

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis de la diversidad genética de poblaciones del oso Andino
(*Tremarctos ornatus*) en Ecuador utilizando nuevos marcadores
mitocondriales**

Doménica Gabriela Barragán Orbe

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Análisis de la diversidad genética de poblaciones del oso Andino
(*Tremarctos ornatus*) en Ecuador utilizando nuevos marcadores
mitocondriales**

Doménica Gabriela Barragán Orbe

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD.

Nombre del profesor, Título académico

María José Pozo, MBS.

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Doménica Gabriela Barragán Orbe

Código: 00213672

Cédula de identidad: 1753099876

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El oso Andino (*Tremarctos ornatus*) es un úrsido originario de América del Sur. Es el único representante vivo de la subfamilia Tremarctinae y ha sido catalogado como una especie vulnerable por la UICN. El oso Andino cumple un rol ecológico importante como modulador de hábitat porque participa en la dispersión de semillas y renovación de capas vegetales. Los análisis genéticos permiten comprender la ecología y estructura poblacional de especies vulnerables como *T. ornatus* para implementar técnicas de monitoreo y planes efectivos de conservación. Por este motivo, en este estudio se diseñaron 3 nuevos marcadores mitocondriales para analizar la diversidad genética de 22 individuos de Quito, Loja y Zamora Chinchipe. Las secuencias de los 3 nuevos marcadores mitocondriales (ATP6-COIII, ND4-ND5, ND6-CytB) fueron concatenadas con las secuencias de otros 4 marcadores diseñados en estudios previos (HVRI del D-Loop, ND1-ND2, COI Parcial, COI-COII-ATP8) y se identificaron 7 haplotipos y 39 sitios polimórficos en total. Se obtuvo una alta diversidad de haplotipos ($H_d = 0.8571 \pm 0.0402$) y baja diversidad de nucleótidos ($\pi = 0.004381 \pm 0.002249$). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló que la mayor parte de variación genética encontrada proviene de las diferencias entre las poblaciones analizadas, y el Índice de Fijación (FST) determinó un alto grado de diferenciación entre dichas poblaciones. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de una estructura poblacional del oso Andino en Ecuador, con un mayor grado de diferenciación entre el Norte (Quito) y Sur (Loja y Zamora Chinchipe) del país. Esto podría deberse, entre otros posibles factores, a la fragmentación del hábitat del oso Andino, la presencia de barreras físicas y los distintos patrones de alimentación.

Palabras clave: *Tremarctos ornatus*, Ecuador, marcadores mitocondriales, diversidad genética, estructura poblacional.

ABSTRACT

The Andean bear (*Tremarctos ornatus*) is a native ursid from South America. It is the only living representative of the subfamily Tremarctinae and has been listed as a vulnerable species by the IUCN. The Andean bear plays an important ecological role in habitat modulation due its activity as a seed disperser and vegetation layer renewal. Genetic studies allow the understanding of ecology and population structure of threatened species such as *T. ornatus* to carry out monitoring techniques and effective conservation plans. Consequently, this study was aimed to design 3 new mitochondrial markers to analyze de the genetic diversity of 22 specimens from Quito, Loja, and Zamora Chinchipe. The sequences of the three new mitochondrial markers (ATP6-COIII, ND4-ND5, ND6-CytB) were concatenated with the sequences of 4 other markers designed in previous studies (HVRI del D-Loop, ND1-ND2, COI Partial, COI-COII-ATP8). A total of 7 haplotypes and 39 polymorphic sites were identified in the whole analyzed region. High haplotype diversity ($H_d = 0.8571 \pm 0.0402$) and low nucleotide diversity ($\pi = 0.004381 \pm 0.002249$) were found. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that most of the genetic variation found comes from the differences between the populations, and Fixation Index (FST) determined a high differentiation degree between the analyzed populations. These results suggest the presence of a population structure of the Andean bear in Ecuador, with a greater degree of differentiation between the North (Quito) and South (Loja and Zamora Chinchipe) of the country. This could be due to, among other possible factors, the fragmentation of the Andean bear's habitat, the presence of physical barriers and different feeding patterns.

Key words: *Tremarctos ornatus*, Ecuador, mitochondrial markers, genetic diversity, population structure

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Generalidades del oso Andino	12
1.1.1. Taxonomía y características morfológicas.....	12
1.1.2. Distribución, comportamiento y alimentación.....	12
1.2. Densidad poblacional y estado de conservación	13
1.3. Marcadores mitocondriales y estudio de diversidad genética	14
2. MÉTODOS	15
2.1. Toma de muestras y selección de individuos	15
2.2. Extracción y cuantificación del ADN	15
2.3. Selección de marcadores y diseño de primers	15
2.4. Amplificación de regiones de ADNmt y secuenciación de amplicones	16
2.5. Procesamiento de secuencias y análisis de datos	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Extracción y cuantificación del ADN	18
3.2. Amplificación y secuenciación de los 3 marcadores de ADNmt	18
3.3. Identificación de haplotipos y sitios polimórficos	18
3.4. Estadísticos de diversidad genética, pruebas de neutralidad y AMOVA	19
4. DISCUSIÓN	21
4.1. Diversidad genética y estructura poblacional	21
4.2. Eventos demográficos	23
4.3. Estructura genética e implicaciones en la conservación del oso Andino	23
5. CONCLUSIONES	25
6. TABLAS	26
7. FIGURAS	34

REFERENCIAS..... 39
ANEXOS..... 46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de sitios polimórficos presentes en la secuencia de cada haplotipo de la región concatenada 2.....	26
Tabla 2. Secuencias de los haplotipos encontrados en la región concatenada 2 y número de individuos de cada población por haplotipo	27
Tabla 3. Número de haplotipos, índices de diversidad genética (H_d, π) y pruebas de neutralidad (D de Tajima, F_s de F_u) de los 3 marcadores moleculares mitocondriales diseñados en este estudio y de 2 regiones concatenadas del ADN mitocondrial de <i>Tremarctos ornatus</i>.....	31
Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) de las Regiones Concatenadas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Ecuador con las localidades de muestreo de los 22 individuos en análisis.....	33
Figura 2. Redes de haplotipos de los marcadores de ADNmt individuales diseñados para este estudio.....	34
Figura 3. Redes de haplotipos de las regiones concatenadas.....	36
Figura 4. Árbol filogenético de los 22 individuos muestreados, construido con el método Maximum-Likelihood y un modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY)....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Información de los 22 individuos muestreados: identificación, localidad, cuantificación del ADN y haplotipo al que pertenecen.....	46
Anexo 2. Set de primers utilizado para la amplificación de los 3 marcadores moleculares de ADNmt.....	48
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR de los marcadores de ADNmt diseñados para este estudio (ATP6-COIII; ND4-ND5; ND6-CytB).....	49
Anexo 4. Resumen de haplotipos e índices de diversidad (H_d; π) reportados en estudios previos en Quito, Loja y Zamora Chinchipe.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del oso Andino

1.1.1. Taxonomía y características morfológicas

El oso Andino (*Tremarctos ornatus*), es un mamífero originario de América del Sur (Cuvier, 1825; Vélez-Liendo, et al., 2020). La especie pertenece al Orden Carnívora; Familia Ursidae, y es el único representante vivo de la subfamilia Tremarctinae (Albarracín, et al., 2013; Sandoval & Yáñez, 2019).

T. ornatus es un úrsido de tamaño mediano y cuerpo robusto, con un rango de peso entre 30 – 200 kg, y longitud corporal entre 0.88 – 2.22 m. Las hembras adultas son notablemente más pequeñas que los machos, representando un dimorfismo sexual marcado. El oso Andino posee un áspero y denso pelaje de tonalidades negra, café e incluso gris en algunas poblaciones (Vélez-Liendo, et al., 2020). Sus extremidades posteriores son más cortas que las extremidades anteriores, y presenta garras cortas, afiladas y no retráctiles. Debido a su actividad arbórea, posee un pulgar falso que le permite manipular su comida (García-Rangel, 2012). Un rasgo muy distintivo de su morfología es la presencia de manchas blancas o amarillas en la región de los ojos, garganta y pecho, de allí su nombre antiguo “oso de anteojos” (Albarracín, et al., 2013). Esta característica, también conocida como ornamenta, es particular en cada individuo, y es un rasgo fenotípico que no cambia drásticamente hasta su adultez, por lo que puede ser utilizada para su identificación (Sandoval & Yáñez, 2019).

1.1.2. Distribución, comportamiento y alimentación

El oso Andino es una especie endémica de Sudamérica, y se distribuye a lo largo de la cordillera de los Andes, desde Venezuela hasta Bolivia en una extensión aproximada de 260,000 km² (García-Rangel, 2012; Vélez-Liendo, et al., 2020). Existe una amplia variedad de ecosistemas habitados por *T. ornatus*, con un rango de altitud entre 200 y 4900 m.s.n.m., incluyendo bosques secos tropicales, bosques montañosos, pastizales de gran altitud y páramos

cercanos a bosques subtropicales (Vélez-Liendo, et al., 2020; Sandoval & Yáñez, 2019).

El oso Andino es un animal diurno y solitario; únicamente forma parejas durante el cuidado parental y grupos cuando existen lugares concentrados de alimento (Vélez-Liendo, et al., 2020). Su estrategia de alimentación varía de acuerdo con la disponibilidad de recursos, los eventos de fructificación, su desplazamiento geográfico y eventos migratorios. Posee una dieta basada principalmente en plantas y frutas frescas incluyendo familias como Bromeliaceae, Araceae, Poaceae, Ericaceae y Lauraceae. Sin embargo, también se alimenta de hongos, insectos, animales muertos, o presas de caza como roedores, venados, tapires, y ganado, por lo que es considerado un omnívoro oportunista. (Albarracín, et al., 2013; Suárez, 1988; Vela-Vargas, et al., 2021).

1.2. Densidad poblacional y estado de conservación

Se estima que la población de *T. ornatus* se conforma de 13000 – 18000 individuos en toda su distribución, con una densidad poblacional de 5-7 ejemplares por cada 100 km²; mientras que en Ecuador su población oscila entre 1200 – 2000 individuos, con una densidad poblacional de 3 – 7.45 ejemplares por cada 100km² (Molina, et al., 2017; Rodríguez, et al., 2020; Viteri, 2007). El oso Andino es considerado un modulador de hábitat por su rol en la dispersión de semillas y contribución en la renovación de capas vegetales. Por lo tanto, su conservación podría garantizar la preservación de un número mayor de especies y ecosistemas (Sandoval & Yáñez, 2019; Crespo & Guerrero, 2019). Sin embargo, su estado de conservación se ve amenazado por factores como la caza furtiva, comercio ilegal, minería, conflictos humanos y la contaminación de agua y suelo (Ruiz-García, et al., 2020).

A nivel regional, *T. ornatus* ha sido catalogado por más de 40 años como una especie “Vulnerable” según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Principalmente la expansión de la frontera agrícola y las malas prácticas de agricultura han conducido a la fragmentación y degradación de su hábitat, y se ha registrado una pérdida del

70%, 31%, 29% y 27% de áreas clave habitadas por el oso Andino en Venezuela, Perú, Colombia, y Ecuador respectivamente (Vélez-Liendo & García-Rangel, 2017; Vélez-Liendo, et al., 2020).

1.3. Marcadores moleculares mitocondriales y estudio de diversidad genética

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de ADN de doble cadena y resulta útil para estudios poblacionales y genéticos en animales debido a su alto nivel de variabilidad, herencia matrilineal, evolución casi neutral, y baja tasa de recombinación (Nabholz, et al., 2008; Taanman, 1999). El ADNmt en mamíferos tiene una longitud aproximada de 16.7 kb y contiene 37 genes: 13 genes codificantes, 22 genes de ARN de transferencia, 2 genes de ARN ribosomal, y una región no codificante con dos regiones hipervariables (HVRI y HVRII). Los 13 genes codifican para subunidades proteicas asociadas a complejos de la cadena de transporte de electrones: ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6 (Complejo I); CytB (Complejo III); COI, COII; COIII (Complejo IV); y ATP6, ATP8 (Complejo V) (Boore, 1999; Saremi, et al., 2021; Yu, et al., 2007)

Hasta la fecha se han reportado algunos estudios de genética poblacional del oso Andino empleando marcadores nucleares microsatélite (Ruiz-García, 2003, 2007, 2012; Ruiz-García et al., 2003, 2005; Viteri & Waits, 2009) y marcadores moleculares mitocondriales (Cueva et al., 2018; Ruiz-García et al., 2020a, 2020b, 2020c). No obstante, la información genética acerca de *T. ornatus* sigue siendo limitada (Juárez-Casillas & Varas, 2011). Es primordial conocer la diversidad genética y estructura poblacional de *T. ornatus* para emplear técnicas de monitoreo de la especie, desarrollar herramientas y planes efectivos enfocados a su conservación (Sandoval & Yáñez, 2019). Por este motivo, el objetivo de esta investigación es determinar la diversidad genética del oso Andino en 3 localidades del Ecuador -Quito, Loja y Zamora Chinchipe- empleando 3 nuevos marcadores de ADNmt diseñados para este propósito (ATP6-COIII, ND4-ND5, y ND6-CytB).

2. MÉTODOS

2.1. Toma de muestras y selección de individuos

Se recolectaron muestras de pelo de oso en 6 localidades del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) y Zamora Chinchipe (Anexo 1). Las muestras fueron recolectadas por Santiago Molina de forma no invasiva durante los años 2015-2017 y 2020. Por otro lado, las muestras de Loja fueron recolectadas de forma no invasiva por investigadores de la Universidad Técnica Particular de Loja en los años 2014 - 2015 a partir de saliva y heces fecales de los ejemplares (Anexo 1). Las muestras de pelo y de ADN extraídas a partir de saliva y heces fecales fueron enviadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito y almacenadas a -20°C. Se verificó el registro fotográfico y los datos de campo de cada individuo, y se seleccionaron 22 muestras: 10 individuos de Quito, 4 de Loja y 8 de Zamora Chinchipe.

2.2. Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de ADN de las muestras del Distrito Metropolitana de Quito y de Zamora Chinchipe se realizó previamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La cuantificación de la calidad y concentración de todas las muestras de ADN se realizó mediante espectrofotometría con Nanodrop 2000TM (Thermo Fisher Scientific, 2009). Posteriormente, se realizó una prueba de amplificación del ADN extraído utilizando la región hipervariable 1 (HVR1) de acuerdo con la metodología descrita por Cueva et al. (2018).

2.3. Selección de marcadores y diseño de primers

Se descargó 4 secuencias completas del genoma mitocondrial de *T. ornatus* disponibles en GenBank (accesiones MW556430.1, NC_009969.1, EF196665.1, y FM177764.1) y 2 genomas ensamblados con lecturas cortas (accesiones ERX1025774 y ERX1025773). Los genomas fueron alineados con CodonCode Aligner v.10.0.2 (CCC, 2021) para identificar regiones del ADNmt polimórficas. Se seleccionaron 3 regiones objetivo para el diseño de

primers 1) ATP6-COIII, 2) ND4-ND5, y 3) ND6-CytB, considerando una longitud mínima de 600 pares de bases (pb), presencia de al menos 3 sitios variables en su extensión y ausencia de secuencias homopoliméricas.

Los primers fueron diseñados bajo parámetros específicos de longitud (18-22 pb), contenido CG (40-60%) y temperatura de melting (T_m entre 55-65°C) con Primer3 v.4.1.0, y se verificó su especificidad mediante Primer-BLAST (Kõressaar, et al., 2018; Ye, et al., 2012). Con MFE primer v3.1 (O'Halloran, 2015) se evaluó la posible formación de dímeros de primer y se seleccionó el par de primers con mejores parámetros para cada región de ADNmt en estudio. Finalmente, las secuencias de los primers fueron enviadas a sintetizar en Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

2.4. Amplificación de regiones de ADNmt y secuenciación de amplicones

Se amplificó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cada marcador de forma independiente con las 22 muestras de ADN de los ejemplares involucrados en este estudio. El volumen final de cada reacción fue 25 μ L y la concentración final de cada reactivo empleado fue: Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 1.5mM, 0.25mg/mL de BSA, 0.5 μ M de cada primer (forward y reverse), dNTPs 0.2mM, 1U de Taq Polimerasa de ADN (Invitrogen, MA, USA), y 2ng de ADN. El programa de termociclado fue el mismo para los 3 marcadores, a excepción del paso de annealing que tenía una temperatura (T_a) específica para cada uno (T_a : 58°C para ATP6-COIII y 60°C para ND4-ND5 y ND6-CytB). Las condiciones empleadas fueron: denaturación inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30s, annealing por 30s a T_a específica, extensión a 72°C por 1min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% de concentración (p/v), a 100V durante 30 minutos. Finalmente, todos los amplicones fueron enviados a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación en ABI 3730XLs con el método Sanger.

2.5. Procesamiento de secuencias y análisis de datos

El procesamiento de secuencias crudas se realizó con el paquete Staden (PreGap y Gap4) para generar una secuencia consenso de cada muestra a partir de las cadenas forward y reverse (Staden, 1996). Las secuencias consenso fueron agrupadas en base a su marcador de ADNmt y alineadas en MEGA v.11 (Kumar, et al., 2008) con el algoritmo Clustal, luego se recortaron los extremos de las secuencias para que todas tengan la misma longitud en pb.

Se recuperaron secuencias de la HVR1 del D-loop analizadas en estudios anteriores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal en DMQ (Cueva, 2018), Loja (Moreta, 2020), y Zamora Chinchipe (Vallejo, 2021). También se recuperaron las secuencias de 3 marcadores de ADNmt que analizan las regiones ND1-ND2, COI-COII-ATP8, y COI Parcial (Guallasamín, 2023). Los 4 estudios previos analizaron los mismos individuos utilizados en el presente. Se generaron 2 regiones concatenadas mediante la fusión de las secuencias de los marcadores individuales en Geneious Prime 2023.1.1 (Kearse et al., 2012). La Región Concatenada 1 incluye los 3 marcadores de este estudio (ATP6-COIII, ND4-ND5 y ND6-CytB), y la Región Concatenada 2 incluye los marcadores de la Región Concatenada 1 más 4 marcadores de estudios previos (HVR1, ND1-ND2, COI Parcial, COI-COII-ATP8).

En 3 regiones individuales y 2 regiones concatenadas, se calculó índice de diversidad de haplotipos (H_d), diversidad de nucleótidos (π), pruebas de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y F_s de Fu's (Fu, 1997). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se calculó en los programas DnaSP (Rozas, et al., 2017) y Arlequín v.3.5.2.2 (Excoffier et al., 2005). En R v.4.2.2 se construyeron redes de haplotipos con el paquete *pegas*, función *haploNet* (Paradis, 2010; Toparslan, et al., 2020) para los marcadores individuales (ATP6-COIII, ND4-ND5, y ND6-CytB) y para las 2 regiones concatenadas descritas previamente. Por último, se construyó un árbol filogenético con el método de Maximum-Likelihood en MEGA v.11 (Tamura et al., 2021), y modelo de sustitución Hasegawa – Kishino – Yano (Hasegawa et al., 1985; Figura 4).

3. RESULTADOS

3.1. Extracción y cuantificación del ADN

El rango de concentración de ADN de las 22 muestras fue de 0.1–43.5 ng/μl, con una concentración promedio de 7.16 ng/μl. Solo el 18% presentó una concentración de ADN mayor a 10 ng/μl. Los índices de calidad del ADN tuvieron un promedio de 1.0 para A260/280, y un promedio de 0.24 para A260/230. (Anexo 1).

3.2. Amplificación y secuenciación de los 3 marcadores de ADNmt

Las 22 muestras de ADN amplificaron exitosamente con los 3 marcadores mitocondriales diseñados (Anexo 2 y 3) y utilizando el protocolo de PCR descrito en la sección 2.4. Las secuencias de los amplicones de cada marcador fueron procesadas de acuerdo con la metodología descrita en la sección 2.5. En el marcador ATP6-COIII los amplicones tuvieron un tamaño aproximado de 680pb, y las secuencias, después de su limpieza y corte de extremos presentaron un tamaño de 676pb. Así mismo, el marcador ND4-ND5 obtuvo amplicones de 649pb y secuencias de 575pb después de su limpieza. Finalmente, el marcador ND6-CytB presentó amplicones de aproximadamente 604 pb y un tamaño final de secuencias de 549 pb después de su limpieza.

3.3. Identificación de haplotipos y sitios polimórficos

Se identificó 6 sitios polimórficos y 3 haplotipos al analizar las secuencias del marcador ND6-CytB, cada haplotipo fue exclusivo para una población (Quito, Loja, Zamora Chinchipe) (Figura 2b). Las secuencias del marcador ND4-ND5 presentaron 2 sitios polimórficos y 2 haplotipos, uno exclusivo de la población de Quito y otro compartido entre Loja y Zamora Chinchipe (Figura 2c). En la región ATP6-COIII se identificaron 11 sitios polimórficos y también 2 haplotipos: uno exclusivo de la población de Quito y otro compartido entre Loja y Zamora Chinchipe (Figura 2d).

La Región Concatenada 1 (1777 pb) que resulta de la unión de los 3 marcadores

mitocondriales individuales (ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB) presentó 3 haplotipos, uno exclusivo para cada población (Quito, Loja, Zamora Chinchipe) (Figura 3a).

En la Región Concatenada 2 se identificó un total de 39 sitios polimórficos y 7 haplotipos (Figura 3b). De los 39 sitios polimórficos, 36 corresponden a transiciones ($C \leftrightarrow T$; $A \leftrightarrow G$), 2 son transversiones ($A \leftrightarrow T$; $A \leftrightarrow C$) y solo 1 inserción/delección (Tabla 1). Existen 3 haplotipos para la población de Quito (HTOQ1, HTOQ2, y HTOQ3), 2 haplotipos para la población de Loja (HTOL1 y HTOL2), y 2 haplotipos para la población de Zamora Chinchipe (HTOZ1 y HTOZ2) (Tabla 2 y Figura 3b). No existen haplotipos compartidos entre las poblaciones de Quito, Loja y Zamora Chinchipe, y los 7 haplotipos identificados en la Región Concatenada 2 fueron previamente reportados en los estudios de Cueva (2018), Moreta (2020), Vallejo (2021) y Guallasamín (2023).

3.4. Estadísticos de diversidad genética, pruebas de neutralidad y AMOVA

La diversidad de haplotipos (H_d) y diversidad de nucleótidos (π) fue igual a cero al analizar los marcadores de ADNmt individuales (ATP6-COIII, ND4-ND5 y ND6-CytB) y la Región Concatenada 1 por poblaciones (Quito, Loja y Zamora Chinchipe), porque solo se identificó un haplotipo para cada población que agrupa a todos sus individuos. Por este motivo, únicamente se reportan los índices de diversidad y las pruebas de neutralidad respecto a la Región Concatenada 2 (Tabla 3).

Los análisis de diversidad genética fueron realizados a partir de la Región Concatenada 2 (4476 pb), debido a que tiene una mayor cobertura del genoma mitocondrial de *T. ornatus* y la distribución de haplotipos revela la presencia de más de un haplotipo por cada población estudiada (3 haplotipos en Quito, 2 en Loja y 2 en Zamora Chinchipe) (Tabla 3 y Figura 3b). La diversidad de haplotipos (H_d) reportada en los individuos de Quito ($n=10$; $H_d = 0.6222 \pm 0.1383$) fue mayor en comparación a los individuos de Zamora Chinchipe ($n=8$; $H_d = 0.5357 \pm$

0.1232), y de Loja ($n=4$; $H_d = 0.5 \pm 0.2652$). Al contrario, la población de Loja presentó una mayor diversidad de nucleótidos ($\pi = 0.000782 \pm 0.000598$) en comparación a la población de Quito ($\pi = 0.000159 \pm 0.000147$), y de Zamora ($\pi = 0.000120 \pm 0.000125$). Adicionalmente, la población total ($n=22$) sin una división por zonas geográficas (Quito, Loja y Zamora Chinchipe), presentó una diversidad de haplotipos (H_d) de 0.8571 ± 0.0402 y una diversidad de nucleótidos (π) de 0.004381 ± 0.002249 (Tabla 3).

En la Región Concatenada 2, las pruebas de neutralidad D de Tajima y Fs de Fu, presentaron valores de 3.276 (valor $p=1$) y 10.555 (valor $p = 0.998$), respectivamente (Tabla 3). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló que el 100% de la variación molecular presente en la Región Concatenada 1 (ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB) proviene de las diferencias existentes entre las poblaciones, resultando en un Índice de Fijación (FST) de 1.00. Sin embargo, al agregar los marcadores mitocondriales HVRI, ND1-ND2, COI Parcial y COI-COII-ATP8 y analizar la Región Concatenada 2, se atribuye un 96.28% de la variación a las diferencias entre las poblaciones y un 3.72% de la variación a las diferencias dentro de las poblaciones, resultando en un Índice de Fijación (FST) de 0.96293 (Tabla 4).

Finalmente, con la construcción del árbol filogenético con el método Maximum-Likelihood y un modelo de sustitución HKY, se identifican dos grupos: uno que agrupa a todos los individuos provenientes de Zamora Chinchipe y Loja, y otro que agrupa a todos los individuos de Quito (Figura 4).

4. DISCUSIÓN

4.1. Diversidad genética y estructura poblacional

El número de haplotipos encontrado en cada región depende del número de sitios polimórficos, su frecuencia, y tasa de mutación del ADN (Stumpf, 2004). La Región Concatenada 1 contiene únicamente regiones de ADN codificante, mientras que la Región Concatenada 2 incluye también una región no codificante (3 haplotipos vs, 7 haplotipos, respectivamente). Los genes codificantes tienen una menor tasa de mutación de ADN porque son regiones conservadas responsables de mantener la integridad celular y sus funciones (Nabholz et al., 2007). Al contrario, la HVRI del D-Loop carece de funciones codificantes y presenta una mayor tasa de mutación del ADN, resultando en un mayor nivel de polimorfismos (Jirat et al., 2023). Además, Guallasamín (2023) demuestra que incluir la región HVRI aumenta el número de haplotipos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 3).

La diversidad de haplotipos (H_d) se define como la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar presenten un haplotipo distinto (Lowe et al., 2004). A nivel de poblaciones, en este estudio se determinó la diversidad de haplotipos en Quito, Loja y Zamora Chinchipe (Tabla 3). Estudios previos similares (que analizaron únicamente la HVRI del D-Loop y un mayor número de individuos por población) revelan una mayor diversidad de haplotipos en Quito, y una menor diversidad de haplotipos en Zamora Chinchipe y en Loja (Anexo 4) (Cueva, 2018; Moreta, 2020; Vallejo, 2021). La diversidad de haplotipos (H_d) en todos los casos fue moderada – alta, sin embargo, el grado de diferenciación entre todos los haplotipos fue bajo. Es decir, que la presencia de al menos un sitio polimórfico permitió discriminar entre 2 haplotipos distintos, por lo que sus secuencias tienden a ser muy similares a pesar de que corresponden a haplotipos distintos (Ruiz-García et al., 2020a).

La diversidad de nucleótidos (π) representa el número promedio de diferencias de

nucleótidos en un sitio específico, al analizar todos los pares posibles de secuencias de ADN en una población (Nei & Li, 1979). En este estudio, la diversidad de nucleótidos en Quito, Loja y Zamora Chinchipe (Tabla 3) fue en todos los casos mucho menor a lo reportado previamente (Anexo 4) (Cueva, 2018; Moreta, 2020; Vallejo, 2021). La baja diversidad de nucleótidos (π) sugiere una escasa variabilidad genética dentro de las poblaciones analizadas, esto podría disminuir la capacidad de adaptación de los individuos ante presiones selectivas y ambientales en su entorno, comprometiendo su supervivencia (Goodall et al., 2012; Qin et al., 2021).

La diversidad de haplotipos (H_d) y diversidad de nucleótidos (π) de la población total ($n=22$) de este análisis (Tabla 3) presenta valores similares en comparación al estudio de Guallasamín (2023) (Anexo 4). Los índices H_d y π pueden verse influenciados por el tamaño, edad y grado de conectividad entre las poblaciones, y las diferencias en estas métricas (H_d y π) pueden atribuirse al tamaño de la región analizada y el número de sitios polimórficos presentes (Goodall et al., 2012). Además, estos parámetros pueden ser sub o sobre estimados artificialmente debido al número reducido de muestras en el análisis (Nei & Li, 1979).

En otro estudio se analizó una población total de 108 ejemplares de *T. ornatus* provenientes de 13 provincias del Ecuador (incluyendo Pichincha, Loja y Zamora Chinchipe) a partir de 6 genes mitocondriales (ND5, 16S rRNA, 12S rRNA, COI, COII y región control). Se encontraron 43 haplotipos presentes, una diversidad de haplotipos (H_d) de 0.845 y una diversidad de nucleótidos (π) de 0.014 (Ruiz-García et al., 2020a). Los índices H_d y π son métricas probabilísticas, por lo que, incluir un número mayor de individuos e identificar más haplotipos podría justificar valores mayores. No es preciso comparar esta información con los resultados obtenidos en este estudio debido a las diferencias en el número de individuos y regiones de ADNmt analizadas. Sin embargo, es un indicativo útil de la necesidad de ampliar los sitios de muestreo y el tamaño de la población para futuros estudios con mayor resolución de la genética y estructura poblacional de *T. ornatus*.

4.2. Eventos demográficos

Las pruebas de neutralidad (D de Tajima y F_s de Fu) se utilizan en estudios de genética de poblaciones para determinar si los patrones de variabilidad genética se ajustan a un modelo de evolución neutral y así evaluar eventos demográficos (Ramírez et al., 2008). En ambos casos, valores positivos sugieren un cuello de botella reciente o una reducción poblacional, mientras que, valores negativos sugieren un crecimiento poblacional. Los valores positivos en los estadísticos D de Tajima y F_s de Fu calculados en la Región Concatenada 2 (Tabla 3) podrían sugerir que la población de osos analizada ha sufrido una reducción poblacional o un cuello de botella a lo largo de su historia evolutiva. Sin embargo, no es posible establecer una conclusión robusta sobre estos resultados por los valores de significancia estadística de estas pruebas de neutralidad (valor $p = 1.00$ y 0.998 , respectivamente). Esto podría deberse al número de individuos analizados, por lo que se sugiere incrementar el tamaño de la población en futuros estudios.

4.3. Estructura genética e implicaciones en la conservación del oso Andino

La estructura genética de una población se puede inferir mediante la caracterización de la variación genética que existe entre y dentro de las poblaciones estudiadas (Fitzpatrick, 2009). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) es un método estadístico que permite estimar el grado de diferenciación de dos o más poblaciones, empleando marcadores moleculares (Excoffier et al., 1992). En la Región Concatenada 1, toda la variación genética (100%) proviene de las diferencias genéticas presentes entre poblaciones, es decir que la población de Quito, Loja y Zamora Chinchipe son genéticamente muy distintas entre sí (Tabla 4). Esto puede explicarse porque en la Región Concatenada 1 cada población presenta un único haplotipo que agrupa a todos sus individuos (Figura 3a). En la Región Concatenada 2, la variación genética proviene principalmente de las diferencias entre las poblaciones (96.28%), y levemente de las diferencias dentro de las poblaciones (3.72%) (Tabla 4). Esta información es concordante con

el número de haplotipos encontrados en la Región Concatenada 2 (Figura 3b). Por lo tanto, los resultados sugieren que, al analizar una región más grande del ADNmt e identificar más sitios polimórficos, es posible determinar un grado mayor de diferenciación genética entre los individuos, obteniendo así una distribución distinta de los haplotipos por población.

El índice de fijación (FST) es una métrica que indica el grado de diferenciación entre poblaciones en base a su estructura genética. Se estima a partir del número de polimorfismos presentes en las secuencias de ADN analizadas, y resulta en valores entre 0 y 1, donde 0 indica que las subpoblaciones son genéticamente idénticas, y 1 indica que son subpoblaciones completamente diferenciadas (Wright, 1949; Smaragdov & Kudinov, 2020). Por lo tanto, los índices FST obtenidos en la Región Concatenada 1 y 2 (1.00 y 0.9629, respectivamente) sugieren una alta diferenciación genética entre las subpoblaciones en estudio (Tabla 4).

No se encontraron haplotipos compartidos por los osos de las poblaciones de Quito, Loja y Zamora Chinchipe. Esto sugiere la presencia de tres poblaciones separadas con mayor grado de diferenciación entre el Norte (Quito) y el Sur del Ecuador (Loja y Zamora Chinchipe) (Figura 3b). La presencia de esta estructura poblacional podría deberse a la fragmentación del hábitat de oso Andino por actividades antropogénicas que impiden la conectividad entre poblaciones, la presencia de barreras físicas como la distancia geográfica, la cordillera de los Andes, carreteras, ríos, y los patrones de alimentación oportunistas en base a la vegetación predominante en cada área geográfica (Chakraborty, 1993; García-Rangel, 2012; Ruiz-García et al., 2020a). Por este motivo, es importante considerar la estructura poblacional y ecología de las poblaciones de oso Andino al momento de establecer planes de conservación efectivos dirigidos a esta especie (Espinosa & Jacobson, 2012; Goodall et al., 2012).

5. CONCLUSIONES

En los análisis de diversidad genética se obtuvo una alta diversidad de haplotipos ($H_d = 0.8571 \pm 0.0402$) y baja diversidad de nucleótidos ($\pi = 0.004381 \pm 0.002249$). Las pruebas de neutralidad presentaron valores positivos de D de Tajima y Fs de Fu (3.276 y 10.555, respectivamente), pero los valores no fueron estadísticamente significativos.

Se determinó mediante el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) que en la Región Concatenada 1 y 2, la mayor proporción de la variación genética presente en las secuencias analizadas proviene de las diferencias existentes entre las poblaciones (100% y 96.28%, respectivamente). Mientras que el Índice de Fijación (FST) permitió determinar una alta diferenciación genética entre las poblaciones en estudio.

Se sugiere considerar la estructura poblacional del oso Andino en el Ecuador al momento de implementar planes de monitoreo y conservación de la especie, para que estos sean efectivos y contribuyan a su preservación. Así mismo, para futuros estudios se sugiere incrementar el número de individuos analizados, sitios de muestreo y regiones de ADN para obtener resultados con mayor resolución y soporte estadístico. También se sugiere complementar esta información con estudios genómicos.

6. TABLAS

Tabla 1. Identificación de sitios polimórficos presentes en la secuencia de cada haplotipo de la región concatenada 2

Haplotipo	n	Posición de nucleótidos en Región Concatenada 2									
		1	16	80	138	148	149	182	198	230	700
HTOQ1	6	ARNt-Pro	C	-	T	C	T	T	T	A	A
HTOQ2	2	ARNt-Pro	C	-	T	C	T	T	T	G	A
HTOQ3	2	ARNt-Pro	C	T	T	C	T	T	T	A	A
HTOL1	3	ARNt-Pro	T	-	T	T	C	C	C	G	T
HTOL2	1	ARNt-Pro	C	T	T	C	T	T	T	A	T
HTOZ1	3	ARNt-Pro	T	T	C	T	T	C	C	G	T
HTOZ2	5	ARNt-Pro	T	-	C	T	T	C	C	G	T
		1172	1206	1304	1529	1872	1967	2028	2189	2209	2483
HTOQ1	6	G	C	G	C	C	C	A	C	G	C
HTOQ2	2	G	C	G	C	C	C	A	C	G	C
HTOQ3	2	G	C	G	C	C	C	A	C	G	C
HTOL1	3	A	A	A	T	T	T	G	T	A	T
HTOL2	1	A	A	A	T	T	T	G	T	A	T
HTOZ1	3	A	A	A	T	T	C	G	T	A	T
HTOZ2	5	A	A	A	T	T	C	G	T	A	T
		2636	2703	2797	3045	3192	3263	3304	3666	3836	3959
HTOQ1	6	G	T	T	G	T	A	C	G	G	A
HTOQ2	2	G	T	T	G	T	A	C	G	G	A
HTOQ3	2	G	T	T	G	T	A	C	G	G	A
HTOL1	3	A	C	C	A	T	G	T	A	A	G
HTOL2	1	A	C	C	A	T	G	T	A	A	G
HTOZ1	3	A	C	C	A	C	G	T	A	A	G
HTOZ2	5	A	C	C	A	C	G	T	A	A	G
		3983	3995	4022	4046	4061	4122	4180	4247	4257	4457
HTOQ1	6	A	A	C	T	G	G	T	A	C	C
HTOQ2	2	A	A	C	T	G	G	T	A	C	C
HTOQ3	2	A	A	C	T	G	G	T	A	C	C
HTOL1	3	G	G	T	C	A	A	C	G	T	T
HTOL2	1	G	G	T	C	A	A	C	G	T	T
HTOZ1	3	G	G	T	C	A	A	C	G	T	T
HTOZ2	5	G	G	T	C	A	A	C	G	T	T

La posición inicial (1) corresponde al primer nucleótido de la secuencia codificante del ARN de transferencia de Prolina del ADNmt de *T. ornatus*. Se identificaron 39 sitios polimórficos.

n, número de individuos que pertenecen a cada haplotipo

<p>HTOQ3</p>	<p>2 individuos (DMQ)</p>	<p>TCGCGTGTATGTATCGGATAA... TTTACTTTTTCATACATATCATCC... TTTACTGAGGACATGGACTTCAAAA... TGAAGAACTGGGGGTTTCTATAC... CCATAAAGACATGGTACTCTCTAT... CCCATGTCATTCGTAATAATCTT... CCTACTTTCTAGCTCTTCCATAG... TCTAGGAGCTATTAACCTTTATT... ACCCATATGTCTCTCTCAATAA... TCCTACACTTCCACGACATACAT... AGCCATATCTCTGGTTCTAATG... GATTCCTACATGATTTCCAAACA... CTAGGACTAAAACTGATGCAAT... GTCTATTTTCGAAAAATGATCC... CTATCTAACTTCAACACTATTT... GTTTAGGGGGGTGATGCCTGT... TTTTGAACGACAGGAGTGTGGT... TTTTATAAGAAAGGGCTGAAAG... ACGGCGAGTTCAAGAAATAGT... ATCATGTAACAAAAGAGCTACT... GGATAGTGTGATTTGAAAGG... ATTACTTTTATTTGGAGTTGCA... GAGCTTTTGTACTAGATTCACA... AAAAATAGATAGCCGTAATACA... GTAGTCTGTCTGTGTATAGG... TTTTAGCTAGTGGTGAATTTTC... TGTAATAGGTTTTGTAGGCTT... TTTACTTTTTCATATATATCAT... CCCCCTATGTACGTCTGTCATTA... TAGTCACCAAGGCTCGAGAAAC... AATCTCTACTAACCTTCAAAT... GTAATAATAGAGGTTAAATCT... ATGTTGGTTTATCCCTTCCATA... TCCCATTTTAAATGAAAAAAT... AACCAATCGCATCAACCGTGA... TCCCTTCTATACCAAGATCTC... CGGCTGAACTAGGTCAACCCG... ATTGGCCCTCCCGATATAGCA... CTAGCCCATGACAGGAGCATC... TATGATCCGTCCTAATTACGG... TTTATATCTCTATGGCGTATC... ACTACTAAACTAACCGCACAA... ACTGTAAAAAATATAGGCCA... CCCATAGAAATGACTATTCG... TGGCAATGCTCGGAAATCTGT... ACTGAGAGTGAAGTCTCTCC... GTGGGCTCAAGTAAATAGATA... GCTCAGAAAATCTCTGTGAAG... TATATTAGTTGTAAGGCTAA... GGGCCATTAGGTTTGTATG... AGAGCTAGAGTAGCTTTTCCA... AGTTGAAATGTGCACTCAGT... AGTACTGGTTAGGATAATGG... AAGCCATGATTTTATGCA... AAGGTTGAGAGATAGCAGT... TCGCGTGTATATCGGATAA... AGGACCCGAAGTTTCATCAT... TCATTAGTCAIGGTTATCCAT...</p>
<p>HTOL1</p>	<p>3 individuos (Loja)</p>	<p>TTTACTTTTTCATATATATCAT... CCCCCTATGTACGTCTGTCATTA... TAGTCACCAAGGCTCGAGAAAC... AATCTCTACTAACCTTCAAAT... GTAATAATAGAGGTTAAATCT... ATGTTGGTTTATCCCTTCCATA... TCCCATTTTAAATGAAAAAAT... AACCAATCGCATCAACCGTGA... TCCCTTCTATACCAAGATCTC... CGGCTGAACTAGGTCAACCCG... ATTGGCCCTCCCGATATAGCA... CTAGCCCATGACAGGAGCATC... TATGATCCGTCCTAATTACGG... TTTATATCTCTATGGCGTATC... ACTACTAAACTAACCGCACAA... ACTGTAAAAAATATAGGCCA... CCCATAGAAATGACTATTCG... TGGCAATGCTCGGAAATCTGT... ACTGAGAGTGAAGTCTCTCC... GTGGGCTCAAGTAAATAGATA... GCTCAGAAAATCTCTGTGAAG... TATATTAGTTGTAAGGCTAA... GGGCCATTAGGTTTGTATG... AGAGCTAGAGTAGCTTTTCCA... AGTTGAAATGTGCACTCAGT... AGTACTGGTTAGGATAATGG... AAGCCATGATTTTATGCA... AAGGTTGAGAGATAGCAGT... TCGCGTGTATATCGGATAA... AGGACCCGAAGTTTCATCAT... TCATTAGTCAIGGTTATCCAT...</p>

<p>5 individuos (Zamora)</p>	<p>AATCTACTAACCCCTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCATATGGTACGTAACCTCTACCTATTATTACAGCAAGCATCCCTCCCAACATAAGAAATATGTCTGACAAAAGAGTACTTTGATAGA GTAATAATAGAGGTTAAATCCTCTTATTTCTAGAAATATAGGAATCGAACCTAATCTTAAGAATCCAAAAATCTTCGTGCTACCTGATTAACACACATCTAGAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCATACCCCGAAA ATGTTGGTTTATCCCTTCCCATACTAATAAATCCTCCCACTTCTACTATTATATATCCACCATCGCTCTAGGAACCATAATCGTTCTATTAGCTCCCACTGATTTATAATCTGAATCGGTTTIGAAAATAAATATACTGGCAATTAT TCCCATTTTAAATGAAAAAATTTAACCCACGAGCCGTAGAAAGCCTCCACAAAAATTTTCTAACACAGGGCCACTGCATCCATGCTCCTCATACTAGGCATTTATATCAACTTACTATACTCAGGACACTGAACAATCTCAACAACCTCTC AACCCAAATCGCATCAACCGTGATCACCATTGCCCTAGCGATAAAAACCTTGGCCTATCTCCCTTCCACTTCTGAGTTCCAGAAAGTTACACAAGGCATTCCTTACTAACATGACAGAAAAATCGCACCCCTTG TCCGTTCTATACCAGATCTCACCATTCAATTAACCCAACTTATTAATAACAATGGCTATCACATACAAACCATAAAGACATTTGGTACTCTCTATATCTTATTCGGTGCAATGAGCCGGAATAGTAGGTAAGTCCCTCAGCCTTCTAATC CGCGCTGAACTAGGTCAACCCGGAGCCCTGTTAGGGGATGATCAAATCTATAACGTGGTCTGAACTGCCCATGCATTCGTAATAATCTCTTTATAGTAATGCCCTATTATAATCGGAGGTTTGGAAACTGATTAGTGCCTTTAATA ATTGGCGCTCCCGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAAATATGAGTTTCTGATTACTGCCACCATCCTTCTACTCTTCTAGCCTTCTCCATAGTAGAAGCAGGTCAGGGACTGGTTGAACTGTTACCCCTCTAGCGGGCAAT CTAGCCATGCAGGAGCATCAGTAGACCTAAACAATTTTTCCCTACATTTAGCAGGCGTTTCTCCATTTCTAGGAGCTATTAACCTTTATTACCCTATTAACAATAGAACCTCTGCAATATCTCAATACCAAACTCCTCTGTTCG TATGATCCGTCCTAATTACGGCGGTAAGGAGTCGAACCCCTGAAATTTGGTTTCAAGCCAATACCATAACCACATGTCTCTCTCAATAAAGAGATATTAGTAAAAATTACATAAATCTCGTCAGGGTTAAATATAGGTGAAAAATCC TTTATATCTCTATGGCGTATCCCTTTCAAATAGGCCCTTCAAGACGCAACTTCTCCCATTAAGAAGAGCTCTACACTTCCACGACCATACTAATGATTGATTTCTGATTAGCTCCTTACTTCTACATTTTCAACTATGCTA ACTACTAACTAACGCACACAAAACAATAGATGCACAGGAAGTAGAAAACGGTATGAACCACTTCTACCAGCCATTTATCCTGGTTCTAATTGCACCTCCATCATTACGAATCCTCTATATAATGGA TGAATCAACAATCCTTTACTG ACTGTAATAAATATAGGCCATCAATGACTGAAATACGAATATACGGACTATGAAGATTTGAACTTTGATTCTTACATGATTTCAACACAAAGAAATTAAGCCTGGAGAACTACGACTATTAGAAGTAGACAATCGAGCGGTA CCCATAGAAATGACTATTCCGATGCTAATTTTCATCAGAAATGCTTTGCACTCATGAGCTTACCCTCCTAGGACTAAAACTGATGCAATTCGGGACGACTAAACCAACCGACTCTATGGC CATGCGACAGGCGCTGATTA TGGCAATGCTCGGAAATCTGTGGCTTAAACCACAGCTTCATGCCTATTGTTCTCGAACTAGTCCCACTGTCTATTTCGAAAAATGATCCGCTTCAATATTAAAACTAATAAGAAGCTATATAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAG ACTGAGAGTGCAAGTCTCTCTTAATGGAGATGCCACAACCTAGACACGTCACAAATGGTTTATCACAATTTCTATATAACTTAACTAACAATTTATGTATTCCAACTAAAAATCGTACATGATTGCGATTTCCTTCTATTAAAGCTATG GTGGGCTCAAGTAATAGATACTCCAGATGCTAGGAGTACTGAGGTATTAAGAAAGCGGCCTTCCAATGGGTTTAAAGGGGGTGTGCTGTGGGTGGTACAGCATGCTCCTAGTTTCGGGAGTAGGTTGCTAGACTTTGAGTGGTAAAAA GCTCAGAAGAACTCTGTGAAGAAAAATACCTCCGATACAATAAATAGGACTATCCCATACCGCAACCCCTTTTGAACGACAGGAGTGTGGTGGCCTTGAAAAAGTACTTTCTCGGATAATGTCCCCGTCATCATTGATATATGGTAAAG TATATTAGTTGTAAGGCCTAATAATAGCAAGGATGTTGAGTTGAAGTGAATCATATGATTAGTCTGATGTTATAAGAAAGGGCTGAAAGGGCTCCCGTTAGTGGTCATGGGCTTGGATTGACTATGTGATATGATGATGTTTGGT GGGCCATTAGGTGTTGTCATGCAAGTATAGACTTACTAGTAGAGCAAGACATAGGCTTGGATGAGAGCCACGGCGAGTTCAAGAAATAGTGAGTAGTATAGAAATAGAGAAAGTATGAGGGCTGTGGCGATGTTGATGTTTAT AGAGCTAGAGTAGCTTTTCCAATFAGATGAATAAGTAGCATGTATATACATGGAAGAAATTTCTATGATTGATCATGTAACAACAGAGCTACTGGCATGAAAAATCATTGAGAAGTAGTCTAGCTTAAAGCTFAGAGTTAACTTTAG AGTTTGAATGTCACTCAGTGTCAAGTTCGAGATGACCGTTTCTGTGCTGAGAAGTGAATATTATTATGGGGATAGTGTGATTGTAAGGCGTAAAGAAATTTGTGGTCTTTACGCTACTGTGGGTAGGATTTATCTTTATATGTTGA AGTACTGGTTAGGATAATGGTATTGTTAGCATGAGTAGGGCTGTAATAACGGAGGAGGTAAATAGATTGATTACTTTTATTTGGAGTTGCA CCAATTTTTTGGTTCTTAAGACCAATGGATTACTTCTATCCTTTAAAAAGTTGAAA AAGCATGATTTTATGCATGGGCGCATGAGTTAGCAGTTCTTGCATACTTTTTCGGTAATAAAAAAGATTTGAGCTTTTATTAAGTATGCAAACTAATGTTTTTGTAAACTATATTTACAA TAAATGGGTCCTAGAATCATTTT AGGGTTGAGAGATAGCAGTAGGATGGCTATAACTGTGAGTAGGAGAAATAATCCGATGTTTCTGTTTCTGAAAAATAGGATAGAGCCGTAGTACAGACCCCGTCCCACTGATGAATAAGCAGATAAAGAAATATTGAAGCCCGT TCCCGTGTATATATCGGATAACTCATCCGTAGTTAACGTCTCGACAGATATGGGCGACTGATGAGAAGGCTATAGTCTGTCTGCTGTATAGTGTATGGCCAGGAAATAGGCCGTTAGGATTTGTAGGACCGGACACCCCAAGA AGGGACCCGAAGTTTCATCATGCTGAGATTTGATGGTGTGGGAGGTCGATGAATGAGTTGATGATTTTAGCTAGTGGGTGAGTTTTTCCGATGTTGGTCAATTAAGATTTTATAGTTGAAATCAACCGTGATTTTTCATG TCATTAGTCAATGTTAGATTCCATGTTGGGAATAATGGTAAACATATACTGTGTTCAATTTAAAGTGTGTTTTTGAATAAGGTTTTGTAGGCTTTTCTTCAAGCCCTCTCCTGTTTACGGGGGTTTAGTTTTAA</p>
--------------------------------------	---

Identificación de los haplotipos y número de individuos (**n**). Los colores representan las secuencias de las regiones analizadas en este estudio: **ND6-CytB**, **ND4-ND5** y **ATP6-COIII**, y secuencias las regiones **HVRI**, **ND1-ND2**, **COI Parcial** y **COI-COII-ATP8** analizadas en estudios previos reportados por Cueva (2018), Moreta (2020), Vallejo (2021) y Guallasamín (2023).

Tabla 3. Número de haplotipos, índices de diversidad genética (H_d , π) y pruebas de neutralidad (D de Tajima, F_s de F_u) de los 3 marcadores moleculares mitocondriales diseñados en este estudio y de 2 regiones concatenadas del ADN mitocondrial de *Tremarctos ornatus*.

Marcador ADNmt (pb)	Población (n)	No. Haplotipos	Diversidad de Haplotipos ($H_d \pm sd$)	Diversidad de Nucleótidos ($\pi \pm sd$)	D de Tajima**	valor p	F_s de F_u **	valor p
ATP6-COIII (653 pb)	Total (22)	3	0.658 \pm 0.052	0.0047 \pm 0.0028	2.704	0.998	5.262	0.983
ND4-ND5 (575 pb)	Total (22)	2	0.5195 \pm 0.0379	0.001807 \pm 0.001395	2.025	0.985	3.154	0.914
ND6-CytB (549 pb)	Total (22)	2	0.5195 \pm 0.0379	0.010409 \pm 0.005783	3.092	1.000	12.181	1.000
<i>Región Concatenada 1</i> (ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB) (1777 pb) *	Total (22)	3	0.658 \pm 0.0519	0.005535 \pm 0.002939	3.281	1.000	13.819	1.000
<i>Región Concatenada 2</i> (HVRI + ND1-ND2 + COI Parcial + COI-COII-ATP8 + ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB) (4476 pb) *	DMQ (10)	3	0.6222 \pm 0.1383	0.000159 \pm 0.000147	0.015	0.727	-0.156	0.312
	Loja (4)	2	0.5 \pm 0.2652	0.000782 \pm 0.000598	-0.809	0.166	3.251	0.920
	Zamora (8)	2	0.5357 \pm 0.1232	0.000120 \pm 0.000125	0.000	1.000	0.866	0.553
	Total (22)	7	0.8571 \pm 0.0402	0.004381 \pm 0.002249	3.276	1.000	10.555	0.998

* *Región Concatenada 1* (ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB): corresponde a la unión de los 3 marcadores de ADNmt individuales diseñados para este estudio; *Región Concatenada 2* (HVRI + ND1-ND2 + COI Parcial + COI-COII-ATP8 + ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB): incluye los marcadores de la Región Concatenada 1 más los 4 marcadores moleculares mitocondriales (de los mismos individuos muestreados) de estudios previos reportados por Cueva (2018), Moreta (2020), Vallejo (2021) y Guallasamín (2023).

** No existe significancia estadística en las pruebas de neutralidad (valor $p > 0.05$)

Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) de las regiones concatenadas

Región Concatenada 1*						Región Concatenada 2*					
Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	% Variación	Valor p	Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	% Variación	Valor p
Entre poblaciones	2	103.273	7.47368 Va	100.00	0.00	Entre poblaciones	2	195.584	14.07546 Va	96.28	0.00
Dentro de las poblaciones	19	0.00	0.0000 Vb	0.00		Dentro de las poblaciones	19	10.325	0.54342 Vb	3.72	
Total	21	103.273				Total	21	205.909			
Índice de Fijación	FST: 1.00					Índice de Fijación	FST: 0.96293				

* *Región Concatenada 1*: corresponde a la unión de los 3 marcadores de ADNmt individuales diseñados para este estudio; *Región Concatenada 2*: incluye los marcadores de la Región Concatenada 1 más los 4 marcadores moleculares mitocondriales (de los mismos individuos muestreados) de estudios previos reportados por Cueva (2018), Moreta (2020), Vallejo (2021) y Guallasamín (2023).

g.l., grados de libertad

FST, Índice de Fijación

7. FIGURAS

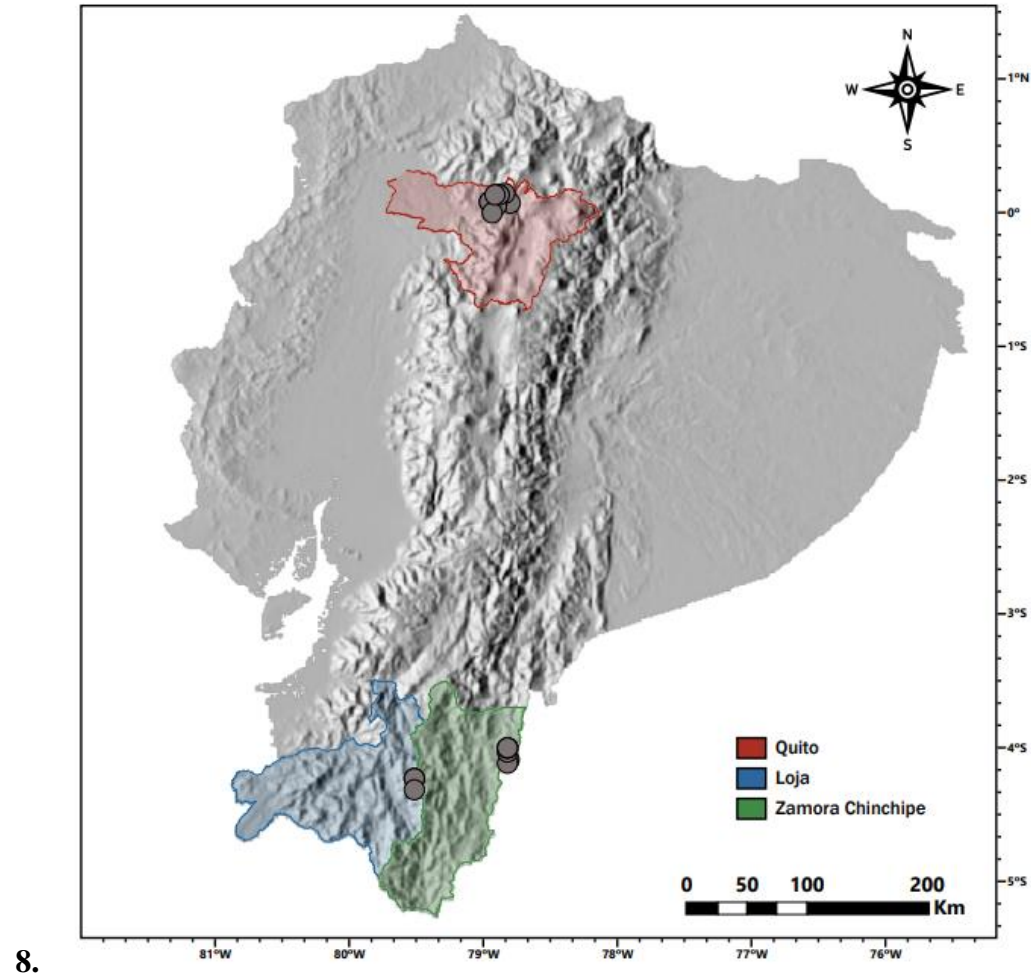


Figura 1. Mapa de Ecuador con las localidades de muestreo de los 22 individuos en análisis

Mapa de los puntos geográficos (Anexo 1) de colección de muestras realizado en QGis v.3.32.3 (Kurt et al., 2016).

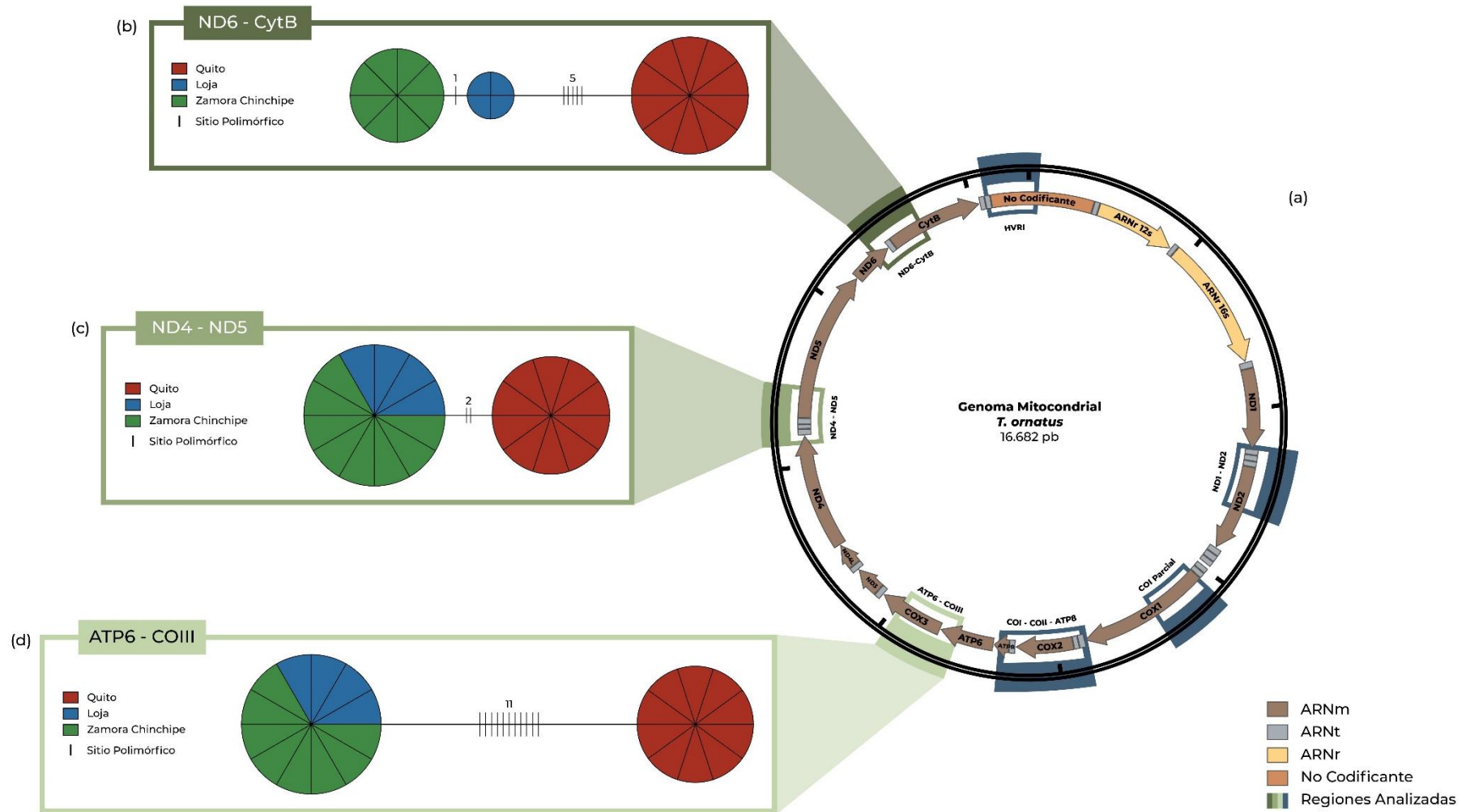


Figura 2. Redes de haplotipos de los marcadores de ADNmt individuales diseñados para este estudio

(a) Mapa genético del ADN mitocondrial de *Tremarctos ornatus* (accesión MW556430.1 NCBI) con los genes (ARNm, ARNt, ARNr) y

regiones no codificantes. Se muestran las regiones analizadas en este estudio: **ND6-CytB**, **ND4-ND5** y **ATP6-COIII**, y las regiones **HVRI**, **ND1-ND2**, **COI Parcial** y **COI-COII-ATP8** analizadas en estudios previos reportados por Cueva (2018), Moreta (2020), Vallejo (2021) y Guallasamín (2023). **(b)** Red de haplotipos de ND6-CytB. **(c)** Red de haplotipos de ND4-ND5. **(d)** Red de haplotipos de ATP6-COIII. Cada círculo representa un haplotipo distinto y está dividido en fracciones de acuerdo con el número de individuos que pertenece a cada haplotipo. Los colores representan la localidad de los individuos (**Quito**, **Loja**, **Zamora Chinchipe**) y las líneas verticales cortas representan el número de sitios polimórficos (cambios de nucleótidos) existentes entre cada haplotipo.

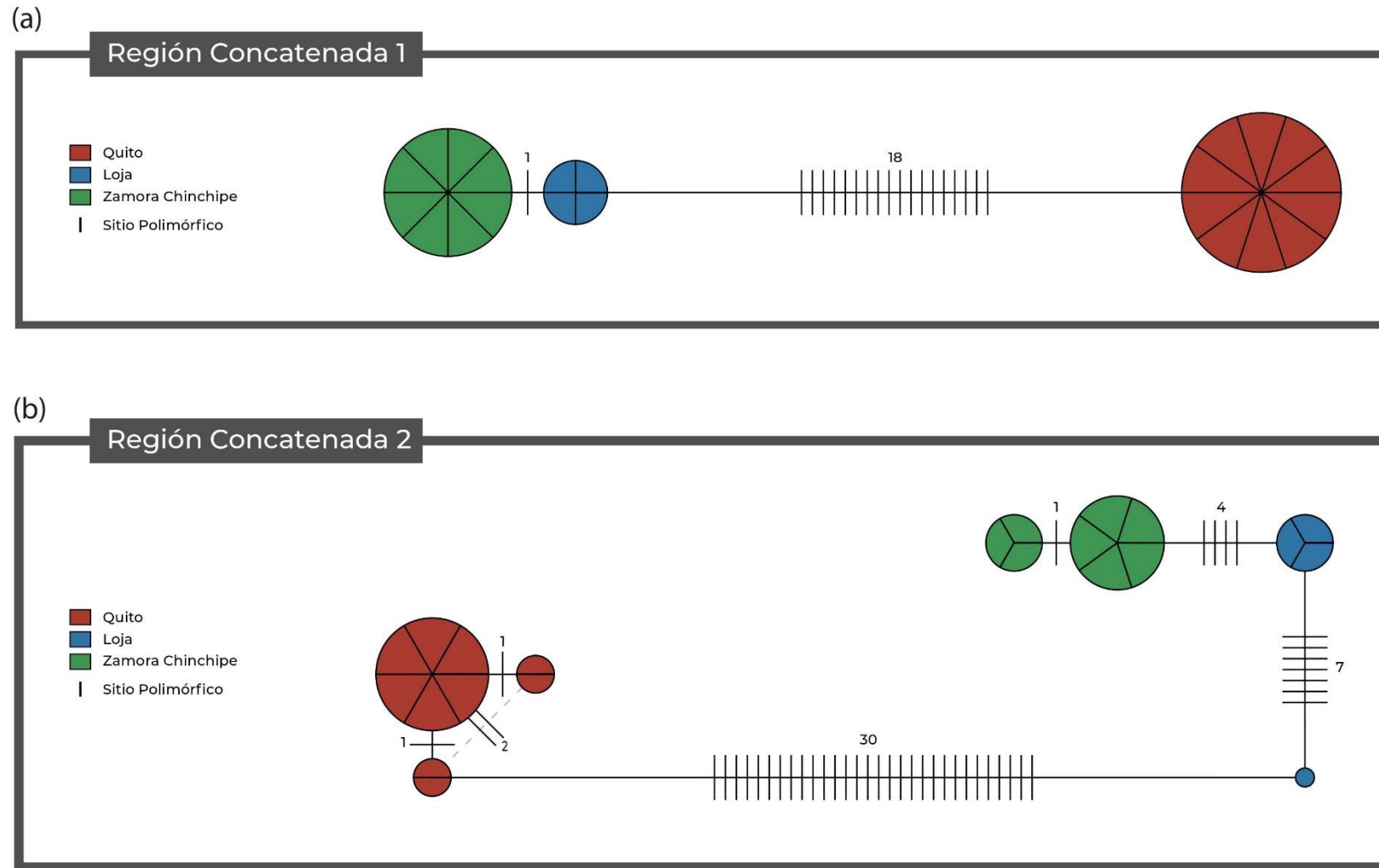


Figura 3. Redes de haplotipos de las Regiones Concatenadas

(a) Red de haplotipos de la Región Concatenada 1, que contiene las secuencias de los 3 marcadores moleculares de ADNmt individuales

diseñados para este estudio: ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB. **(b)** Red de haplotipos de la Región Concatenada 2 que contiene los 3 marcadores moleculares de la Región Concatenada 1 más las secuencias de 4 marcadores moleculares mitocondriales de estudios previos (HVRI + ND1-ND2 + COI Parcial + COI-COII-ATP8 + ATP6-COIII + ND4-ND5 + ND6-CytB). Cada círculo representa un haplotipo distinto y está dividido en fracciones de acuerdo con el número de individuos que pertenece a cada haplotipo. Los colores representan la localidad de los individuos (**Q**uito, **L**oja, **Z**amora **C**hinchipe) y las líneas cortas representan el número de sitios polimórficos existentes entre cada haplotipo.



Figura 4. Árbol filogenético de los 22 individuos muestreados, construido con el método Maximum-Likelihood y un modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY).

Se evidencian dos grupos, uno agrupa a todos los individuos provenientes de Zamora Chinchipe y Loja, y otro agrupa a todos los individuos de Quito. Se utilizó la secuencia del genoma de ADNmt de *Ursus americanus* como outgroup (Accesión GenBank: NC_003426.1)

REFERENCIAS

- Albarracín, V., Paisley, S., Aliaga-Rossel, E., & Liendo, X. V. (2013). State of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*) in Bolivia. *Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of Neotropical Carnivores*, 507-602.
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767–1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
- Chakraborty, R. (1993). Analysis of Genetic Structure of Populations: Meaning, Methods, and Implications. Springer eBooks, 189–206. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2970-5_14
- Cueva, D. (2018). 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. Universidad San Francisco de Quito.
- Cueva, D. F., Gutierrez, B., Bruque, G., Molina, S., & Torres, M. L. (2018). Mitochondrial DNA reveals low genetic diversity in Ecuadorian Andean bears. *Ursus*, 29(1), 43-50.
- Cuvier, F. 1825. *Tremarctos ornatus*. En: *Histoire Naturelle des Mammifères* (E. Geoffroy SaintHilaire & F.G. Cuvier) 3:50.
- Cuvier, F. 1825. *Tremarctos ornatus*. En: *Histoire Naturelle des Mammifères* (E. Geoffroy SaintHilaire & F.G. Cuvier) 3:5
- Espinosa, S. & Jacobson, S. (2012). Human-Wildlife Conflict and Environmental Education: Evaluating a Community Program to Protect the Andean Bear in Ecuador. *The Journal of Environmental Education*, 43(1), 55–65. doi:10.1080/00958964.2011.579642
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

- Fitzpatrick, B. M. (2009). Power and sample size for nested analysis of molecular variance. *Molecular Ecology*, 18(19), 3961–3966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2009.04314.x>
- Fu, Y., & Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693–709. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.693>
- 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>
- Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A., & Murphy, E. J. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*, 109(1), 50–56. <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.12>
- Guallasamín, A. (2023). Analysis of the genetic diversity of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*) using three new mitochondrial markers in populations from Quito, Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador. Universidad San Francisco de Quito.
- Jirat, V., Supakit, K., Tawachai, M., Phatcharin, M., Kittikhun, M., Watsana, P., Taddaow, K., & Sorawat, T. (2023). The Analysis of Genetic Polymorphism on Mitochondrial Hypervariable Region III in Thai Population. *Genes*, 14(3), 682–682. <https://doi.org/10.3390/genes14030682>
- Juárez-Casillas, L. A., & Varas, C. (2011). Genética evolutiva y molecular de la familia Ursidae: una revisión bibliográfica actualizada. *Therya*, 2(1), 47-65.
- Lowe, A., Harris, S., & Ashton, P. (2004). *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*.
- Moreta, E. (2020). Estudio de la diversidad genética del oso andino en el sur de la Sierra ecuatoriana mediante el análisis de la región D-Loop del ADN mitocondrial. Universidad San Francisco de Quito

- Nabholz, B., Sylvain Glémin, & Galtier, N. (2007). Strong Variations of Mitochondrial Mutation Rate across Mammals--the Longevity Hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(1), 120–130. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm248>
- Nabholz, B., Mauffrey, J. F., Bazin, E., Galtier, N., & Glemin, S. (2008). Determination of mitochondrial genetic diversity in mammals. *Genetics*, 178(1), 351-361.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- 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>
- Qin Aili, Ding, Y., Jian, Z., Fanqiang, M., James, Pei, S., Xu, G., Guo, Q., & Shi, Z. (2021). Low genetic diversity and population differentiation in *Thuja sutchuenensis* Franch., an extremely endangered rediscovered conifer species in southwestern China. *Global Ecology and Conservation*, 25, e01430–e01430. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01430>
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J., Francesc Calafell, & Navarro, A. (2008). Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination. *Genetics*, 179(1), 555–567. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083006>
- Rodríguez, D., Reyes, A., Quiñones-Guerrero, A., Poveda-Gómez, F. E., Castillo-Navarro, Y., Duque, R., & Reyes-Amaya, N. R. (2020). Andean bear (*Tremarctos ornatus*) population density and relative abundance at the buffer zone of the Chingaza National Natural Park, cordillera oriental of the Colombian Andes. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 60, e20206030.

- Ruiz-García, M. (2003). Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the northern Andean area. *Hereditas*, 138(2), 81-93. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2003.01578.x>
- Ruiz-García, M. (2007). Genética de Poblaciones: Teoría y aplicación a la conservación de mamíferos neotropicales (Oso andino y delfín rosado). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección biológica: órgano del Instituto de Ciencias Naturales José de Acosta*, 102, 99-126.
- Ruiz-García, M. (2012). The genetic demography history and phylogeography of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae) by means of microsatellites and mtDNA markers. Chapter 5. "Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Biological Conservation of the Neotropical Carnivores".
- Ruiz-García, M., Arias Vásquez, J. Y., Restrepo, H., Cáceres-Martínez, C. H., & Shostell, J. M. (2020). The genetic structure of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora) in Colombia by means of mitochondrial and microsatellite markers. *Journal of Mammalogy*, 101(4), 1072-1090. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyaa082>
- Ruiz-García, M., Castellanos, A., Arias-Vásquez, J. Y., & Shostell, J. M. (2020a). Genetics of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora) in Ecuador: When the Andean Cordilleras are not an Obstacle. *Mitochondrial DNA Part A*, 31(5), 190-208. <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1769088>
- 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-García, M., Orozco-terWengel, P., Payan, E., & Castellanos, A. (2003). Genética de Poblaciones molecular aplicada al estudio de dos grandes carnívoros (*Tremarctos ornatus* – Oso andino, *Panthera onca*- jaguar): Lecciones de conservación. *Boletín de la*

Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección biológica: órgano del Instituto de Ciencias Naturales José de Acosta, 98, 135-158.

Ruiz-García, M., Vásquez, J. Y. A., Castellanos, A., Kolter, L., & Shostell, J. M. (2020b). Molecular Evolution (Mitochondrial and Nuclear Microsatellites Markers) in the Andean 48 Bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora): How Many ESUs Are There? En J. Ortega & J. E. Maldonado (Eds.), *Conservation Genetics in Mammals: Integrative Research Using Novel Approaches* (pp. 165-194). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33334-8_8

Ruiz-García, M., Vásquez, J. Y., Restrepo, H., Cáceres-Martínez, C. H., & Shostell, J. M. (2020c). The genetic structure of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora) in Colombia by means of mitochondrial and microsatellite markers. *Journal of Mammalogy*, 101(4), 1072-1090. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyaa082>

Sandoval-Guillén, P., & Patricio Yáñez-Moreta. (2019). Aspectos biológicos y ecológicos del oso de anteojos (*Tremarctos Ornatus*, Ursidae) en la zona andina de Ecuador y perspectivas para su conservación bajo el enfoque de especies paisaje. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 30(2), 19–27. <https://doi.org/10.17163/lgr.n30.2019.02>

Saremi, N. F., Oppenheimer, J., Vollmers, C., O'Connell, B., Milne, S. A., Byrne, A., Yu, L., Ryder, O. A., Green, E., & Shapiro, B. (2021). An Annotated Draft Genome for the Andean Bear, *Tremarctos ornatus*. *Journal of Heredity*, 112(4), 377–384. <https://doi.org/10.1093/jhered/esab021>

Smaragdov, M. G., & Kudinov, A. A. (2020). Assessing the power of principal components and wright's fixation index analyzes applied to reveal the genome-wide genetic differences between herds of Holstein cows. *BMC Genetics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00848-0>

- Stumpf, M. (2004). Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. *European Journal of Human Genetics*, 12(6), 469–477. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201179>
- Suarez, L. (1988). Seasonal distribution and food habits of spectacled bears *Tremarctos ornatus* in the highlands of Ecuador. *Studies on neotropical fauna and environment*, 23(3), 133-136.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Taanman, J. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1410(2), 103–123. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00161-3)
- Thermo Fisher Scientific. (2016). NanoDrop One: User Guide. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>
- Vallejo, D. (2021). Estudio preliminar de la diversidad de haplotipos del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en la provincia de Zamora-Chinchipec mediante el análisis de la región D-Loop mitocondrial. Universidad San Francisco de Quito
- Vélez-Liendo, X., Jackson, M., Ruiz-García, M., Castellanos, A., Espinosa, S., Laguna, A. (2020). Andean Bear (*Tremarctos ornatus*). *Bears of the World*, (), -. doi:10.1017/9781108692571.008
- Vela-Vargas, I. M., Jorgenson, J. P., González-Maya, J. F., & Koprowski, J. L. (2021). *Tremarctos ornatus* (Carnivora: Ursidae). *Mammalian Species*, 53(1006), 78-94.
- Vélez-Liendo, X. & García-Rangel, S. (2017). *Tremarctos ornatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017.

Wright, S. (1949). *THE GENETICAL STRUCTURE OF POPULATIONS*, 15(1), 323–354. doi:10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x

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. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-198>

ANEXOS

Anexo 1. Información de los 22 individuos muestreados: identificación, localidad, cuantificación del ADN y haplotipo al que pertenecen.

Población (n)	Código de Individuo	Código de muestra	Localidad	Latitud	Longitud	Tipo de Muestra	Concentración ADN (ng/μl)	A260/280	A260/230	Haplotipo
Quito (10)	O1H3M	DMQ1	Lulumbamba	0.09	-78.48	Pelo	9.5	2.0	0.8	HTOQ1
	23M8	DMQ3	Cambugan	0.16	-78.52	Pelo	0.7	1.2	-0.2	HTOQ2
	Ind2	DMQ4	Bellavista 3	0.15	-78.56	Pelo	4.7	1.5	-1.4	HTOQ1
	25M9	DMQ5	Gavilanes	0.07	-78.58	Pelo	1.9	-11.5	0.4	HTOQ1
	20I	DMQ8	Gavilanes	0.07	-78.58	Pelo	6.7	5.0	0.2	HTOQ1
	5M5	DMQC	Campamento	0.10	-78.63	Pelo	0.1	0.2	0.0	HTOQ2
	21M7	DMQD	Bellavista 3	0.15	-78.56	Pelo	0.0	-0.7	0.0	HTOQ3
	35I	DMQE	Campamento	0.10	-78.63	Pelo	1.3	1.9	-0.2	HTOQ3
	YUMBO	DMQK	Santa Lucía	0.02	-78.61	Pelo	43.5	2.0	1.0	HTOQ1
	Ind1	DMQL	Curipogrio	0.15	-78.59	Pelo	2.4	12.8	0.3	HTOQ1
Loja (4)	UTPL002	UTPL2	Reserva Madrigal	-4.04	-79.17	Heces	5.7	1.9	0.2	HTOL1
	UTPL013	UTPL13	Reserva Madrigal	-4.04	-79.17	Heces	16.2	2.1	0.4	HTOL1
	UTPL018	UTPL18	Parque Nacional Podocarpus	-4.04	-79.17	Saliva	1.9	-11.1	0.1	HTOL1
	UTPL032	UTPL32	Parque Nacional Podocarpus	-4.12	-79.17	Saliva	9.2	2.2	0.4	HTOL2
Zamora (8)	C5LB	Z2	Paquisha, Río Blanco	-3.91	-78.49	Pelo	7.2	1.9	1.4	HTOZ1
	D5LBC	Z3	Paquisha, Río Blanco	-3.9	-78.49	Pelo	2.5	1.0	0.2	HTOZ1

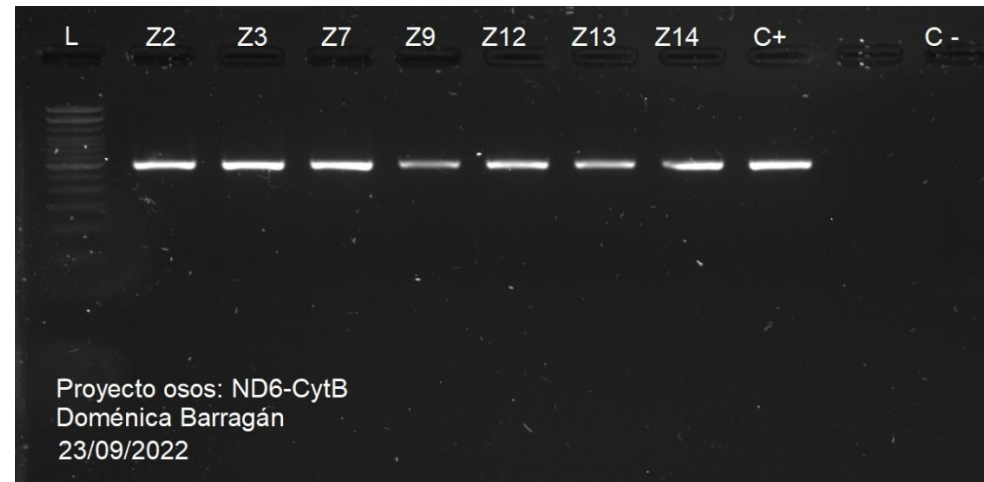
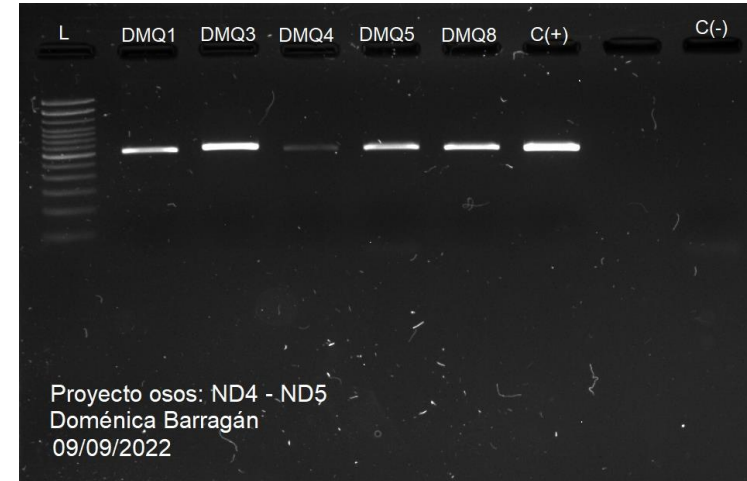
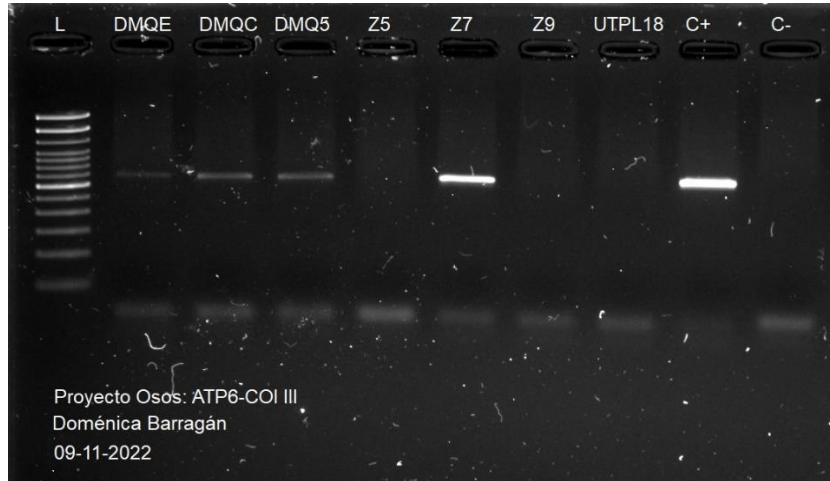
A4LA	Z5	Paquisha, Río Blanco	-3.93	-78.50	Pelo	2.7	1.3	0.5	HTOZ2
I4C	Z7	Paquisha, Río Blanco	-3.85	-78.50	Pelo	14.6	1.9	0.5	HTOZ1
A2C	Z9	Paquisha, Río Blanco	-3.82	-78.50	Pelo	6.3	1.6	0.5	HTOZ2
A2A2B2	Z12	Paquisha, Río Blanco	-3.82	-78.50	Pelo	1.8	1.1	-2.2	HTOZ2
A2A2B2	Z13	Paquisha, Río Blanco	-3.82	-78.50	Pelo	17.0	1.9	0.8	HTOZ2
R2LA2I	Z14	Paquisha, Río Blanco	-3.82	-78.50	Pelo	1.6	1.8	1.6	HTOZ2

Anexo 2. Set de primers utilizado para la amplificación de los 3 marcadores moleculares de ADNmt

Marcador ADNmt	Tamaño esperado (pb)	Tamaño final (bp)	Secuencia primer (5' - 3')		T_m (°C)	T_a (°C)	%GC	Off-targets	Comentarios
ATP6 - COIII	680	676	Forward	CAACATCACTGCAGGTCACT	59	58	50	Ninguno	No dímeros/ no hairpins
			Reverse	AGTGATAAGTAGAGCCTGGAGT	59		45		
ND4 - ND5	649	575	Forward	TCAAGCCATCCTTCACACGA	60	60	50	Ninguno	No dímeros/ no hairpins
			Reverse	ATTGGTTAATGTTGGGGTCG	57		45		
ND6 - CytB	604	549	Forward	AGTACGATACCACATCCAACA	57	60	43	Ninguno	No dímeros/ no hairpins
			Reverse	GGACGTACCCCATGAATGCT	60		55		

Los primers fueron diseñados por Darío F. Cueva y validados por Doménica Barragán. Los parámetros especificados incluyen a la temperatura de melting (**T_m**), temperatura de annealing (**T_a**), y contenido de guanina-citosina (**%GC**)

Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR de los marcadores de ADNmt diseñados para este estudio (ATP6-COIII; ND4-ND5; ND6-CytB).



Anexo 4. Resumen de haplotipos e índices de diversidad (H_d , π) reportados en estudios previos en Quito, Loja y Zamora Chinchipe

Marcador ADNmt (pb)	Población (n)	No. Haplotipos	Diversidad de Haplotipos (H_d)	Diversidad de Nucleótidos (π)	Referencia
HVRI del D-Loop (600 pb)	Quito (38)	4	0.7055	0.001772	Cueva (2018)
HVRI del D-Loop (600 pb)	Loja (26)	3	0.526	0.00691	Moreta (2020)
HVRI del D-Loop (600 pb)	Zamora Chinchipe (12)	2	0.530	0.00115	Vallejo (2021)
HVRI + ND1-ND2 + COI Parcial + COI-COII-ATP8 (2731 pb)	Total (23) Quito (10) + Loja (5) + Zamora Chinchipe (8)	7	0.8617	0.0036	Guallasamín (2023)