

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Diversidad genética del oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*)**

**en el Distrito Metropolitano de Quito mediante análisis de la**

**región D-loop del ADN mitocondrial y marcadores SSR**

**Proyecto de Investigación**

**Darío Fernando Cueva Granda**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de

Ingeniería en procesos Biotecnológicos

Quito, 3 de diciembre del 2018

**Universidad San Francisco de Quito USFQ  
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Diversidad genética del oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) en Distrito  
Metropolitano de Quito mediante análisis de la región D-loop del ADN  
mitocondrial y marcadores SSR**

**Darío Fernando Cueva Granda**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph. D.

Firma del profesor

\_\_\_\_\_

Nombre del profesor, Título académico

Bernardo Gutiérrez, M. Sc.

Firma del profesor

\_\_\_\_\_

Quito, 3 de diciembre del 2018

## 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.

Asimismo, 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: Darío Fernando Cueva Granda

C. I.: 2100691944

Lugar y fecha: Quito, 03 de diciembre del 2018

## **DEDICATORIA**

A mis abuelos, cuyo legado permanece presente en la familia hoy y siempre.

A mis padres, Marco y Gladys, quienes me enseñaron que no existen personas perfectas, pero que existe un millón de maneras de ser buenas personas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad San Francisco de Quito por todas las oportunidades que me ha dado a lo largo de mi vida académica.

A quienes conforman el Laboratorio de Biotecnología Vegetal por todo el apoyo brindado a lo largo de esta investigación.

A Santiago Molina y a los técnicos de campo por todo el trabajo realizado durante la colección de muestras.

A Gabriela Bruque por su apoyo durante las etapas iniciales del proyecto.

A mis profesores, quienes han sido de gran ayuda y apoyo durante el proceso de aprendizaje, especialmente a Miguel Ángel Méndez, Jaime Chaves, Margarita Brandt, Antonio León y Antonio Machado por alimentar y motivar mi curiosidad en cuanto a la investigación.

A María de Lourdes Torres, a quien admiro, estimo y aprecio mucho, por brindarme la oportunidad de participar en el presente proyecto de investigación, y por todas sus grandes lecciones y enseñanzas.

A Bernardo Gutiérrez por ser una guía durante todo el proceso, y por enseñarme que hay mil y una maneras de hacer ciencia.

A mis amigos, por todos los momentos, risas, y comidas compartidas. Muchas gracias por todo: Paula Erazo, Daniel Aguilera, Antonia Castells, David Perasso, Daniela Rojas, Karen Asencio, Dominique Montalvo, Sebastián Vinueza, Sebastián Andrade, Gabriela Mateo, Darío Ramírez, Noelia Barriga y Aracely Zambrano.

A mi tía Martina por su inmensa paciencia.

A toda mi familia, por su incondicionalidad en mi vida.

## RESUMEN

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) ha sido clasificado como una especie vulnerable. Es por ello que estudiar su diversidad genética resulta útil para evaluar el estado de la especie, y así elaborar estrategias y planes de conservación. Hasta el momento, existen pocos estudios sobre la genética del oso de anteojos en el Ecuador y un número limitado de marcadores genéticos desarrollados específicamente para *T. ornatus*, que permitan realizar inferencias poblacionales adecuadas. Por estas razones, en el presente estudio se analizó una región hipervariable del ADN mitocondrial y se desarrollaron 11 marcadores microsátélites homólogos para la especie con los cuales se evaluó la diversidad genética de la población de oso andino en el corredor ecológico del Distrito Metropolitano de Quito. Para ello se colectaron 38 muestras de pelo de diferentes individuos mediante métodos no invasivos en 14 localidades dentro del corredor. Se extrajo ADN, se amplificó y secuenció un fragmento de la región D-loop del mtDNA, y se amplificaron los 11 loci microsátélites que fueron genotipados mediante electroforesis capilar. En total, se encontraron 4 haplotipos mitocondriales y se identificaron sólo 2 sitios polimórficos en una región de 456 pb. Los haplotipos encontrados forman parte de un grupo monofilético y poseen niveles muy bajos de diferenciación entre ellos, con una distancia genética de 0.002. La diversidad de haplotipos ( $H$ ) fue de  $0.7055 \pm 0.0369$  y la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) fue de  $0.001772 \pm 0.001559$ . Estos índices de diversidad se encuentran entre los más bajos reportados para poblaciones de osos de cualquier especie. Los resultados de los análisis con marcadores microsátélites muestran una heterocigosidad esperada moderada ( $H_e = 0.521$ ) y una baja heterocigosidad observada ( $H_o = 0.365$ ). Los índices  $F_{st}$  (0.069-0.137) sugieren una diferenciación genética moderada entre osos de las diferentes localidades en el Corredor Ecológico, posiblemente atribuida a barreras físicas dentro de esta zona. La baja diversidad genética mitocondrial, en conjunto con la moderada heterocigosidad esperada y la diferenciación genética en la población dada por fragmentación de su hábitat sugieren la necesidad de establecer y revisar las estrategias de conservación del oso de anteojos en la región.

**Palabras clave:** *Tremarctos ornatus*, diversidad genética, mtDNA, D-loop, diversidad de haplotipos, diversidad de nucleótidos, heterocigosidad, marcadores microsátélite.

## ABSTRACT

The Andean bear (*Tremarctos ornatus*) has been classified as a vulnerable species. Thus, its genetic diversity study is useful to assess species status and to elaborate conservation strategies. To date, there are few studies about Andean bear genetics for Ecuadorean populations and a lack of genetic markers developed specifically for *T. ornatus* that allows making appropriated population inferences. For these reasons, in the present study a hypervariable region of mitochondrial DNA was analyzed, and 11 homologous microsatellite markers were developed and the genetic diversity of an Andean bear population in the ecological corridor of Quito metropolitan district was evaluated. For that, 38 hair samples from different individuals were obtained through non-invasive sampling in 14 localities within the corridor. DNA was extracted, and a hypervariable fragment of D-loop region was amplified and sequenced. 11 SSR loci were amplified and genotyped through capillary electrophoresis. Overall, 4 mitochondrial haplotypes were found, and only 2 polymorphic sites were identified in a 456 pb region. Found haplotypes are part of a monophyletic group and display low degree of differentiation between them with low pairwise genetic differences (0.002). Haplotype diversity ( $H$ ) was  $0.7055 \pm 0.0369$  and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was  $0.001772 \pm 0.001559$ . These diversity indexes are among the lowest reported for any bear population of any species. SSR markers display a moderate expected heterozygosity ( $H_e = 0.521$ ) and a low observed heterozygosity ( $H_o = 0.365$ ).  $F_{st}$  indexes (0.069-0.137) suggest a mild genetic differentiation between bears from different localities within the Ecological Corridor, possibly due to physical barriers in this area. The low mitochondrial diversity with the moderate expected heterozygosity and the genetic differentiation in the population suggest the need of review and establish conservation and management strategies of Andean bear in the region.

**Key words:** *Tremarctos ornatus*, genetic diversity, mtDNA, D-loop, haplotype diversity, nucleotide diversity, heterozygosity, SSR markers.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción</b> .....	<b>13</b>
1.1. Generalidades de la especie .....	13
1.1.1. Clasificación e historia evolutiva .....	13
1.1.2. Distribución, morfología y nicho ecológico .....	13
1.1.3. Decrecimiento poblacional y estado actual de conservación.....	15
1.2. Corredor Ecológico del Oso Andino del Distrito Metropolitano de Quito.	16
1.3. Estudios genéticos en el oso de anteojos.....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>21</b>
2.1. Objetivo general .....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
<b>3. Justificación</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Área de Estudio</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Materiales</b> .....	<b>24</b>
5.1. Extracción de ADN a partir de pelo de oso de anteojos.....	24
5.2. Cuantificación de ADN.....	25
5.3. Amplificación de la región D-loop del ADN mitocondrial de <i>Tremarctos ornatus</i> .....	25
5.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	25
5.5. Electroforesis en gel de acrilamida para purificar fragmentos amplificados	
5.6. Tinción del gel de acrilamida con nitrato de plata.....	27
5.7. Purificación de los fragmentos de PCR extraídos del gel de acrilamida.	27
5.8. Diseño de primers para amplificación de loci microsatélite.....	27
5.9. Amplificación de regiones microsatélite.....	27
5.10. Armado de placas.....	28
5.11. Análisis de datos.....	28
<b>6. Métodos</b> .....	<b>29</b>
6.1. Obtención de muestras e identificación de individuos.....	29
6.2. Extracción de ADN.....	30
6.3. Cuantificación de ADN.....	31
6.4. Amplificación inicial de la región D-loop del ADN mitocondrial de <i>Tremactos ornatus</i> .....	31



6.5.	Electroforesis en gel de acrilamida y revelado del gel .....	32
6.6.	Extracción de bandas del gel de acrilamida, purificación y reamplificación de los fragmentos .....	33
6.7.	Secuenciación de los fragmentos de la región D-loop.....	33
6.8.	Análisis de datos de secuencias mitocondriales.....	34
6.9.	Diseño de primers para amplificación de loci microsatélite.....	36
6.10.	Amplificación de los loci microsatélite.....	37
6.11.	Armado de placas.....	38
6.12.	Análisis de datos de marcadores microsatélite.....	39
<b>7.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>42</b>
7.1.	Identificación de individuos y selección de muestras válidas.....	42
7.2.	Concentración y calidad del ADN.....	42
7.3.	Resultados de la amplificación y secuenciación de la región D-loop	43
7.4.	Diversidad genética mitocondrial y pruebas de neutralidad.....	43
7.5.	Análisis filogenético de las secuencias mitocondriales y red de haplotipos	
7.6.	Amplificación y genotipado de los loci microsatélite.....	45
7.7.	Desequilibrio de ligamiento.....	46
7.8.	Índices de diversidad genética de los marcadores microsatélite.....	46
7.9.	Distancias genéticas y estructura poblacional.....	47
7.10.	Endogamia y parentesco.....	48
7.11.	Equilibrio Hardy-Weinberg.....	49
7.12.	Cuello de botella.....	49
<b>8.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>50</b>
8.1.	Diversidad genética.....	50
8.2.	Análisis filogenético.....	55
8.3.	Cuello de botella.....	56
8.4.	Estructura poblacional.....	57
8.5.	Endogamia y parentesco.....	60
8.6.	Conservación del oso andino en el DMQ.....	61
8.7.	Limitaciones y perspectivas futuras.....	63
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>Recomendaciones</b> .....	<b>66</b>

<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>67</b>
<b>12. Figuras .....</b>	<b>81</b>
<b>13. Tablas.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa del área de estudio y los sitios de colección de muestras.....	81
<b>Figura 2:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de la región D-loop ADN mtDNA de <i>T. ornatus</i> ....	82
<b>Figura 3:</b> Sitios polimórficos encontrados en la región hipervariable 1 del D-loop del ADN mitocondrial de <i>Tremarctos ornatus</i> .....	83
<b>Figura 4:</b> Árbol <i>Maximum Clade Credibility</i> (MCC) representando las relaciones filogenéticas de <i>T. ornatus</i> en relación con la subfamilia Tremarctinae resultado del análisis de la región parcial del D-loop.....	83
<b>Figura 5:</b> Red de haplotipos <i>median joining</i> construida mediante el método de <i>máximum-parsimony</i> usando el software Phylogenetic Network.....	84
<b>Figura 6:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los marcadores SSR.....	85
<b>Figura 7:</b> Electroferograma resultado del genotipado de los distintos marcadores mediante electroforesis capilar.....	86
<b>Figura 8:</b> Dendrograma entre diferentes localidades construido mediante el método <i>Neighbour Joining</i> utilizando los valores de Weir y Cockerham <i>Fst</i> ....	86
<b>Figura 9:</b> Gráfico de 2 ejes derivado de un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando los dos primeros componentes.....	87
<b>Figura 10:</b> Gráfico de coeficientes de asignación de cada individuo obtenidos en el programa <i>Structure</i> para la población de oso andino del DMQ.....	87
<b>Figura 11:</b> Histograma de los coeficientes de endogamia ( <i>F</i> ) obtenido para la población de osos del DMQ con un <i>K</i> óptimo de 2.....	88
<b>Figura 12:</b> Índices de estimador de 11 parentesco <i>W</i> entre pares de individuos de la población de osos.....	88
<b>Figura 13:</b> Mapa de las zonas montañosas según altitud, uso de suelo y cobertura vegetal en el Ecuador.....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Detalle de las muestras utilizadas en el presente estudio.....	90
<b>Tabla 2:</b> Resumen sobre los primers diseñados y utilizados para amplificación de loci microsatélite utilizados en el presente estudio.....	91
<b>Tabla 3:</b> Información de las secuencias de los haplotipos y número de individuos con su haplotipo correspondiente.....	92
<b>Tabla 4.</b> Índices obtenidos para cada uno de los loci microsatélite utilizados en el presente estudio.....	93
<b>Tabla 5.</b> Índices obtenidos para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino en el Distrito Metropolitano de Quito.....	94
<b>Tabla 6.</b> Distancias genéticas <i>Fst</i> de Weir y Cockerham para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito.....	95
<b>Tabla 7.</b> Distancias genéticas de <i>Nei</i> para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito...	95
<b>Tabla 8.</b> Índices del estimador de parentesco <i>W</i> para cada uno de los grupos analizados en el presente estudio.....	95

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades de la especie

#### 1.1.1. Clasificación e historia evolutiva

El oso de anteojos u oso andino (*Tremarctos ornatus*) es la única especie de oso que habita en América del Sur y es la única especie remanente dentro de la subfamilia Tremarctinae en la familia de los úrsidos. Esta subfamilia se originó en el continente americano y se compone de cuatro géneros que pertenecen a un solo grupo monofilético siendo estos: *Arctotherium*, *Arctodus*, *Plionarctos* y *Tremarctos* (García-Rangel, 2012). Reconstrucciones filogenéticas evidencian una rápida radiación entre las especies de osos. No obstante, el clado que dio origen al oso andino se separó tempranamente de otros durante el mioceno temprano hace unos 20 millones de años (Krause et al., 2008). Se estima que el género *Tremarctos* se originó hace aproximadamente 5.5 millones de años durante la transición del Mioceno tardío y el Plioceno temprano en América del Norte, pero la aparición de *T. ornatus* se dio solo hace 130.000 años, convirtiéndose así en una de las especies de oso más recientes. Sin embargo, poco se sabe sobre el origen exacto de *T. ornatus*. Unas hipótesis sugieren que podría haberse especiado en América del Norte y posteriormente haber migrado hacia Sudamérica mientras que sugieren que la especie podría haberse originado en Sudamérica. La falta de un registro fósil adecuado y de evidencia molecular hacen difícil aclarar esta situación (García-Rangel, 2012).

#### 1.1.2. Distribución, morfología y nicho ecológico

*T. ornatus* se distribuye desde Venezuela hasta Bolivia ocupando una extensión de norte a sur de 4600 km y de este a oeste de 200 a 600 km, y un

rango altitudinal que va desde los 200 a 4700 msnm a lo largo de la cordillera de los Andes. El rasgo más característico de la especie, y que es altamente variable de individuo a individuo, es su patrón de manchas color marrón-amarillento alrededor de sus ojos, mejillas y mandíbula. Dichas manchas resultan útiles para identificación de individuos, debido a que sus patrones no sufren cambios a lo largo de su vida. Los osos pesan entre 60 y 175 kilogramos, y la longitud de su cuerpo varía desde 1.12 a 2.22 metros en individuos adultos. Esta variación en peso y tamaño está dada principalmente debido al dimorfismo sexual que existe en la especie, siendo los machos más grandes que las hembras. La disponibilidad de recursos del hábitat en el que se encuentren también influye en el tamaño de cada animal (García-Rangel, 2012).

El oso generalmente suele tener comportamiento solitario, manifiesta actividad tanto diurna como nocturna y es un excelente trepador de árboles en donde se alimenta y genera nidos para dormir o resguardarse (Goldstein, 1991). Posee una dieta omnívora, la cual es bastante diversa y depende del alimento que se encuentre disponible. Por esta razón, la especie suele desplazarse grandes distancias en búsqueda de alimento. La gran mayoría de su alimentación se compone de hojas y de frutos (resultando en la dispersión de semillas, e incluso promoviendo la germinación de éstas al pasar por su tracto digestivo), mientras que la proteína animal que necesitan es obtenida a partir de la caza de mamíferos pequeños o del consumo de invertebrados terrestres tales como escarabajos o gusanos. Sin embargo, también se sabe que es capaz de cazar venados y atacar al ganado vacuno. Adicionalmente, el oso tiene un papel ecológico importante en cuanto a la renovación vegetal en los bosques debido a

que, al trepar árboles, generalmente rompe ramas lo cual crea espacio en el dosel por donde puede ingresar luz y se promueve el crecimiento de nueva vegetación (García-Rangel, 2012; Vela, Vázquez, Galindo, & Pérez, 2011).

### **1.1.3. Decrecimiento poblacional y estado actual de conservación**

Históricamente el oso de anteojos ha tenido un amplio rango de distribución a lo largo de la cordillera de los Andes (Peyton, 1980). No obstante, en la actualidad esta se encuentra limitada a un espacio geográfico menor, mismo que ha sido fuertemente modificado y fragmentado por asentamientos humanos y sus actividades (Kattan et al., 2004). En consecuencia, los osos se han visto impactados por actividades agrícolas, introducción de otras especies animales, explotación de recursos como madera o minerales y tenencia de la tierra (Goldstein, Velez-Liendo, Paisley, & Garshelis, 2008). Esta reducción en el hábitat del oso de anteojos durante las últimas décadas ha generado un decrecimiento en el tamaño de su población. Se estima que Ecuador posee la tasa anual más grande de pérdida de área de distribución del oso andino debido a las razones previamente mencionadas, poniendo así a la especie en estado de peligro en el país (Kattan et al., 2004). Sumado a esto, los osos poseen una tasa reproductiva baja, densidades poblacionales reducidas y un largo periodo de cuidado parental lo cual hace que las poblaciones de oso se vean seriamente amenazadas (García-Rangel, 2012).

A nivel regional, de acuerdo a la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), desde hace más de cuatro décadas el oso de anteojos se encuentra clasificado como una especie vulnerable dentro de la Lista Roja de Especies Amenazadas, y sus tamaños poblacionales muestran una

tendencia decreciente (Goldstein et al., 2008). Se estima que para el año 2030 el estado de la especie pasará de ser vulnerable a seriamente amenazada, acercándola peligrosamente a una posible extinción (Cardillo et al., 2004).

## **1.2. Corredor Ecológico del Oso Andino del Distrito Metropolitano de Quito**

El proyecto del “Corredor Ecológico del Oso Andino del Distrito Metropolitano de Quito” surgió de la necesidad de crear un programa de conservación para el oso andino, especie emblemática para el DMQ, y para otras especies animales y vegetales que habitan en los bosques donde habita el oso. La efectividad del proyecto se basa en la ejecución de diferentes proyectos y actividades enmarcadas dentro de programas de investigación, monitoreo, educación, comunicación, control y vigilancia. La sensibilización, difusión e involucramiento de las comunidades locales ha sido de vital importancia para llevar a cabo dicho propósito y de esta manera ha contribuido al desarrollo sostenible de las mismas. El corredor abarca un área superficial de aproximadamente 65.000 hectáreas en las parroquias rurales de Calacalí, Nanegalito, Nanegal, Nono y San José de Minas, dentro del Distrito Metropolitano de Quito, lo cual corresponde a menos del 1% del área total de la distribución de la especie. Dentro de estos territorios históricamente se han desarrollado diversas actividades humanas que tienen un gran impacto en la extensión del hábitat del oso. Así mismo, las carreteras que se encuentran en estas zonas son altamente transitadas, lo cual reduce la movilidad de la especie de unas localidades a otras (Concejo Metropolitano de Quito, 2013; Secretaría de Ambiente del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2014). Se estima que cada oso necesita al menos 800 hectáreas para



desarrollarse de manera adecuada (Molina, 2012). Por esto, el establecimiento de programas de manejo y de conservación, y la implementación de corredores ecológicos resulta de vital importancia para mejorar la conectividad entre individuos de diferentes localidades. De esta manera, los osos tendrán mayores áreas en la que desplazarse, lo que implica que tendrán una mayor probabilidad de reproducirse con individuos de otras poblaciones contribuyendo de esta manera al mantenimiento de la viabilidad y la permanencia de la especie a nivel local y regional (García-Rangel, 2012).

### **1.3. Estudios genéticos en el oso de anteojos**

Hasta ahora, los estudios genéticos hechos en la población ecuatoriana de oso andino son escasos. Sumado a esto, existe poca información en cuanto al uso de secuencias de ADN mitocondrial (mtDNA) para evaluar la diversidad genética en la especie. El ADN mitocondrial resulta un buen marcador molecular debido a se ha demostrado que posee suficiente variación entre individuos tanto dentro de una misma población, y entre individuos pertenecientes a diferentes poblaciones. Esto se debe a que éste tiene una alta homología y una tasa elevada de divergencia dentro de los vertebrados. Además, el mtDNA se hereda exclusivamente vía materna y no pasa por fenómenos de recombinación. De esta manera, los cambios que ocurren en este son rastreables hacia su origen de manera directa debido a que las nuevas mutaciones que aparezcan serán transmitidas directamente de madre a hijos. Es así como, el ADN mitocondrial como marcador molecular resulta apropiado para evaluar diversidad genética e historia evolutiva de una población, incluyendo procesos de efecto fundador y cuellos de botella. Así mismo, estudiar la distribución del ADN mitocondrial

permite obtener evidencia en cuanto a la existencia de estructura poblacional (Harrison, 1989). Adicionalmente, el ADN mitocondrial tiene un alto número de copias en cada célula, por lo que se facilita el análisis de éste en muestras con poco ADN como en las obtenidas en el caso de muestreo no invasivo o en muestras con material genético degradado provenientes de tejido pobremente conservado (Taberlet, Waits, & Luikart, 1999). Dentro del genoma mitocondrial, la mayor variabilidad se encuentra en la región D-loop, misma que no es codificante. Dentro del D-loop existen dos regiones hipervariables, la región hipervariable 1 (HVRI) y la región hipervariable 2 (HVRII), las cuales se caracterizan por ser sitios en los que se acumulan mutaciones a una tasa elevada (Stoneking, 2000). Consecuentemente, el análisis de estas regiones ha sido muy utilizado para monitorear especies que se encuentran en estado vulnerable o en vías de extinción (Kawabe et al., 2014; Ma et al., 2010; Ponomarev et al., 2004).

Otros marcadores moleculares que son ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética y genética poblacional son los marcadores microsatélite o SSR (del inglés *Simple Sequence Repeats*). Estos consisten en unidades de secuencia corta (denominada como motivo), entre 1 y 9 pares de bases, repetidas en tándem. Se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma de un organismo y son altamente polimórficos. El polimorfismo en este tipo de marcadores genéticos se debe a duplicaciones o deleciones de los motivos repetidos (Oliveira, Pádua, Zucchi, Vencovsky, & Vieira, 2006; Selkoe & Toonen, 2006). Por lo tanto, fragmentos con un diferente número de repeticiones de la secuencia corta se considerarán como diferentes alelos. Esta discriminación de

diferentes alelos se realiza en base a la medición del tamaño de los fragmentos mediante métodos de separación de ácidos nucleicos con un alto poder de resolución, tal es el caso de la electroforesis capilar (Ruiz-Martinez et al., 1993). Otra de las ventajas de estos marcadores es su herencia codominante, lo que implica que se pueden distinguir individuos homocigotos, los cuales poseen el mismo alelo en el mismo locus, y heterocigotos que poseen diferentes alelos en el mismo locus. El análisis de loci SSR depende de la amplificación de éstos mediante reacción de la cadena polimerasa (PCR), lo cual hace estos marcadores sean ampliamente reproducibles debido a la sensibilidad y especificidad de la técnica del PCR (Oliveira et al., 2006). Gracias a esto, también estos marcadores resultan óptimos para analizar muestras obtenidas de manera no invasiva, mismas que usualmente suelen tener poco material genético y cuyo análisis mediante amplificación de regiones específicas se ve facilitado (Taberlet et al., 1999).

Además, los marcadores SSR son muy útiles para discriminar diferentes individuos ya que su alta variabilidad hace que sea poco probable que dos individuos compartan la misma combinación de alelos en múltiples loci (Oliveira et al., 2006). Conjuntamente, estos marcadores resultan eficientes para establecer relaciones de parentesco entre individuos, así como para realizar inferencias sobre estructura poblacional y flujo de genes. Estas y otras ventajas hacen que los marcadores SSR sean ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética y genética de poblaciones (Selkoe & Toonen, 2006).

De esta manera, los pocos estudios hechos hasta ahora en *T. ornatus* con marcadores microsatélites reportan altos niveles de aislamiento entre diferentes

poblaciones de osos de anteojos que se encuentran alejadas por grandes distancias geográficas. Adicionalmente, para las poblaciones ecuatorianas de osos se reporta que existe una baja diversidad genética, lo que las pone en riesgo de encontrarse seriamente amenazadas. No obstante, los marcadores genéticos utilizados en dichos estudios son heterólogos, es decir, que no han sido diseñados específicamente para la especie sino para otras especies y han sido transferidos a *T. ornatus*. Estos marcadores son provenientes del oso negro americano (*Ursus americanus*) y de otras especies pertenecientes al orden Carnívora (Ruiz-García, 2003; Ruiz-García, Orozco-terWengel, Castellanos, & Arias, 2005; Viteri & Waits, 2009).

En el contexto del Distrito Metropolitano de Quito, recientemente se realizó un estudio preliminar en la población del oso de anteojos en el cual se diseñó un protocolo para la amplificación y análisis de secuencias provenientes de la región D-loop del ADN mitocondrial de esta especie (Bruque, 2016). En dicho estudio se encontró que existe una baja diversidad de nucleótidos y una diversidad de haplotipos moderada. Sin embargo, solo 13 individuos fueron analizados requiriéndose así un estudio más amplio para lograr obtener evidencia que permita elaborar conclusiones más robustas sobre el estado genético y de conservación del oso de anteojos en el DMQ.

Por lo tanto, en el presente proyecto de investigación se obtuvo una muestra más representativa de la población que habita de en esta área en comparación al estudio preliminar ya realizado. Las 38 muestras obtenidas provienen de varios muestreos comprendidos entre el año 2015 al año 2017. Para los análisis, se utilizó la misma región de ADN mitocondrial analizada por Bruque en el año

2016, y adicionalmente se estandarizaron y utilizaron 11 marcadores microsatélites desarrollados específicamente para la especie. Utilizar estos 2 tipos de marcadores moleculares permite obtener una visión más global del estado del oso a nivel local. Los resultados obtenidos en el presente estudio ayudarán a entender de mejor manera la diversidad genética de *T. ornatus* en el Distrito Metropolitano de Quito.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Determinar la diversidad genética de la población de oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) en el Corredor Ecológico del Distrito Metropolitano de Quito por medio de análisis de ADN mitocondrial y marcadores SSR.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Amplificar una región hipervariable de la región D-loop del ADN mitocondrial del oso de anteojos mediante el uso de primers específicos.
- Analizar secuencias mitocondriales e identificar haplotipos en el oso de anteojos mediante secuenciación de los fragmentos amplificados.
- Realizar análisis filogenético de los haplotipos encontrados.
- Diseñar, estandarizar y analizar nuevos marcadores microsatélite homólogos para la especie.
- Determinar la diversidad genética de la población de estudio.
- Realizar inferencias poblacionales y sobre el estado de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Según la IUCN, el oso de anteojos se encuentra catalogado como una especie en estado vulnerable. Diferentes actividades humanas tales como cacería, agricultura, ganadería, construcción de carreteras y viviendas son las principales causas que contribuyen a la destrucción del hábitat de los osos y por lo tanto al deterioro de sus poblaciones (Goldstein et al., 2008). Se estima que dentro de pocos años el estado de la especie pasará de ser vulnerable a seriamente amenazada, acercándola peligrosamente a una posible extinción (Cardillo et al., 2004).

En el Distrito Metropolitano de Quito, la población de osos se encuentra separada por el Río Guayllabamba, y más recientemente por la construcción de la vía colectora Quito-La Independencia E28 (más comúnmente conocida como la vía Calacalí-Nanegalito). Este río constituye una barrera natural a la movilidad de los osos en la zona. De igual manera, la vía probablemente podría dificultar el movimiento de individuos. Se cree que las dos barreras obstaculizan el flujo de individuos entre diferentes localidades, lo que causa que la población de osos se fragmente y se deteriore con el paso del tiempo (Molina, 2012). Es por ello que es necesario realizar esfuerzos para estudiar el estado de las poblaciones de osos de anteojos, especialmente a nivel genético, y utilizar esta información para contribuir al establecimiento de programas de conservación para la especie (Goldstein et al., 2008; Peyton, 1980).

Hasta la fecha no se han reportado marcadores genéticos específicos para *T. ornatus*, y los que se han usado en estudios anteriores son marcadores provenientes de especies relacionadas (Ruiz-garcía, 2003; Ruiz-García et al.,

2005; Viteri & Waits, 2009). El desarrollar marcadores moleculares específicamente para una especie en particular facilitan el flujo de trabajo en comparación a marcadores heterólogos. Esto ocurre ya que éstos últimos tienen una probabilidad más alta de presentar algún tipo de problema durante la amplificación dado por algún tipo de mutación en la secuencia del genoma de la especie a analizar en el sitio puntual de hibridación de los cebadores. Para el oso andino, los marcadores homólogos servirán como una gran herramienta para determinar la diversidad genética y genética poblacional de la especie no solo a nivel local, pero en un futuro, a nivel regional. En el caso específico del Distrito Metropolitano de Quito, el estudio de la diversidad genética del oso permitirá entender de mejor manera la problemática de la especie a nivel local. De esta manera, se podrán tomar acciones adecuadas en cuanto al manejo de las poblaciones silvestres de osos andinos, los cuales son claves para la dispersión de semillas, renovación vegetal y el mantenimiento de los ecosistemas. Adicionalmente, gracias al estado de especies paraguas de *T. ornatus*, mediante la conservación de esta especie se ayudará a conservar de manera directa e indirecta a otras especies (García-Rangel, 2012).

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en el Corredor Ecológico del Oso Andino al Noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito ubicado en la provincia de Pichincha al norte de los Andes ecuatorianos. El corredor está cubierto en gran parte por bosques, aunque también en ciertas áreas se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas. Se encuentra atravesado por el Río Guayllabamba, el cual fluye de

este a oeste y la vía colectora Quito-La Independencia E28 (Secretaría de Ambiente del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2014). El corredor cubre un área de aproximadamente 650 kilómetros cuadrados lo cual presenta una pequeña área (<1%) de la distribución total del oso andino (García-Rangel, 2012).

Dentro del corredor existe una población de aproximadamente 40 individuos los cuales se encuentran bajo constante monitoreo mediante el uso de cámaras trampa (Molina et al., 2017). Gracias a estas cámaras se han identificado varios individuos dentro del corredor, mismos que han sido muestreados de manera no invasiva. Así se ha logrado obtener muestras en 14 diferentes localidades del corredor: El Guarumal, Campamento, Pichan, Bellavista 3, El Porvenir, Curipogrio, Horizontes Rivera, Bellavista 2, Santa Lucía, Cambugán, Pahuma (Tabla 1). Las muestras fueron obtenidas hacia el norte del Río Guayllabamba, hacia el sur de la vía E28 y entre estas dos barreras (Figura 1).

Las muestras obtenidas fueron almacenadas y analizadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), en la ciudad de Quito, Ecuador.

## **5. MATERIALES**

### **5.1. Extracción de ADN a partir de pelo de oso de anteojos**

- Pelos de 38 muestras colectadas de oso andino.
- Baño maría (Equitron).
- Dneasy Blood & Tissue Mini Spin Column Kit (Qiagen)
- Estereomicroscopio (Wolfe)



- Etanol 96-100%
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- Tubos Eppendorf 0.6mL
- Vortex (IKA)

## **5.2. Cuantificación de ADN**

- ADN extraído de 38 muestras de oso andino
- Buffer AE 1X (Qiagen)
- Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Agua ultra pura libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific)

## **5.3. Amplificación de la región D-loop del ADN mitocondrial de**

### ***Tremarctos ornatus***

- ADN extraído de 38 muestras de oso andino
- 10X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 10 mM dNTPs (Invitrogen)
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- Agua ultra pura libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific)
- Platinum *Taq* DNA polimerasa 5 U/uL (Invitrogen)
- Primer TORmt2F: 5'-TAGCTCCACCATCAACACCC-3'
- Primer TORmt2R: 5'-ACTGCGACGAGACCTTTACG-3'
- Termociclador T100 (Bio-Rad)
- Tubos Eppendorf 0.2ml (Axygen)

## **5.4. Electroforesis en gel de agarosa**

- Balanza (Ohaus).

- Buffer TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA)
- BlueJuice 10X (Invitrogen)
- Cámara de electroforesis ENDURO XL (Labnet)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad)
- Ladder 100bp (Promega)
- Parafilm®.
- SYBR™ Safe (Invitrogen)
- Ultra Pure Agarose (Invitrogen)

### **5.5. Electroforesis en gel de acrilamida para purificar fragmentos amplificados**

- Etanol 70%
- Solución de tratamiento de vidrio (etanol 96 %, ácido acético 0.5%)
- Bind-silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane) (Sigma-Aldrich)
- BlueJuice 10X (Invitrogen)
- Buffer TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA)
- Fuente de poder PowerPac HV (Bio-Rad)
- Ladder 100bp (Promega)
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- Repelente de agua para vidrio (RainX)
- Sequi-Gen Cell GT System (Bio-Rad)
- Sigmacote® (Sigma-Aldrich)
- Ultra Pure Acrylamide (Invitrogen)
- Ultra Pure N, N - Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- Ultra Pure UREA (Invitrogen)

- UltraPure TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Thermo Fisher Scientific)

#### **5.6. Tinción del gel de acrilamida con nitrato de plata**

- Solución de revelado (Hidróxido de sodio 15 g/L, Formaldehído 0.0002% v/ v)
- Solución de tinción (Nitrato de plata, 2 g/L, Formaldehído 0.00015% v/v)
- Solución fijación/ parada (Alcohol 10% v/v, Ácido acético glacial 0.5% v/v)
- Transiluminador de luz blanca.

#### **5.7. Purificación de los fragmentos de PCR extraídos del gel de acrilamida**

- Bisturí estéril
- Buffer AE 1X (Qiagen)
- Incubadora con agitación (Barnestead)
- Tubos Eppendorf 0.6 mL

#### **5.8. Diseño de primers para amplificación de loci microsatélite**

- Software CodonCode Aligner v8.0.2 (Codon Code Corporation, 2017).
- Software online MFE primer 2.0 (Qu et al., 2012).
- Software online Primer 3 (Untergasser et al., 2012).
- Software online Primer BLAST (Ye et al., 2012).

#### **5.9. Amplificación de regiones microsatélite**

- 10X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 10mM dNTPs (Invitrogen)

- 11 pares de primers (Tabla 2).
- 50mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- Agua ultra pura libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific )
- Platinum *Taq* DNA polimerasa 5 U/μL (Invitrogen)
- Primer “Cola A” (5'-GCCTCCCTCGCGCCA-3') marcado con diferentes fluoróforos: NED, PET, 6-FAM, VIC (Invitrogen).
- Termociclador T100 (Bio-Rad)
- Tubos Eppendorf 0.2ml (Axygen)

#### **5.10. Armado de placas**

- MicroAmp 8-Cap Strip (Thermo Fisher Scientific)
- MicroAmp Optima 96-well reaction plate (Thermo Fisher Scientific)

#### **5.11. Análisis de datos**

- Lenguaje de programación R (Ihaka & Gentleman, 1996).
- Paquete para R ade4 (Dray & Dufour, 2007).
- Paquete para R adegenet (Jambart, 2008).
- Paquete para R ape (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004).
- Paquete para R diveRsity (Keenan, McGinnity, Cros, & Crozier, 2013).
- Paquete para R genepop (Rousset, 2008).
- Paquete para R hierfstat (Goudet & Thibaut, 2015).
- Paquete para R pegas (Paradis, 2010),
- Paquete para R polysat (Clark & Jasieniuk, 2011).
- Paquete para R poppr (Kamvar, Tabarima, & Grünwald, 2014).
- Software Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier, Laval, & Schneider, 2005).
- Software BEAST v1.8.4(Drummond & Rambaut, 2007).

- Software Bottleneck v1.2.02 (Luikart & Cornuet, 1999).
- Software Coancestry v1.1.0.8 (Wang, 2011).
- Software Gap4 del paquete Staden v2.0 (Staden, 1996).
- Software GeneMarker v2.6 (Holland & Parson, 2010).
- Software HP-Rare v1.0 (Kalinowski, 2005)
- Software MEGA v7.0 (S. Kumar, Nei, Dudley, & Tamura, 2008).
- Software Network v5.0.0.3 (Fluxus-Engineering, 2017).
- Software PGD Spider v2.1.1.3 (Lischer & Excoffier, 2012).
- Software RStudio v1.1.442 (R core Team, 2018).
- Software Structure v2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000).
- Software Structure Harvester en línea (Earl & vonHoldt, 2012).
- Software Tracer v1.7 (Ambaut, Rummond, Dong, & Suchard, 2018).

## **6. MÉTODOS**

### **6.1. Obtención de muestras e identificación de individuos**

Las muestras fueron colectadas en el campo en los puntos señalados en la figura 1 utilizando un método no invasivo desde el año 2015 hasta el año 2017. Este método consistió en la utilización de un cebo de esencia de vainilla para atraer a los osos, corrales de alambre para capturar sus pelos, y cámaras trampa para identificar los individuos de los cuales provenían las muestras. Se utilizaron aproximadamente 40 estaciones de fototrampeo. Las muestras de pelos de osos fueron recolectadas de los alambres utilizando pinzas y fueron guardadas en sobres de papel. Estos fueron transportados a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ en un lapso menor a 15 días

desde su recolección en el campo. Las muestras por analizar fueron seleccionadas mediante la comparación de fotografías y videos provenientes de las cámaras trampa localizadas en los sitios de colección con los registros documentados de los osos del Distrito Metropolitano de Quito (En comunicación personal con Santiago Molina). Para realizar los análisis moleculares se seleccionaron aquellas muestras que provenían de un solo individuo y que pertenecían o se sospechaba que pertenecían a individuos diferentes. Se seleccionaron 38 muestras de un total de 83 muestras receptadas. Todas las muestras fueron almacenadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

## **6.2. Extracción de ADN**

Los pelos colectados se observaron utilizando un estereomicroscopio para identificar la presencia de folículos. Una vez se identificaron aquellos pelos que poseían folículo, se procedió a recortar aproximadamente 1 cm de pelo con el folículo incluido y se colocó a este material dentro de un tubo Eppendorf de 0.6 mL. El ADN fue extraído a partir de aproximadamente 10 pelos con folículos por muestra (en algunas muestras la extracción se realizó con el material disponible, comprendido entre 2 y 5 pelos). La extracción se realizó mediante la utilización del Kit DNAeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante, con la adición de un paso previo de incubación de las muestras durante toda la noche en proteasa K a  $56^{\circ}\text{C}$  y con 3 eluciones de ADN para recuperar la mayor cantidad de ADN posible. Cada elución se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL diferente. Estas eluciones

secuenciales se realizaron en volúmenes de 70  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de buffer AE respectivamente. El ADN extraído fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.3. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de la concentración de ADN se llevó a cabo mediante la utilización del espectrofotómetro Nanodrop 2000<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EE. UU.). Los espectros de absorbancia fueron normalizados para una solución blanco de buffer AE (incluido en el kit de extracción de ADN). Se realizó la medición para cada alícuota de ADN obtenida para cada muestra y se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de cada tubo de ADN.

### **6.4. Amplificación inicial de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Tremactos ornatus***

Se amplificó la región hipervariable 1 de la región D-loop mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando los primers Tormt2F y Tormt2R (secuencia de los primers en la sección 5.3) diseñados previamente por Bruque (2016). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  con 1 U de Platinum *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), Buffer de PCR 1x, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), 0.75  $\mu\text{M}$  de cada primer y 5 ng de ADN molde de cada muestra. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con el siguiente protocolo de temperaturas: denaturación inicial por 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 35 ciclos denaturación de 30s a  $94^{\circ}\text{C}$ , hibridación de 30s a  $68^{\circ}\text{C}$  y extensión de 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ , seguido de una extensión final por 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Los productos resultantes de la amplificación fueron resueltos utilizando geles de agarosa

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) al 1.5% m/m utilizando tinción por SYBR™ Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y un fotodocumentador BioRad Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Se utilizó 5 µL de producto de PCR y las muestras se corrieron durante 45 minutos a 80 V.

### **6.5. Electroforesis en gel de acrilamida y revelado del gel**

Una vez comprobada la amplificación exitosa en geles de agarosa, se realizó una electroforesis en un gel denaturante de acrilamida (Urea-PAGE) utilizando el sistema SequiGen GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Para el tratamiento de la cámara de electroforesis, ésta se lavó utilizando una solución de Alconox™ y una vez seca se aplicó de manera uniforme 2 mL de RainX y 800 µL de Sigmacote® sobre la superficie de esta. Para el tratamiento del vidrio se realizaron 3 lavados con Alconox™, posteriormente se aplicó una solución de 2 µL de Bind-silane y 2 mL de solución de tratamiento del vidrio. Todas las demás partes del sistema de electroforesis fueron tratados con alcohol al 70% y el sistema de polimerización fue armado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a inyectar 100 mL de la solución de poli(acrilamida (Urea 5M, acrilamida:bisacrilamida 19:1 al 6%, TBE 1X, Temed y persulfato de amonio 0.1%) dentro de la cámara y se colocó el peine para colocar el frente de corrida. Se dejó polimerizar el gel durante 2 horas.

Una vez se polimerizó el gel, se armó la cámara de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 500 mL de TBE 1X a la base de la cámara y 1100 mL dentro de la cámara. Posteriormente se insertó el peine para generar los pocillos y se realizó una pre-corrída durante 30 minutos a 80 watts utilizando buffer de carga para comprobar el estado de formación de los pocillos. Se



procedió a denaturar los productos de PCR a 94°C por 7 minutos y se cargó 5 µL de cada producto de PCR con buffer de carga BlueJuice (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) en de cada pocillo. Se realizó la corrida durante 2 horas y 30 minutos utilizando como marcador de peso molecular un Ladder de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), y el revelado del gel se llevó a cabo utilizando tinción de nitrato de plata (Benbouza, Jacquemin, Baudoin, & Mergeai, 2006).

#### **6.6. Extracción de bandas de acrilamida, purificación y reamplificación de los fragmentos**

Una vez identificado el fragmento (aprox. 600bp), se procedió a remover los fragmentos del gel utilizando un bisturí estéril. Cada fragmento proveniente de cada muestra fue removido y colocado en un tubo Eppendorf de 0.6 mL y se añadió 50 µL de buffer AE 1X. Se utilizó un bisturí diferente entre cada banda extraída. Posteriormente, cada muestra se homogenizó mediante vórtex durante 2 minutos, y se procedió a incubar durante 12 horas a 37°C para promover el desprendimiento de ADN desde el gel hacia el buffer. Posteriormente se llevó a cabo una reamplificación utilizando el mismo protocolo de la sección 6.4.

#### **6.7. Secuenciación de los fragmentos de la región D-loop**

Los productos de PCR resultados de la reamplificación fueron cuantificados de acuerdo con la sección 6.3, los tubos eppendorf de 0.2 mL fueron sellados con Parafilm y fueron enviados para su secuenciación en ambas direcciones utilizando un secuenciador ABI 3730XLs (Macrogen, Corea del Sur).

### 6.8. Análisis de datos de secuencias mitocondriales

Se utilizó el programa GAP4 del paquete de software Staden v2.0 (Staden, 1996) para utilizar la información de las dos hebras de ADN secuenciadas por cada muestra y de esta manera obtener una secuencia consenso. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas en el software MEGA v7.0 (S. Kumar et al., 2008) utilizando el método implementado en Clustal. Posteriormente se cortó la longitud de las secuencias a aquellos sitios que resultaron informativos para todas ellas. Es decir, se dejaron todas las secuencias de un mismo tamaño para de esta manera realizar los análisis subsiguientes.

Se utilizó el software Network (Fluxus-Engineering, 2017) para obtener una red de haplotipos *median joining* mediante el método *Maximum-Parsimony*, el cual resulta apropiado para construir una red a partir de información de secuencias (Huson & Bryant, 2006). En la red de haplotipos graficada se representó la procedencia de las muestras en cuanto a las barreras geográficas con 3 diferentes colores: Azul para representar muestras provenientes del norte del Río Guayllabamba, morado para representar las muestras provenientes del sur de la vía E28 y celeste para representar las muestras provenientes entre el río y el carretero. Posteriormente con la información de la secuencia y la frecuencia de los haplotipos se utilizó el software Arlequin v2.5.2.2 (Excoffier et al., 2005) para calcular los índices de diversidad de haplotipos ( $H$ ) y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ), así como para realizar pruebas de neutralidad en base a los índices  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). Finalmente se utilizó el software BEAST v1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007) para inferir la filogenia

de las secuencias obtenidas de las muestras colectadas. El árbol consenso fue generado a partir de 15 millones pasos de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC), mediante el método de *Maximum Clade Credibility* (MCC). En base al análisis de la distribución de los valores posteriores (*posterior distribution*) con el software Tracer v1.7 (Ambaut et al., 2018), se utilizó un modelo de sustitución de *Jukes-Cantor*. Las puntas del árbol MCC no fueron calibradas utilizando las fechas de recolección debido a la falta de información disponible para las secuencias externas a las obtenidas en el presente estudio. De esta manera, los análisis se enfocaron únicamente en la topología del árbol MCC. Cada nodo de la filogenia se evaluó utilizando las probabilidades posteriores del mismo.

Tanto para la construcción de la red de haplotipos como para el árbol filogenético final se utilizaron dos secuencias correspondientes a la región analizada proveniente de otros dos individuos de *T. ornatus*. Dichas secuencias se encontraban disponibles en la base de datos de nucleótidos del NCBI bajo las accesiones EF196665.1 (Yu, Li, Ryder, & Zhang, 2007) y FM177764.1 (Krause et al., 2008) y fueron reportadas originalmente como secuencias de genoma mitocondrial completo de la especie. Adicionalmente, para la construcción del árbol filogenético se utilizaron secuencias de las regiones correspondientes de dos miembros extintos de la familia Tremarctinae: *Arctotherium* sp. (accesión NC\_030174.1), *Arctodus simus* (accesión FM 177762.1) (Mitchell et al., 2016) y se incluyó una secuencia de *Ursus thibetanus* (Familia Ursidae, accesión JF681220.1) como grupo externo (Jun et al., 2011).

### **6.9. Diseño de primers para amplificación de loci microsatélite**

Para el diseño de marcadores SSR específicos para *T. ornatus*, primeramente, se procedió a realizar una búsqueda de todos los loci SSR reportados para cualquier especie de oso en la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En total se encontró alrededor de 400 accesiones reportadas y se seleccionaron para un análisis posterior 72 loci cuya secuencia contenía motivos repetidos de 3 o más nucleótidos, debido a la mayor facilidad de interpretación que potencialmente presentan durante la fase de genotipado. Estos 72 loci fueron alineados con sus regiones homólogas en 2 genomas completos del oso andino reportados en la base de datos SRA (Sequence Read Archive) del NCBI, bajo las accesiones ERX1025773 y ERX1025774 (V. Kumar et al., 2017), mediante el uso de la herramienta BLAST (Madden, 2013). Posteriormente, se descargaron las lecturas de secuencia de aquellos loci cuyo alineamiento resultó exitoso con una cobertura completa de la región correspondiente del genoma de *T. ornatus*. Esto se realizó para cada genoma por separado y las lecturas se ensamblaron utilizando el programa CodonCode Aligner v8.0.2 (Codon Code Corporation, 2017) para obtener una secuencia consenso de cada una de las regiones microsatélite. En total se obtuvieron 25 secuencias correspondientes a regiones diferentes y con estas secuencias se procedió a realizar diseño de primers flanqueantes a la región microsatélite utilizando la herramienta Primer 3 v0.4.0 (Untergasser et al., 2012). Para este diseño se tomó en cuenta un tamaño de cada primer de entre 18 a 22 nucleótidos, un contenido de guanina – citosina entre 45% y 55%, una temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 55°C y 65°C, y un

tamaño esperado del fragmento amplificado entre 200 y 400 pares de bases. Para todos los candidatos de primers se evaluó su potencial de amplificación de regiones diana no blanco con la herramienta Primer BLAST (Ye et al., 2012), y se seleccionaron las combinaciones de primers con menos blancos inespecíficos. Seguidamente, se revisó *in silico* la posible formación de dímeros de primers con la herramienta mFold (Zuker, 2003) y con MFE primer 2.0 (Qu et al., 2012). Adicionalmente, se revisó la compatibilidad de estos primers con la cola A (5'-GCCTCCCTCGCGCCA-3') (Blacket, Robin, Good, Lee, & Miller, 2012), como una alternativa al marcaje de los productos de PCR con fluoróforos. A cada primer Forward se le agregó la secuencia de la cola A en el extremo 5' y se volvió a evaluar la posible formación de dímeros. Una vez validado este proceso, se eligieron 13 sets de primers para sintetizar y realizar pruebas de amplificación subsiguientes (Tabla 2). Cada uno de los pares de primers desarrollados en el presente estudio fue llamado "TorX" en nombre de la especie *Tremarctos ornatus*.

#### **6.10. Amplificación de los loci microsatélite**

Cada uno de los 13 marcadores diseñados se amplificó de manera independiente en reacciones de PCR utilizando los primers correspondientes para cada locus. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) en un volumen total de 30  $\mu$ L con 1U de Platinum *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), Buffer de PCR 1x, 1.5 mM  $MgCl_2$  (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), 0.2 mM de dNTPs, 0.5  $\mu$ M primer Reverse, 0.2  $\mu$ M de primer Forward, 0.5  $\mu$ M de primer cola A con fluoróforo y 5 ng de ADN molde de cada muestra.

Se utilizaron 4 primers marcados (cola A) con fluoróforos diferentes (NED, PET, VIC y 6-FAM) y se asignó un fluoróforo diferente por cada locus amplificado (Tabla 2). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con el siguiente protocolo de temperaturas: denaturación inicial por 7 minutos a 94°C, 55 ciclos denaturación de 30s a 94°C, hibridación de 30s a 60°C y extensión de 30 segundos a 72°C, seguido de una extensión final por 5 minutos a 72°C. Los productos resultantes de la amplificación fueron resueltos utilizando geles de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) al 1.5% m/m utilizando tinción por SYBR™ Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se utilizó 5 µL de producto de PCR y las muestras se corrieron durante 45 minutos a 80 V. Para revelar el gel se utilizó un fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

Para las muestras con las que no se obtuvo una amplificación exitosa, se realizó una amplificación inicial con 0.5 µM de primer Forward y 0.5 µM de primer Reverse, sin la adición de primer cola A marcado; y posteriormente se realizó una reamplificación con 0.5 µM de primer cola A marcado y 0.5 µM de primer Reverse, sin la inclusión de primer Forward. El resto de las concentraciones y condiciones de la PCR se mantuvieron como previamente descritas.

#### **6.11. Armado de placas**

Los productos de PCR obtenidos fueron cargados en placas de 96 pocillos y cada pocillo contuvo marcadores amplificados con fluoróforos diferentes agrupados en *pool* de acuerdo con la Tabla 2. Las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su análisis mediante electroforesis capilar en un equipo ABI 3730XL.

### 6.12. Análisis de datos de marcadores microsatélite

Los picos de genotipado obtenidos del análisis por electroforesis capilar fueron analizados utilizando el programa GeneMarker v2.6 (Holland & Parson, 2010). Con los alelos discriminados se procedió a elaborar una matriz codominante, misma que contuvo información sobre el código identificador del individuo, la localidad de muestreo de los individuos, y los alelos expresados en número de pares de bases. Dicha matriz se realizó dos formatos. El primero de ellos se realizó en un formato propietario del paquete para R *pegas* (Paradis, 2010) y la segunda matriz fue realizada en formato GenePop.

Los análisis de datos descritos a continuación se llevaron a cabo utilizando paquetes estadísticos desarrollados en el lenguaje de programación R (Ihaka & Gentleman, 1996) mediante el uso de la interfaz gráfica RStudio v1.1.442 (R core Team, 2018). Primeramente, la importación de la matriz datos se realizó utilizando el paquete *pegas* (Paradis, 2010), y dicha matriz fue transformada en un objeto *genind* y en un objeto *genpop* para realizar análisis a nivel de individuos y de poblaciones con otros paquetes desarrollados en lenguaje R y diseñados para interactuar con los objetos ya mencionados. Se procedió a comprobar que los marcadores utilizados no se encuentren ligados entre sí, para ello se procedió a realizar una prueba de desequilibrio de ligamiento (LD) mediante el uso del código implementado en el paquete *genepop* (Rousset, 2008). Una vez comprobado que los marcadores no se encuentren ligados, los cálculos de índices diversidad genética como heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), y alelos por locus y por grupo analizado fueron calculados utilizando el código implementado en el paquete *polysat* (Clark &

Jasieniuk, 2011) y *diveRsity* (Keenan et al., 2013) respectivamente. A continuación, para el cálculo de distancias genéticas de *Nei* (Nei, 1977), se utilizó el paquete *adegenet* (Jombart, 2008), mientras que para el cálculo de las distancias genéticas de Weir y Cockerham *Fst* (B. S. Weir & Cockerham, 1984), se utilizó el paquete *hierfstat* (Goudet & Thibaut, 2015). Se utilizó el paquete *ape* para realizar un gráfico de estas distancias (Paradis et al., 2004). Los alelos privados fueron evaluados con la ayuda del código implementado en el paquete *proprr* (Kamvar et al., 2014). Adicionalmente, mediante el uso del paquete *pegas* (Paradis, 2010) se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) y una prueba de desviación del equilibrio Hardy-Weingberg (*HWE*). Finalmente, se realizó una prueba de endogamia en la población utilizando el paquete *adegenet* (Jombart, 2008) y un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando el paquete *ade4* (Dray & Dufour, 2007).

Se realizó una corrección del cálculo de alelos privados y riqueza alélica por rarefacción utilizando el programa HP-Rare v1.0 (Kalinowski, 2005) utilizando como entrada la matriz obtenida en formato GenePop. Esto se realizó debido al número desigual de muestras obtenidas para cada grupo analizado, lo que reduce la probabilidad de encontrar alelos en las muestras más pequeñas sesgando así los valores obtenidos para estos índices (Kalinowski, 2004).

Mediante el programa PGD Spider v2.1.1.3 (Lischer & Excoffier, 2012) se transformó la matriz en formato GenePop a formato Structure. A continuación, se realizó un análisis de estructura poblacional utilizando el software Structure v2.3.4 (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005). Para ello, se corrieron 500000 pasos en la cadena MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) tras una fase de *Burn-In* de



50000. Se evaluaron valores de  $K$  desde 1 hasta 10, con 10 réplicas independientes para cada uno. Se evaluaron dos modelos diferentes, con y sin *admixture*. El modelo *No admixture* es adecuado cuando se asume o existe algo de evidencia de que cada población analizada es completamente discreta, es decir, que no existe reproducción entre poblaciones que se encuentran genéticamente diferenciadas. Por otro lado, el modelo *Admixture* asume que los individuos muestreados tienen ancestros de múltiples poblaciones. Este modelo resulta más adecuado cuando se tiene cierta evidencia o se asume la existencia de dos o más poblaciones previamente aisladas y diferenciadas genéticamente, las cuales se reprodujeron entre sí luego de un periodo de tiempo de separación (Porras-Hurtado et al., 2013). Se alternaron ambos modelos con la posibilidad de incluir la información de localidad de muestreo de cada individuo como información previa (*priors*) para un total de cuatro análisis diferentes. La determinación del número óptimo de grupos genéticos ( $K$ ) (Porras-Hurtado et al., 2013) se realizó mediante el software en línea Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) mismo que implementa el método de Evanno el cual utiliza un método estadístico *ad hoc* para calcular la tasa de cambio en la probabilidad de los datos obtenidos para diferentes valores de  $K$  sucesivos (Evanno et al., 2005).

Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de existencia de un cuello de botella en la población utilizando el software Bottleneck v1.2.02 (Luikart & Cornuet, 1999) utilizando el modelo de alelos infinitos (*infinite allele model*) IAM, el modelo de dos fases (*two phase model*) TPM, y el modelo paso a paso (*stepwise model*) SSM. Finalmente, se utilizó el software Coancestry v1.0.1.8 (Wang, 2011), para estimar el parentesco por parejas (*pairwise relatedness*)

entre individuos y entre grupos mediante el cálculo del estimador de momento para parentesco (*moment estimator for relatedness*) ( $W$ ) (Wang, 2002).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Identificación de individuos y selección de las muestras válidas**

Gracias a la información proveniente de cámaras trampa en total se identificaron 28 individuos en base a los patrones de manchas faciales. Para otras 10 muestras, no se logró identificar la procedencia de esta debido a que no se mostraba el rostro del oso en el video. No obstante, estas muestras se incluyeron en el estudio ya que, a pesar de no identificar al individuo, la información de las cámaras trampa demostraron que la muestra provenía de un solo individuo. En total se incluyeron 38 muestras (Tabla 1) válidas de un total de 83 muestras de pelo colectadas. Las muestras descartadas correspondían a recapturas de individuos previamente muestreados o a casos en los que el pelo colectado provenía de más de un individuo.

### **7.2. Concentración y calidad del ADN**

De acuerdo con la cuantificación utilizando NanoDrop 2000™, la concentración de ADN de las muestras extraídas fue baja, oscilando entre 0.2 ng/μL y 7.5 ng/μL (datos no mostrados). Para 4 muestras la concentración medida por el equipo fue incluso negativa (-0.5 ng/μL L). En cuanto a la calidad tanto en las relaciones de los valores de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm (datos no mostrados) se obtuvieron valores muy por de fuera del rango aceptable (aprox. 1.8) en todas las muestras sugiriendo así la presencia de contaminantes en estas. No obstante, los índices fuera de los parámetros establecidos y la lectura negativa de las 4 muestras pueden deberse a una

lectura errónea debido a la baja concentración de ADN, la cual se encuentra fuera de los límites de sensibilidad del equipo. Al encontrarse poco ADN, existe una baja absorbancia a 260nm, lo cual hace que las relaciones con las absorbancias a 230nm y 280nm estén fuera de rango (Thermo Fisher Scientific, 2009). Por lo tanto, pese a esto se procedió a realizar la amplificación del ADN.

### **7.3. Resultados de la amplificación y secuenciación de la región D-loop**

Todas las muestras fueron exitosas en la amplificación inicial. Por lo tanto, el Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) funcionó de manera adecuada para la extracción de ADN a partir de las muestras de pelo colectadas. De igual manera, todas las muestras reamplificaron de manera exitosa obteniéndose el fragmento en el tamaño esperado de 615pb (Figura 2). En consecuencia, se obtuvo información de secuencias para el 100% de las muestras seleccionadas. En todos los casos se obtuvo señal en el cromatograma. No obstante, debido a una región homopolimérica rica en adeninas-timinas se generaron picos mixtos en algunas de las secuencias luego de dicha región como consecuencia del deslizamiento de la polimerasa de ADN en este tipo de regiones (Viguera, Canceill, & Ehrlich, 2001). Es por ello que se obtuvo una secuencia consenso mediante la concatenación de las secuencias provenientes de ambas cadenas de ADN.

### **7.4. Diversidad genética mitocondrial y pruebas de neutralidad**

En total, solo se encontraron 4 haplotipos de 456pb en las 38 secuencias analizadas de los osos de anteojos del DMQ. Los haplotipos fueron nombrados HTOQx (Haplotipo de *Tremarctos ornatus* de Quito). Se identificaron 15 individuos pertenecientes al haplotipo HTOQ1, 7 individuos pertenecientes al

haplotipo HTOQ2, 13 individuos pertenecientes al haplotipo HTOQ3 y 3 individuos pertenecientes al haplotipo HTOQ4. Las secuencias de los haplotipos se encuentran disponibles en la Tabla 3 y además fueron depositadas en las accesiones KX812512-KX812515 de la base de datos de nucleótidos del NCBI.

Los haplotipos fueron definidos por 2 sitios polimórficos correspondientes a una inserción-delección en la posición 168 adyacente a una región poli-T, y a una transición (A $\leftrightarrow$ G) en la posición 318 (Figura 3). La diversidad de haplotipos ( $H$ ) fue de 0.7055 +/- 0.0369 y la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) fue de 0.001972 +/- 0.001559 (media +/- desviación estándar). Todas las distancias genéticas por pares (*pairwise genetic distances*) entre los haplotipos fueron muy bajas (0.002). En cuanto a las pruebas de neutralidad para evaluar expansión poblacional o cuellos de botella, el valor obtenido en la prueba de D de Tajima fue de 0.9759 (P = 0.8732) y el Fs de Fu fue de 0.3567 (P = 0.5855). Estos valores sugieren que no ha existido una expansión poblacional ni un cuello de botella reciente en la población de oso andino del DMQ.

### **7.5. Análisis filogenético de las secuencias mitocondriales y red de haplotipos**

De acuerdo con el análisis filogenético, los resultados indican que todos los haplotipos encontrados en el Distrito Metropolitano de Quito pertenecen a un solo grupo monofilético sugiriendo así que la población que habita en estas localidades se originó a partir de un solo ancestro común. Las otras secuencias provenientes de la base de datos corresponden a un grupo filogenético diferente (Figura 4). No obstante, debido a la falta de información de la localidad

geográfica de origen de estas muestras no se pueden realizar más deducciones sobre este grupo.

La red de haplotipos muestra que los cuatro haplotipos encontrados en el DMQ tienen poca variación a nivel de secuencia de unos con otros, con solo uno o dos cambios nucleotídicos entre ellos. Se observa que estos 4 haplotipos forman parte de un grupo cercano ya que tienen una longitud de ramas muy cortas (Figura 5). Esto concuerda con lo encontrado en el árbol filogenético en el que se observa que estos 4 haplotipos están estrechamente relacionados. De acuerdo con la red, la secuencia de la accesión FM17777.1 posee 5 cambios nucleotídicos, mientras que la secuencia EF196665.1 posee 21 cambios nucleotídicos con el haplotipo del DMQ más cercano. De acuerdo con la distribución de los haplotipos por localidades, HTOQ2 y HTOQ4 se encuentran en mayor frecuencia en el norte del Río Guayllabamba, y en particular, HTOQ4 es un haplotipo encontrado exclusivamente en las localidades del norte del río. Por otro lado, los haplotipos HTOQ1 y HTOQ3 fueron muy frecuentes en las localidades que se encontraban entre el río y la vía E28.

#### **7.6. Amplificación y genotipado de los loci microsatélite**

En total, de los 13 marcadores microsatélite diseñados en este estudio, se logró una amplificación exitosa en 12 de ellos, observándose bandas claras y definidas en los geles de agarosa (Figura 6). En algunos casos, la amplificación de las muestras requirió de la realización de una nueva amplificación con los primers Forward y Reverse seguido de una reamplificación tal y como se encuentra descrito en la sección 6.10. De estos 12 loci, en 11 de ellos hubo una muy buena discriminación de alelos durante el análisis del genotipado (Figura 7).

Esto significa que en estos 11 marcadores se obtuvieron picos claros y sin ruido. Por lo tanto, se realizó el análisis de datos con los 11 marcadores SSR restantes: Tor2, Tor4, Tor5, Tor6, Tor7, Tor8, Tor9, Tor10, Tor11, Tor12 y Tor13 (Tabla 2). El análisis se realizó solamente con 29 muestras de las 38 obtenidas en este estudio debido a una falta de amplificación exitosa en 9 muestras las cuales fueron excluidas (Tabla 1).

### **7.7. Desequilibrio de ligamiento**

No se observó evidencia de ligamiento entre los distintos marcadores desarrollados en este estudio, tras la aplicación de la corrección de Bonferroni de la significancia estadística para comparaciones múltiples ( $P > 0.0126$ ). Este resultado es en base a la prueba de desequilibrio de ligamiento compuesto (Bruce S. Weir, 1996), estimados mediante una prueba G (*G test*) implementada en el paquete *Genepop* para R (Rousset, 2008). Por lo tanto, los marcadores fueron tratados como independientes para todos los análisis posteriores.

### **7.8. Índices de diversidad genética de los marcadores microsatélite**

En total se encontró 45 alelos en toda la población, con una heterocigosidad esperada global moderada ( $He = 0.521$ ) y una baja heterocigosidad observada global ( $Ho = 0.365$ ). Se encontró entre 2 y 6 alelos por locus siendo el promedio de 4.09 alelos. La heterocigosidad esperada ( $He$ ) por locus fue desde 0.324 hasta 0.718, mientras que la heterocigosidad observada ( $Ho$ ) por locus fue desde 0.103 hasta 0.552 (Tabla 4). En cuanto a la heterocigosidad encontrada al analizar grupos de individuos (Tabla 5), la heterocigosidad esperada más alta se encontró en los individuos que se encuentran entre el Río Guayllabamba y la vía

E28 ( $He = 0.52$ ), seguido por los individuos al norte del río ( $He=0.51$ ), mientras que el índice más bajo se encontró al sur de la vía E28 ( $He=0.37$ ).

En lo que respecta a la diversidad alélica encontrada por grupos, la mayor riqueza alélica (2.52), el mayor número de alelos (38) y la mayor cantidad de alelos privados (10) se encontraron en las muestras provenientes de las localidades entre el Río Guayllabamba y la vía E28 (Tabla 5). En las muestras provenientes al norte del río se encontraron 31 alelos, 3 alelos privados y una riqueza alélica de 2.45. Finalmente, la menor riqueza alélica (1.94), el menor número de alelos (25) y la menor cantidad de alelos privados (2) fueron encontrados en las localidades al sur de la vía E28 (Tabla 5).

### **7.9. Distancias genéticas y estructura poblacional**

De acuerdo con las distancias genéticas de Weir y Cockerham  $F_{st}$  (Tabla 6) la mayor distancia genética se encuentra entre los individuos de las localidades de norte del río y los individuos del sur de la vía E28 ( $F_{st} = 0.137$ ). Por otro lado, los individuos que se encuentran entre estas dos barreras son más cercanos genéticamente a los individuos del norte ( $F_{st} = 0.033$ ) que a los del sur ( $F_{st} = 0.069$ ). La dimensión de estas diferencias puede observarse claramente en el dendrograma realizado con estas distancias genéticas (Figura 8). Este patrón es consistente con las distancias genéticas de  $Nei$  en donde los individuos del norte del río y del sur del carretero son los que se encuentra genéticamente más distantes (Tabla 7). En cuanto a la relación de las distancias genéticas de los individuos y las distancias geográficas de colección de muestras, los resultados de la prueba de Mantel revelan que no existe una relación significativa ( $R^2 = 0.0325$ ,  $P = 0.1$ ).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) revela que no existe una separación completa entre los individuos de diferentes localidades. Sin embargo, los individuos ubicados al norte del río se dispersan en ambos ejes en mayor medida de aquellos que se encuentran al sur de la vía E28 (Figura 9). En cuanto al análisis de estructura poblacional con *Structure*, no hubo una concordancia en cuanto al mejor valor de K para cada uno de los modelos. El modelo de *Admixture* – No LocPrior sugiere un valor óptimo de K de 2, mientras que el modelo de *No Admixture* – No LocPrior sugiere un valor K de 3. Por otro lado, el modelo *Admixture* – LocPrior sugiere un valor óptimo de K de 8 mientras que el modelo *No Admixture* – LocPrior sugiere un valor K de 3. Todos estos modelos fueron probados para evaluar la posibilidad de existencia de estructura poblacional bajo diferentes posibles escenarios. Esto, debido a que el análisis realizado en *Structure* utiliza inferencia bayesiana, la cual utilizará la información previa (*priors*) para elaborar nuevas hipótesis y así obtener el mejor resultado que explique los datos (*posteriors*). Por lo tanto, se espera que diferentes parámetros de entrada originen diferentes resultados, los cuales explicarán de mejor manera los datos para ese escenario dado (Newton & Raftery, 1994). De acuerdo con los gráficos obtenidos para un K de 2 (Figura 10), se aprecia que no existe una diferenciación genética entre individuos de diferentes localidades, y, por lo tanto, no existe estructura poblacional.

#### **7.10. Endogamia y parentesco**

La gráfica del histograma obtenido para los coeficientes de endogamia ( $F$ ) (Figura 11) no sigue una distribución normal habiendo 8 individuos que poseen un coeficiente  $F$  elevado ( $>0.5$ ). Estos individuos son de acuerdo con los códigos



asignados 2, 20 y 23 (al norte del río), 9 (entre el río y la vía E28), y 11, 19, 24 y 25 (al sur de la vía E28). 17 individuos presentaron un coeficiente  $F$  moderado (entre 0.2 y 0.5) y sólo 3 individuos presentaron un coeficiente  $F$  bajo ( $<0.2$ ). De acuerdo con los análisis hechos en el programa Coancestry, toda la población muestra un valor de estimador de parentesco negativo ( $W = -0.1932$ ), lo cual sugiere que a nivel global los individuos muestran un nivel de parentesco bajo entre ellos. Al analizar grupos de individuos se evidencia que los individuos al sur de la vía E28 poseen un índice positivo ( $W = 0.02953$ ), lo cual denota que estos poseen cierto nivel de parentesco y es la localidad en la cual los individuos están más emparentados entre sí (Tabla 8). Al analizar todos los individuos de todas las localidades a manera de díadas (Figura 12), se evidencia que varios de estos están estrechamente relacionados entre sí. Hay 53 comparaciones múltiples cuyo estimador de parentesco ( $W$ ) es mayor a 0.2.

### **7.11. Equilibrio Hardy-Weinberg**

Al analizar cada uno de los loci (Tabla 4), se evidencia que los marcadores Tor2, Tor6, Tor9, Tor 10, Tor12 y Tor13 se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE). Al analizar cada grupo, los individuos que se encuentran en las localidades entre el río y el carretero son los que se desvían del HWE (Tabla 5).

### **7.12. Cuello de botella**

En los análisis hechos en el software Bottleneck, la prueba de Wilcoxon realizada bajo los modelos de mutación TPM (Two-Phase Model) y SMM (Stepwise Mutation Model) para cada uno de los grupos analizados no se evidencia la ocurrencia de cuellos de botella poblacionales para ninguno de los

grupos en la historia reciente de los mismos. Por otra parte, el modelo IAM (Infinite Alleles Model) sugiere que existió un cuello de botella para los individuos que se encuentran entre el río y el carretero ( $P = 0.01$ ).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Diversidad genética

Hasta la fecha no existen estudios genéticos publicados sobre el oso andino que reporten índices de diversidad de nucleótidos y de haplotipos de la misma región de ADN mitocondrial analizada en este estudio que permitan realizar comparaciones directas de los resultados obtenidos con otras poblaciones de la misma especie. No obstante, en análisis similares llevados a cabo en una población de oso pardo (*Ursus arctos*) de isla de Hokkaido en Japón se encontraron 17 haplotipos de 696 bp definidos por 44 sitios polimórficos en 56 individuos analizados (Matsushashi, Masuda, Mano, & Yoshida, 1999). De igual manera, en un estudio llevado a cabo en Corea del Sur con el oso negro asiático (*U. thibetanus*) se encontraron 60 haplotipos de 615 bp definidos por 79 sitios polimórficos en 84 individuos analizados (Kim et al., 2011). En contraste, en el presente estudio se encontraron tan solo 4 haplotipos de un tamaño de 456 bp definidos por 2 sitios polimórficos en 38 muestras analizadas. Se compara estos estudios con los resultados obtenidos debido a que estos también fueron llevados en un área geográfica reducida y con un número de individuos limitado. No obstante, cabe mencionar que estas especies tienen una historia evolutiva diferente (V. Kumar et al., 2017), por lo que las comparaciones podrían no ser las más adecuadas.

De igual manera, en otro estudio realizado en el oso pardo (*U. arctos*) en el que se utilizó información de la región del citocromo B del ADN mitocondrial se muestran índices de diversidad genética superiores a los encontrados en este estudio (Randi, Gentile, Boscagli, Huber, & Roth, 1994), incluso al analizar una región codificante en la que se espera encontrar menor variación que en el D-loop (Harrison, 1989; Stoneking, 2000). Todo esto sugiere que la población analizada de oso de anteojos en el Distrito Metropolitano de Quito posee una baja variabilidad genética ya que los índices encontrados de diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y de haplotipos ( $H$ ) son mucho más bajos en comparación a otros estudios poblacionales realizados en otras especies de osos (Kutschera et al., 2016; Waits, Talbot, Ward, & Shields, 1998). La baja diversidad genética encontrada también se podría explicar debido a que *T. ornatus* es una especie reciente (aproximadamente 130 000 años) dentro de la familia Ursidae en la cual ocurrió una rápida radiación evolutiva (García-Rangel, 2012; Krause et al., 2008). Por lo tanto, puede que aún no haya transcurrido suficiente tiempo para que se acumule un alto número de polimorfismos en la región analizada. Harrison (1989), menciona que este proceso toma cierta cantidad de tiempo ya que existen muchas moléculas de mtDNA por célula que se transmitirán del ovocito de la madre hacia el hijo. Por consiguiente, para que una nueva variante de mtDNA sea observable al analizar genética poblacional, ésta primero se tendrá que fijar tanto en la población de moléculas de mtDNA en una célula de la línea germinal materna, como en la población de individuos.

Llama la atención que al comparar los haplotipos obtenidos con las secuencias correspondientes de las accesiones FM177764.1 y EF196665.1 de

la base de datos del NCBI, se observan varios cambios nucleotídicos (de 5 a 21 cambios) en relación con los haplotipos encontrados en el DMQ (Figura 5). Al ser estas secuencias más alejadas a las secuencias del DMQ, es probable que se pueda encontrar más diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y de haplotipos ( $H$ ) en la especie en otras localidades en su rango de distribución debido a la posible existencia de haplotipos intermedios (Bandelt, Forster, & Röhl, 1999; Harrison, 1989).

Por otro lado, también es cierto que la región del D-loop analizada es pequeña en relación con todo el genoma mitocondrial, el cual se compone de aproximadamente 16.5 kpb. Además, la baja cantidad de polimorfismos encontrados en esta región reduce la cantidad de información utilizable para los análisis realizados (Harrison, 1989). Por este motivo, la complementación del análisis de la región D-loop del mtDNA con marcadores SSR resulta adecuada para obtener una visión más completa sobre el estado de la especie.

En el presente estudio se desarrollaron 11 nuevos marcadores SSR homólogos para la especie que se espera que sean de gran utilidad para realizar estudios de genética poblacional de *T. ornatus* en otras localidades en su rango de distribución. Aunque si bien es cierto que estos marcadores aún representan una porción muy pequeña de todo el genoma de la especie, siguen siendo de gran utilidad debido a que son más baratos de implementar en comparación a otros marcadores nucleares o a análisis genómicos, y debido a que son altamente informativos (Oliveira et al., 2006; Selkoe & Toonen, 2006; Taberlet et al., 1999).

En cuanto a análisis realizados con marcadores microsatélites heterólogos,

Ruiz-García (2003) analizó muestras de oso de anteojos provenientes de Venezuela, Colombia y Ecuador utilizando 5 marcadores SSR heterólogos y encontró que los osos ecuatorianos poseían una baja diversidad genética ( $He = 0.24$ ), explicando esta observación por el aislamiento de dichas poblaciones. Dos años después, en un análisis con un número expandido de 7 marcadores heterólogos (Ruiz-García et al., 2005) se encontró una diversidad genética mayor ( $He = 0.403$ ). De igual manera, Viteri y Waits (2009), encontraron una diversidad genética moderada ( $He = 0.45$ ) al analizar 9 osos provenientes de la cuenca del Río Oyacachi, al norte de los Andes ecuatorianos, con 10 marcadores SSR heterólogos. En contexto con la población analizada en el presente estudio, esta población de la cuenca del Oyacachi se encuentra en la cordillera oriental de los Andes, mientras que la población analizada en el DMQ se encuentra en la cordillera occidental. Una vez dicho esto, para la población de osos del Distrito Metropolitano de Quito se encontró una diversidad genética moderada ( $He = 0.521$ ) con 11 marcadores analizados. Cabe recalcar que el set de marcadores desarrollado y utilizado en el presente estudio difiere de los estudios mencionados anteriormente. Por esta razón, las comparaciones entre este estudio y los otros estudios son limitadas. Esto se debe a que los marcadores utilizados en este estudio son, en su gran mayoría, de motivo de tetranucleótido, a diferencia de en los otros estudios ya mencionados en la cual los marcadores utilizados son de motivo de dinucleótido (Viteri & Waits, 2009). Esto es relevante ya que los microsatélites con motivo de dinucleótido tienen una tasa de mutación mayor en comparación a los de tetranucleótido. Por lo tanto, la aparición de nuevos alelos tomará más tiempo en aquellos microsatélite que sean

tetranucleótido, lo que impactará directamente a los índices de heterocigosidad obtenidos (Chakraborty, Kimmel, Stivers, Leslea, & Deka, 1997). De igual manera, la transferencia de los SSR heterólogos no ha sido completamente exitosa en la especie. Viteri y Watis (2009), reporta que ciertos marcadores heterólogos, como el G10L, funcionaron en unos estudios de oso andino, pero no en otros. Posiblemente esto se deba a la existencia de mutaciones puntuales en los sitios de hibridación de los primers, lo cual por un lado incrementa la probabilidad de que la amplificación del marcador falle, o de que no se detecten todos los alelos en un locus (alelos nulos) (Oliveira et al., 2006; Rossetto, 2001). Adicionalmente, el número de marcadores heterólogos y de individuos utilizados en todos los estudios de genética poblacional de oso andino que se han hecho hasta ahora ha sido diferente (Ruiz-Garcia, 2003; Ruiz-García et al., 2005; Viteri & Waits, 2009). Esto hace que las comparaciones sean limitadas gracias que el cálculo de los índices de heterocigosidad depende del número de marcadores utilizados, de si estos marcadores son los mismos entre estos estudios y del número de individuos utilizados (Nei, 1978).

Al dividir las muestras en diferentes grupos basado en la localidad de colección de las muestras respecto al río Guayllabamba y a la vía E28, se observa que la mayor diversidad genética se encuentra en las localidades existentes entre el río y la carretera ( $He = 0.52$ ), seguido por las localidades del norte del río ( $He=0.51$ ), y finalmente seguido por las localidades del sur de la vía ( $He=0.37$ ). De igual manera, en cuanto a la diversidad alélica, se observa el mismo patrón de diversidad. No obstante, cabe recalcar que el número de muestras analizadas en cada grupo es diferente entre sí, siendo este de 18

muestras, 5 muestras y 6 muestras respectivamente. Por esta razón, se tomó en cuenta este factor y se corrigió los valores obtenidos por rarefacción, y con esto se observa que claramente existen valores más bajos en el grupo de individuos proveniente del sur del carretero (Tabla 5).

En consecuencia, tanto el análisis de la región D-loop del mtDNA como el análisis con marcadores SSR sugieren que la población de oso de anteojos del DMQ posee una diversidad genética baja/moderada. Sin embargo, también se deben tomar en cuenta las limitaciones de los marcadores utilizados y del número reducido de individuos analizados (n=38 para mtDNA y n=28 para marcadores SSR), los cuales provienen de un área geográfica pequeña.

## **8.2. Análisis filogenético**

De acuerdo con el árbol MCC (Figura 4), el oso de cara corta de Norte América (*Arctodus simus*) apareció mucho más temprano que el oso de cara corta sudamericano (*Arctotherium* sp.), y la aparición de este último fue más reciente que el oso andino. Los resultados obtenidos al analizar la región hipervariable 1 del D-loop en el presente estudio son consistentes con los encontrados en análisis realizados utilizando información de todo el genoma mitocondrial de la subfamilia Tremarctinae, en los cuales se muestra que *Tremarctos ornatus* es un clado que apareció mucho más tarde en comparación a otras especies de la subfamilia, especies que ahora se encuentran extintas (Mitchell et al., 2016).

De acuerdo con el análisis, todos los haplotipos encontrados en el DMQ en este estudio corresponden a un grupo monofilético. Esto sugiere que la población de osos existente en el Distrito Metropolitano de Quito se originó de un solo

ancestro común en cuanto a su linaje materno (Figura 4). Dentro de este grupo, los haplotipos HTOQ1 y HTOQ3 comparten un mismo ancestro, que se separó del ancestro común de los haplotipos HTOQ2 y HTOQ4. HTOQ4, encontrado exclusivamente en los individuos al norte del Río Guayllabamba, está más relacionado a las secuencias externas incorporadas en el análisis cuyo origen es desconocido (Figura 5). Por lo tanto, es posible que éste sea un haplotipo ancestral y que los demás haplotipos del DMQ se hayan originado de éste y se distribuyeron posteriormente hacia el sur. Se sugiere esto en base a la hipótesis filogeográfica de que *T. ornatus* se origina en la parte norte de Sudamérica, o incluso, fuera de Sudamérica y que posteriormente se va radiando hacia el sur del continente (García-Rangel, 2012; Mitchell et al., 2016). No obstante, poco se puede discutir en cuanto a la historia evolutiva de *T. ornatus* debido a la falta de un registro fósil adecuado y de información genética proveniente de diferentes áreas geográficas. Si existiera esta información, se podría elaborar una hipótesis sobre el origen de las poblaciones del oso andino en el norte y sur de los Andes (García-Rangel, 2012).

### **8.3. Cuello de botella**

En cuanto a las pruebas de neutralidad realizadas con el análisis de la región D-loop, tanto la prueba  $D$  de Tajima como la prueba  $F_s$  de Fu rechazan la hipótesis de expansiones poblacionales o cuellos de botella recientes para la población del DMQ. Estas pruebas sugieren que la población no muestra una desviación de un modelo de evolución neutral. Estos resultados podrían ser producidos por el tamaño pequeño y efectivo de la población en esta especie, que intensifican los efectos de la deriva génica y podría tener un impacto en su



potencial adaptativo y viabilidad (Kahilainen, Puurtinen, & Kotiaho, 2014).

Esto es concordante con los resultados obtenidos del análisis de cuello de botella con los marcadores SSR, en los cuales no existe evidencia para la existencia de un cuello de botella bajo los modelos SSM y TPM. Sólo el modelo IAM sugiere la posibilidad de que uno de los grupos haya pasado por un cuello de botella. No obstante, este resultado no es conclusivo debido a que diferentes modelos de mutación para microsatélites pueden discordar entre sí (Oliveira et al., 2006). Ambos marcadores sugieren que la población de *T. ornatus* del DMQ no ha pasado por un cuello de botella reciente.

#### **8.4. Estructura poblacional**

El patrón de distribución de haplotipos en relación con las barreras físicas (Figura 5) es un indicio de que podría haber estructura poblacional en la población de osos analizada. Al analizar este patrón, se observa que HTOQ2 y HTOQ4 son más frecuentes en el norte del Río Guayllabamba. De estos dos, el haplotipo HTOQ4 resultó ser exclusivo de las localidades del norte del río (Figura 5). De acuerdo con Harrison (1989), el uso de secuencias de ADN mitocondrial tiene la capacidad de dar información sobre estructura poblacional. En consecuencia, debido a los patrones de distribución de los haplotipos, existe la posibilidad de que haya estructura poblacional en los osos del DMQ, y es posible que esta esté dada por fragmentación causada principalmente por el Río Guayllabamba, el cual ha estado presente por mucho tiempo, mucho más que la vía E28 antes ya mencionada. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que el patrón de frecuencias de los haplotipos observados en las diferentes localidades pueda estar dado como consecuencia de deriva génica o debido a

presiones selectivas que favorecieron a ciertos haplotipos que si bien es cierto, no son codificantes, sí están ligados a regiones que lo son (Lande, 1976).

En contraste, con los análisis llevados a cabo con los marcadores SSR (Figura 10), no se evidencia la existencia de una estructura poblacional de acuerdo con lo obtenido en *Structure* (Figura 10). A pesar de esto, el análisis de coordenadas principales (PCoA) sugiere que existe cierto nivel de diferenciación entre los grupos que habitan al sur del carretero y al norte del Río Guayllabamba (Figura 9). Esto concuerda con las distancias genéticas de *Nei* (Tabla 7) y de Weir y Cockerham *Fst* (Tabla 6 y Figura 8) cuyos valores son moderados para estas dos localidades. De acuerdo con la prueba de Mantel, estas diferencias entre grupos no se explican directamente por la distancia geográfica en la que se encontraron los individuos. No obstante, cabe recalcar que el área geográfica analizada es muy pequeña por lo que puede que no sea suficiente para observar estas diferencias (García-Rangel, 2012). Ruiz-García (2003) hace hincapié en que existe heterogeneidad genética entre diferentes poblaciones de osos, principalmente dada por un bajo flujo de genes. Esto podría causar que poblaciones de oso andino se aislen genéticamente por la distancia a la que se encuentran causando una problemática en la especie. Esto puede estar dado ecológicamente debido a que diferentes características topográficas como acantilados, barrancos, o cimas de montañas son usualmente seleccionadas por la especie como puntos de refugio o de acceso a recursos (García-Rangel, 2012). Además, la cobertura del bosque, la disponibilidad de agua, la pendiente de los bosques y la presencia de actividades humanas también modifican el uso de hábitat del oso. De igual manera, su patrón de alimentación oportunista hace

que los patrones de desplazamiento de la especie varíen en gran proporción en diferentes áreas (Cuesta et al., 2003).

Poca información existe en cuanto a la movilidad del oso. Se estima que este se desplaza entre 800 metros a 6 kilómetros por día (García-Rangel, 2012). No obstante, existe evidencia de que los osos usualmente regresan a los mismos sitios, especialmente cuando existe abundancia de recursos (Cuesta et al., 2003; García-Rangel, 2012). En un estudio realizado en el Distrito Metropolitano de Quito, se evidencia mediante información de recaptura utilizando cámaras trampa que algunos osos se mantienen cercanos a los mismos lugares en donde fueron registrados (Molina et al., 2017). Adicionalmente, existen reportes en otras especies de osos que la construcción de carreteros impacta negativamente a las poblaciones de estos reduciendo su hábitat y limitando su movilidad (Elgmork, 1978; McLellan & Shackleton, 1988).

Al considerar la posibilidad de diferencias de dispersión por sexo, la información disponible es escasa, y las estimaciones que se han hecho hasta ahora sobre esto en *T. ornatus* provienen de datos recolectados de un número pequeño de animales, los cuales en su mayoría han sido reintroducidos luego de haber permanecido en cautiverio. Es así como se conoce preliminarmente que es común que las hembras y los machos compartan los mismos espacios vitales. Adicionalmente, se ha reportado que las hembras tienen rangos de dispersión más reducidos que los machos, sin embargo, las razones de esto aún no están esclarecidas (García-Rangel, 2012). Resulta interesante que en el presente estudio la gran mayoría de la información recolectada proviene de individuos de sexo masculino (Tabla 1) lo cual posiblemente denota que los

machos tienen una mayor dispersión tal y como se sugiere en la literatura. Cabe recalcar, que en algunas muestras no fue posible la discriminación de sexo mediante la información de las cámaras trampa. Molina y sus colaboradores (2017) quienes analizaron detalladamente la información proveniente de las cámaras trampa utilizada en este estudio no mencionan detalles sobre dispersión por sexo o sobre el porcentaje de capturas de individuos clasificados por sexo. Debido a esto, resulta difícil realizar un análisis discriminatorio por sexo. Si bien es cierto, el ADN mitocondrial es capaz de proporcionar información en cuanto a los linajes maternos (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992), la falta de información sobre haplotipos del cromosoma Y, el cual da información sobre linajes paternos, hace difícil establecer una comparación directa entre estos (Su et al., 1999). Esto, en adición a que existe un gran sesgo de muestreo dado que casi la totalidad de los individuos analizados son machos imposibilita realizar una hipótesis adecuada sobre diferencia de dispersión de sexo.

### **8.5. Endogamia y parentesco**

Resulta interesante que al analizar las comparaciones entre pares de individuos de los estimadores de parentesco  $W$  (Figura 12), se evidencia que algunos de los coeficientes tienen un valor superior a 0.5, De acuerdo con Wang (2002), un valor de 0.5 indica que existe una relación de parentesco de padres-hijos o de hermanos, mientras que coeficientes menores, pero mayores a cero, indican una consanguineidad menor. No obstante, este rango se cumple cuando se asume que existe una población en la que no ocurre endogamia (Wang, 2002). Por lo tanto, este análisis sugiere la existencia de endogamia en la población analizada, la cual probablemente cause que muchos individuos

compartan más alelos de los que se esperaría incrementando el valor calculado de los estimadores de parentesco  $W$ . Al analizar los grupos de individuos, aquellos que habitan al sur del carretero son los que están más relacionados entre sí (Tabla 8) y presentan un mayor coeficiente de endogamia  $F$  (Figura 11). Esto sugiere que probablemente exista alguna razón por la que estos se reproduzcan en menor medida con individuos de otras localidades geográficas. De acuerdo con información obtenida de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 2012) en una evaluación del uso de suelo en las zonas montañosas del Ecuador (Figura 13), una gran parte de occidente del Distrito Metropolitano de Quito, al sur del área de estudio de la presente investigación, se ocupa para actividades agrícolas y más específicamente como zona de pasturas. Probablemente esto contribuya a reducir la movilidad de los osos hacia otras localidades más hacia el sur y viceversa, lo cual se sumaría al posible impacto causado por el carretero presente en la zona.

Adicionalmente, existen ciertos loci SSR y un grupo de individuos analizados que se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg. Ruiz-García (2005) sugiere que esta desviación del equilibrio está dada en gran medida por efecto Wahlund y por consanguineidad y que esto es especialmente relevante en las poblaciones ecuatorianas de oso de anteojos.

#### **8.6. Conservación del oso andino en el DMQ**

Es posible que la reducida diversidad genética observada en la población de osos analizada en conjunto con la posible diferenciación genética y endogamia estén causadas debido a la expansión de poblaciones humanas. Hoy en día, una

gran parte de la zona es utilizada para actividades agrícolas y ganaderas (FAO, 2012), contribuyendo dramáticamente a la reducción y fragmentación del hábitat del oso (García-Rangel, 2012). Además, conflictos oso-humano y la mala percepción de los lugareños en cuanto al oso han contribuido a la cacería y por lo tanto a la reducción del tamaño poblacional (García-Rangel, 2012; Sánchez-Mercado et al., 2008; Zukowski & Ormsby, 2016). Claramente, es necesario incrementar los esfuerzos para mejorar progresivamente la percepción de la especie y asegurar la persistencia de ésta, la cual es clave en la conservación y manejo del hábitat en la zona (García-Rangel, 2012; Kahilainen et al., 2014).

La necesidad para conservar la diversidad genética en esta especie se basa en dos argumentos. El primero es la relación directa entre la diversidad genética y la eficacia biológica o "*fitness*" de las poblaciones; el segundo es la necesidad de una diversidad genética alta para que ocurra evolución y que por lo tanto que la especie pueda ser capaz de adaptarse a cambios en el ambiente (Reed & Frankham, 2003). La reducción del tamaño de las poblaciones de una especie y la pérdida de diversidad genética en estas, están relacionadas a fenómenos de endogamia, lo que conlleva a la pérdida de la eficacia biológica y por ende a la reducción de la supervivencia de la especie a largo plazo (Kahilainen et al., 2014). Por esta razón, mejorar la conectividad de la especie, no solo en el Distrito Metropolitano de Quito sino en un área mucho más grande, ayudaría a fomentar el contacto entre individuos de diferentes zonas geográficas, para que éstos puedan reproducirse entre sí (Secretaría de Ambiente del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, 2014) de tal manera que se pueda mantener la diversidad genética de la especie.

Sumado a todo lo anterior, la conservación del oso de anteojos juega un rol muy importante en cuanto a la conservación de los ecosistemas andinos debido a su clasificación como especie paraguas en la región (Kattan et al., 2004; Peyton, Yerena, Rumiz, & Jorgenson, 1998). Dichos ecosistemas se caracterizan por ser muy biodiversos y por contener un alto grado de endemismo tanto en especies animales como vegetales. La región andina contiene la mayor cantidad de especies endémicas del planeta, respecto a aves y anfibios. Esta esta gran biodiversidad se debe a la cantidad de microclimas y microambientes que existen en todo el rango altitudinal de la región (Myers, Mittermeier, Mittermeier, Fonseca, & Kent, 2000). Es por ello que mediante la conservación del oso de anteojos, se contribuiría también a la conservación de un gran número de especies de manera directa e indirecta (García-Rangel, 2012).

### **8.7. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras**

Como se mencionó previamente, es importante recalcar que los resultados obtenidos al analizar la región D-loop deben ser interpretados con precaución dado que el ADN mitocondrial representa solo una pequeña porción del material genético de la especie. Así mismo, el ADN mitocondrial no se encuentra no ligado al genoma nuclear y no posee el mismo patrón de herencia que éste (Harrison, 1989). Es por ello que en algunos casos se puede observar discordancia entre resultados obtenidos con estudios de ADN mitocondrial y resultados obtenidos con marcadores de ADN nuclear (Harrison, 1989). Adicionalmente, el haber encontrado sólo dos sitios informativos proporciona poca información y poco poder estadístico para hacer inferencias poblacionales más robustas. Esto viene dado ya que al estudiar una región pequeña del

genoma mitocondrial, se tiene un poder de resolución mucho menor en comparación al estudio de todo el genoma mitocondrial, en el cual se esperaría encontrar una mayor variabilidad (Keis et al., 2013). A pesar de esto, estudiar la región D-loop sigue siendo una buena herramienta para analizar la diversidad genética de una especie debido a ser la parte más variable de todo el genoma mitocondrial (Stoneking, 2000).

Por otra parte, en el presente estudio se analizó un número pequeño de muestras, las cuales provienen de un área geográfica reducida que comprende menos del 1% del área total de distribución del oso andino (García-Rangel, 2012). Por esta razón, los resultados obtenidos en este estudio son relevantes solamente a nivel local. Sin embargo, resultaría interesante emplear los marcadores genéticos desarrollados en este estudio en muestras de individuos de otros lugares donde habita el oso de anteojos, lo cual permitiría entender de mejor manera la diversidad genética, estado poblacional y la existencia de grupos diferentes en la especie.



## 9. CONCLUSIONES

- Se encontraron sólo 4 haplotipos y muy pocos sitios polimórficos (2) en una región de ADN mitocondrial que, de acuerdo con la literatura, se espera que sea hipervariable.
- Se encontró una baja diversidad genética ( $H = 0.7005$ ,  $\pi = 0.001772$ ) al analizar la región hipervariable 1 (HVR1) del D-loop del mtDNA.
- Se diseñaron, estandarizaron y genotiparon exitosamente once marcadores SSR, los cuales permitieron evaluar la diversidad genética en área de estudio.
- Se encontró una diversidad genética moderada ( $H_e = 0.52$ ) al analizar la población de osos del DMQ con marcadores SSR.
- Se sugiere una diferenciación genética moderada entre los individuos de diferentes localidades ( $F_{st} = 0.069 - 0.137$ ).

## 10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar otras poblaciones de osos con los marcadores desarrollados y utilizados en este estudio para entender de mejor manera la diversidad genética en la especie.
- Se recomienda analizar una región más grande u otras regiones del ADN mitocondrial, las cuales potencialmente permitirían identificar una mayor cantidad de polimorfismos de utilidad para caracterizar de mejor manera la diversidad de haplotipos y de nucleótidos de la población analizada.
- Se recomienda utilizar un mayor número de marcadores SSR, para obtener una mayor cobertura de otras regiones del genoma e incrementar la robustez de los resultados obtenidos. Estos marcadores podrían ser diseñados y estandarizados con la metodología planteada en el presente estudio.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Ambaut, A., Rummond, A., Dong, X., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1 . 7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Benbouza, H., Jacquemin, J., Baudoin, J., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10(2), 77–81.
- Blacket, M., Robin, C., Good, R., Lee, S., & Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
- Bruque, M. G. (2016). *Análisis preliminar de diversidad genética de una población de osos andinos ( Tremarctos ornatus ) identificados en el Corredor Ecológico , al Noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito*. Universidad San Francisco de Quito.
- Cardillo, M., Purvis, A., Sechrest, W., Gittleman, J. L., Bielby, J., & Mace, G. M. (2004). Human population density and extinction risk in the world's carnivores. *PLoS Biology*, 2(7), 909–914. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020197>
- Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D., Leslea, D., & Deka, R. (1997).

Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(February), 1041–1046.

Clark, L., & Jasieniuk, M. (2011). Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>

Codon Code Corporation. (2017). Codon Code Aligner. Retrieved from  
<https://www.codoncode.com>

Concejo Metropolitano de Quito. (2013). Resolución No. 431. Quito.

Cuesta, F., Peralvo, M. F., Manen, F. T. Van, Cuesta, F., Peralvo, M. F., Manen, F. T. Van, ... Box, P. O. (2003). Andean Bear Habitat Use in the Oyacachi River Basin , Ecuador Published by: International Association for Bear Research and Management Stable URL :  
<http://www.jstor.org/stable/3873019> Andean bear habitat use in the Oyacachi River Basin , Ecuador. *Ursus*, 14(2), 198–209.

Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4), 1–20.

Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.  
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

- Elgmork, K. (1978). Human impact on a brown bear population (*Ursus arctos* L.). *Biological Conservation*, 13(2), 81–103. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(78\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(78)90063-0)
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ( version 3 . 0 ): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0730-7>
- FAO. (2012). Diagnóstico Nacional de Montañas de la República del Ecuador. Retrieved from [http://www.fao.org/fileadmin/templates/mountain\\_partnership/doc/TCP\\_Andes/Diagnóstico\\_de\\_Montañas\\_del\\_Ecuador\\_final.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/mountain_partnership/doc/TCP_Andes/Diagnóstico_de_Montañas_del_Ecuador_final.pdf)
- Fluxus-Engineering. (2017). Free Phylogenetic Network Software. Retrieved from <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925. <https://doi.org/genetics.org//147/2/915>
- García-Rangel, S. (2012). Andean bear *Tremarctos ornatus* natural history and

conservation. *Mammal Review*, 42(2), 85–119.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00207.x>

Goldstein, I. (1991). Are spectacled bear's tree nests feeding platforms or

resting places? *Mammalia*. <https://doi.org/10.1515/mamm.1991.55.3.433>

Goldstein, I., Velez-Liendo, X., Paisley, S., & Garshelis, D. (2008). *Tremarctos*

*ornatus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2008.*, 8235,

eT22066A9355162.

Goudet, J., & Thibaut, J. (2015). Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical

F-Statistics. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=hierfstat>

Harrison, R. G. (1989). Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in

Population and Evolutionary Biology. *Trends in Ecology and Evolution*,

4(7), 6–11.

Holland, M., & Parson, W. (2010). GeneMarker® HID: A Reliable Software Tool

for the Analysis of Forensic STR Data. *Journal of Forensic Sciences*, 56(1),

29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01565.x>

Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in

Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254–367.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>

Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and

Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3), 299–

314. <https://doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713>

Jambart, T. (2008). Adegnet: a R package for the multivariate analysis of

genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>

- Jun, J., Hoon, S., Jeong, H. T., Chul, H., Byoungyoon, P., & Myounghai, L. (2011). Wildlife forensics using mitochondrial DNA sequences : Species identification based on hairs collected in the field and confiscated tanned Felidae leathers. *Genes & Genomics*, *33*, 721–726.  
<https://doi.org/10.1007/s13258-011-0080-7>
- Kahilainen, A., Puurtinen, M., & Kotiaho, J. S. (2014). Conservation implications of species-genetic diversity correlations. *Global Ecology and Conservation*, *2*, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2014.10.013>
- Kalinowski, S. T. (2004). Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, *5*, 539–543.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041021.91777.1a>
- Kalinowski, S. T. (2005). HP-RARE 1.0 : a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, *5*, 187–189. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x>
- Kamvar, Z. ., Tabarima, J. ., & Grünwald, N. . (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peer J*, *2*, 281.
- Kattan, G., Hernández, O. L., Goldstein, I., Rojas, V., Murillo, O., Gómez, C., ... Cuesta, F. (2004). Range fragmentation in the spectacled bear *Tremarctos ornatus* in the northern Andes. *Oryx*, *38*(02), 155–163.  
<https://doi.org/10.1017/S0030605304000298>
- Kawabe, K., Worawut, R., Taura, S., Shimogiri, T., Nishida, T., & Okamoto, S. (2014). Genetic diversity of mtDNA D-loop polymorphisms in laotian native fowl populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *27*(1),

19–23. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13443>

Keenan, K., McGinnity, P., Cros, T. ., & Crozier, W. . (2013). DiveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>

Keis, M., Remm, J., Ho, S. Y. W., Davison, J., Tammeleht, E., Tumanov, I. L., ... Saarma, U. (2013). Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. *Journal of Biogeography*, *40*(5), 915–927. <https://doi.org/10.1111/jbi.12043>

Kim, Y. K., Hong, Y. J., Min, M. S., Kim, K. S., Kim, Y. J., Voloshina, I., ... Lee, H. (2011). Genetic status of asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) reintroduced into South Korea based on mitochondrial DNA and microsatellite loci analysis. *Journal of Heredity*, *102*(2), 165–174.

<https://doi.org/10.1093/jhered/esq121>

Krause, J., Unger, T., Noçon, A., Malaspinas, A.-S., Kolokotronis, S.-O., Stiller, M., ... Hofreiter, M. (2008). Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary.

*BMC Evolutionary Biology*, *8*, 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-220>

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, *9*(4), 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>

Kumar, V., Lammers, F., Bidon, T., Pfenninger, M., Kolter, L., Nilsson, M. A., & Janke, A. (2017). The evolutionary history of bears is characterized by



gene flow across species. *Scientific Reports*, (April), 46487.

<https://doi.org/10.1038/srep46487>

Kutschera, V. E., Frosch, C., Janke, A., Skírnisson, K., Bidon, T., Lecomte, N., ... Hailer, F. (2016). High genetic variability of vagrant polar bears illustrates importance of population connectivity in fragmented sea ice habitats. *Animal Conservation*, 19(4), 337–349.

<https://doi.org/10.1111/acv.12250>

Lande, R. (1976). Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. *Evolution*, 30, 314–334.

Lischer, H. E. L., & Excoffier, L. (2012). PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298–299.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>

Luikart, P. S., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90(47), 502–503.

<https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>

Ma, Z., Zhong, J., Han, J., Xu, J., Bai, W., & Li, J. (2010). Genetic diversity and demographic history of wild Yak ( *Bos grunniens mutus* ) inferred from mtDNA D-loop sequences, 9(46), 7805–7810.

<https://doi.org/10.5897/AJB10.1074>

Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool.

Matsushashi, T., Masuda, R., Mano, T., & Yoshida, M. C. (1999). Microevolution of the mitochondrial DNA control region in the Japanese brown bear (*Ursus*

arctos) population. *Molecular Biology and Evolution*, 16(5), 676–684.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026150>

McLellan, B., & Shackleton, D. (1988). Grizzly Bears and Resource-Extraction Industries : Effects of Roads on Behaviour , Habitat Use and Demography. *Journal of Applied Ecology*, 25(2), 451–460.

Mitchell, K. J., Bray, S. C., Bover, P., Soibelzon, L., Schubert, B. W., Prevosti, F., ... Cooper, A. (2016). Ancient mitochondrial DNA reveals convergent evolution of giant short-faced bears (Tremarctinae) in North and South America. *Biology Letters*, 12(4), 20160062.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0062>

Molina, S. (2012). *Análisis preliminar de la dinámica poblacional y amenazas del oso andino (Tremarctos ornatus) al nor-occidente del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ)-Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito, Quito.

Molina, S., Fuller, A. K., Morin, D. J., Royle, J. A., Molina, S., Fuller, A. K., ... Royle, J. A. (2017). Use of spatial capture – recapture to estimate density of Andean bears in northern Ecuador Use of spatial capture – recapture to estimate density of Andean bears in northern Ecuador. *Ursus*, 28(1), 117–126. <https://doi.org/10.2192/URSUS-D-16-00030.1>

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. d., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(February), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>

Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.*, 41(2), 225–233.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1977.tb01918.x>

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, *89*, 583–590.

Newton, M. A., & Raftery, A. E. (1994). Approximate Bayesian Inference with the Weighted Likelihood Bootstrap. *Journal of the Royal Statistical Society*, *56*(1), 3–48.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, *29*(2), 294–307.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>

Paradis, E. (2010). Pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, *26*, 419–420.

Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, *20*(289), 290.

Peyton, B. (1980). Ecology, Distribution, and Food Habits of Spectacled Bears, *Tremarctos ornatus*, in Peru. *Journal of Mammalogy*, *61*(4), 639–652.

<https://doi.org/10.2307/1380309>

Peyton, B., Yerena, E., Rumiz, D. I., & Jorgenson, J. (1998). Status of Wild Andean Bears and Policies for Their Management Jorge Orejuela Source : *Ursus* , Vol . 10 , A Selection of Papers from the Tenth International Conference on Bear Research and Management , Fairbanks , Alaska , July 1995 , and Mora , Sweden , P, *10*(July 1995), 87–100. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3873115>

Ponomarev, A. G., Tatarinova, T. D., Bubyakina, V. V, Smagulova, F. O.,

Morozov, I. V, Kashentseva, T. A., & Solomonov, N. G. (2004). Genetic diversity in Siberian crane (*Grus leucogeranus*) based on mitochondrial DNA D-loop polymorphism. *Doklady Akademii Nauk*, 397(3), 424–426.

Retrieved from

[http://search.proquest.com/docview/13246187?accountid=10223%5Cnhttp://condor.library.colostate.edu/sfx\\_local?url\\_ver=Z39.88-](http://search.proquest.com/docview/13246187?accountid=10223%5Cnhttp://condor.library.colostate.edu/sfx_local?url_ver=Z39.88-)

[2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Azoologicalrecord&atitle=Genetic+diversity+in+Siberian+c](http://search.proquest.com/docview/13246187?accountid=10223%5Cnhttp://condor.library.colostate.edu/sfx_local?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Azoologicalrecord&atitle=Genetic+diversity+in+Siberian+c)

Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Á., & Lareu, M. (2013). An overview of STRUCTURE : applications , parameter settings , and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4(May), 1–13.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945–959.

Qu, W., Zhou, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, X., Zhao, D., ... Zhang, C. (2012). MFEprimer-2.0: A fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 205–208.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks552>

R core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.

Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from

<https://www.r-project.org/>.

Randi, E., Gentile, L., Boscagli, G., Huber, D., & Roth, H. U. (1994).

Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos*) populations. Lessons for conservation. *Heredity*.

<https://doi.org/10.1038/hdy.1994.146>

Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, *17*(1), 230–237.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>

Rossetto, M. (2001). Chapter 14: Sourcing of SSR Markers from Related. In *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of plants* (pp. 211–220).

Rousset, F. (2008). A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 103–106.

<https://doi.org/dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>

Ruiz-Garcia, M. (2003). Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the northern Andean area. *Hereditas*, *93*, 81–93.

Ruiz-garcía, M. (2003). El oso andino, evolución y conservación: Una sorprendente historia contenida en sus genes., 20–27.

Ruiz-García, M., Orozco-terWengel, P., Castellanos, A., & Arias, L. (2005). Microsatellite Analysis of the Spectacled Bear (*Tremarctos ornatus*) Across its Range Distribution. *Genes & Genetic Systems*, *80*(1), 57–69.

<https://doi.org/10.1266/ggs.80.57>

Ruiz-Martinez, M. C., Berkaj, J., Belenkii, A., Foret, F., Miller, A. W., & Karger, B. L. (1993). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis with Replaceable Linear Polyacrylamide and Laser- Induced Fluorescence Detection. *Annals of Chemistry*, *65*(1), 2851–2858.

Sánchez-Mercado, A., Ferrer-Paris, J. R. J. R. J. R., Yerena, E., García-Rangel, S., Rodríguez-Clark, K. M., Sanchez-Mercado, A., ... Rodríguez-Clark, K.

M. (2008). Factors affecting poaching risk to Vulnerable Andean bears *Tremarctos ornatus* in the Cordillera de Merida, Venezuela: space, parks and people. *Oryx*, 42(3), 437–447.

<https://doi.org/10.1017/S0030605308006996>

Secretaría de Ambiente del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito.

(2014). *Consolidación del corredor natural para el oso andino (Tremarctos ornatus) al nor occidente del DMQ*. Quito.

Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>

Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233–241. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>

Stoneking, M. (2000). Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots. *The American Journal of Human Genetics*, 67(4), 1029–1032. <https://doi.org/10.1086/303092>

Su, B., Xiao, J., Underhill, P., Deka, R., Zhang, W., Akey, J., ... Jin, L. (1999). Y-Chromosome Evidence for a Northward Migration of Modern Humans into Eastern Asia during the Last Ice Age. *The American Journal of Human Genetics*, 65(6), 1718–1724. <https://doi.org/10.1086/302680>

Taberlet, P., Waits, L. P., & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8), 323–327.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.

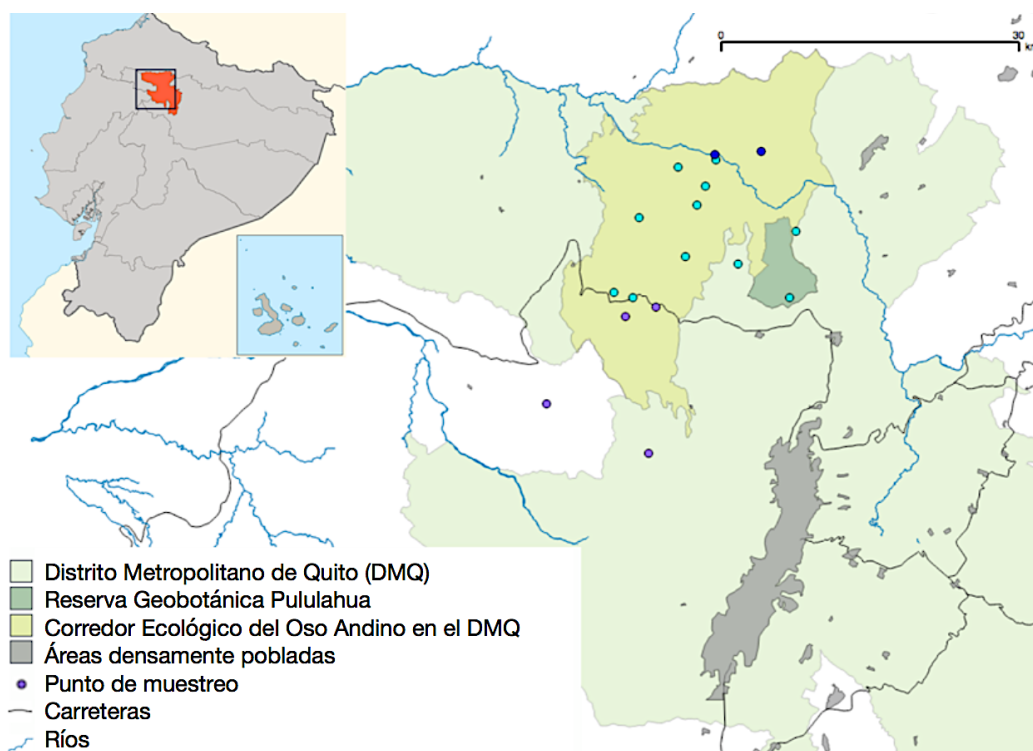
<https://doi.org/PMC1203831>

- Thermo Fisher Scientific. (2009). *T042 - Technical Bulletin: 260/280 and 260/230 Ratios*. Wilmington, Delaware, USA. Retrieved from <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vela, I., Vázquez, G., Galindo, J., & Pérez, J. (2011). El oso Andino sudamericano, su importancia y conservación. *Ciencia (Revista de La Academia Mexicana de Ciencias)*, *62*, 44–51.
- Viguera, E., Canceill, D., & Ehrlich, S. D. (2001). In vitro Replication Slippage by DNA Polymerases from Thermophilic Organisms. *Journal of Molecular Biology*, *312*, 323–333. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4943>
- Viteri, M. P., & Waits, L. P. (2009). Identifying polymorphic microsatellite loci for Andean bear research. *Ursus*, *20*(2), 102–108. <https://doi.org/10.2192/09gr004.1>
- Waits, L. P., Talbot, S. L., Ward, R. H., & Shields, G. F. (1998). Mitochondrial DNA Phylogeography of the North American Brown Bear and Implications for Conservation. *Conservation Biology*, *12*(2), 408–417. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.96351.x>
- Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, *160*(3), 1203–1215. <https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.531>
- Wang, J. (2011). Coancestry: A program for simulating, estimating and

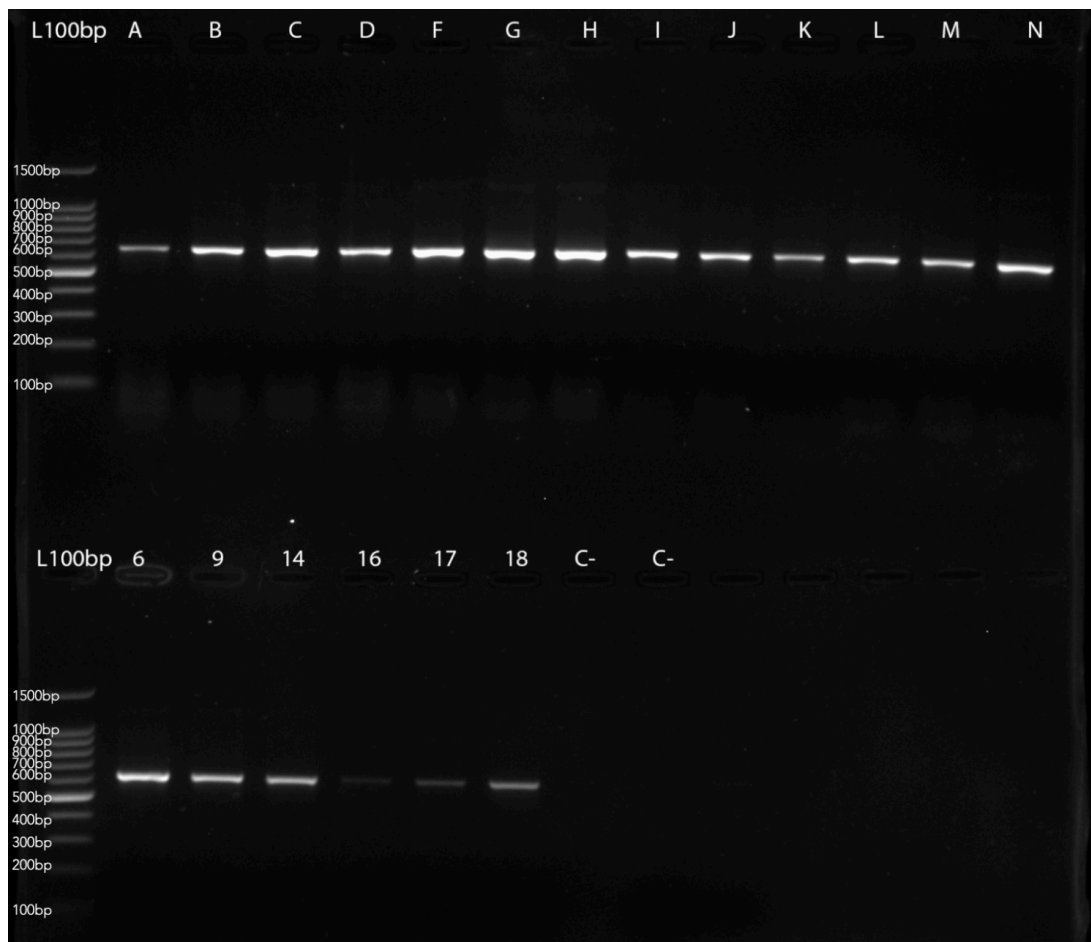
- analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 141–145. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x>
- Weir, B. S. (1996). *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yu, L., Li, Y.-W., Ryder, O. A., & Zhang, Y.-P. (2007). Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 198–208. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-198>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
- Zukowski, B., & Ormsby, A. (2016). Andean Bear Livestock Depredation and Community Perceptions in Northern Ecuador. *Human Dimensions of Wildlife*, 1209(February), 1–16. <https://doi.org/10.1080/10871209.2015.1126871>



## 12.FIGURAS



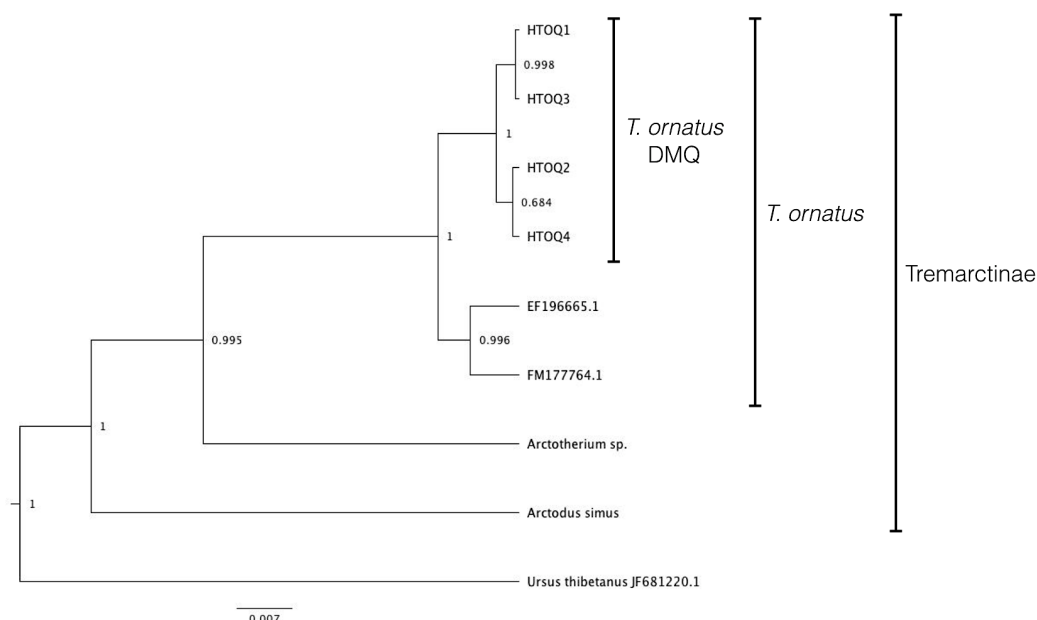
**Figura 1: Mapa del área de estudio y los sitios de colección de muestras.** En el mapa se evidencia el área delimitada de la fase 1 del Corredor Ecológico del Oso Andino del Distrito Metropolitano de Quito sombreada en amarillo verdoso. Las líneas negras representan carreteras mientras que las azules representan ríos. Los sitios de muestreo con cámara trampa corresponden a los puntos en el mapa. Mapa construido en el programa Q-GIS por Darío Cueva con datos provistos por Santiago Molina.



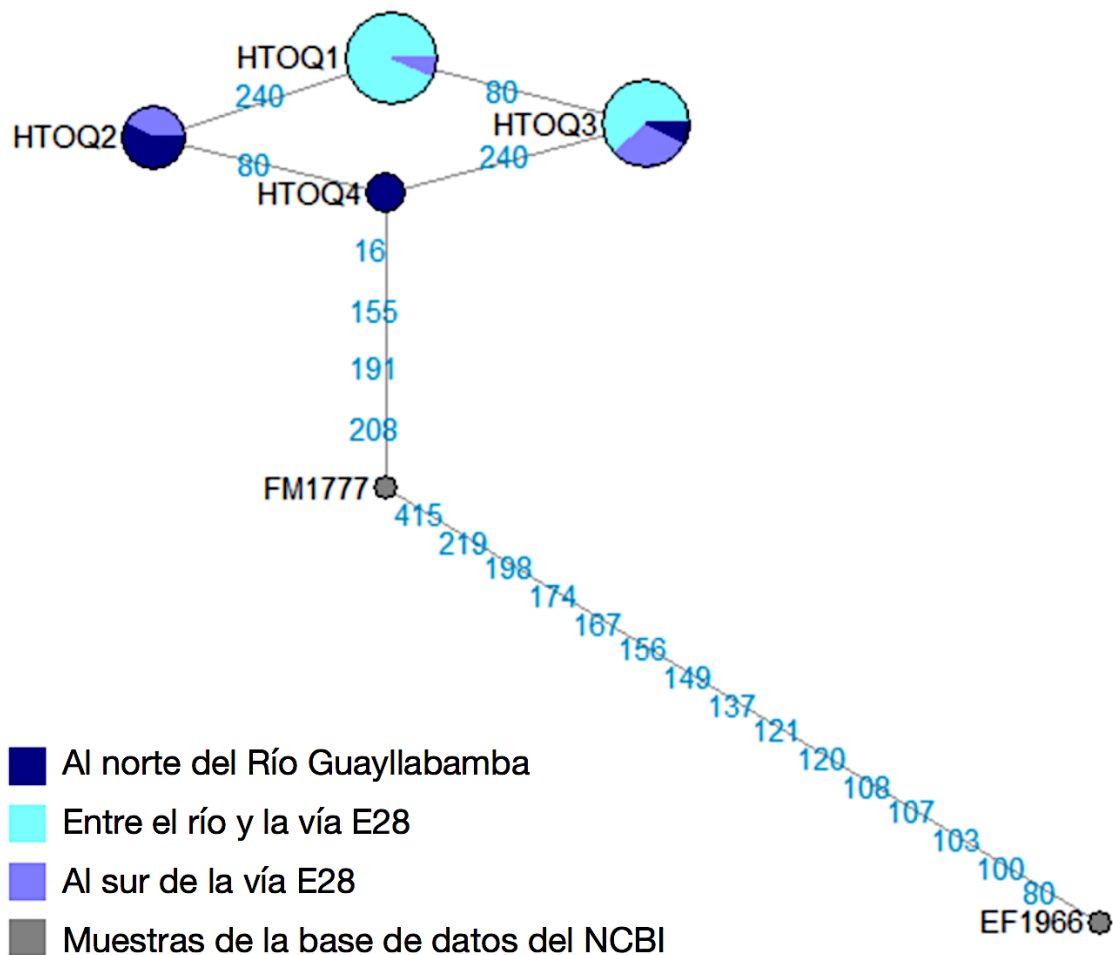
**Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de la región D-loop del mtDNA de *T. ornatus*.** En el gel se evidencia la presencia de la amplificación exitosa de la región HVR1 del mtDNA de *T. ornatus* en algunas muestras del estudio. El tamaño esperado del amplicón es de 615 pares de bases.

Haplotipo	<i>n</i>		Posición					
			1	104	168	236	270	286
FM177764.1		tRNA-Pro	T	T	T	C	C	G
HTOQ1	15	tRNA-Pro	C	—	C	T	T	A
HTOQ2	7	tRNA-Pro	C	—	C	T	T	G
HTOQ3	13	tRNA-Pro	C	T	C	T	T	A
HTOQ4	3	tRNA-Pro	C	T	C	T	T	G

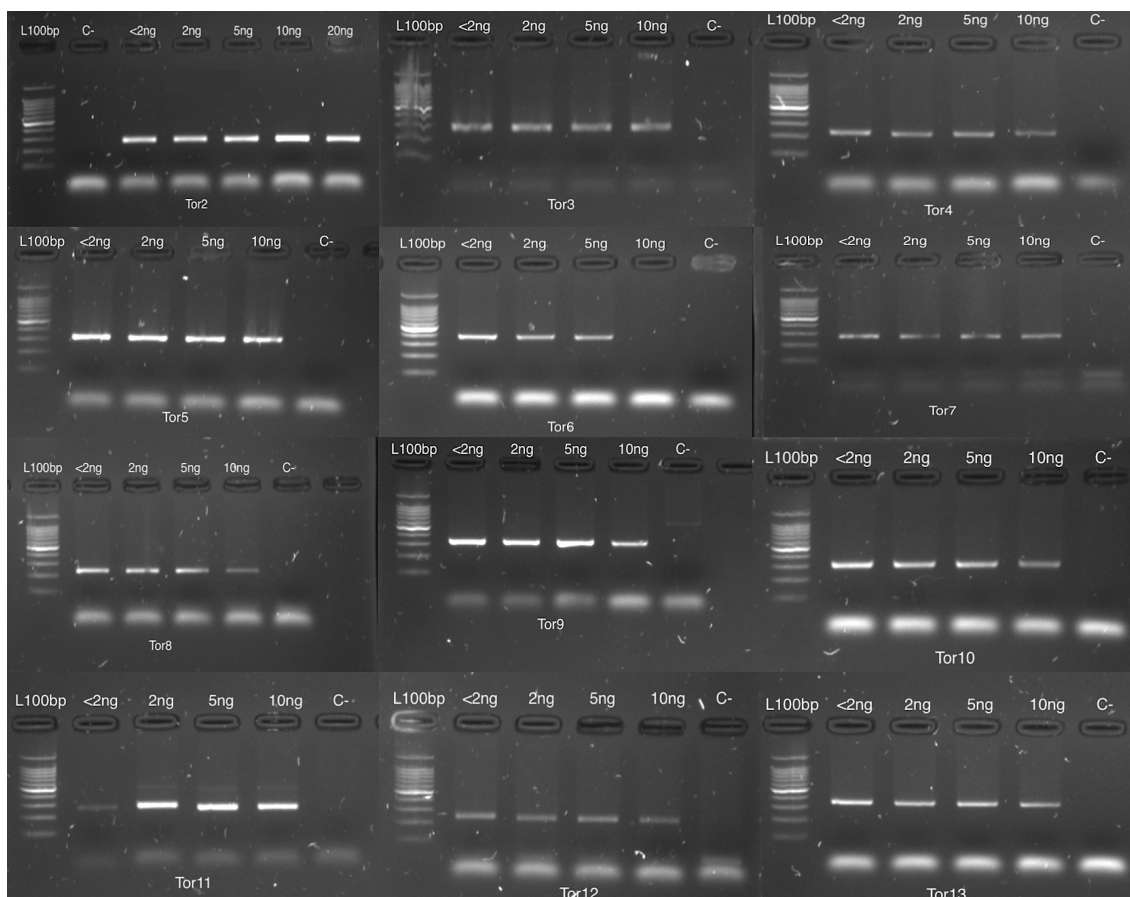
**Figura 3: Sitios polimórficos encontrados en la región hipervariable 1 del D-loop del ADN mitocondrial de *Tremarctos ornatus*.** Los 2 sitios polimórficos encontrados en la población analizada están localizados a 168 y 318 pares de bases a partir del primer nucleótido de la región codificante para tRNA de prolina en el mtDNA. El número de individuos en los que se encontró cada haplotipo encontrado en el estudio se muestra a la derecha del nombre de este.



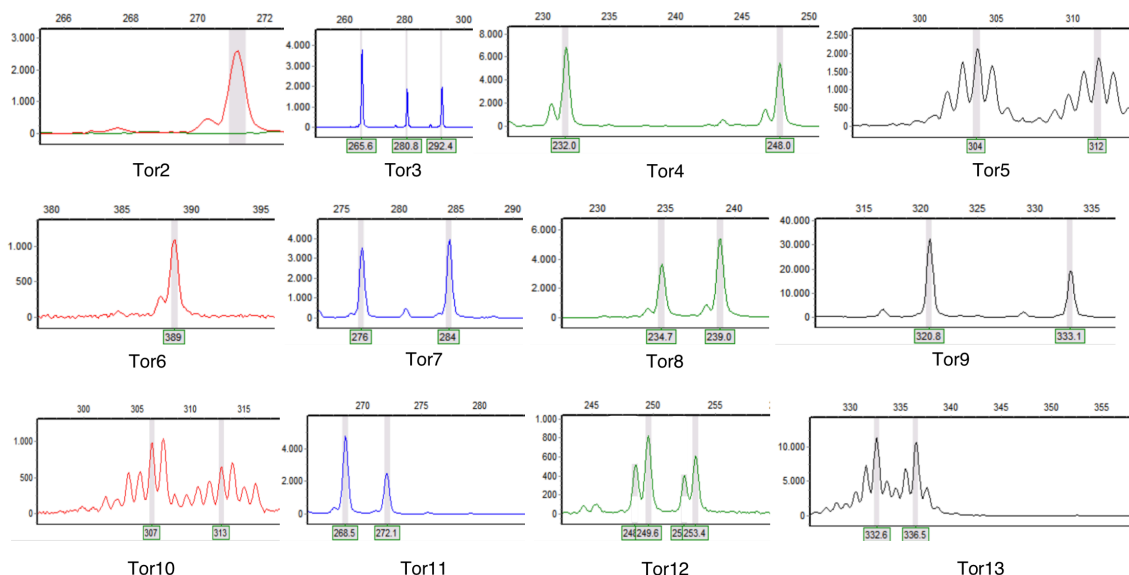
**Figura 4: Árbol *Maximum Clade Credibility* (MCC) representando las relaciones filogenéticas de *T. ornatus* en relación con la subfamilia Tremarctinae resultado del análisis de la región parcial del D-loop.** Los valores de soporte de los nodos (probabilidad posterior) están dados para cada clado. *Actotherium sp.* y *Arctodus sp.* se encuentran extintos, siendo *T. ornatus* el único miembro restante en la subfamilia Tremarctinae. Otras dos secuencias de *T. ornatus* disponibles en la base de datos del NCBI bajo las accesiones FM177764.1 y EF196665.1 fueron incorporadas en el análisis.



**Figura 5: Red de haplotipos *median joining* construida mediante el método de *maximum-parsimony* usando el software *Phylogenetic Network*. Los diámetros de los nodos en la red son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos encontradas y los colores de los nodos representan la procedencia de las muestras según la barrera evaluada. Las posiciones en donde existe una mutación se muestran entre los nodos. La numeración empieza desde el primer nucleótido en referencia a los haplotipos HTOQx reportados en la base de datos de nucleótidos del NCBI. Las regiones homólogas de las accesiones FM177764.1 y EF196665.1 fueron incorporadas en la red.**

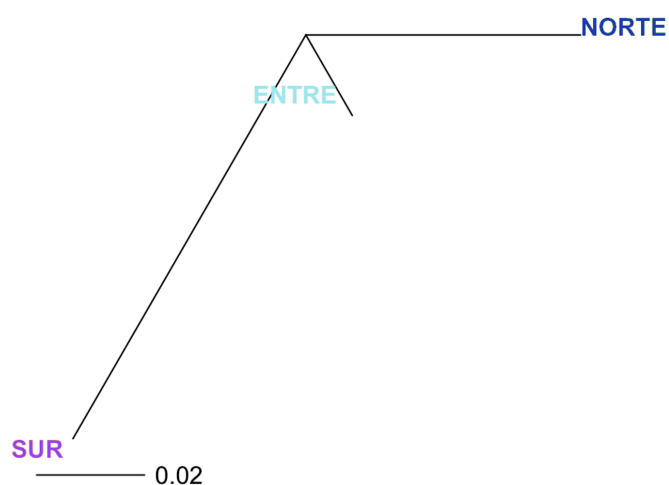


**Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los marcadores SSR.** En el gel se evidencia la presencia de la amplificación exitosa con los primers desarrollados en el presente estudio. De derecha a izquierda y de arriba abajo: Tor2, Tor3, Tor4, Tor5, Tor6, Tor7, Tor8, Tor9, Tor10, Tor11, Tor12, Tor13. Se utilizó una muestra del estudio en diferentes concentraciones de ADN para las pruebas de estandarización. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo de acuerdo con lo establecido en la sección 6.10. Los tamaños obtenidos en la amplificación de cada marcador fueron concordantes con los tamaños esperados en base al diseño de primers (Tabla 2) y en ningún caso se obtuvieron bandas inespecíficas.

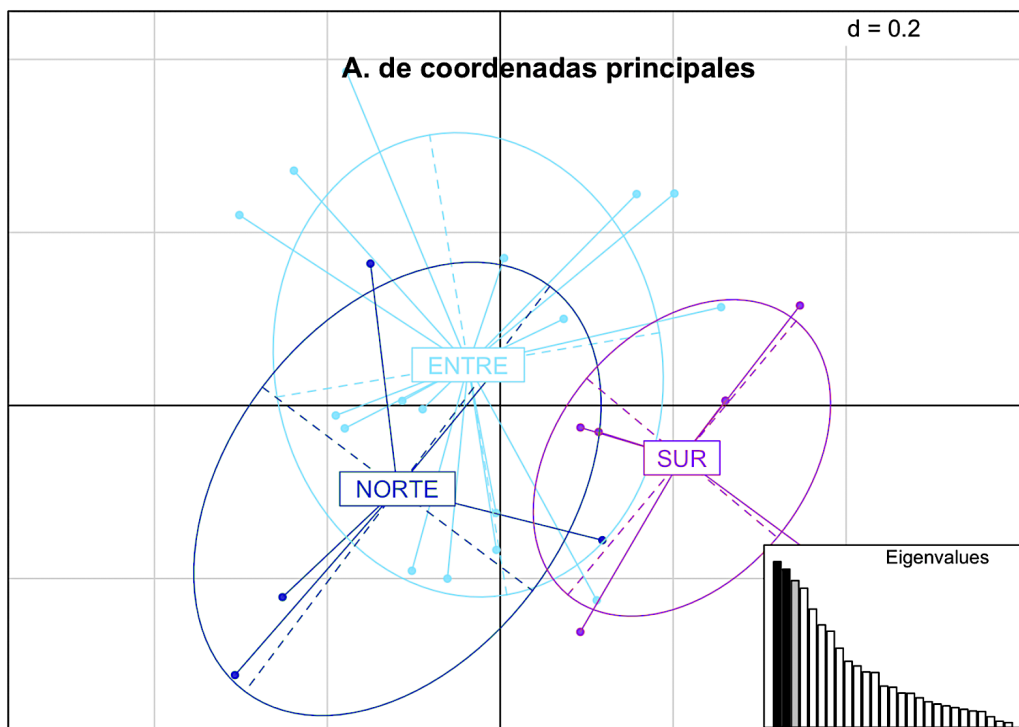


**Figura 7: Electroferograma resultado del genotipado de los distintos marcadores mediante electroforesis capilar.** Se evidencia la presencia de alelos en cada uno de los marcadores. El pico seleccionado como alelo se encuentra sombreado en color gris. En los picos, el color rojo corresponde al fluoróforo PET, azul a 6-Fam, verde a VIC y negro a NED. De derecha a izquierda y de arriba abajo: Tor2, Tor3, Tor4, Tor5, Tor6, Tor7, Tor8, Tor9, Tor10, Tor11, Tor12, Tor13. Se evidencia que la discriminación de alelos es clara en todos los marcadores a excepción de Tor3 en donde existen múltiples picos. Se excluyó a este marcador de los análisis.

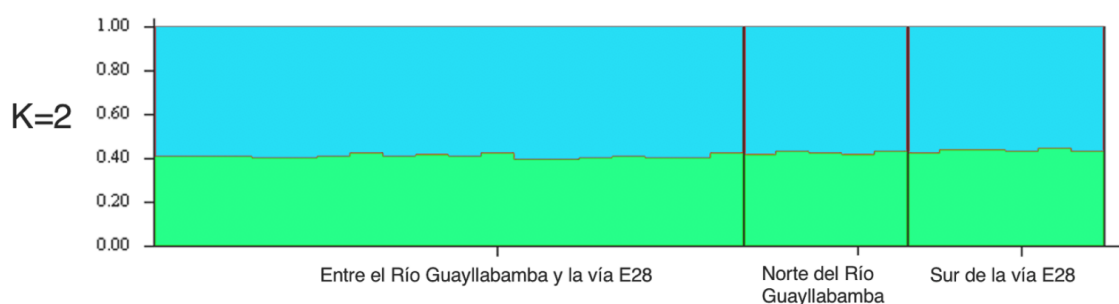
### Neighbour Joining by Fst



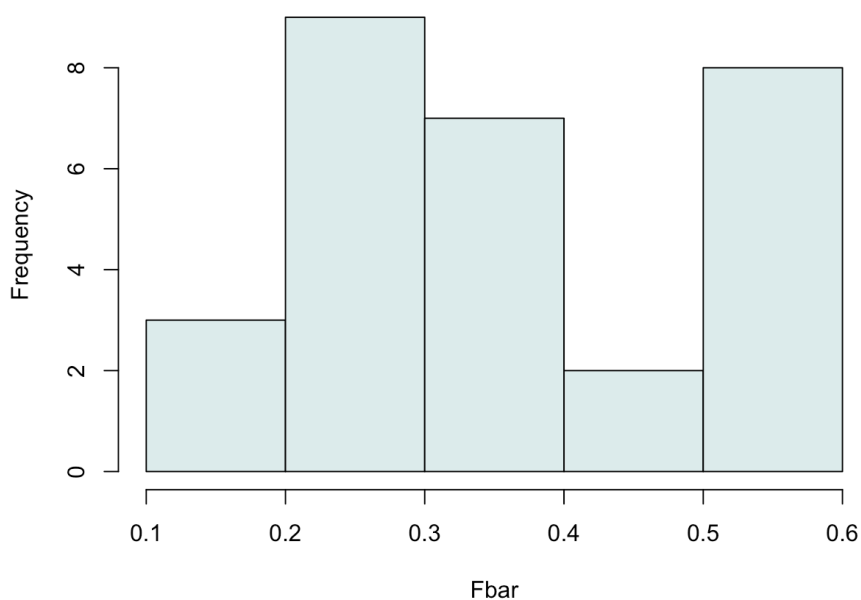
**Figura 8: Dendrograma entre diferentes localidades construido mediante el método *Neighbour Joining* utilizando los valores de Weir y Cockerham *Fst*.** Se observa que la mayor distancia es aquella de los individuos de norte del río y los individuos sur de la vía E28.



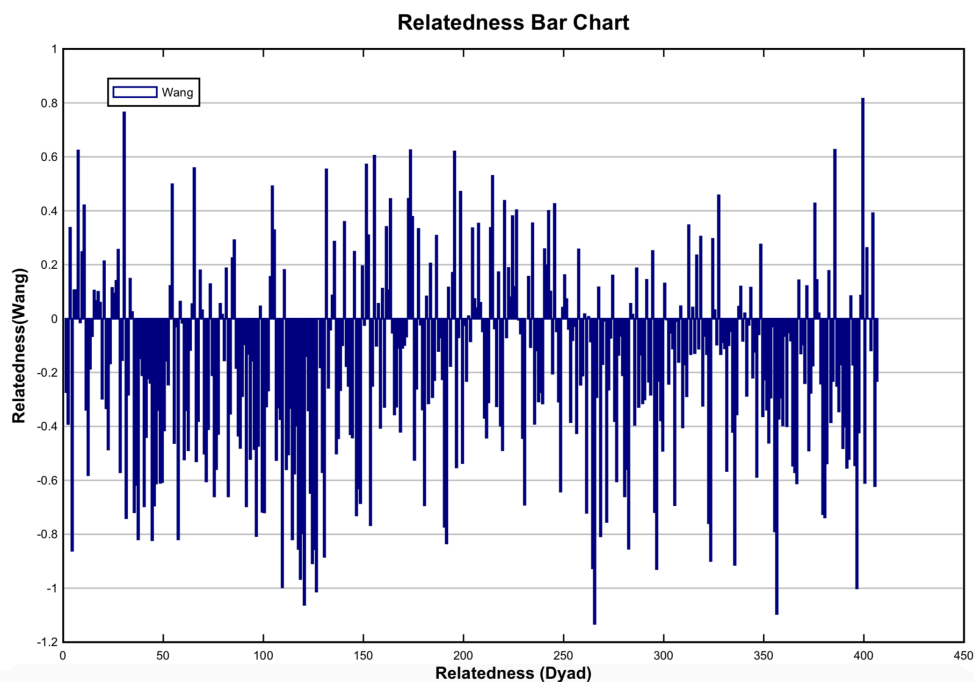
**Figura 9: Gráfico de 2 ejes derivado del análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando los dos primeros componentes.** El primer componente en el eje de las abscisas explica el 15.01% y el segundo componente en el eje de las ordenadas representa el 14.33% de la variabilidad. En el gráfico no se evidencia una separación completa entre los grupos de individuos de diferentes localidades al haber sobre posición entre los círculos que representan a los 3 grupos. Sin embargo, se aprecia que los individuos ubicados al norte del Río Guayllabamba se separan en mayor medida de aquellos que se encuentran al sur de la vía E28 al haber poco sobre posición entre estos.



**Figura 10: Gráfico de coeficientes de asignación de cada individuo obtenidos en el programa *Structure* para la población de oso andino del DMQ con un K óptimo de 2.** Se aprecia que no existe estructura poblacional en los grupos de individuos analizados al no haber una dominancia de un linaje en particular en cada uno de estos.

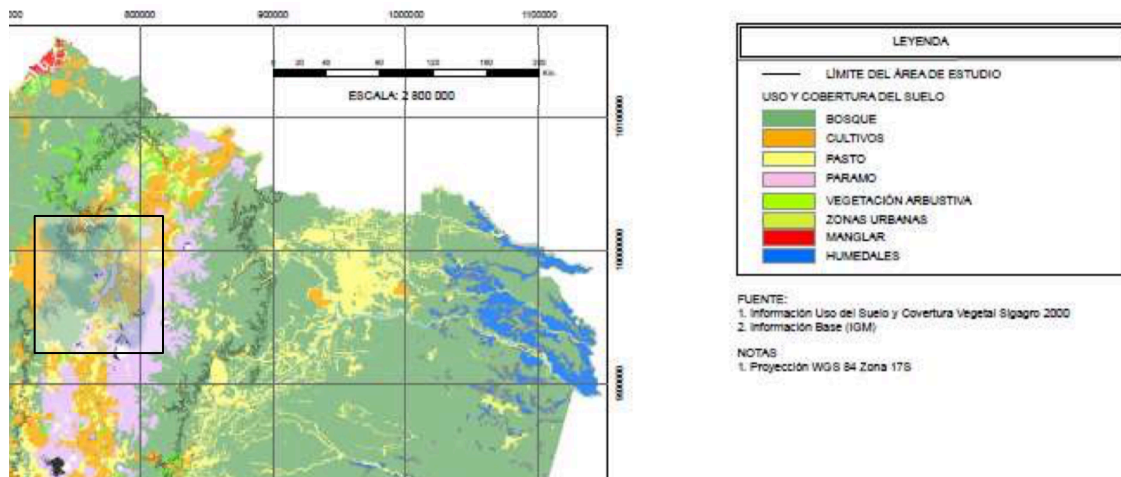


**Figura 11: Histograma de los coeficientes de endogamia ( $F$ ) obtenido para la población de osos del DMQ.** Existen 8 individuos que tienen un coeficiente de endogamia mayor a 0.5. Estos individuos son de acuerdo con los códigos asignados 2, 20 y 23 (al norte del río), 9 (entre el río y la vía E28), y 11, 19, 24 y 25 (al sur de la vía E28).



**Figura 12: Índices de estimador de parentesco  $W$  entre pares de individuos de la población de osos.** Se evidencia como muchos individuos tienen cierto nivel de relación entre sí al tener valores de “relatedness ( $W$ )” positivos.





**Figura 13. Mapa de las zonas montañosas según altitud, uso de suelo y cobertura vegetal en el Ecuador.** Imagen extraída de una consultaría realizada para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2012. El recuadro superpuesto sombreado en gris corresponde el área geográfica del Distrito Metropolitano de Quito.

## 13. TABLAS

**Tabla 1:** Detalle de las muestras utilizadas en el presente estudio. ND: No definido.

Código muestra	Individuo	Sexo	Localidad	Lado de las barreras	Haplotipo	Análisis con marcadores microsatélites
1	O1H3M	ND	LULUBAMBA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
2	Ind7	ND	EL CHIVO	Entre río y la vía E28	HTOQ3	Sí
3	23M8	Macho	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ2	Sí
4	Ind2	ND	BELLAVISTA 3	Entre río y la vía E28	HTOQ1	No
5	25M9	Macho	GAVILANES	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
6	26M10	Macho	LULUBAMBA	Entre río y la vía E28	HTOQ3	No
7	5M5	Macho	LULUBAMBA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
8	20I	ND	GAVILANES	Entre río y la vía E28	HTOQ1	No
9	13O1H2	ND	BELLAVISTA3	Entre río y la vía E28	HTOQ3	Sí
10	No identificado	ND	BELLAVISTA3	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
11	No identificado	ND	PAHUMA	Sur de la vía E28	HTOQ1	Sí
12	No identificado	ND	PAHUMA	Sur de la vía E28	HTOQ3	Sí
13	No identificado	ND	LULUBAMBA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
14	No identificado	ND	LULUBAMBA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	No
15	No identificado	ND	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ2	Sí
16	No identificado	ND	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ3	No
17	Possible Individuo nuevo (OSO DE CARA NEGRA)	ND	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ2	Sí
18	23M8	Macho	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ4	No
19	No identificado	ND	NANEGALITO	Sur de la vía E28	HTOQ3	Sí
20	30M13	Macho	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ4	Sí
21	29M12 o 34I	Macho	MINDO	Sur de la vía E28	HTOQ3	Sí
22	03H1M	ND		Entre río y la vía E28	HTOQ2	Sí
23	27M11	Macho	CAMBUGAN	Norte del río	HTOQ4	Sí
24	No identificado	ND	MINDO	Sur de la vía E28	HTOQ3	Sí
25	No identificado	ND	VERDECOCHA	Sur de la vía E28	HTOQ3	Sí
A	Ind 2	ND	HORIZONTES RIVERA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	No
B	25M9	Macho	EL PORVENIR	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
C	5M5	Macho	CAMPAMENTO	Entre río y la vía E28	HTOQ2	Sí
D	21M7	Macho	BELLAVISTA 3	Entre río y la vía E28	HTOQ3	Sí
E	35I	Macho	CAMPAMENTO	Entre río y la vía E28	HTOQ3	Sí
F	37M16	Macho	EL PORVENIR	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
G	23M8	Macho	BELLAVISTA 2	Norte del río	HTOQ2	No
H	44M19	Macho	PICHAN	Entre río y la vía E28	HTOQ1	No
I	42M18	Macho	EL GARUMAL	Entre río y la vía E28	HTOQ3	Sí
J	33M15	Macho	CAMPAMENTO	Entre río y la vía E28	HTOQ3	No
K	YUMBO	Macho	SANTA LUCIA	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
L	Ind1	ND	CURIPOGRIO	Entre río y la vía E28	HTOQ1	Sí
M	39I	ND	CAMPAMENTO	Entre río y la vía E28	HTOQ2	Sí

**Tabla 2.** Resumen sobre los primers diseñados y utilizados para la amplificación de loci microsatélite. \* Al primer le antecedió la secuencia 5'-GCCTCCCTCGCGCCA-3' como adaptador para añadir marcaje con fluoróforo con un tercer primer (Blacket et al., 2012). ° El microsatélite tiene un motivo de repetición imperfecto.

Marcador	Secuencia del primer (5'-3')	Contenido Guanina - Citocina (GC%)	Temperatura de fusión (Tm °C)	Tamaño esperado pb	Motivo	Cola A con fluoróforo utilizado	Amplificación exitosa	Pool de primers
Tor1	F: *TTGCGGGTCTTCACTTCCTG R: TGAGGATGGCACTGATCGAC	55.00 55.00	60.25 59.54	311-347	(agat) <sub>24</sub>	NED	No	NA
Tor 2	F: *AGAAATGGGCAAAGGACTCAA R: AACAGCAGTGAACAAGGGTTTC	42.86 45.45	57.76 59.57	271-283	(aaag) <sub>13</sub>	PET	Sí	3
Tor 3	F: *CCATCAACTTTGCCATTTACC R: AATCACAAAAGGCCAGAAGG	42.86 45.00	55.72 56.20	279-287	(atgt) <sub>10</sub>	6-FAM	Sí	3
Tor4	F: *CGATGGCACCTATTTGCAG R: TTGGGTTAGGATTACACAGCA	52.63 42.86	56.77 56.92	240-248	(cttt) <sub>17</sub>	VIC	Sí	1
Tor5°	F: *AGCAAACCCAAAGACAGAGG R: CGATGTGGGTCTCTTCAGGT	50.00 55.00	58.00 59.10	300-410	(gaaa) <sub>31</sub>	NED	Sí	1
Tor6	F: *TTRACTTCCCCAAGGCACTGT R: TGTGGCAGTGGATCTATTCAG	50.00 47.60	58.85 57.45	321-375	(cttt) <sub>12</sub>	PET	Sí	1
Tor7	F: *TCACCCAACACTTACCAGGA R: ACAACTGCACATCCTCACTAA	50.00 42.86	58.19 57.23	278-283	(ttaa) <sub>12</sub>	6-FAM	Sí	1
Tor8	F: *CTGTATTGGAGCTCACGACTT R: TTACAGCATAGCACCTGGATT	47.62 42.86	57.76 57.07	243-255	(tatc) <sub>18</sub>	VIC	Sí	2
Tor9	F: *GCCTTCCCATTTGCTGTAGA R: GGCACAGGAAAACCTTCTCA	50.00 50.00	57.87 58.02	321-349	(atag) <sub>19</sub>	NED	Sí	2
Tor10	F: *ATTCGGTGGTCAGGTTTGAG R: TAAATGTTGCTTTGGTCCTG	50.00 40.00	57.81 55.08	302-310	(gt) <sub>23</sub>	PET	Sí	2
Tor11	F: *TGCTGTGGGTACTTGCTGTG R: CGGCGGAAGTGAAGTAGATG	55.00 55.00	60.53 58.64	274	(aaag) <sub>13</sub>	6-FAM	Sí	2
Tor12	F: *GCATAATTGCAGAACCAGAGC R: TGAAGCCTAAGTGCCTGTGG	47.62 55.00	57.92 59.96	236-248	(tatc) <sub>11</sub>	VIC	Sí	3
Tor13°	F: *CCCAGAACACTGTGAAGCAA R: CCATACAGCCCCTTTGTCAG	50.00 55.00	58.32 59.24	339	(aaag) <sub>12</sub>	NED	Sí	3

**Tabla 3:** Información de las secuencias de los haplotipos y número de individuos con su haplotipo correspondiente. Las secuencias fueron reportadas y se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI.

Haplotipo	n	Secuencia	Accesión NCBI
HTOQ1	15 individuos	TTTACTTATTTTCATACATATCATCCCACGTAAGTACTGTAGCATCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTCC CCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTTACATGAGGAC ATGGACTTCAAAAACCTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAATCACCAGGCCT CGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTATAACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTG AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAATGGGAC ATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGC	KX812512.1
HTOQ2	7 individuos	TTTACTTATTTTCATACATATCATCCCACGTAAGTACTGTAGCATCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTCC CCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTTACATGAGGAC ATGGACTTCAAAAACCTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACCAGGCC TCGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTATAACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACT GAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAATGGGA CATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGC	KX812513.1
HTOQ3	13 individuos	TTTACTTATTTTCATACATATCATCCCACGTAAGTACTGTAGCATCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTCC CCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTTACATGAGGA CATGGACTTCAAAAACCTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAATCACCAGGC CTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTATAACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATAC TGAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAATGGG ACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGC	KX812514.1
HTOQ4	3 individuos	TTTACTTATTTTCATACATATCATCCCACGTAAGTACTGTAGCATCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTCC CCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTTACATGAGGA CATGGACTTCAAAAACCTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACCAGGC CTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTATAACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATAC TGAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAATGGG ACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGC	KX812515.1

**Tabla 4.** Índices obtenidos para cada uno de los loci microsatélite utilizados en el presente estudio. \*Significancia estadística (valor  $p < 0.05$ ).

<b>Marcador</b>	<b>Tamaño obtenido</b>	<b>Alelos por locus</b>	<b>Heterocigosidad esperada (<math>H_e</math>) por locus</b>	<b>Heterocigosidad observada (<math>H_o</math>) por locus</b>	<b>p-value prueba de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg</b>
Tor 2	271-279	3	0.324	0.103	0.000*
Tor4	232-252	6	0.698	0.621	0.164
Tor5	304-316	5	0.471	0.519	0.550
Tor6	373-393	5	0.718	0.318	0.000*
Tor7	276-284	3	0.615	0.522	0.159
Tor8	235-239	2	0.441	0.310	0.109
Tor9	321-349	5	0.632	0.552	0.046*
Tor10	306-312	2	0.324	0.185	0.048*
Tor11	268-280	3	0.489	0.346	0.058
Tor12	242-262	5	0.453	0.231	0.000*
Tor13	333-363	6	0.709	0.381	0.000*

**Tabla 5.** Índices obtenidos para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino en el Distrito Metropolitano de Quito. \*Significancia estadística (valor  $p < 0.05$ ).

Grupo	Muestras analizadas (n)	Número de alelos (Na)	Número de alelos por rarefacción (Nar)	Número de alelos privados (PA)	Número de alelos privados por rarefacción (PAr)	Riqueza alélica (AR)	Riqueza alélica por rarefacción (ARr)	Heterocigosidad esperada ( $H_e$ )	Heterocigosidad observada ( $H_o$ )	Valor p Equilibrio Hardy-Weinberg
Al norte del Río Guayllabamba	5	31	27	3	5	2.45	2.48	0.51	0.45	0.051
Entre el Río Guayllabamba y la vía E28	18	38	28	10	5	2.52	2.54	0.52	0.38	0.000*
Al sur de la vía E28	6	25	22	2	3	1.94	2.02	0.37	0.27	0.075

**Tabla 6.** Distancias genéticas de Weir y Cockerham  $F_{st}$  para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito.

	Entre	Norte
Norte	0.033738	
Sur	0.069178	<b>0.137378</b>

**Tabla 7.** Distancias genéticas de  $N_{ei}$  para cada uno de los grupos de individuos analizados en la población del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito.

	Entre	Norte
Norte	0.1285360	
Sur	0.1759289	<b>0.2421457</b>

**Tabla 8.** Índices del estimador de parentesco  $W$  para cada uno de los grupos analizados en el presente estudio

	Norte	Entre	Sur
Norte	-0.17436		
Entre	-0.20622	-0.17618	
Sur	-0.28901	-0.23255	<b>0.02953</b>