

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Validación del protocolo de análisis de diversidad genética
en Leoncillos (*Cebuella pygmaea*) mediante el uso de
marcadores moleculares microsatélites**

Trabajo de investigación

Marcela Estefanía Garzón Tituaña

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito

para la obtención del título de

Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, mayo del 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Validación del protocolo de análisis de diversidad genética en Leoncillos
(*Cebuella pygmaea*) mediante el uso de marcadores moleculares
microsatélites en la población del Centro de Rescate Yanacocha en Puyo**

Marcela Garzón Tituaña

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico Venancio Arahana, Ph.D.

Firma del Profesor _____

Nombre del profesor, Título académico Stella de la Torre, Ph.D.

Firma del Profesor _____

Quito, mayo del 2016

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

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

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Marcela Estefanía Garzón Tituaña

Código:

00103424

Cédula de Identidad:

171902731-8

Lugar y fecha:

Quito, mayo del 2016

DEDICATORIA

*“Pon tu corazón, mente, intelecto y alma
incluso en tus actos más pequeños.
Ese es el secreto del éxito”*

(Swami Sivananda)

A mis padres que han estado ahí desde siempre. Por su apoyo y confianza en todo momento. Por ser mis “fans” número uno inclusive en los momentos más difíciles. Los amo con todo mi corazón, para siempre.

A Jeanneth, quien a pesar de ya no estar físicamente con nosotros, sé que desde el cielo me sonrío y me protege. Sé que estarías tan orgullosa de mí ahora como lo estuviste siempre. Gracias por tus últimas palabras, nunca me rendiré, lo prometo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres quienes han estado ahí para apoyarme, guiarme y de ser necesario reprenderme haciendo de mí una mejor persona. Me han demostrado que todo lo bueno en la vida llega cuando uno lucha y se esfuerza por ello. Han sido la mejor compañía durante este camino y siempre estaré orgullosa de tener unos padres como ustedes. Infinitas gracias por todo.

A mi familia, todos y cada uno de ellos con sus locuras, peleas, risas y lágrimas han sabido educarme convirtiéndose en el motor principal de mi vida. Gracias por ser perfectamente imperfectos para mí, no pude haber llegado a una mejor familia.

A mi Carito, mi prima/hermana quién ha sido mi constante fuente de energía y risas durante los momentos difíciles. Gracias por soportar mis quejas constantes, mis momentos de hiperactividad y compartir conmigo cada pequeño detalle. La distancia jamás será una excusa para mantenernos unidas.

A los chicos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ que hicieron del trabajo diario algo increíblemente divertido y lleno de buenos recuerdos. Vivi, gracias por la paciencia con los monitos y el cariño con el que me dedicabas tus pocos minutos libres en el día. Meche, gracias por las risas, por dejarme ser parte de tu vida y por sacrificar tus tardes por enseñarme a hacer acrilamida y Berni, gracias por siempre estar ahí con una sonrisa recordándome que todo tiene siempre un lado positivo.

A todos mis amigos quienes han sido cómplices de muchas locuras y travesuras. Siempre estuvieron ahí para apoyarme, darme un consejo o solo escucharme.

Stefy y Joely por haber estado a mi lado en el momento más difícil de mi vida. Por no rendirse conmigo y darse el tiempo de ser esas amigas incondicionales que siempre agradeceré que hayan llegado a mi vida, nunca podré agradecerles por todo lo que hicieron. Las quiero para siempre.

A mis profesores, especialmente Lourdes y Venancio quienes tuvieron la habilidad de transmitirme sus conocimientos y experiencias para convertirme en una excelente profesional y más allá de eso una excelente persona.

A la USFQ por haberme brindado la oportunidad de estudiar y convertirme en una profesional, por haber sido mi hogar durante estos años, por haberme dado la oportunidad de vivir maravillosas experiencias y haberme permitido conocer a tanta gente maravillosa que ha dejado marcada mi vida para siempre.

RESUMEN

El leoncillo (*Cebuella pygmaea*), es una de las especies de primates más pequeñas del Ecuador, que actualmente es considerada en la lista del IUCN como una especie vulnerable. El estudio de la diversidad genética resulta fundamental para la conservación y estabilidad de las especies para así garantizar el cuidado y protección de las mismas. Si se utilizan técnicas de muestreo no invasivas (heces, orina, pelo) para el estudio de diversidad genética del leoncillo, este estudio se vuelve crítico ya que el ADN extraído de este tipo de muestras presenta problemas de calidad (degradación, presencia de inhibidores y contaminantes) que dificultan los posteriores análisis moleculares y restan confiabilidad a los resultados. Esto se agrava, si no se cuenta con marcadores específicos para la amplificación de ADN de la especie analizada. El objetivo de la presente investigación fue determinar el número de réplicas de PCR requeridas para asegurar un nivel aceptable de confiabilidad de los resultados obtenidos en muestras de heces de leoncillos como fuente de ADN y primers heterólogos desarrollados para amplificar regiones microsatélites en *Callithrix jacchus*. Se analizó 35 muestras de heces provenientes de leoncillos del Centro de Rescate Yanacocha en Puyo, se extrajo el ADN y se realizaron varias repeticiones de PCR con cinco pares de primers heterólogos, siguiendo el enfoque de “tubos múltiples”. Se determinó que, el genotipaje incorrecto por la presencia de falsos alelos y la no detección de heterocigotos, es el principal error que se presenta en los estudios con muestras no invasivas. De los cinco marcadores utilizados en este estudio únicamente dos se encuentran dentro de los rangos recomendados en la literatura (CJ11 y CJ14). Los tres restantes no deberían ser utilizados en estudios de diversidad genética para *C. pygmaea* por el número de repeticiones requeridas para obtener resultados (CJ1, CJ7 y CJ15). Con los resultados obtenidos, se espera poder definir protocolos adecuados para determinar, de manera confiable, la diversidad genética de las poblaciones de leoncillos y con ello definir medidas adecuadas para su conservación y determinar un factor de correspondencia de genotipos que ayude a mejorar el análisis de diversidad genética utilizando el set de primers utilizados en este estudio.

Palabras clave: Diversidad genética, muestreo no invasivo, ADN, PCR, *Cebuella pygmaea*, microsatélites, factor de correspondencia, genotipos.

ABSTRACT

Cebuella pygmaea also known as Pigmy Marmoset is considered the smallest species of primates in Ecuador which is currently considered in the IUCN list as a vulnerable species. Genetic diversity studies result fundamental for the conservation and stability of the species to guarantee their care and protection. If non-invasive sampling techniques (feces, hair or urine) are used for the study, this becomes critic as DNA extracted from these sources may have quality problems (degradation, inhibitors and contaminants) that make subsequent molecular analysis difficult and results reliability diminishes. This is aggravated if specific DNA markers are not available for the amplification of DNA of the tested species. The objective of the present study was to determine the required number of PCR replications to ensure an acceptable level of reliability of the obtained results using Pigmy Marmoset feces samples as DNA sources and heterologous primers designed to amplify microsatellites regions from *Callithrix jacchus*. Thirty five feces samples of Pigmy Marmosets from “Yanacocha” Rescue Center in Puyo were analyzed. DNA was extracted and several PCR replications were performed using five pairs of heterologous primers, following the multiple tubes approach. It was determined that the main types of error for the analysis of non-invasive samples correspond to a wrong genotyping due to the presence of false alleles and non-detection of heterozygotes. From the five primers used in this study only two are within the recommended ranges recommended in the literature (CJ11 and CJ14). The remaining three should not be used in studies of genetic diversity for *C. pygmaea* due to the number of replications needed to obtain results (CJ1, CJ7 y CJ15). It is expected that the results of this study help define appropriate protocols to reliably determine the genetic diversity of *C. pygmaea* populations and thereby make the right decisions for their conservation and determine a factor of genotype correspondence to improve genetic diversity analysis using the set of primers used in this study.

Key words: Genetic diversity, non-invasive samples, DNA, PCR, *Cebuella pygmaea*, microsatellites.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	12
1.1 <i>Cebuella pygmaea</i>	12
1.1.1 Generalidades	12
1.1.2 Hábitat	13
1.2 <i>Diversidad Genética</i>	14
1.2.1 Definición	14
1.2.2 Importancia del estudio de la diversidad genética.....	15
1.3 <i>Marcadores moleculares como herramienta para estudiar la diversidad genética</i> 16	
1.3.1 Marcadores moleculares microsatélites.....	16
1.3.1.1 Marcadores moleculares Microsatélites Heterólogos	17
1.3.2 Extracción de muestras no invasivas	17
1.3.3 Amplificación mediante PCR de ADN obtenido de muestras no invasivas....	18
1.3.3.1 Genotipaje Incorrecto.....	18
1.3.3.2 Aparición de falsos alelos	18
1.4 <i>Estudios de Diversidad Genética para Cebuella pygmaea</i>	19
2. Objetivos	20
2.1 <i>Objetivo General</i>	20
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	20
3. Justificación	20
4. Área de Estudio	22
5. Materiales.....	22
5.1 <i>Extracción de ADN a partir de muestras de heces de leoncillos</i>	22
5.2 <i>Cuantificación de Ácidos Nucleicos</i>	22
5.3 <i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	23
5.4 <i>Amplificación de regiones microsatélite</i>	23
5.5 <i>Electroforesis en geles de Poliacrilamida</i>	23
5.6 <i>Toma de datos y análisis estadísticos</i>	24
6. Métodos	25
6.1 <i>Diseño Experimental</i>	25
6.2 <i>Recolección de muestras de heces de leoncillos</i>	25

6.3	<i>Extracción de ADN a partir de muestras de heces</i>	25
6.4	<i>Cuantificación de ADN y determinación de la calidad</i>	26
6.5	<i>Amplificación de regiones microsátélites</i>	27
6.6	<i>Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida</i>	27
6.7	<i>Toma de datos</i>	28
6.8	<i>Análisis de datos</i>	28
7.	Resultados	31
7.1	<i>Eficiencia de Amplificación</i>	31
7.2	<i>Replicabilidad del genotipo</i>	32
7.3	<i>Incidencia de genotipos indefinidos</i>	32
7.4	<i>Relación de la concentración de ADN con la tasa de amplificación</i>	32
7.5	<i>Tasa de Error</i>	33
7.6	<i>Análisis de muestras repetidas</i>	33
7.7	<i>Análisis de Alelos</i>	33
8.	Discusión	34
9.	Conclusiones	39
10.	Recomendaciones	39
11.	Bibliografía	41
12.	Tablas	44
13.	Figuras	46
14.	Anexos	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Eficiencia de amplificación y genotipificación.	44
Tabla 2. Análisis realizado para muestras repetidas por triplicado y duplicado.....	44
Tabla 3. Alelos por locus y Frecuencias de Observación de Alelos.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Ubicación del centro de Rescate Yanacocha donde se realizó la colección de muestras de heces de leoncillos.	46
Figura No. 2 Porcentaje de Amplificación de las muestras de <i>Cebuella pygmaea</i> en relación a la concentración de ADN.	47

1. Introducción

1.1 Cebuella pygmaea

1.1.1 Generalidades

Una de las especies de primates más pequeñas que se conocen es el leoncillo (*Cebuella pygmaea*), que habita en los bosques tropicales y subtropicales del Ecuador. El leoncillo es una de las 20 especies de primates ecuatorianos que se encuentran amenazadas por actividades antropogénicas como la destrucción de sus hábitats, la cacería indiscriminada y el tráfico de animales. El leoncillo, por su pequeño tamaño y alta especialización en dieta y hábitat es vulnerable a alteraciones humanas en el ecosistema (de la Torre et al., 2005). Las poblaciones que han sido estudiadas en la región noreste del Ecuador se han visto gravemente afectadas por factores como la contaminación sonora y destrucción de su hábitat por el constante desarrollo de la industria petrolera en la región, así como también el crecimiento de los asentamientos humanos. Sin duda, estos factores han hecho efecto a lo largo de los años y han afectado de manera negativa a las poblaciones de leoncillos (de la Torre et al. 2009).

La especie *Cebuella pygmaea* puede ser claramente distinguible de otros miembros de la familia Callithricidae no solo por su reducido tamaño, sino también por su densa melena de color dorado. Su cola no es prensil, sus patas traseras y delanteras, tienen garras en lugar de uñas, excepto en el hallux y tienen un color dorado oscuro moteado en la parte superior de su cuerpo. El tamaño promedio de los individuos es de 339 mm, incluyendo la cola que puede medir entre 172-229 mm lo cual representa un 60% del tamaño total (Townsend, 2001).

Los miembros de esta especie habitan varios estratos de los bosques tropicales siempre verdes. Se distribuyen por el sur del Río Caquetá en Colombia, hacia el oeste de la Amazonía Ecuatoriana y hacia el sur se localizan en las tierras bajas de la amazonía del Perú al margen derecho del Río Ucayali, al este del Río Mayo y del Río Huallaga, al norte del Solimões-Amazonas-Marañón y al este del Río Pastaza. También se distribuyen por el norte

de Bolivia y el oeste de Brasil a lo largo del margen del Río Purus y Madeira al sur del Río Abunã (IUCN, 2015).

Respecto a la reproducción y la forma de vida de los leoncillos, esta especie tiene picos reproductivos, uno en la temporada seca y uno en la lluviosa. Son monógamos y cuando se encuentran en cautiverio solo el macho y la hembra dominantes se reproducen. El tiempo de gestación es de 19-20 semanas en cautiverio y el intervalo entre nacimientos es de 145-746 días. Las hembras paren gemelos el 67-76% de las veces, aunque tener una sola cría también es posible. Por otro lado, los trillizos pueden ocurrir pero es un caso raro. Viven en grupos que pueden estar conformados de 2 a 9 individuos adultos con 1 o 2 crías. Grupos más grandes (10-15 individuos) pueden observarse aunque se piensa que estos grupos son la unión de dos grupos adyacentes relacionados. La estabilidad de los grupos depende directamente de la disponibilidad de exudados para su alimentación (Townsend, 2001).

Los principales depredadores de *C. pygmaea* incluyen ocelotes, tigrillos, jaguares y tayras. El sobrevuelo de las aves y la presencia de monos capuchinos genera en los miembros de esta especie un llamado de alerta por lo cual se cree que también pueden ser potenciales depredadores. Las serpientes venenosas como *Bothrops atrox* son probablemente los depredadores más importantes de los leoncillos (Townsend, 2001).

1.1.2 Hábitat

Cebuella pygmaea habita las tierras bajas de los bosques tropicales siempre verdes del de la Amazonia ecuatoriana, mayormente en llanuras que son inundadas periódicamente por los ríos o cerca de los lagos en las tierras bajas. El nicho ecológico utilizado por esta especie para su alimentación es único dentro del rango geográfico y esto se debe a que la alimentación de estos animales se basa en exudados de ciertas especies de plantas. Del 60%-80% de su tiempo total de alimentación lo dedican al consumo de exudados provenientes de los árboles, el resto del tiempo se alimentan de insectos. La distribución y densidad de las poblaciones de esta especie se relaciona directamente con la presencia y la abundancia de los especies vegetales que utilizan para alimentarse dentro de las cuales principalmente se encuentra *Sterculia apetala*, *Cedrales odorata*, *Inga marginata* y *Parkia balslevii* (Yépez et al., 2005).

Situación de *C. pygmaea* en el Ecuador

Cebuella pygmaea es una especie que se encuentra en situación vulnerable en el Ecuador según el Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador (Tirira, 2011). Se ha presentado evidencia de la sensibilidad de estos primates a la presencia de personas en su hábitat, al ruido ambiental y a las capturas, lo cual altera su comportamiento, se reduce el tamaño de los grupos y se altera su tasa de reproducción. Considerando que la tasa de destrucción de hábitats es uno de los factores más importantes que afectan las poblaciones de *Cebuella pygmaea* en el Ecuador, que la tasa de deforestación ha registrado valores de 47 479 ha/año entre el 2008-2014 (FAO, 2014) y que los bosques de galería a lo largo de los ríos ecuatorianos se han visto significativamente alterados por las actividades humanas, es que se incluyó al leoncillo en la lista de especies Vulnerables en el Ecuador, basándose en el criterio A4 de la IUCN. Este criterio es aplicado a especies donde una observación, estimación, inferencia, proyección o sospecha demuestra que ha existido al menos una reducción del 30% del tamaño de la población en 10 años o un periodo de tres generaciones. También aplica a las especies donde se observe una reducción del área donde habiten, una reducción de la calidad del hábitat y niveles potenciales de explotación de la zona (UICN, 2000).

1.2 Diversidad Genética

1.2.1 Definición

La diversidad genética se estima por las diferencias de alelos entre los individuos de una especie. Estas diferencias son generadas por cambios en las secuencias de las bases nitrogenadas del ADN que, a su vez, pueden modificar las cadenas de aminoácidos, los cuales pueden causar diferencias funcionales, bioquímicas y morfológicas de las proteínas que se generan, influyendo en el comportamiento, tasas de reproducción y supervivencia de los individuos de una población. Esta variedad que se observa en las secuencias de los alelos determina el polimorfismo de las especies. El nivel de polimorfismo es directamente proporcional a la diversidad genética de la especie, es decir, mientras mayor sea el polimorfismo mayor será la diversidad genética (Frankham et al., 2002).

1.2.2 Importancia del estudio de la diversidad genética

Mantener la diversidad genética es el principal objetivo de la biología de la conservación. Debido a que el medio ambiente se encuentra en constante cambio, la diversidad genética es la principal herramienta que las poblaciones necesitan para poder evolucionar y adaptarse a los cambios. Además, la pérdida de diversidad genética se relaciona con la endogamia y la reducción del fitness (Frankham et al., 2002).

Se debe considerar que una baja tasa de supervivencia o reproducción de los individuos va a disminuir la tasa de crecimiento de una población, lo cual puede aumentar la probabilidad de extinción. De la misma forma, los cuellos de botella prolongados pueden generar una gran pérdida de variación por medio de pérdida de alelos (Lacy, 2003).

La diversidad genética de las poblaciones resulta importante dado que la pérdida de información genética hace que las poblaciones pasen por un proceso de evolución adaptativa mucho más lento. Por otro lado, la deriva genética es una fuerza evolutiva que modifica las frecuencias alélicas y produce cambios evolutivos por acontecimientos al azar. Puede influir significativamente en la diversidad genética de una especie ya que da como resultado cambios en el reservorio genético entre generaciones sucesivas de una población. El resultado final es que eventualmente la población puede alcanzar la homocigocidad (Lacy, 2003).

Si bien, los impactos de la pérdida de diversidad genética pueden darse de forma lenta, también pueden ser fuertemente decisivos. Es importante considerar que una vez que los impactos son lo suficientemente grandes para ser identificados también es bastante tarde para intentar revertirlos (Lacy, 2003). Es claro que la diversidad genética dentro de las poblaciones puede afectar directamente a la productividad, crecimiento y estabilidad de las especies, así como a las interacciones intraespecíficas dentro de las comunidades y por consiguiente dentro de los ecosistemas. Por lo tanto, tener un vasto conocimiento de la situación de las especies respecto a su diversidad genética es importante para poder controlar a tiempo los efectos adversos que se pueden generar al perder cierta información genética (Hughes et al., 2008).

1.3 Marcadores moleculares como herramienta para estudiar la diversidad genética

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN con una ubicación conocida e identificable en un cromosoma y cuya herencia es fácilmente rastreable. Para que un fragmento de ADN sea considerado como marcador genético debe mostrar una variación que pueda ser experimentalmente detectable entre los individuos de una población. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles como cambios fenotípicos heredables significativos o variaciones en un solo nucleótido de la secuencia de ADN (polimorfismo). El polimorfismo genético es la expresión simultánea de una característica con dos o más variantes en una población. Los marcadores de ADN son de gran ayuda al momento de hacer estudios poblacionales ya que son segregados como genes individuales y no son influenciados por el ambiente (Kumar et al., 2009).

1.3.1 Marcadores moleculares microsatélites

Los microsatélites o SSR (simple sequence repeats) son pequeños segmentos de ADN que resultan de la repetición en tandem de cortas secuencias de 2-6 nucleótidos y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma. Tienen una alta tasa de mutación, generalmente se encuentran en regiones no codificantes del genoma y muestran una notable variación en su tamaño (polimorfismo). Los microsatélites son marcadores ideales por su naturaleza codominante y multialélica. Son útiles para estudios de evolución, genómica comparativa y muy eficientes en la selección asistida por marcadores cuando se trabaja con germoplasma (Reddy et al. 2001).

Las desventajas de los microsatélites son que su elaboración es costosa si no se tiene secuenciado el genoma de la especie de interés y que a pesar de ser considerados marcadores codominantes, mutaciones en los sitios de unión al ADN molde pueden ocasionar que los primers no se peguen adecuadamente lo que puede resultar en la aparición de alelos nulos los cuales pueden generar errores en el genotipaje (Kumar et al., 2009).

En general, los microsatélites tienen un alto polimorfismo, son altamente informativos y pueden ser ampliamente utilizados para estudios poblacionales, mapeo genético, estimación de relaciones genéticas y estudios de diversidad genética (Kumar et al., 2009).

1.3.1.1 Marcadores moleculares Microsatélites Heterólogos

La mayor limitación de los marcadores microsatélites es la necesidad de aislar y caracterizar los fragmentos de ADN con técnicas como la clonación y el secuenciamiento cuando no se ha trabajado antes con las especies de interés, lo cual resulta costoso y requiere tiempo. Una alternativa consiste en buscar marcadores que se hayan utilizado en otros estudios para especies emparentadas con el fin de encontrar primers potencialmente útiles. Sin embargo, la utilidad de primers heterólogos es generalmente incierta dado que no siempre tienen la misma afinidad en las secuencias a pesar de provenir de especies cercanas (Anger y Bernatchez, 1996).

Se ha comprobado que las regiones flanqueantes de los microsatélites evolucionan y cambian en una tasa similar a la de los intrones, lo cual indica que las secuencias flanqueantes son neutrales. Esta información concuerda con la idea de que los microsatélites están ubicados dentro de regiones del genoma no codificantes (Brohede y Ellegren, 1999).

El uso de marcadores heterólogos ha dado buenos resultados en estudios con organismos de sangre fría y vertebrados acuáticos. Se piensa que esto se debe a que la tasa de mutación en los organismos acuáticos es menor en comparación a la de los organismos terrestres. Por lo tanto, la variación de nucleótidos en las regiones flanqueantes del microsatélite será mayor para organismos de sangre caliente y eso reducirá la eficiencia de los marcadores de este tipo entre especies emparentadas dando como resultado problemas en la amplificación al momento de realizar el PCR (Brohede y Ellegren, 1999).

1.3.2 Extracción de muestras no invasivas

Los estudios moleculares requieren de una muestra que proporcione ADN de buena calidad y en cantidad suficiente para no generar sesgos en los resultados. Las muestras más adecuadas para este fin son segmentos de piel, músculo y sangre. Sin embargo los procedimientos para obtenerlos son invasivos y afectan la homeostasis de los animales, lo cual es especialmente crítico en el caso de la fauna silvestre. De hecho, en la mayoría de estudios genéticos las muestras han sido tomadas de tejidos de animales que han sido capturados o sacrificados (Taberlet et al., 1999). Diferentes alternativas se han propuesto para resolver este problema, considerando el caso de extraer ADN de muestras obtenidas de manera no invasiva como heces o pelo.

Si bien, los métodos de muestreo no invasivos representan una gran alternativa para dejar de lado los muestreos invasivos que ponen en riesgo la vida de los individuos, se deben considerar los pros y contras dado que no siempre es lo más recomendable para obtener ADN de buena calidad (Taberlet et al., 1999). Para estudios de diversidad o genética de poblaciones es importante obtener un genotipaje correcto por lo cual los errores que generan las muestras de ADN obtenidas heces son un problema al momento de sacar conclusiones consistentes (Taberlet et al., 1999).

1.3.3 Amplificación mediante PCR de ADN obtenido de muestras no invasivas

Normalmente, los estudios moleculares realizados con ADN extraído de muestras de heces o pelo enfrentan ciertas complicaciones que tienen que ver con la baja calidad del ADN como consecuencia de su degradación, su baja concentración (picogramos) y la alta concentración de inhibidores. Estos problemas pueden traer consigo consecuencias al momento de realizar los análisis e interpretar los resultados. Los principales problemas pueden ser ausencia de producto de PCR, desaparición de alelos o aparición de falsos alelos, lo cual puede ocasionar un falso genotipaje de los individuos (Taberlet et al., 1999).

Si bien los microsatélites son marcadores moleculares bastante utilizados para estudios de diversidad genética, el uso de muestras no invasivas, como heces, limita el potencial de los marcadores disminuyendo la eficiencia y la confiabilidad de los resultados obtenidos (Taberlet et al., 1999).

1.3.3.1 Genotipaje Incorrecto

Este tipo de error puede ser ocasionado por un evento llamado “deserción alélica” el cual genera que se pase por alto los heterocigotos ya que solo se detecta a uno de los dos posibles alelos. Una explicación de este evento es que al momento de pipetear una muestra de baja concentración y colocarla en el tubo de PCR, solo uno de los dos alelos es incluido y por lo tanto es el único que se amplifica (Taberlet et al., 1996).

1.3.3.2 Aparición de falsos alelos

Este tipo de error ocurre cuando durante el PCR se amplifican artefactos que pueden ser mal interpretados como alelos. Los falsos alelos son usualmente producidos en individuos que son homocigotos, entonces por la aparición de los falsos alelos este individuo se puede confundir con heterocigoto alterando así el genotipaje del individuo (Taberlet et al., 1996).

Una posible explicación de este evento es que los falsos alelos pueden ser ocasionados por una contaminación esporádica por ADN proveniente de otra fuente. Este tipo de error ocurre en un 5% de los PCRs, sin embargo no se lo debe dejar de lado ya que puede ser fuertemente influyente (Taberlet et al., 1996).

1.4 Estudios de Diversidad Genética para *Cebuella pygmaea*

En un primer estudio (Nieto et al. 2010), se logró establecer un protocolo de PCR para trabajar con *C. pygmaea* y estandarizar el uso de siete de nueve primers de microsatélites de ADN nuclear usados para *C. jaccus* a *C. pygmaea*. El análisis se realizó con tres grupos de la población de San Pablo, a orillas del río Aguarico; en estos grupos se encontró una baja variabilidad genética (Nieto, 2009). En un segundo estudio (Terán et al. 2013), se comparó la diversidad genética entre las poblaciones de Sehuaya, a orillas del río Aguarico y Sacha, a orillas del río Napo. Los resultados de este estudio sugieren que existe mayor variabilidad genética en una misma población que entre diferentes poblaciones. Por último, en un estudio más reciente realizado por Acosta (2014) con la población de leoncillos de Tiputini, a orillas del río del mismo nombre, se encontraron valores altos de heterocigocidad sugiriendo que esta población mantiene una alta variabilidad genética. En todos estos estudios se identificaron genotipos usando una matriz en la que se agrupaban muestras con 60% o más de coincidencia en los alelos de todos los loci y se las consideraba como provenientes de un mismo individuo. Es necesario saber si este método es válido, considerando todos los factores que pueden influir en los resultados, como degradación del ADN, uso de primers heterólogos, entre los principales. Este estudio se enfocó entonces en la validación del método previamente mencionado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

- Validar el protocolo de análisis de diversidad genética en leoncillos (*Cebuella pygmaea*) con el uso de marcadores moleculares microsatélites heterólogos y ADN obtenido de heces.

2.2 Objetivos Específicos

- Comprobar la eficiencia de 5 pares de primers microsatélites heterólogos utilizados previamente por Nieto (2009), Terán (2013) y Acosta (2014) en el análisis de diversidad genética de la especie *C. pygmaea*.
- Determinar niveles de error, por exceso o por defecto, en la amplificación de alelos en muestras de leoncillos mediante primers SSR heterólogos, para usarlos como factores de corrección.
- Establecer criterios de validez para los datos generados por amplificación de regiones microsatélites en *C. pygmaea*.

3. Justificación

El Ecuador es un país megadiverso y por lo tanto rico en especies vegetales y animales. Lamentablemente, la caza indiscriminada, la tala de árboles, la contaminación de los ecosistemas, la extensión de la agricultura, el crecimiento de la población humana, entre otros, están reduciendo notablemente el área silvestre y por tanto la diversidad de las especies. Es debido a estos problemas de deterioro ambiental y a la estrecha relación que existe entre la conservación y el desarrollo económico que se ha generado un interés cada vez más grande en el estudio de la biodiversidad a nivel mundial. La conservación de la diversidad biológica es importante y se basa en tres puntos principales: su valor ecológico, su valor ético o cultural y su valor económico (Varea et al., 1997).

La diversidad tiene un valor ecológico debido al número de funciones reguladoras que son producto de los diferentes procesos ecológicos y las interacciones que existen entre los organismos y el entorno en el cual se desarrollan. De la misma forma se menciona un valor ético o cultural que va de la mano del derecho intrínseco que cada ser vivo tiene para existir independientemente de la utilidad que tenga o no para la humanidad. Y por último, un valor

económico que se refiere al aporte de los ecosistemas, las especies y la información genética para el desarrollo de una región (Varea et al., 1997).

Las técnicas moleculares y dentro de éstas, los marcadores microsatélites, han sido usadas en varios estudios de diversidad genética de diferentes especies. Como es obvio, es preferible el uso de marcadores moleculares específicos para la especie en estudio, reduciendo así las variables y obteniendo resultados más robustos. Sin embargo, en muchos casos no se cuenta con primers específicos por lo que se recurre a marcadores heterólogos lo que trae consigo complicaciones de consistencia y reproducibilidad de los datos generados. Por otro lado, es claro que se requiere de material genético de buena calidad y en cantidad suficiente para realizar estos estudios. Sin embargo, cuando se trata de estudios de vida silvestre, los métodos de colección invasivos pueden generar estrés en los individuos de las poblaciones, y la tendencia es hacia el uso de muestras no invasivas como pelo o heces. Sin embargo, en estos casos el ADN que se obtiene no es de buena calidad debido a la presencia de inhibidores, nucleasas y demás sustancias propias del intestino del animal que hacen que la muestra se vuelva problemática al momento de ser analizada (Taberlet y Lukiart, 1999).

Una manera de reducir los posibles errores derivados de las condiciones mencionadas y generar resultados confiables, es repetir la amplificación de PCR un determinado número de veces para cada individuo para establecer la consistencia de los resultados y tratar de determinar el genotipo correcto con base en el resultado más constante. Según Navidi et al., (1992) un enfoque adecuado es dividir las muestras en diferentes tubos de PCR, amplificar y analizar cada resultado por separado. Así se intentará evitar los errores que pueden darse en una sola reacción. Usando esta técnica se puede determinar el genotipo inclusive si se tiene pequeñas cantidades de contaminación o inhibidores. Con el mismo fin se pueden utilizar muestras repetidas de un mismo individuo, amplificarlas a todas bajo las mismas condiciones y analizarlas por separado para así poder determinar el genotipo correcto del individuo.

El uso de marcadores heterólogos para *C. pygmaea* en los estudios realizados previamente pudo haber generado datos que probablemente adolezcan de las inconsistencias indicadas en los párrafos anteriores. Las diversas características de la muestra, más el uso de marcadores heterólogos requieren el establecimiento de parámetros de eficiencia y rangos de error aceptables para llevar a cabo los estudios de diversidad genética de especies silvestres, de tal modo que los resultados que se obtienen sean confiables, correctos y reproducibles. Es

por esto que se lleva a cabo esta investigación, para establecer parámetros que ayuden a realizar un mejor estudio de la diversidad genética para *C. pygmaea* mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites que demuestren tener alta reproducibilidad y replicabilidad en sus resultados.

4. Área de Estudio

Este proyecto utilizó muestras de heces de leoncillos recolectadas en el centro de rescate Yanacocha, en la ciudad del Puyo, provincia de Pastaza, cuyas coordenadas de referencia son 1°27'49.40''S – 77°59'21.19''O (Figura 1).

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

5. Materiales

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

- Muestras de heces de *Cebuella pygmaea* recolectadas en el Centro de Rescate Yanacocha
- 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

- ADN extraído de muestras de heces de leoncillos
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™)

5.3 Electroforesis en geles de agarosa

- ADN extraído de muestras de heces de leoncillos
- Agarosa LE (Axygen™)
- Ladder 100bp (Axygen™)
- Tris Base (Invitrogen™)
- Ácido bórico (Amp™)
- EDTA (Invitrogen™)
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™)
- Blue juice (Invitrogen™)
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL (Labnet™)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad™)

5.4 Amplificación de regiones microsatélite

- ADN extraído de muestras de heces de leoncillos
- Tubos de 1,5 mL y 0,2 mL (Eppendorf)
- Agua de PCR (Invitrogen)
- dNTPMix 10 μ M (Invitrogen™)
- Primers heterólogos CJ1, CJ7, CJ11, CJ14 y CJ15 (Nievergelt et al., 1998)
- Taq DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen™)
- Buffer 10X para PCR (Invitrogen™)
- Cloruro de Magnesio 50mM (Invitrogen™)
- BSA (Bovine Serum Albumin, Acetylated) (Promega)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf™)
- Termociclador T personal (Biometra™)

5.5 Electroforesis en geles de Poliacrilamida

- TBE 10x (Tris base Invitrogen™ 108g/L, Ácido bórico Amp™ 55g/L, EDTA Invitrogen™ 7.44g/L)
- Solución poliacrilamida 6% (Acrilamida Invitrogen™ 57g/L, Bisacrilamida Invitrogen™ 3g/L, TBE 1X 100 mL/L, Urea Invitrogen™ 300g/L)
- Persulfato de amonio 10% (J.T. Baker™)
- Temed (Invitrogen™)
- Alconox™

- RainXTM
- Ladder 10bp (Ladder 10bp InvitrogenTM 5mL/25mL, Bluejuice InvitrogenTM 2,5mL/25mL)
- Loading Dye (0.01% azul bromofenol, 0.01% xilen cianol, urea InvitrogenTM 5M, glycerol FisherTM)
- Blue juice (InvitrogenTM)
- Solución alcohol-ácido acético para tratamiento del vidrio (Alcohol absoluto J.T. BakerTM, ácido acético glacial MerckTM0.5%)
- Bind Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane) (Sigma AldrichTM)
- Alcohol potable al 70%
- Cámara Vertical de electroforesis Sequi-Gen GT (BioRadTM)
- Fuente de poder PowerPac HV (BioRadTM)
- Termociclador (Techne)
- 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 teñido
- Transiluminador de luz blanca
- Cámara de Fotos (Canon EOSRebel T1iTM)
- Software Microsoft Excel 2010
- Software DARwin 6 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2010)

6. Métodos

6.1 Diseño Experimental

En esta tesis se trabajó con muestras de heces de individuos de *Cebuella pygmaea* del centro de rescate Yanacocha ubicado en la ciudad del Puyo en la provincia de Pastaza ($1^{\circ}27'49.40''\text{S} - 77^{\circ}59'21.19''\text{O}$). Se colectaron 35 muestras de heces repartidas de la siguiente manera: tres muestras de 4 individuos, dos muestras de 3 individuos y 17 muestras de individuos no identificados (Anexo 1).

Para cada una de las muestras se extrajo el ADN y se realizaron 3 repeticiones de PCRs con los 5 pares de primers. En cada ensayo de PCR se incluyó un control positivo, con ADN extraído de pelo de leoncillo (Terán, 2013).

6.2 Recolección de muestras de heces de leoncillos

La recolección de muestras de heces de leoncillo se realizó en el Centro de Rescate Yanacocha en los meses de Junio y Julio del 2013, en el mes de Diciembre del 2013 y en el mes de Mayo del 2014 (permisos de investigación MAE para Stella de la Torre 006/2013-IC-FAU-DPAP/MAE; 001/14-IC-FAU-DPAP/MAE). Las muestras fueron colectadas, en su mayoría, inmediatamente después de ser evacuadas por los individuos. Utilizando pinzas se tomó cada muestra y se la colocó en tubos Eppendorf de 1,5mL que contenían alcohol al 90%, tratando al máximo de prevenir la contaminación cruzada. Luego fueron colocadas a 4°C en un cooler con geles fríos. En estas condiciones fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá, y almacenadas a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

6.3 Extracción de ADN a partir de muestras de heces

Se utilizó el protocolo del QIAamp DNA Stool mini kit, modificado por Chaves et al. (2010). Cuando fue posible se tomó 200 mg de materia fecal, sin embargo en las muestras que no existía esa cantidad se utilizó todo el material disponible (34.3% de las muestras). Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf de 2mL y se añadió 1,5 mL de buffer de lisis ASL; con la ayuda de palillos y vórtex se disolvió la muestra en el buffer y se la dejó incubar a 60°C con agitación constante de 25 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 13,200 rpm. Cuando fue posible se transfirió 1,5 mL o si no, volúmenes menores de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. Con una pinza se añadió la pastilla InhibitEX para eliminar inhibidores

de PCR; la cantidad de pastilla colocada fue proporcional al volumen del sobrenadante recuperado, de la siguiente manera: 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 (Chaves et al., 2010). Se mezcló con el vórtex por un minuto para homogenizar la pastilla con el sobrenadante, y se centrifugó por 12 minutos a 13,200 rpm para sedimentar el material de la pastilla.

A continuación, se transfirió 600 uL, o el volumen existente de sobrenadante, a un nuevo tubo de 2 mL en el cual previamente se colocó 25 uL de proteinasa K, se mezcló suavemente hasta homogenizar la solución. Se añadió 600 uL de un nuevo buffer de lisis AL y se mezcló utilizando el vórtex por 15 segundos. Después se colocaron los tubos en la cama de arena a 70°C y se dejó incubar por 15 minutos. Luego, 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 fue filtrada. Utilizando un nuevo tubo de colección, a la columna se añadió 500 uL de buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 13,200 rpm por un minuto, se repitió el proceso con el buffer de lavado AW2 y se centrifugó 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 de elución AE caliente directamente a la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 40 minutos, luego de lo cual se centrifugó a 8,000 rpm. Después se añadió nuevamente 60 uL de buffer AE, se lo dejó incubar por 15 minutos y se repitió la centrifugación. Este último paso se repitió una segunda vez. De esta forma se obtuvo 180 uL de ADN de cada muestra que fue resuspendido en buffer AE y almacenado a -4°C hasta su uso.

6.4 Cuantificación de ADN y determinación de la calidad

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para visualizar la calidad del ADN se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Se disolvió 1,5 g de agarosa en 100mL de buffer TBE 1X, se le agregó 3 uL de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen™ y se dispensó en el molde, que ya contenía el peine, se dejó gelificar y 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 y se cargó en cada pocillo del gel. Luego se dejó correr durante 45 minutos a 90V. Al finalizar, se retiró el

gel de la cámara y se tomó una foto utilizando el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad™).

6.5 Amplificación de regiones microsátélites

Los primers utilizados en este proyecto fueron los desarrollados por Nievergelt et al. (1998) para *C. jacchus*. Se seleccionaron los 5 pares de primers (CJ1, CJ7, CJ11, CJ14 y CJ15) que mejor habían funcionado en los estudios de diversidad genética realizados previamente por Nieto (2009), Terán (2013) y Acosta (2014). Los primers fueron sintetizados por Invitrogen. La amplificación de las regiones microsátélites del genoma de *Cebuella pygmaea* se realizó con el método previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Nieto et al., 2010), utilizando Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™).

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 y volúmenes utilizados de cada reactivo se muestran en el Anexo 2. Posterior a la preparación del master mix, se distribuyó 23 uL en los tubos de PCR y se añadieron 2 uL de ADN de cada muestra. Los tubos fueron colocados en el Termociclador Tpersonal (Biometra™) bajo el programa de ciclaje de temperaturas indicado en el Anexo 3, en el cual la temperatura de annealing varió de acuerdo al par de primers utilizado.

6.6 Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida

Previo a la electroforesis en poliacrilamida, se comprobó la amplificación exitosa o no mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% por 1 hora a 90 V (Ver sección 6.4). Para la electroforesis en poliacrilamida se utilizó la cámara Sequi-Gen (Bio-Rad™). En primer lugar se lavó los vidrios cuidadosamente utilizando el detergente Alconox. Se dio a cada vidrio un tratamiento especial utilizando papel Kimtex para esparcir las soluciones, primero alcohol al 70% seguido de Bind Silane (1mL ácido acético glacial + 3 µL Bind Silane™) al vidrio donde se pega el gel y de 3mL de RainX™ y 800 µL de Sigmacote™ 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 µL de persulfato de amonio 0.1% y 109 µL de Temed™. 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, en el reservorio superior e inferior, 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 urea de cada pocillo con ayuda de una pipeta Pasteur y se cargó 3 μL de buffer de corrida (loading dye) saltando un pocillo a lo ancho de todo el gel. Se realizó la pre-corrída a 80W (5000 V) y una temperatura máxima de 50°C durante 30 minutos.

Luego se cargaron las muestras (10 μL de producto de PCR y 1 μL Bluejuice 10X (Invitrogen TM) previamente desnaturalizadas a 96°C utilizando el termociclador TECHNE y se las corrió durante 2 horas y media a 80W (5000 V) y una temperatura máxima de 50°C. Al finalizar el tiempo de corrida, se llevó a cabo la tinción del gel con nitrato de plata (Benbouza et al., 2006). Para ello, se desensambló la cámara, separando cuidadosamente el vidrio de la cámara. En primer lugar se colocó el vidrio que contenía 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 y se tomó una foto con la cámara Canon EOSRebel T1i TM.

6.7 Toma de datos

Con la ayuda del transiluminador de luz blanca se evidenciaron los patrones de bandas presentes en el gel. La atención se centró en las bandas que tenían aproximadamente el tamaño esperado según lo reportado por Nievergelt et al. (1998). El tamaño de los alelos se determinó mediante regresión logarítmica, tomando en cuenta la migración de los fragmentos del ladder 10pb (Invitrogen) y la distancia recorrida por cada alelo. A cada alelo se le asignó un código (A, B, C, etc). Los resultados de las repeticiones realizadas se compararon para determinar la constancia de la presencia de los alelos entre muestras y entre repeticiones. Se registró en Excel cada uno de los resultados para cada marcador y se tomó foto de todos los geles.

6.8 Análisis de datos

En cada caso, primero se registró el genotipo observado de cada individuo; cuando no hubo amplificación se le otorgó el valor de 0 al individuo para el cual no se pudo establecer un genotipo. Para el cálculo de eficiencia de amplificación si se consideran las veces donde

se registró un valor de cero. Sin embargo, para los cálculos de replicabilidad de genotipo e incidencia de genotipos indefinidos no se toman en cuenta los valores de 0. A continuación, se establecieron: los individuos que tenían un genotipo definido, es decir, que presentaban el mismo genotipo en todas las repeticiones; un genotipo indefinido, el cual se refiere a individuos donde se obtenían diferentes genotipos en cada repetición; y por último, genotipos incompletos que fueron aquellos en los que no se pudo establecer el genotipo por falta de amplificación. Se calculó la frecuencia de genotipos indefinidos, considerando el número de muestras sin genotipo definido dividido para el número total de muestras (Pagano, 2011). Después, se calculó la eficiencia de amplificación, para lo cual se consideró el número total de experimentos realizados con cada marcador. A este número se le restó el número de veces que no se obtuvo ninguna amplificación para ese marcador. Este valor se dividió para el total de experimentos realizados con cada marcador y se multiplicó por cien para obtener el porcentaje.

$$\text{Eficiencia Amplificación} = \frac{((35)(n)-m)}{(35)(n)} \times 100 \quad (\text{Stephenson, 2010}).$$

Donde 35 es el número de muestras utilizadas en este estudio, n es el número de experimentos realizados para cada marcador y m es el número de veces que no se obtuvo una amplificación para ese marcador. La eficiencia de amplificación fue calculada como un indicador inicial de la eficiencia del marcador en general; representa el número de muestras que amplifican dentro del total para un determinado número de repeticiones en cada marcador.

Sin embargo, la información presentada sobre eficiencia de amplificación es complementada con la replicabilidad de genotipo. Esta información es útil para evaluar realmente al marcador y la consistencia de los resultados que se obtienen. Para la replicabilidad de genotipo se consideraron todos los genotipos obtenidos en las muestras de un mismo individuo para determinar cuántas veces apareció el genotipo más común para cada individuo; para esto se dividió el número de veces que apareció determinado genotipo para el total de genotipos obtenidos. Con esto se obtuvo el porcentaje de reproducibilidad para cada individuo, de estos datos se calculó el promedio para todos los individuos y se lo multiplicó por cien para obtener el porcentaje de replicabilidad de genotipo para cada marcador (Stephenson, 2010).

Dado que no se realizó el mismo número de repeticiones para todos los marcadores, una comparación únicamente entre los porcentajes de eficiencia de amplificación y la replicabilidad del genotipo no es correcta porque no se está evaluando a todos los marcadores bajo parámetros iguales y eso puede generar errores al evaluar la eficiencia de cada marcador molecular. En base a lo mencionado previamente, es importante normalizar los datos estadísticos para poder evaluar los resultados por igual y reducir el sesgo que puede existir al momento de realizar los análisis. Es por eso que se calculó el radio existente entre el porcentaje de eficiencia de amplificación y el número de repeticiones para determinar la relación entre estos valores.

El valor del radio se obtuvo al dividir la eficiencia de amplificación para el número de repeticiones realizadas con cada marcador. Lo que se busca con el radio es conocer con cuanta información aporta cada marcador en cada repetición para lograr completar la información necesaria para determinar el genotipo de los individuos. Es así que mientras más alto sea el valor del radio menos repeticiones se requerirán para completar el genotipo de los individuos (Pagano, 2011).

Para determinar la incidencia de genotipos indefinidos, se multiplicó la frecuencia de genotipos indefinidos por cien. La frecuencia de genotipos indefinidos se calculó contando el número de veces que se obtuvo un genotipo indefinido dividido para el total de veces que se obtuvo un genotipo con cada marcador.

Se realizó una relación entre la concentración de ADN con respecto a la tasa de amplificación para las muestras analizadas con el fin de evaluar la influencia de la concentración inicial de ADN en los análisis moleculares. Para esto, se contabilizó el número de veces que amplificó cada muestra en todas las repeticiones realizadas con los 5 marcadores. Se calculó el número total de repeticiones realizadas entre los 5 marcadores (36). Conociendo estos valores, se dividió el número de veces que amplificó para el número total de repeticiones realizadas y se multiplicó por cien para obtener el porcentaje de amplificación de cada muestra. Y por último se graficó la relación entre la concentración de ADN con respecto a la tasa de amplificación (Anexo 1) (Morin et al., 2001).

Finalmente, se calculó la tasa de error la cual indica qué tan grande es la desviación que existe entre los datos obtenidos de las repeticiones realizadas en este estudio con respecto a las repeticiones recomendadas por la literatura (Taberlet et al., 1996). Para obtener la tasa de error se utilizó el valor de error relativo y se utilizó la fórmula $Ea = |V_{real} - V_{ref}|$

(Arriagada y Peralta, 2008), donde V_{real} se refiere al número de repeticiones con resultados positivos para cada marcador y V_{ref} se refiere al número de repeticiones que sugieren Taberlet et al. (1996), que es 4 repeticiones. Con estos valores, se obtuvo el error absoluto utilizando la fórmula $E = \frac{Ea}{V_{real}}$, el cual corresponde a la diferencia que existe entre el valor obtenido en este estudio y el valor recomendado por Taberlet et al., (1997).

Adicionalmente, se determinó un factor de replicabilidad de genotipo únicamente con las muestras de los individuos de los cuales se tenían muestras por triplicado y duplicado. Este factor tiene como objetivo ser un indicador del porcentaje de correspondencia de genotipos a muestras recolectadas en campo de las cuales se desconoce el individuo y fue calculado de la misma manera que se explica previamente.

Para el caso de los alelos, en base a la simulación computacional realizada por Taberlet et al., (1996), una banda debe ser observada al menos el 50% del total de repeticiones para ser considerada alelo y asumiendo que en cada repetición las moléculas de ADN molde se distribuyen al azar en cada una de las reacciones. Para aplicar la idea establecida por Taberlet et al., se calculó la prevalencia alélica, dividiendo el número de veces que se observó un alelo determinado sobre el total de alelos observados. La frecuencia de visualización de alelos se calculó dividiendo el número de veces que se observó un alelo en el total de repeticiones, para el número de veces que se esperaba ver dicho alelo en todas las repeticiones, asumiendo una presencia del 100% de las veces, obteniendo así un valor que indica que tan frecuente y consistentemente se observa el alelo. Se calculó un índice de ocurrencia de los alelos donde se dividió la frecuencia de visualización de un alelo para la frecuencia de ese alelo en el reservorio genético de la población. Esto indica el número de veces que se observó dicho alelo, el cual es un indicador para determinar si la banda observada puede o no ser considerada un alelo (Stephenson, 2010).

7. Resultados

7.1 Eficiencia de Amplificación

Como se puede observar en la Tabla 1, se obtuvo una eficiencia de amplificación del 100% en dos (CJ7 y CJ11) de los cinco pares de primers probados, lo cual significa que cada vez que se amplificó la región de interés con estos primers siempre se obtuvo un resultado positivo, es decir, se logró observar bandas en los tamaños esperados en los geles de

poliacrilamida. Para el caso del par de primers CJ1 se tuvo un porcentaje de eficiencia de amplificación del 94% y para los marcadores CJ14 y CJ15 se tuvo una eficiencia de amplificación menor al 80%, lo cual significa que no siempre se van a obtener amplificaciones positivas.

7.2 Replicabilidad del genotipo

Se observa en la Tabla 1 que para los loci CJ11 y CJ14 el porcentaje de replicabilidad fue de más del 80%, lo cual indica que en la mayoría de veces estos primers amplificaron los mismos patrones de bandas, por lo cual el genotipo que se obtuvo fue constante. Para el caso de los marcadores CJ1, CJ7 y CJ15 se tuvo un porcentaje de replicabilidad igual o menor a 80% lo cual indica que no siempre amplificaron el mismo patrón de bandas. Sin embargo, es importante considerar el número de repeticiones que se requiere realizar con cada marcador para obtener la información necesaria para establecer el genotipo de los individuos y es el valor de radio el cual nos indica con cuanta información aporta cada marcador en cada repetición. Como se observa en la Tabla 1 el marcador CJ11 tiene un valor de radio de 25 y eso significa que con cuatro repeticiones se puede establecer un genotipo sin problema. Por otro lado, el marcador CJ15 tiene un radio de 7.52 lo cual indica que en cada repetición solo aporta con un 7.52% de información y por eso requiere de más repeticiones. Así, a medida que el valor del radio va bajando se requieren de más repeticiones ya que los marcadores son poco informativos en pocas repeticiones.

7.3 Incidencia de genotipos indefinidos

Se observa en la Tabla 1 que para el marcador CJ1 el porcentaje de incidencia de genotipos indefinidos fue de 18%, mientras que para los marcadores CJ15 Y CJ7 se vio un porcentaje entre 3 y 5% de genotipos indefinidos. En tanto que para los marcadores CJ11 y CJ14 siempre se obtuvo una amplificación y un genotipo definido.

7.4 Relación de la concentración de ADN con la tasa de amplificación

Para el estudio realizado en *C. pygmaea* se obtuvieron concentraciones de ADN entre 10 – 555ng/uL (Anexo 2). Como se observa en la Figura 2 hay un porcentaje de amplificación que va desde el 20 al 50% en muestras de ADN con una concentración menor a 200 ng/uL. Esto sugiere que mientras mayor es la concentración de ADN, la tasa de amplificación es también mayor.

7.5 Tasa de Error

Se observa en la Tabla 1 que el porcentaje de error del marcador CJ15 se encuentra sobre el 60% con 12 repeticiones siendo el más alto de los cinco. Para el marcador CJ7 el porcentaje de error está sobre el 50% con 9 repeticiones. El marcador CJ1 tiene un porcentaje de error por debajo del 50% con 7 repeticiones y CJ11 y CJ14 no presentan error debido a que el número de repeticiones realizadas con estos marcadores es el mismo que recomienda la literatura que es 4 repeticiones. La tasa de error promedio para los 5 marcadores fue de 33,52%.

7.6 Análisis de muestras repetidas

En la Tabla 2 se observa los valores de replicabilidad de genotipo, para los 5 loci estudiados, en los individuos de los cuales se tenía muestras repetidas por triplicado o duplicado. El rango va desde 74.24% para el marcador CJ15 hasta 98.14% para el marcador CJ11, con promedio del 85% para los cinco marcadores.

7.7 Análisis de Alelos

Se puede observar en la Tabla 3 la frecuencia de observación de cada uno de los alelos que se encontraron en este estudio para cada par de primers. Con base a lo establecido en la sección 6.8 cada banda observada en los geles debe ser observada al menos el 50% de las veces para ser considerada una banda.

Los datos de la tabla 2 se compararon con el valor de referencia que representa el 50% del total de las repeticiones. Tomando en cuenta el total de repeticiones realizadas para cada marcador se calcularon las frecuencias de observación y se obtuvo que para el marcador CJ1, para el cual se obtuvieron tres alelos, sus frecuencias de observación fueron de 81.7%, 60.6% y 69%. Para el marcador CJ7 se obtuvieron dos alelos cuyas frecuencias de observación fueron de 76% y 18%. Para el marcador CJ11 también se obtuvieron dos alelos para los cuales su frecuencia de observación fue 96% y 60%. Para el marcador CJ14 se obtuvieron tres alelos y sus frecuencias de observación fueron 78.6%, 58% y 85.3%. Por último, para el marcador CJ15 igualmente se obtuvieron tres alelos y sus frecuencias de observación fueron 75%, 66.4% y 81.7%. Comparando los valores que se obtuvieron se observa que todos los alelos reportados en los 5 marcadores moleculares utilizados cumplen con la frecuencia mínima de observación con excepción de uno de los alelos del marcador CJ7 no cumple con la frecuencia mínima de observación.

8. Discusión

El uso de marcadores moleculares microsátélites ha demostrado tener un gran potencial en diversas aplicaciones dentro de la genética evolutiva y la conservación. Sin embargo, la calidad de los datos que se obtienen está en relación directa con la cantidad y calidad del ADN y de los primers disponibles. La calidad del ADN primeramente depende de la muestra de donde se lo obtiene y los primers varían en eficiencia dependiendo si son homólogos o heterólogos para la especie en estudio (Angers y Bernatchez, 1996). Los casos más críticos se presentan cuando se trata de estudiar organismos silvestres donde las técnicas no invasivas de muestreo junto con el uso de primers heterólogos, no siempre garantizan elevada calidad de la información generada (Taberlet et al., 1996).

El uso de muestras obtenidas por técnicas no invasivas, pelo, heces, saliva y otras secreciones, es sin duda la mejor opción al momento de realizar estudios en animales silvestres ya que se busca alterar lo menos posible al animal y su ecosistema. Sin embargo, el muestreo no invasivo tiene ciertos problemas que radican en la baja cantidad o calidad del ADN que se obtiene de la muestra colectada, lo cual puede estar relacionado con degradación del ADN por exposición a enzimas degradativas dentro del intestino del animal, contaminación con microorganismos o factores ambientales (Taberlet y Luikart, 1999). Otro problema es la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra obtenida. Los inhibidores se caracterizan por sus interacciones directas con el ADN; la unión de los inhibidores con una cadena simple o cadena doble de ADN puede fácilmente prevenir la amplificación y de la misma manera bloquear la actividad enzimática de la polimerasa. Los inhibidores que se pueden encontrar en muestras obtenidas de heces son las sales biliares y los polisacáridos complejos provenientes del metabolismo del animal (Bessetti, 2007). Las características de la muestra, previamente mencionadas, más el uso de marcadores heterólogos requieren el establecimiento de parámetros de eficiencia y rangos de error aceptables para llevar a cabo los estudios de diversidad genética de especies *silvestres*, de tal modo que los resultados que se obtienen sean confiables, correctos y reproducibles (Taberlet et al., 1996).

En este estudio de validación del protocolo de análisis de la diversidad genética de *C. pygmaea* se midió la eficiencia de amplificación, la replicabilidad del genotipo y el número de genotipos indefinidos, usando varias repeticiones así como muestras repetidas de varios individuos. Los resultados obtenidos permitieron identificar índices de error en la eficiencia de amplificación y un número de referencia para el número repeticiones necesarias para cada primer con el que se trabajó en este estudio (7 repeticiones CJ1, 9 repeticiones CJ7, 4

repeticiones CJ11 y CJ14 y 12 repeticiones CJ15) para validar los datos observados a nivel de alelo y genotipo, con lo cual se espera poder definir índices de corrección para futuros estudios con esta especie. Se encontró que la eficiencia de amplificación de los primers para este estudio están en el rango de 65% a 100% (Tabla 1). En un estudio similar realizado en chimpancés salvajes se estableció que un ensayo de PCR es exitoso cuando la eficiencia de amplificación va de 65% hasta 97% (Morin et al., 2001), con lo cual los 5 primers utilizados en este estudio serían útiles para estudios de diversidad genética en *C. pygmaea* en términos de eficiencia de amplificación. El valor del radio obtenido para cada marcador (Tabla 1) indica qué tan buena es la Eficiencia de Amplificación en relación al número de repeticiones. Para el marcador CJ11 con un radio de 25 se observa que la eficiencia es muy buena ya que con el menor número de repeticiones (4) se logra un 100% de amplificación, no así para CJ15 que con un radio de 7.52 demuestra que logra un porcentaje de eficiencia del 90% pero después de realizarse 12 repeticiones. Para CJ7 por su parte se observa una amplificación del 100% pero el radio es significativamente menor a 25 lo cual se ve reflejado en el número de repeticiones que se necesita realizar con este marcador (9) para obtener el 100% de eficiencia.

La eficiencia de amplificación debe estar relacionada con la replicabilidad del genotipo obtenido. La Tabla 1 muestra que el rango de replicabilidad de genotipo obtenida para este estudio va desde 75% a 96%. Como se puede observar en la Tabla 1, los marcadores CJ11 y CJ14 fueron los que menos repeticiones (4) necesitaron para lograr genotipos definidos para todos los individuos estudiados. Sin embargo, para los marcadores CJ7 y CJ1 se necesitaron de siete a nueve repeticiones y por último para el marcador CJ15 se realizaron más de diez repeticiones y aun así para algunas muestras no se logró determinar el genotipo. Para el caso de CJ7, si bien los valores que se observan en la Tabla 1 muestran que es muy eficiente en la amplificación, alcanza un 80% de replicabilidad del genotipo. Algo similar ocurre con el marcador CJ1 al alcanzar apenas un 75.98% de replicabilidad del genotipo, a pesar de tener un porcentaje de amplificación de 95.92%. Para CJ15 la replicabilidad del genotipo alcanza un 77% en las doce repeticiones realizadas lo cual es notablemente poco eficiente ya que requiere de muchas más repeticiones en comparación a los demás marcadores. Los análisis moleculares con los marcadores que requieren de un alto número de repeticiones para dar valores de eficiencia y replicabilidad altos no resultan eficientes ya que se gasta tiempo y recursos en un solo marcador. Lo ideal es tener un marcador que tenga altos niveles de eficiencia y replicabilidad en pocas repeticiones (Angers y Bernatchez, 1996).

La estrategia utilizada en este estudio que consistió en realizar varias repeticiones para establecer diferentes criterios de validez de los datos generados, es una técnica confiable que permite monitorear las tres potenciales fuentes de error: el muestreo estocástico, los falsos alelos y la contaminación esporádica (Taberlet et al., 1996). Al llevar a cabo este método de varias repeticiones es importante establecer el número de ensayos que se van a realizar. El número de repeticiones adecuado que se debe realizar para obtener los mejores resultados depende de la concentración de ADN inicial, extraído de las muestras de heces, ya que no se diluyen las muestras a una concentración específica sino que se trabaja con las concentraciones obtenidas después de la extracción y una baja cantidad de ADN puede no ser suficiente para obtener una amplificación positiva. El éxito de una reacción de PCR depende de la concentración inicial del ADN y se ha reportado que un número substancial de PCR resultan positivos cuando se usa una baja concentración de template de ADN (Morin et al., 2001). Se consideran bajas concentraciones de ADN cuando se tiene unidades en picogramos por microlitro y es ahí donde se recomienda realizar el análisis pertinente para determinar el número de repeticiones necesarias (Taberlet et al., 1996). Sin embargo, una concentración de ADN inicial en nanogramos sobre microlitro (Tabla 1) se considera que es aceptable y se recomienda realizar cuatro repeticiones por cada loci, y repeticiones extra en el caso de sospechar heterocigocidad (Morin et al., 2001, Taberlet et al., 1996, Gagneux et al., 1997).

En este estudio se ha identificado el error de tipo 1 (Gagneux et al., 1997), el cual corresponde a error en el genotipaje de las muestras e indica que hay que realizar más repeticiones de las establecidas hasta llegar a completar el genotipo de los individuos. Morin et al. (2001) reportan un error tipo 1 del 49% en sus estudios realizados con ADN obtenido a partir de heces en *Pan troglodytes verus*. Para el caso de *C. pygmaea*, la tasa de error relativa que se obtiene para el número de repeticiones realizadas es de 33.52%, dato que es menor al reportado en estudios previos.

Por otro lado, la tasa de genotipos indefinidos para este estudio se encuentra en un rango de 0% a 17.24%. Teniendo como referencia los datos reportados por Morin et al. (2001) en sus estudios realizados con heces de chimpancés salvajes los cuales van desde 12% a 35%, podemos decir que los datos obtenidos en este estudio son menores en comparación a la investigación citada en chimpancés salvajes. El número de genotipos indefinidos está relacionado con las posibles fuentes de error que pueden influir en las reacciones de PCR. Una de las posibles fuentes de error que se ha reportado en estudios previos y que puede

llegar a ser muy influyente es la concentración de ADN con la que se trabaja. Esto se evidencia en un estudio similar realizado para chimpancés salvajes, donde se ha observado que un PCR exitoso depende de la concentración inicial de ADN. Y se observa que se obtienen PCRs positivos a partir de una concentración inicial de ADN baja (0,2 ng/uL) (Morin et al., 2001). En este estudio, se observa que con concentraciones bajas (entre 0 -200 ng/uL) la mayoría de muestras se encuentra en un rango de amplificación del 20% al 50% (Figura 2). Para estos estudios realizados con muestras no invasivas, la concentración de ADN es influyente en una reacción de PCR ya que una baja concentración puede no contener el material genético de interés y por otro lado una alta concentración puede provocar una inhibición de la reacción (Morin et al., 2001). Esta variable complica enormemente que se lleve a cabo la reacción de PCR e influye en los valores de eficiencia y replicabilidad de la técnica. Otra posible fuente de error es la presencia de inhibidores de la PCR. La mejor forma de solucionar esto es utilizando reactivos que ayuden a disminuir la acción de los inhibidores. En este estudio se utilizó BSA cuya función es unirse a los inhibidores de la Taq polimerasa en la PCR evitando su acción (Morin et al., 2001).

Tomando en cuenta solo los individuos de los cuales se contaba con muestras repetidas se determinó que el promedio de replicabilidad del genotipo, para los cinco loci analizados, era de 85%. Esto podría indicar que las muestras con 85% de coincidencia en los genotipos observados, corresponderían al mismo individuo. Estos valores obtenidos podrían ser usados para mejorar los criterios de asignación de muestras a un genotipo con más exactitud, ayudando así a realizar un mejor análisis de los resultados obtenidos de los estudios de diversidad genética en *C. pygmaea*.

Una vez definida la eficiencia de amplificación de los marcadores moleculares es importante definir si las amplificaciones observadas pueden ser consideradas alelos o no. Esto es importante para poder identificar individuos homocigotos o heterocigotos. Primero, un genotipo homocigoto no puede ser aceptado como tal hasta que se confirme en al menos cuatro amplificaciones diferentes la presencia del alelo y segundo, ninguna banda es aceptada como alelo hasta que se la haya detectado al menos dos veces en varias repeticiones (Creel et al., 2003).

Para el caso de genotipos heterocigotos, la regla apunta a la deserción alélica, si se observa un alelo en una repetición y se deja de observarlo en las siguientes entonces debe ser contado como homocigoto ya que es muy poco probable que un alelo no aparezca en

siete repeticiones después de haber aparecido una vez. Por otro lado, para confirmar los individuos heterocigotos es necesario observar al menos el 50% de las veces cada alelo para definirlo como tal (Creel et al., 2003). En este estudio, se observa en la Tabla 2, el número de alelos encontrados en cada marcador y la frecuencia en la cual fue observado dicho alelo en el total de repeticiones realizadas para cada marcador. Se observa que, con excepción de un alelo en CJ7, todos los demás pueden ser considerados alelos de la población al cumplir con la frecuencia mínima de observación y se descarta la idea de que estas amplificaciones sean artefactos generados por patinajes de la polimerasa o algún tipo de contaminación (Taberlet et al., 1996). Para el alelo B de CJ7 que no cumple con el 50% de observación mínima que se requiere para ser considerado alelo se puede pensar que una de las posibles explicaciones para la presencia de esta banda es que es una sombra de la banda principal. Esta sombra se pudo generar tras la amplificación de la región microsatélite y puede ser el resultado de un patinaje de la polimerasa durante el proceso de amplificación. El patinaje de la polimerasa puede ocurrir en cualquiera de los ciclos de la PCR por lo tanto la intensidad de la banda dependerá del ciclo en el cual ocurrió el patinaje y es también una guía para determinar si es una sombra o un alelo (Taberlet et al., 1996).

El presente estudio permitió definir niveles de eficiencia y confiabilidad de datos generados por 5 pares de primers microsatélites heterólogos en estudios de diversidad genética de leoncillos usando heces como fuente de ADN. Estos resultados servirán para diseñar futuras investigaciones en esta especie que permitan caracterizar la diversidad genética de esta especie de forma más eficiente.

9. Conclusiones

- La eficiencia de amplificación de los 5 marcadores moleculares se encuentra en un rango de 65.71% a 100%.
- La replicabilidad del genotipo obtenido para los 5 marcadores moleculares va desde 75.98% a 96.19%.
- El número de genotipos indefinidos para los 5 marcadores moleculares se encuentra en un rango de 0% (CJ11 y CJ14) a 17.24% (CJ1).
- Se ha establecido un error tipo 1 que corresponde a errores en el genotipaje de las muestras e indica que se deben realizar más repeticiones de las que normalmente recomienda la literatura.
- La tasa de error en el número de repeticiones realizadas este estudio para los 5 marcadores fue del 33.52%.
- Se obtuvieron amplificaciones positivas con 7 repeticiones para CJ1, 9 para CJ7, 4 para CJ11 y CJ14 y con más de 10 para CJ15.
- El método utilizado en el estudio ayuda a monitorear las posibles de fuentes de error como un genotipaje incorrecto y los falsos alelos.
- Es importante siempre definir a priori el número de ensayos que deben realizarse para obtener un genotipo confiable.
- Descartar aquellos marcadores que requieren de muchas repeticiones como CJ15 ya que la técnica pierde eficacia.
- El promedio de replicabilidad de genotipo obtenido para las muestras repetidas (85%) puede ser usado como un factor de asignación de genotipos lo cual ayudará el análisis de los resultados de diversidad genética.

10. Recomendaciones

- Cuando se use el set de 5 primers evaluados en este estudio se recomienda realizar 4 repeticiones con el primer CJ11 y CJ14, 7 repeticiones con el primer CJ1, 9 repeticiones con el primer CJ7.
- No es recomendable utilizar el primer CJ15 ya que no se obtienen buenos resultados.
- Se recomienda realizar análisis como los presentados en este trabajo siempre que se vaya a usar primers heterólogos con muestras no invasivas para valorar la reproducibilidad y eficiencia de amplificación y determinar las repeticiones necesarias para minimizar errores.

- Se recomienda realizar un estudio similar pero comparando muestras de sangre con muestras de heces para evaluar la eficiencia del método utilizado en este estudio.
- Se recomienda obtener más muestras por triplicado o duplicado para poder hacer relaciones estadísticas más robustas.

11. Bibliografía

- Acosta López, C. (2014). *Estudio de diversidad genética en Callithrix pygmaea mediante el uso de marcadores moleculares microsatelites (SSR)*. Quito: USFQ.
- Angers, B., & Bernatchez, L. (1996). Usefulness of heterologous microsatellites obtained from brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill, in other *Salvelinus* species. Montreal, Canadá: Molecular Ecology.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P., & Mergeai, G. (2006). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. Obtenido de Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=1128>
- Bessetti, J. (Marzo de 2007). An introduction to PCR Inhibitors. Estados Unidos. Obtenido de PCR Inhibition.
- Brohede, J., & Ellegren, H. (1999). Microsatellites evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *The Royal Society*, 825-833.
- Chaves, S. L., Dias, I., & Pomilla, C. (2010). *Extraction of Genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAamp DNA Stool Mini Kit*.
- Creel, S., Spong, G., Sands, J., Rotella, J., Zeigle, J., Lawrence, J., Murphys, K., Smiths, D. (2003). Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellites genotypes. *Molecular Ecology*, 2003-2009.
- de la Torre, S., & Yépez, P. (2003). Environmental Education: A Teaching Tool for the Conservation of Pygmy Marmosets (*Cebuella pygmaea*) in the Ecuadorian Amazon. *Neotropical Primates*, 73-75.
- de la Torre, S., Yépez, P., & Snowdon, C. (2009). *Conservation Status of Pygmy Marmosets Cebuella pygmaea in Ecuador*. The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico radiation.
- de la Torre, S., Yépez, P., Snowdon, C., & Payaguaje, A. (2005). Ecología, comportamiento y conservación del Leoncillo *Callithrix (cebuella) pygmaea en tierras Secoya*.
- FAO. (2014). *Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2015* . Roma.
- Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press.
- Gagneux, P., Boesch, C., & Woodruff, D. (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. San Diego, California, Estados Unidos: Molecular Ecology.

- Ghatak, S., Muthukumaran, R., & Kumar, S. (2013). A simple method of genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 224-231.
- Hughes, R., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 609-623.
- IUCN. (2015). *Cebuella pygmaea, Pygmy Marmoset*. Londres: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., & Pandey, B. (2009). Potential in Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 141-162.
- Lacy, R. (1997). Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 320-335.
- Morin, P., Chambers, K., Boesch, C., & Vigilant, L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). Leipzig, Alemania: Molecular Ecology.
- Navidi, W., Arnheim, N., & Waterman, S. (1992). A Multiple-Tubes Approach for Accurate Genotyping of Very Small DNA Samples by Using PCR: Statistical Considerations. *The American Society of Human Genetics*, 347-359.
- Nieto, D. (2009). *Evaluación preeliminar de la diversidad genética del leoncillo Callithrix pygmaea (Primatea: Cebidae: Callithrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeat)*. Quito: USFQ.
- Nieto, D., de la Torre, S., Troya, A., Arahana, V., & Torres, M. d. (2010). Evaluación preeliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primatea: Cebidae: Callithrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeat). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 1-5.
- Nievergelt, C., Mundy, N., & Woodruff, D. (21 de Abril de 1998). Microsatellite primers for genotyping common marmosets (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids. San Diego, California: Department of Biology and Center of Molecular Genetics, University of California.
- Pagano, R. (2011). *Estadística para las ciencias del comportamiento*. Mexico D.F: Cengage Learning.
- Reddy, U., Pepper, A., Abdurakhmonov, I., Saha, S., Jenkins, J., Brooks, T., Bolek, Y., El-Zik, K. (2001). New Dinucleotide and Trinucleotide Microsatellite Marker Resources for Cotton Genome Research. *The Journal of Cotton Science*, 103-113.
- Stephenson, F. (2010). *Cálculo en biología molecular y biotecnología*. Barcelona: Elsevier.

- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L., Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Oxford University Press*, 3189-3194.
- Taberlet, P., & Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41-55.
- Taberlet, P., Waits, L., & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *TREE*, 323-327.
- Terán Egüez, C. (2013). *Estudio de Diversidad Genética de Callithrix pygmaea en la Amazonía Ecuatoriana mediante el uso de Microsatélites (SSR: Short Sequence Repeats)*. Quito: USFQ.
- Tirira, D. (2011). *Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador*. Quito: Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente.
- Townsend, W. (2001). *Callithrix pygmaea*. *American Society of Mammalogists*, 1-6.
- UICN. (2000). *Categoría y Criterios de la Lista Roja de la UICN*. Gland, Suiza.
- Varea, A., Suárez, L., Chávez, G., Cordero, M., Alvarez, N., Espinoza, F., Paz y Miño, C., Carrión, P., Vogel, J., Bravo, E., Vásquez, L., Chiriboga, J., Pocaterra, F., Beltrán, R., López, F., Romero, F. (1997). *Biodiversidad, Bioprospección y Bioseguridad*. Quito: ABYA-YALA.
- Yépez, P., de la Torre, S., y Snowdon, C. (2005). *Interpopulation Differences in Exudate Feeding of Pygmy Marmosets in Ecuadorian Amazonia*. *American Journal of Primatology*, 145-158.

12. Tablas

Tabla 1. Eficiencia de amplificación y genotipificación.

Primer	No repeticiones	Eficiencia de Amplificación (%)	Radio	Replicabilidad de Genotipo (%)	Incidencia de genotipos indefinidos (%)	Error (%)
CJ1	7	95.92	13.70	75.98	17.24	42,85
CJ7	9	100	11.11	80.95	2.9	55,5
CJ11	4	100	25	96.19	0	0
CJ14	4	65.71	16.43	87.30	0	0
CJ15	12	90.24	7.52	77.54	5.26	69,23
						Promedio 33,52

Tabla 2. Análisis realizado para muestras repetidas por triplicado y duplicado

Marcadores	Replicabilidad de genotipo (%)
CJ1	78.70
CJ7	85.18
CJ11	98.14
CJ14	88.88
CJ15	74.24
Promedio	85.03

Tabla 3. Alelos por locus y Frecuencias de Observación de Alelos.

Primer	Alelo	Tamaño alelos	Promedio Frecuencias de Observación	Desviación Estándar
CJ1	A	135 pb	0.817	0.193
	B	138 pb	0.606	0.2816
	C	130 pb	0.69	0.2816
CJ7	A	127 pb	0.76	0.72
	B	125 pb	0.18	0.228
CJ11	A	121 pb	0.96	0.082
	B	128 pb	0.6	0.224
CJ14	A	210 pb	0.7867	0.293
	B	192 pb	0.58	0.238
	C	175 pb	0.853	0.208
CJ15	A	148 pb	0.75	0.214
	B	130 pb	0.664	0.260
	C	125 pb	0.817	0.229

13. Figuras

Figura No. 1 Ubicación del centro de Rescate Yanacocha donde se realizó la colección de muestras de heces de leoncillos.

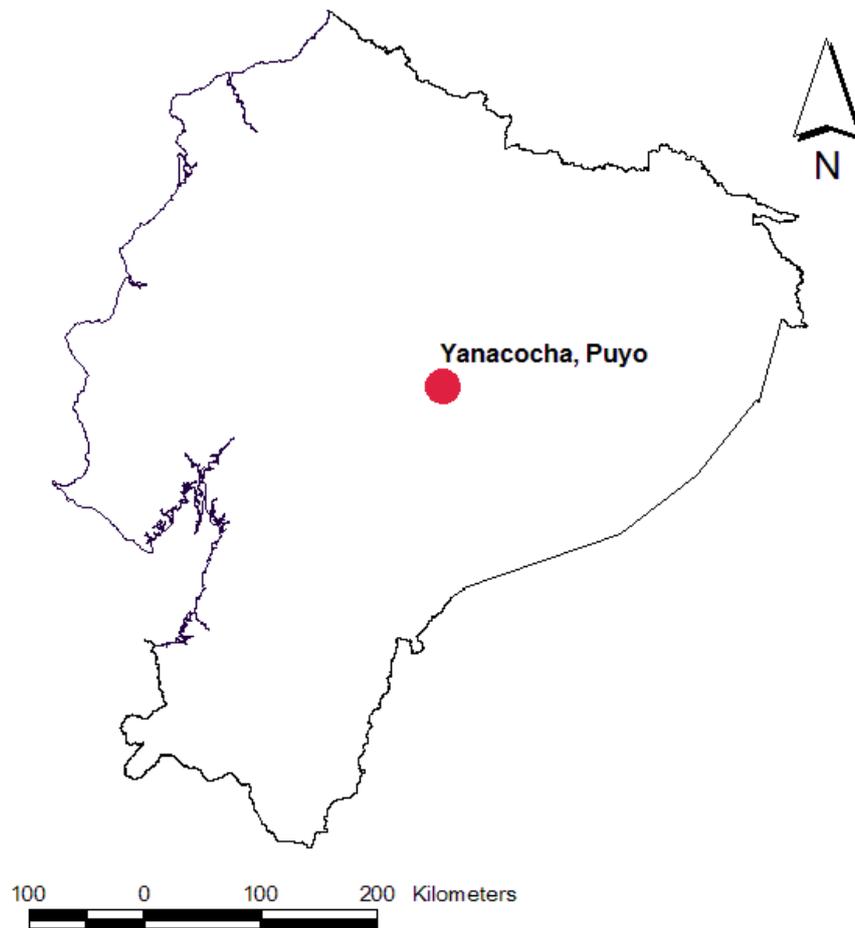
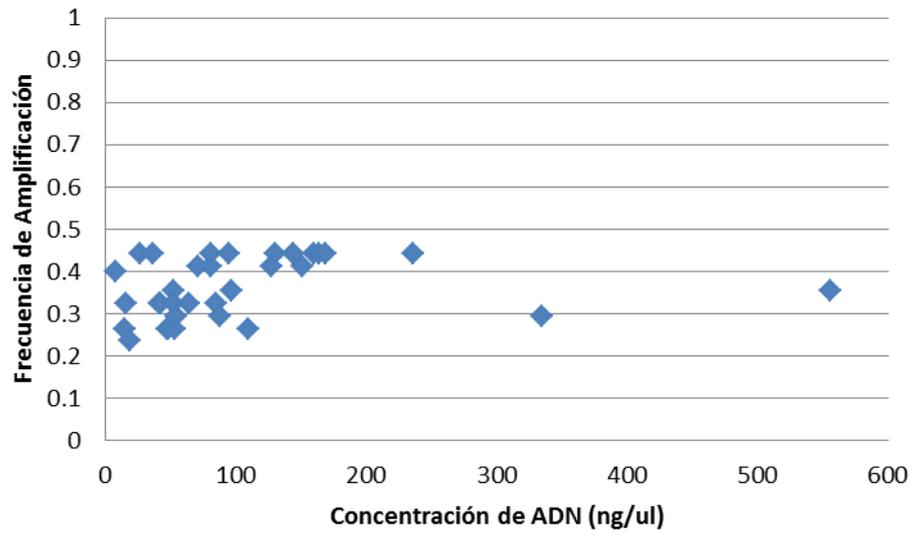


Figura No. 2 Porcentaje de Amplificación de las muestras de *Cebuella pygmaea* en relación a la concentración de ADN.



14. Anexos

Anexo 1. Concentración de ADN y Porcentajes de Amplificación para cada individuo

Muestra	Concentración ADN (ng/uL)	% de Amplificación
Macho Joven	8.1	0.4
Hembra Subadulta	14.7	0.26
JP Coco 1.1	15.8	0.32
Ximena 1.1	18.9	0.24
Juvenil 2	26.4	0.44
Orejón	36.3	0.44
Merki	41.6	0.32
Macho Adu. Conf.	43	0.32
Hembra Adulta 1.1	47.9	0.26
Hembra Adulta 1.2	48.2	0.26
Juvenil Colita	52.2	0.35
Adulta 1.1	52.3	0.32
Adulto 1.3	53.7	0.26
Juvenil Curioso	54	0.29
Ximena 1.2	64.6	0.32
Nineta 1.1	71.3	0.41
Adulto Joven	80.8	0.44
Conguita 1.1	81.5	0.41
Juvenil N/I	82.4	0.24
Adulto 1.1	85.3	0.32
JP Coco 1.2	88.3	0.29
Juvenil 1	94.9	0.44
Adulta 1.3	96.6	0.35
Nineta 1.3	109.2	0.26
Adulto 1.2	127.5	0.41
Macho Adu. Jov.	130.7	0.44
Conguita 1.2	144	0.44
AJM	150.8	0.41
Ximena 1.3	159.9	0.44
Macho Adulto	163.9	0.44
Adulta 1.2	168.8	0.44
CV1	235.8	0.44
Clínica	334.3	0.29
Nineta 1.2	555.9	0.35
Juvenil 3	<10.5	0.17

Anexo 2. Muestras de heces de leoncillos colectadas en Yanacocha y concentración de ADN extraído de las muestras.

Muestra	Cantidad ADN (ng/ul)
Ximena 1.1	18,9
Ximena 1.2	64,6
Ximena 1.3	159,9
Nineta 1.1	71,3
Nineta 1.2	555,9
Nineta 1.3	109,2
Adulto 1.1	85,3
Adulto 1.2	127,5
Adulto 1.3	53,7
Adulta 1.1	52,3
Adulta 1.2	168,8
Adulta 1.3	96,6
Conguita 1.1	81,5
Conguita 1.2	144
JP Coco 1.1	15,8
JP Coco 1.2	88,3
Orejón	36,3
AJM	150,8
Merki	41,6
CV1	235,8
Clínica	334,3

Juvenil 1	94,9
Juvenil 2	26,4
Juvenil 3	-10,5
Macho Adu. Conf.	43
Adulto Joven	80,8
Macho Joven	8,1
Hembra Subadulta	14,7
Macho Adulto	163,9
Hembra Adulta 1.1	47,9
Hembra Adulta 1.2	48,2
Juvenil Colita	52,2
Juvenil Curioso	54
Macho Adu. Jov.	130,7
Juvenil N/I	82,4

(NanoDrop, 2000)

Anexo 3. Concentración y volúmenes para la reacción de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen
H ₂ O		16,2 uL
Buffer 10X para PCR Invitrogen TM	1X	2,5 uL
Cloruro de Magnesio 50mMInvitrogenTM	1,5 mM	1,5 uL
BSA	1 ng/uL	1 UI
Primer Forward	0,24 uM	0,6 uL
Primer Reverse	0,24 uM	0,6 uL
dNTPMix 10µMInvitrogenTM	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 4. Ciclaje del PCR para la amplificación de regiones microsatélites.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Denaturación Inicial	92°C	5 min	1
Denaturación	95°C	1 min	40
Annealing	Varía según el primer	1 min	40
Extensión	72°C	1 min	40
Extensión final	72°C	5 min	1