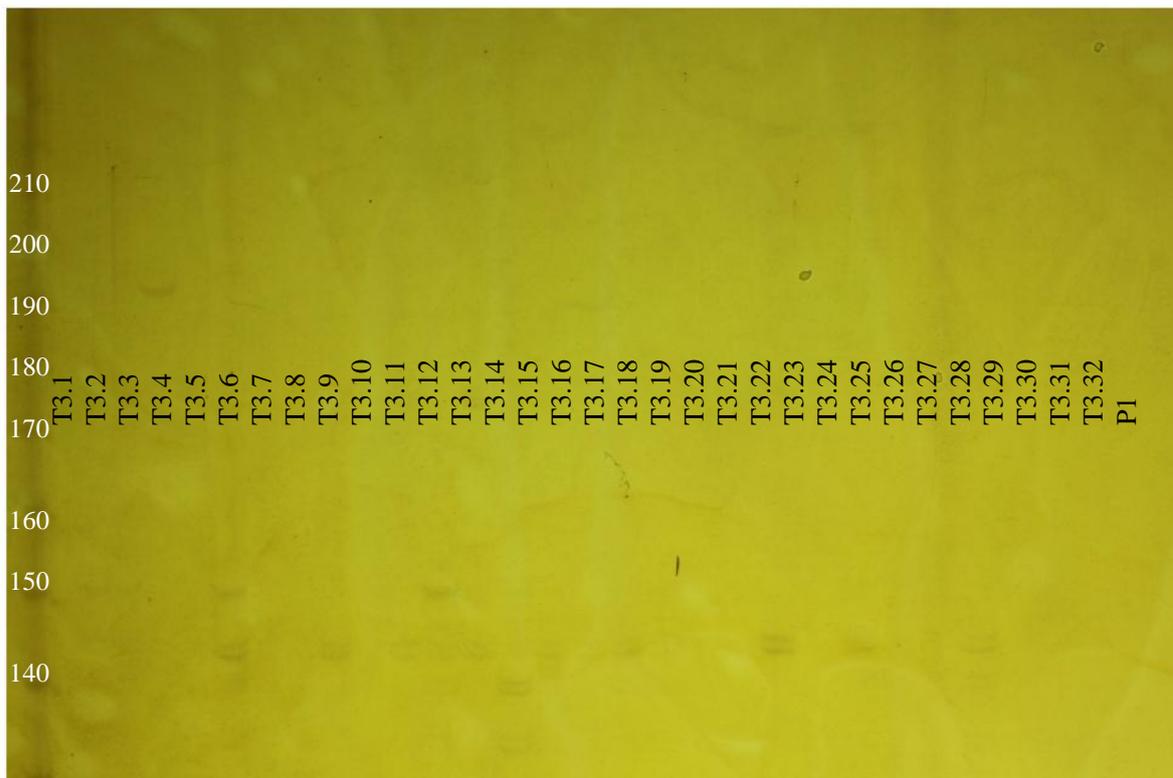
150



Anexo 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ11 para T1. Del carril 1 al 28 se encuentran los productos de PCR de las muestras T1.1-T1.28 para CJ11.



Anexo 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador CJ15 para T3. Donde el primer carril muestra el ladder 10 bp y del carril 2 en adelante se encuentran los productos de PCR del grupo T3 para CJ15 (T3.1-T3.32).



Anexo 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para el marcador P5BE6 para T3. Donde el primer carril muestra el ladder 10 bp usado como referencia y los siguientes son los productos de PCR para P5BE6 generados a partir de las muestras pertenecientes al grupo T3 (T3.1-T3.32).

