

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

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

Erick Andrés Moreta Urbano

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Proceso Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**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**

Erick Andrés Moreta Urbano

Nombre del profesor, título académico

María de Lourdes Torres, Ph D.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y Apellidos: Erick Andrés Moreta Urbano

Código: 00134510

Cédula de identidad: 1720020120

Lugar y Fecha: Quito, mayo de 2020

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 de anteojos (*Tremarctos ornatus*) es una especie que se distribuye a lo largo de la región andina, desde Venezuela hasta Bolivia. A esta especie se le atribuye un gran valor ecológico y cultural. Se destaca por ser la única especie de úrsido en América del Sur y el último miembro vivo de la subfamilia Tremarctinae. Se ha catalogado a la especie como un potencial dispersor de semillas y una especie paraguas. Pese a la importancia de esta especie en su ecosistema, la densidad de sus poblaciones tiende a decrecer; por lo que la UICN la ha catalogado como vulnerable y en Ecuador se considera que se encuentra en peligro de extinción. Realizar análisis de diversidad genética es de suma importancia para conocer el estado de las poblaciones, además de proveer evidencia de su estructura poblacional. Investigaciones previas ya han evaluado la diversidad genética de la especie en el norte del Ecuador, sin embargo, surge la necesidad de realizar más investigaciones en otras regiones del país. En el presente estudio se analizó la diversidad genética del oso de anteojos de 26 muestras de *T. ornatus* pertenecientes al sur de la Sierra ecuatoriana mediante un marcador para la región hipervariable del ADN mitocondrial. Se encontró un nuevo haplotipo al analizar las secuencias de este marcador. Además, resultados sugieren una baja diversidad nucleotídica ($\pi= 0.00691$) y baja diversidad de haplotipos ($H=0.526$). En comparación con datos previos de la diversidad de las poblaciones al norte del Ecuador, se demuestra una mayor diversidad nucleotídica, pero menor diversidad de haplotipos. Adicionalmente, se analizaron nueve de estas muestras en 4 regiones microsatélite para evaluar diversidad y estructura poblacional. Estos arrojaron una riqueza alélica de 1.87, la cual resulta menor que la encontrada en la población del norte del Ecuador, que fue de 3.43. El análisis de coordenadas principales evidencia una separación de las muestras del norte y sur del Ecuador en base a sus distancias genéticas; mientras que el análisis Structure indica la existencia de dos acervos genéticos que dividen a los individuos del norte y sur del Ecuador. Los índices obtenidos reflejan valores bajos de diversidad en comparación a otras especies de oso, resaltando la necesidad de mantener y expandir el alcance y escala de este tipo de estudios, los cuales son fundamentales para implementar planes futuros de conservación.

Palabras clave: Oso de anteojos, *Tremarctos ornatus*, Sur del Ecuador, ADN mitocondrial, Marcadores microsatélite, Haplotipos, Diversidad genética, Estructura poblacional

ABSTRACT

The spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) is a species that is distributed all along the Andean region, spanning from Venezuela to Bolivia. Great ecological and cultural values are attributed to this species, while it is also remarkable for being the only Ursid in South America and the last living member of the subfamily Tremarctinae. The spectacled bear is a potential seed dispersing agent in nature, and it is also considered as an umbrella species, highlighting its important role in the ecosystems that inhabits. Nonetheless, the density of their populations tends to decrease, which classifies this species as Vulnerable according to the IUCN, while in Ecuador it has been classified as Endangered. Performing genetic diversity analyses is of great importance to better understand the current state of the populations, while also providing evidence for the existence of a population structure. A previous research has already assessed the genetic diversity of this species in the northern Andean region of Ecuador. However, there is a need to conduct additional research in other regions of the country. This study analyzed the genetic diversity of the spectacled bear in southern Ecuador through the analysis of a hypervariable region of the mitochondrial DNA from 26 faeces and saliva samples. A new haplotype was found when analyzing the sequences obtained with this marker. In addition, results suggest that it exists a low nucleotide ($\pi=0.00691$) and a low haplotype ($H=0.526$) diversity. Compared to previous data on population diversity in northern Ecuador, a greater nucleotide and a lower haplotype diversity was observed. Nine of these samples were also analyzed with 4 microsatellite molecular markers to assess the diversity and population structure. An allelic richness of 1.87 was obtained, which is less than that the one found in the population of northern Ecuador, which value was 3.43. The principal coordinate analysis shows a separation of the samples from northern and southern Ecuador based on their genetic distances, while the Structure analysis indicates the existence of two genetic lineages that divide individuals from northern and southern Ecuador. The diversity statistics obtained reflect low values of diversity compared to other bear species, highlighting the need to maintain and expand the scope and scale of such studies, which are essential for implementing future conservation management plans for this species.

Key words: Spectacled bear, *Tremarctos ornatus*, South of Ecuador, mitochondrial DNA, Microsatellite markers, Haplotypes, Genetic Diversity, Population Structure.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1 | Generalidades de <i>T. Ornatus</i> : Morfología, distribución e historia evolutiva..... | 10 |
| 1.2 | Estado de Conservación..... | 11 |
| 1.3 | Importancia del oso andino..... | 12 |
| 1.4 | Genética del oso andino y estudios genéticos llevados a cabo | 14 |
| 2 | METODOLOGÍA | 16 |
| 2.1 | Obtención y datos de muestras analizadas..... | 16 |
| 2.2 | Amplificación, purificación y reamplificación de la región D-loop..... | 17 |
| 2.3 | Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas..... | 18 |
| 2.4 | Amplificación de loci microsatélites. | 18 |
| 2.5 | Análisis de genotipado de muestras..... | 19 |
| 3 | RESULTADOS..... | 20 |
| 3.1 | Cuantificación y calidad de las muestras/ fuente y extracción | 20 |
| 3.2 | Amplificación y secuenciación del ADN mt | 20 |
| 3.3 | Diversidad Genética mitocondrial y análisis de pruebas de neutralidad | 21 |
| 3.4 | Análisis de Median Joining | 22 |
| 3.5 | Amplificación y genotipado de las muestras mediante marcadores microsatélite | 22 |
| 3.6 | Estructura poblacional | 23 |
| 4 | DISCUSIÓN | 24 |
| 4.1 | Calidad de las muestras y su efecto en posteriores análisis..... | 24 |
| 4.2 | Diversidad genética | 26 |
| 4.3 | Eventos demográficos..... | 30 |
| 4.4 | Estructura poblacional | 32 |
| 5 | CONCLUSIONES | 34 |
| 6 | REFERENCIAS..... | 36 |
| 7 | TABLAS | 41 |
| 8 | FIGURAS | 44 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Código, lugar de recolección, origen y haplotipo al que pertenecen las muestras analizadas. | 42 |
| Tabla 2: Información acerca de las secuencias de cada resultado obtenido de la secuenciación | 43 |
| Tabla 3. Sitios polimórficos encontrados dentro de la secuencia de cada haplotipo dentro de la región hipervariable 1 dentro de D-Loop del ADN mitocondrial del oso andino..... | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mapa de las localizaciones de recolección de muestras..... | 44 |
| Figura 2: Red de haplotipos generado en Phylogenetic Network representado como Median Joining contruido bajo Maximum Parsimony method. | 45 |
| Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de amplicones obtenidos a partir de la amplificación del ADN nuclear de marcadores SSR | 46 |
| Figura 4: Análisis de coordenadas principales..... | 46 |
| Figura 5: Modelo de estructura poblacional basado en análisis bayesianos en software STRUCTURE..... | 47 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *T. Ornatus*: Morfología, distribución e historia evolutiva

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*), también llamado oso andino, es una especie distribuida a lo largo de Sudamérica, desde Bolivia hasta Venezuela incluyendo Ecuador, en un área total de más de 1400 km de largo y de 200-265 km de ancho en bosques nublados y páramos andinos (García-Rangel, 2012). Se considera a la especie como un mamífero endémico y emblemático dentro del territorio de los Andes tropicales pues es la última representante de los osos de nariz corta y además la única especie de oso en América del Sur (Sandoval & Yáñez, 2019). Los principales hábitats que ocupa el oso dentro del Ecuador se encuentran a lo largo de la Sierra ecuatoriana y parte de la Amazonía (Titira, 2017)

Morfológicamente, tanto las hembras como los machos pueden ser de 1.8 a 2 m de alto y tener un peso de hasta 175kg, siendo la hembra la que comúnmente posee menor peso, definiendo a la especie como un mamífero robusto y con dimorfismo sexual notable (Sandoval & Yáñez, 2019; Peyton, 1999). La especie se caracteriza además por poseer cuello y cola cortos, pelaje grueso y oscuro, orejas redondeadas pequeñas y premolares reducidos (Garshelis, 2009). Además, cada individuo posee un patrón único de pelaje marrón claro o blanco alrededor de los ojos que puede llegar hasta las mandíbulas e incluso hasta el pecho; patrón que es de gran utilidad para la identificación de individuos (Castellanos, 2010) pues no varía por factores de simetría, sexo o edad (García-Rangel, 2012). En cuanto a su comportamiento, el oso andino posee hábitos diurnos (principalmente) y nocturnos, primariamente terrestres, parcialmente arbóreos y solitarios. Su dieta es omnívora y se compone en gran parte por especies vegetales como bromelias, bulbos de orquídeas, palmas, frutos, entre otros. Al escasear estas fuentes de alimento, se ha registrado que recurren a la caza de ciervos

o ganado cercano a su hábitat (Goldstein, 2002). Sin embargo, la dieta cambia según la localidad específica y los recursos disponibles (García-Rangel, 2012).

El oso andino es la única especie viviente de la subfamilia Tremarctinae, perteneciente a la familia Ursidae. Esta subfamilia se originó cuando el género *Plionarctos* se separó de *Ursavus* a la mitad del Mioceno; en donde se distribuía a lo largo de todo el continente americano (García-Rangel, 2012). La subfamilia contiene a cuatro géneros agrupados en dos clados: Por un lado, el clado basal que contiene a *Plionarctos* y *Tremarctos*. Por otro lado, el clado de osos de cara corta que incluye a *Arctodus* y *Arctotherium*. El nacimiento de *Tremarctos* se dio con el apareamiento, en el Mioceno tardío, de *T. floridanus*. No fue sino hasta el Pleistoceno tardío que *T. ornatus* divergió de *T. floridanus* convirtiéndose así en la especie de oso más reciente en aparecer. El lugar geográfico de origen de *T. ornatus* es desconocido debido a la falta de récord fósil de su ancestro *T. floridanus* en América del Sur; mientras que los registros más antiguos del oso de anteojos son de hace 5980-1500 años en territorios colombianos, ecuatorianos y peruanos (García-Rangel, 2012). La falta de este conocimiento podría ser superada con estudios moleculares y de esta manera poder conocer más acerca de la historia de la especie.

1.2 Estado de Conservación

A pesar del amplio rango de condiciones que puede soportar el oso andino, pues ocupa un gran rango de ecosistemas altitudinales, es una especie vulnerable a amenazas debido a bajas densidades poblacionales provocadas por una tasa de reproducción lenta, un largo periodo de cuidado parental y hábitos que compiten con actividades humanas (García-Rangel, 2012). Se la considera como una especie vulnerable (VU) dentro de la lista roja (IUCN, 2019); y dentro del Ecuador se la clasifica como una especie en peligro de extinción (Cuesta et al., 2001). Además, se ha determinado que han emergido amenazas más severas producto de la combinación de diferentes factores como técnicas de agricultura inapropiadas, introducción de

animales domésticos, prácticas no reguladas relacionadas al desarrollo y explotación de recursos, transculturización, desplazamiento humano, falta de planeación gubernamental, tráfico de drogas y malestar social (Sandoval & Yáñez, 2019; García-Rangel, 2012). Adicionalmente, se ha registrado que el oso andino sufre, al igual que otras especies de oso, cazas furtivas y reducción de su ecosistema natural. En el ámbito nacional las amenazas provienen mayormente por la fragmentación y pérdida de zonas boscosas pues Ecuador, junto con Venezuela, han registrado las mayores pérdidas en áreas de distribución del oso andino (García-Rangel, 2012). Ya en 1999, Sierra et al. habían estimado que los ecosistemas de hábitat principal del oso de anteojos (páramo y bosque nublado) se habían reducido en un 38% debido a la expansión de tierra agrícola y urbana en Ecuador.

1.3 Importancia del oso andino

Es importante estudiar a los mamíferos endémicos y su biodiversidad debido a que estos son parámetros usados para caracterizar la pérdida de ecosistemas e identificar amenazas provenientes de actividades antrópicas hacia la biodiversidad (Sandoval & Yáñez, 2019). En comparación con la información disponible de otros mamíferos, los datos acerca de la ecología y el rol que desempeña el oso de anteojos en el Ecuador es deficiente (Sandoval & Yáñez, 2019). Sin embargo, existen estudios puntuales que resaltan el impacto de las actividades del oso en determinadas localidades de la región andina, arrojando indicios sobre su importante rol en los ecosistemas dentro del territorio ecuatoriano. El uso de hábitat por el oso está relacionado con su rol ecológico y principalmente determinado por la disponibilidad de alimentos, sugiriendo que esta especie funciona como modulador de la estructura y composición del hábitat, abriendo espacios, generando senderos, podando, rompiendo ramas y dispersando semillas (García-Rangel, 2012). Este último aspecto es importante pues en las temporadas donde hay mayor presencia de frutos, alimento esencial de la dieta del oso, las semillas ingeridas no son destruidas en su tracto digestivo y por tanto éstas se dispersan a lo largo de la

trayectoria que toma el oso al moverse (Rivadeneira-Canedo, 2008). Las especies en las que se ha observado que el oso ingiere la fruta o infrutescencia en Ecuador, y que podrían beneficiarse de la dispersión de sus semillas, pertenecen a las familias Myrtaceae, Poaceae, Rosaceae y Rubiaceae (García-Rangel, 2012).

Además de su importante rol ecológico, el oso de anteojos también posee valor cultural dentro de algunas comunidades indígenas a lo largo de los Andes. Por ejemplo, en Perú se celebra actualmente un festival, en donde miles de personas denominadas hombres-oso, ascienden a montañas de glaciales y recolectan bloques de hielo que serán usados en diferentes rituales (Randall, 1982). El oso andino es visto como el mediador entre la tierra y el cielo según algunas creencias Andinas (Paisley & Saunders, 2010). Adicionalmente, la relación de ciertas poblaciones humanas con el oso andino ha sido relatada en varias crónicas hispánicas en las que, cronistas como Garcilaso de la Vega, reconocían que las tribus preincas adoraban a los osos, pumas y jaguares por su fuerza. En Ecuador, el agustino Antonio Calancha reportó que los indígenas que habitaban en los andes veneraban a tigres, osos, serpientes e identificó a los habitantes de Tomebamba (actual Cuenca) como grandes adoradores del oso (Paisley & Saunders, 2010).

Adicionalmente, algunos autores han clasificado al oso de anteojos como una especie paraguas (Peyton, 1999). Ser el último miembro viviente de la subfamilia Tremarctinae y la única especie de oso en Sud América, junto con su potencial rol como dispersor de semillas, su carisma y su importancia cultural y espiritual, han hecho que *T. ornatus* sea una especie considerada bajo el término “paraguas” (Crespo-Gascón & Guerrero-Casado, 2019). Esta denominación hace referencia a que los esfuerzos de protección dirigidos a esta especie, resultan en la protección adicional de otros grupos que cohabitan el mismo ecosistema. Estudios que se han realizado a lo largo de la región andina, en cada uno de los ecosistemas en los que habita el oso, han comprobado que efectivamente, algunos taxones se encuentran en mayor

abundancia en aquellas zonas en donde habita el oso andino. El estudio determinó que las ecorregiones que se ven beneficiadas por acciones de protección al oso de anteojos incluyen a los páramos, bosques secos, yungas, bosques montanos y bosques húmedos. Sin embargo, también se determinó que el efecto no es el mismo y depende de los taxones en los que se analiza los efectos de la especie paraguas; y dentro del territorio ecuatoriano, se concluye que las regiones en donde está presente el oso de anteojos muestran mayor abundancia los taxones estudiados (Crespo-Gascón & Guerrero-Casado, 2019).

1.4 Genética del oso andino y estudios genéticos llevados a cabo

Se sabe que *T. ornatus* posee un cariotipo de $2n=52$; 15 pares de autosomas centrales y 10 pares de autosomas acrocéntricos; mientras que el cromosoma X es metacéntrico y el cromosoma Y acrocéntrico. Sin embargo, estudios genéticos llevados a cabo en la especie son escasos. Algunos de estos, mediante el uso de marcadores SSR heterólogos de la especie *Ursus americanus* y otros carnívoros, estudiaron la diferenciación genética entre poblaciones del oso de anteojos ubicadas a lo largo de su rango de distribución (Ruiz-García, 2003; Ruiz-García et al., 2005; Ruiz-García et al., 2020). Los marcadores microsatélites (SSR), que consisten en repeticiones en tándem de secuencias cortas de nucleótidos de entre 1 a 9 (conocidos como motivos) pares de bases distribuidos en todo el genoma del organismo, sirven también como blanco de estudio de la diversidad genética de una especie. El polimorfismo que presentan estos marcadores radica en el número de repeticiones de un motivo que presenta un individuo, pues durante la replicación del ADN se pueden dar deleciones o duplicaciones de estos motivos, permitiendo así asignar un alelo a cada número diferente de repeticiones. Asimismo, este marcador presenta la ventaja de ser codominante (es posible discriminar individuos homocigotos de heterocigotos) y de que posee alta reproducibilidad, haciéndolo un marcador ideal (Oliveira et al., 2006). Este marcador es muy usado en estudios de diversidad genética y genética de poblaciones, pues proporciona información acerca del parentesco entre individuos,

permite revisar la presencia de estructura poblacional y flujo de génico (Selkoe & Toonen, 2006).

Cueva et al. (2018) expandieron el espectro del estudio genético del oso mediante el análisis de la región hipervariable I de la sección D-loop del ADN mitocondrial con el uso de marcadores específicos para *T. ornatus*. Esta sección es una región no codificante de control que posee los índices más altos de evolución en todo el ADNmt. El interés de esta región radica en que se considera como hotspot mutacional debido a la acumulación de diferentes cambios en su secuencia especialmente dentro de sus dos regiones hipervariables; convirtiendo a esta región como una herramienta de estudio de variabilidad genética intraespecífica (Gupta et al., 2015). Por su herencia exclusiva materna, permite también evaluar procesos de efecto fundador, historia evolutiva, cuellos de botella, así como proveer evidencia de estructura poblacional (Harrison, 1989). Adicionalmente, Ruiz-García et al. (2020) llevaron a cabo un estudio en el que usaron los genes mitocondriales *ND5*, *12s ADNr* y *COI* para determinar Unidades Significativamente Evolutivas (ESU por sus siglas en inglés) en 302 individuos ubicados en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y algunos especímenes ubicados en zoológicos de distintos países.

Los estudios llevados a cabo por Ruiz-García (2003) determinaron que el aislamiento entre poblaciones ubicadas en diferentes países era marcado, así como concluyó que la diversidad genética de la población de osos en el Ecuador era extremadamente baja. Así mismo, Ruiz-García et al. (2005) determinaron que la población de osos ecuatoriano se encontraba especialmente en desequilibrio Hardy-Weinberg. Por último, se determinó que las poblaciones de oso andino que se encuentran en el territorio ecuatoriano pertenecen a un ESU denominado Clado Andino del Norte, junto con poblaciones de Venezuela, Colombia y el norte de Perú; excluyéndose del Clado Andino del Sur, ESU que contiene a poblaciones del sur del Perú y del centro-sur de los andes de Bolivia. Además, Cueva et al. (2018) llevaron a cabo un estudio en

el que reportan una notable baja diversidad genética en las muestras analizadas del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito basándose en índices obtenidos a partir del análisis de la región hipervariable I del D-Loop perteneciente al ADN mitocondrial. Cueva (2018) también reportó una moderada heterocigocidad esperada obtenido a partir del análisis de marcadores microsatélites homólogos a la especie. Sin embargo, estudios que evalúen el estado genético y de conservación del oso de anteojos en localidades del sur del Ecuador no se han llevado a cabo hasta el momento. Por ello, este proyecto de investigación busca ampliar la información acerca de la diversidad genética del oso andino en Ecuador, así como buscar evidencias de la estructura poblacional de osos en el sur de la Sierra ecuatoriana. Para ello se analizaron 26 muestras provenientes de distintas localidades dentro de la provincia de Loja y Azuay, obtenidas de muestreos llevados a cabo entre 2014 y 2015. Los análisis se llevaron a cabo usando la región hipervariable I de D-Loop usada ya por Cueva et al. en 2018 y los 11 marcadores microsatélites descritos por Cueva (2018). Los resultados obtenidos servirán para conocer de manera más comprensiva el estado del oso a nivel local en el sur de los Andes ecuatorianos; complementando a la vez la información genética obtenida en estudios previos dentro del territorio ecuatoriano.

2 METODOLOGÍA

2.1 Obtención y datos de muestras analizadas.

En el presente estudio se obtuvieron 33 muestras que fueron recogidas por profesionales de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) mediante técnicas no invasivas de recolección de material fecal y saliva dentro de múltiples áreas pertenecientes a la provincia de Loja y Azuay entre los años 2014 y 2015. Estas áreas comprenden la zona de la Reserva Madrigal, Cajanuma del Parque Nacional Podocarpus, Yanochoa, El Capulí, y Sevilla; zonas señaladas en la Figura 1. La extracción de ADN se realizó con el Kit DNAeasy Blood and

Tissue (Qiagen) y la cuantificación y calidad se midió por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific, Madison, 2009) y verificados con Qubit (Institut Pasteur, 2018). Dada las bajas concentraciones, el stock fue usado para la amplificación. Todas las muestras obtenidas fueron registradas y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

2.2 Amplificación, purificación y reamplificación de la región D-loop.

Para el análisis de la región D-loop, se utilizaron los primers Tormt2F y Tormt2R específicos de la región hipervariable I diseñados y validados por Cueva et al. (2018) para la amplificación de esta región con la técnica de reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Para la reacción de PCR se usó una concentración final de Buffer a 1X, Cloruro de Magnesio (Invitrogen, Waltho, MA, EE.UU.) a 1,5 mM, dNTPs (Invitrogen, Waltho, MA, EEUU) a 0,2mM, Albúmina de suero bovino (BSA) a 1 mg/ml, Primer Forward 0,5 mM, Primer Reverse a 0,5mM y 0,75U de Taq Platinum a un volumen final de 25µl/rxn. Cada reacción fue llevada a cabo con 1µl de ADN. El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial de 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos, 72°C por un minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los amplicones resultantes fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/p). Una vez obtenidas las bandas se las cortó con una hoja de bisturí nueva para cada banda diferente y fueron purificados mediante el uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Posteriormente, cada uno de los productos de la purificación fueron reamplificados usando los mismos primers. Para esta etapa se usó una reacción con volumen final de 25µl, Buffer a 1X, Cloruro de Magnesio a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM, Primer Forward a 0.5mM, Primer Reverse a 0.5mM y 0.75U de Taq Platinum. El producto de la reamplificación fue secuenciado en Macrogen (Corea del Sur).

2.3 Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas.

Las secuencias obtenidas fueron curadas en los softwares Pregap y Gap4 contenidos en el paquete STADEN (Staden, 1996). Una vez obtenidas todas las secuencias en un solo documento formato FASTA, estas fueron alineadas usando el software MEGA7.0 con el uso del algoritmo Clustal (Kumar et al., 2008) y se definió el largo de las secuencias según a la longitud de las secuencias reportadas por Cueva et al., 2018. Posteriormente estas secuencias fueron convertidas a una matriz formato “.nexus” mediante el uso del conversor de formato de la HIV Sequence Database (Format Converter, 2016); posteriormente se transformó manualmente al formato “.nex”. Este último archivo fue leído en Phylogenetic Network Software (Fluxus-Engineering, 2017) para poder calcular la red de Haplotipos utilizando un Median Joining. El software DNAsp (Rozas et al., 2010) fue usado para estimar la diversidad de haplotipos y nucleotídica; mientras que el software Arlequin (Excoffier et al., 2005) fue usado para realizar las pruebas de neutralidad F_s de Fu (Fu, 1997) y D de Tajima (Tajima, 1989).

2.4 Amplificación de loci microsatélites.

Para el análisis de microsatélites se realizaron amplificaciones con primers específicos para marcadores microsatélites (Cueva, 2018) del ADN cromosómico del oso de anteojos. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 30 μ l cada uno con una concentración de Buffer de 1X, Cloruro de Magnesio a 2mM (para los primers 2, 5.6, 7, 8, 9, 10, 12 y 1.5mM para los primers 3, 4, 11 y 13), dNTPs a 0.2mM, BSA a 0.2mg/ml, Primer Forward a 0.2, Primer Reverse a 0.5mM, primer cola poli A marcado con fluoróforo a 0.5mM y 1U/rxn de Taq ADN Polimerasa. Se usaron en total 4 primers marcados con los fluoróforos NED, 6-FAM, PET y VIC; asignando un tipo de fluoróforo a un locus diferente y usando la misma asignación realizada por Cueva (2018). El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial durante 7 minutos a 94°C, posteriormente 55 ciclos que consistieron en una denaturación por

30 segundos a 94°C, annealing por 30 segundos a 60°C y polimerización por 30 segundos a 72°C y una polimerización final durante 5 minutos a 72°C. Los productos de estas reacciones se corrieron en un gel de agarosa (1.5% m/m) teñido con SybrSafe para verificar que la amplificación haya sido exitosa. Para cargar el gel se usó 5µl del producto de PCR y se corrieron las muestras a 80V durante 45 minutos. Aquellas reacciones confirmadas por la presencia de una banda en el tamaño reportado por Cueva (2018) fueron enviados a genotipar en MacroGen (Seúl, Corea del Sur).

2.5 Análisis de genotipado de muestras

Una vez obtenido el genotipado mediante electroforesis capilar, los resultados fueron analizados en el software GeneMarker v2.6 (Holland & Parson, 2010), para posteriormente asignar los alelos encontrados dentro de una matriz codominante. A partir de esta matriz se generaron dos matrices más: una compatible con el paquete para R *pegas* (Paradis, 2010) y otra en formato GenePop. Los estadísticos de diversidad se calcularon con el programa R Studio Studio v1. 1.442 (R core Team, 2018). Los datos fueron importados usando el paquete *pegas* y transformados a un objeto *genind* y *genpop* para análisis tanto en individuos como en poblaciones. También se usó funciones del paquete *diveRsity* para poder obtener la riqueza alélica con método de rarefacción para que la diferencia en número de muestras por población no sea un factor de sesgo (Keenan et al., Crozier, 2013). Además se utilizó el paquete *adegenet* (Jambart, 2008) para poder calcular las distancias de Nei (Nei, 1977); mientras que el paquete *ape* se utilizó para poder graficar dichas distancias (Paradis et al., 2004); sin embargo ciertas limitaciones requirieron que se realice distancias de Lynch utilizando el paquete *Polysat* (Clark & Jasieniuk, 2011). Finalmente se utilizó el paquete *ade4* y *ggcord* para poder realizar un análisis de coordenadas principales (Dray & Dufour, 2007; Beck, 2019).

La matriz en formato GenePop se transformó a formato Structure con el uso del programa PGD Spider v2.1.1.3 (Lischer & Excoffier, 2012) y se corrió el archivo en el software

Structure v2.3.4 (Evanno et al., 2005) en el cual se realizaron 1000000 pasos MCMC con un Burn-in de 100000 evaluando los valores de K mediante 10 réplicas independientes para cada uno de los K. Se utilizó el software Structure Harvester para poder determinar el número ideal de acervos genéticos (K) (Earl & vonHoldt, 2012). Una vez creados los archivos en formato STRUCTURE se procedió a encontrar el modelo consenso con K=2; para ello se utilizó la plataforma CLUMPACK (Kopelman et al., 2015), el cual encuentra el modelo consenso y lo grafica siguiendo el proceso de otros programas como Distruct. Se usó el método de búsqueda Greedy con 1000 repeticiones y se colocó los respectivos archivos con el nombre de la muestra, así como también los códigos de los colores para cada acervo.

3 RESULTADOS

3.1 Cuantificación y calidad de las muestras/ fuente y extracción

La concentración del ADN extraído de las muestras provenientes del sur del Ecuador fue evaluada usando espectrofotometría de absorción en el equipo NanoDrop 2000™. El ADN genómico obtenido poseía concentraciones en un rango de 53.2 ng/μl a 1.9ng/μl. El 67% de las muestras mostró una concentración menor a 10ng/μl. Por otro lado, se midió la calidad del ADN usando la relación de absorbancias 260/230 y 260/280. La relación 260/230 mostró valores menores a 1 en el 85% de las muestras (datos no mostrados), lo que indica la presencia de alta contaminación del ADN con componentes orgánicos.

3.2 Amplificación y secuenciación del ADN mt

Un total de 27 muestras de ADN de oso de anteojos fueron amplificadas, purificadas y reamplificadas exitosamente. La amplificación llevada a cabo requirió de la adición de Albúmina de Suero Bovino (BSA) para lograr la amplificación exitosa de las muestras. Todas las muestras amplificadas mostraron un tamaño de alrededor de 600 pares de bases, concordando con lo reportado por Cueva et al. (2018). La secuenciación de los fragmentos fue

exitosa y se recuperó el 100% de la información requerida. Algunas de las muestras requirieron una nueva secuenciación debido a la región homopolimérica conformada de adeninas-timinas pues se reporta que la polimerasa puede deslizarse durante la secuenciación generando picos ambiguos (Viguera et al., 2001). Además, se secuenciaron nuevamente aquellas muestras que durante el proceso de análisis sugerían la existencia de un haplotipo nuevo presente en un solo individuo. El tamaño de las secuencias obtenidas posterior a su limpieza y que se usaron para posteriores análisis fue de 462 pb.

3.3 Diversidad Genética mitocondrial y análisis de pruebas de neutralidad

El análisis de las 27 secuencias obtenidas procedentes de individuos del sur de la Sierra ecuatoriana determinó la existencia de 3 haplotipos. Uno de ellos no había sido reportado anteriormente y siguiendo con la nomenclatura sugerida por Cueva (2018), se la denominó HTOL1 (Haplotipo *Tremarctos ornatus* de Loja 1), pues todos los individuos que pertenecían a este haplotipo pertenecen a la Provincia de Loja (número de acceso: MT425202). Se encontró que 17 individuos analizados corresponden al haplotipo HTOL1, 6 individuos corresponden al haplotipo ya reportado HTOQ3 y 3 individuos al haplotipo HTOQ1 (Tabla 1). La secuencia correspondiente a cada uno de los haplotipos se muestra en la Tabla 2.

La comparación de las secuencias de cada haplotipo revela 7 sitios polimórficos que se muestran en la Tabla 3. En las posiciones 104, 236, 237, 270 y 286 se observa una transición (T \leftrightarrow C), una transición diferente en la posición 318 (G \leftrightarrow A) y por último una inserción-delección en la posición 168. Los análisis realizados con estas secuencias revelan una diversidad nucleotídica (π) de 0.00691 y una diversidad de haplotipos (H_d) de 0.526 ± 0.00804 . También se determinó que el promedio de número de diferencias nucleotídicas por pares (average of pairwise distances) fue de 3.194; este dato es obtenido al calcular las diferencias en secuencia de los haplotipos encontrados y realizar una media aritmética para obtener un solo dato que represente la cantidad de polimorfismos presentes. Además, las pruebas de neutralidad que

evalúan cambios demográficos en la población arrojaron que el valor de la prueba D de Tajima es de 2.26849 con un valor p de 0.979; mientras que el valor del estadístico Fs de Li y Fu es de 5.914 con un valor p de 0.984.

3.4 Análisis de Median Joining

En la red de haplotipos representada en un Median Joining, se puede observar a los haplotipos ya descritos en anteriores estudios HTOQ1, HTOQ2, HTOQ3 y HTOQ4 así también como el haplotipo reportado HTOL1. La representación por Median Joining no necesariamente representa la distancia entre haplotipos con el largo de la rama que los une, sino con las divisiones entre las ramas que conectan a estos haplotipos. Cada una de estas líneas pequeñas representa a una mutación o polimorfismo que diferencia a dos haplotipos. Es así que se puede observar que los haplotipos HTOQ1, HTOQ2, HTOQ3 y HTOQ4 presentan pocos cambios entre sí, específicamente parecen tener una mutación en una posición nucleotídica en común que los agrupa como se puede observar en la Figura 2. Además, el haplotipo HTOL1 parece tener mayor similitud en secuencia a otra reportada en la base de datos del NCBI identificada como FM177764.1 (Krause et al., 2008) ya que presenta solo 2 mutaciones entre ellos. También se adicionó otra secuencia que también fue recuperada de la base de datos del NCBI llamada EF196665.1 (Yu et al., 2007). Ésta muestra una gran diferencia tanto con HTOL1 como con el resto de los haplotipos que han sido reportados por primera vez en el DMQ. Cabe recalcar además que el origen geográfico de ambas secuencias recuperadas de la base datos no es conocida.

3.5 Amplificación y genotipado de las muestras mediante marcadores microsatélite

Se planteó analizar los 13 marcadores microsatélite desarrollados por Cueva (2018). Sin embargo, la amplificación de las muestras fue baja, pues solamente se obtuvo el 41% de éxito

en la amplificación. Bandas tenues fueron obtenidas en el caso de las amplificaciones exitosas mientras que en las no exitosas no se observó banda alguna (Figura 3). Adicionalmente, el porcentaje de genotipado de las muestras también mostró ser bajo pues solamente se logró obtener el genotipo del 54.23% de las muestras enviadas (datos no mostrados).

Por ello, sólo 9 muestras fueron analizadas con cuatro loci SSR (Tor2, Tor4, Tor8 y Tor9) (datos no mostrados). La matriz alélica obtenida a partir de estas 9 muestras analizadas en el sur del Ecuador fue analizada y los resultados fueron comparados con aquellos alelos obtenidos en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), en donde se había analizado 29 muestras y se usaron los mismos 4 loci SSR mencionados anteriormente. En cuanto a la población del Sur del Ecuador, en los 4 loci se encontraron 8 alelos diferentes en total. La diferencia entre número de muestras requirió que realicen análisis por rarefacción para compensar la sobre representación de muestras del DMQ. La riqueza alélica encontrada en la población del DMQ correspondió a 3.43, superior a la encontrada en las muestras del sur del Ecuador, que mostró una riqueza alélica de 1.87. Además, el análisis de riqueza de alelos privados mostró un valor de 0.48 para el sur y 2.24 para el norte del Ecuador.

3.6 Estructura poblacional

El análisis de coordenadas principales indica que hay una separación definida por las distancias genéticas de las muestras; separando aquellas que provienen del Sur del Ecuador con aquellas provenientes del DMQ. La diversidad que se explica con ambos componentes principales es de alrededor del 64%, siendo uno de ellos el que explica el 51% de la diversidad (Figura 4). Por otro lado, el análisis en Structure arrojó que el óptimo número de acervos genéticos que explican mejor los datos encontrados es de dos ($k=2$). Se observa que hay una estructura marcada entre las poblaciones del norte y sur del Ecuador definida por dos linajes.

4 DISCUSIÓN

4.1 Calidad de las muestras y su efecto en posteriores análisis

Las muestras evaluadas mostraron cuantificaciones con variaciones marcadas y cuya mayoría se encontraba por debajo de los 10ng/μl. Esto, sumado a la baja calidad de ADN observada en la absorbancia 260/230, sugieren que el tipo de muestras, heces y saliva, presentaron gran cantidad de contaminantes posterior a la extracción de ADN. La recolección de esta clase de muestras es una práctica comúnmente empleada como parte de las metodologías no invasivas para el estudio de la biología de especies elusivas, o como en este caso, especies en peligro de extinción (Piggott & Taylor, 2003). Muestras obtenidas a partir de saliva son ampliamente usadas en estudios de genética de poblaciones. Sin embargo, este tipo de muestras biológicas poseen gran cantidad de ADN no deseado provenientes de bacterias, hongos y otros remanentes de alimento que se almacenan en la cavidad bucal (Sun & Reichenberger, 2014). En el proceso de extracción de ADN a partir de saliva, se pueden usar técnicas y consideraciones que faciliten el análisis de marcadores mitocondriales y nucleares (Quinque et al., 2006). Algunos de los protocolos que han demostrado ser eficientes al extraer ADN a partir de saliva incluyen el uso de extractores automáticos, protocolos de extracción para muestras de alta salinidad y un método denominado “acetato de amonio” (Quinque et al., 2006; Solomon et al., 2015). Además, se debe considerar la forma de almacenar las muestras debido a que se ha reportado degradación del material genético en muestras de saliva al no ser congeladas o refrigeradas (Quinque et al., 2006).

La principal fuente de la que se extrajo el ADN analizado en este estudio provenía de heces (77.7%). Algunos estudios han encontrado que el uso de excremento como método de muestreo no invasivo puede llegar a ser bastante útil para realizar estudios moleculares en otras especies de oso (*Ursus arctos*) (Bellemain et al., 2005). Sin embargo, también se conoce que

existen muchas desventajas al optar por estas muestras. Los dos principales problemas que presenta este tipo de muestras son: el alto porcentaje de reacciones de PCR fallidas y la generación de resultados erróneos causadas por la pérdida de alelos o registro de alelos falsos causados principalmente por la presencia de altos niveles de inhibidores (Wehausen et al., 2004; Sidransky, 1992). Estos inhibidores se encuentran en mayor cantidad cuando las heces provienen de un individuo cuya dieta es principalmente herbívora (Fernando et al., 2003). Esto resulta especialmente relevante debido a que *T. ornatus* posee una dieta basada principalmente en especies vegetales (García-Rangel, 2012), lo que podría explicar en parte las dificultades que se presentaron al momento de amplificar las muestras, en concreto con los marcadores de ADN nuclear SSR.

Otros estudios han resaltado la importancia de la metodología de extracción de material genético al utilizar excremento. Se recomienda usar solamente las partes más externas del material fecal pues es en donde mayor cantidad de moco intestinal con células del individuo existe y donde menor cantidad de inhibidores están presentes. Además, es importante evitar la contaminación de ADN exógeno, proveniente de procariontas que habitan en el intestino. Para ello uno de los equipos que facilitan la obtención de ADN a partir de heces es el minikit Qiagen stool (Fernando et al., 2003). Además, secar las heces antes de la extracción es una práctica que ha reportado un alto rendimiento (98%) en amplificación de ADNmt (Murphy et al., 2000). Para futura consideración, los inhibidores que están presentes en el producto de extracción de ADN pueden ser removidos usando un tratamiento de purificación con un método “glass milk” que ha sido efectivo en estudios de úrsidos en donde las heces son recogidas en campo (Wasser et al., 1997).

Ahora bien, como ya se ha mencionado, las dificultades en los pasos de amplificación de las muestras se mostraron principalmente al procesar marcadores SSR y no especialmente en ADNmt. Las dificultades presentadas en la amplificación para ADNmt fueron superadas al

usar BSA en la reacción, este compuesto se cree que interacciona con los inhibidores impidiendo que estos interfieran en la reacción de polimerización (Waleed & Radstrom, 2000). Sin embargo, el BSA no tuvo efecto positivo significativo en la amplificación de SSR. Específicamente, en el presente estudio la eficiencia de amplificación del ADN nuclear fue de 54.23%, resaltando la gran dificultad del análisis de marcadores SSR en comparación al análisis de ADNmt. Este fenómeno se explica debido a dos razones: la primera consiste en la alta proporción de ADN mitocondrial vs ADN nuclear por célula, y la segunda se debe a la baja sensibilidad de la amplificación de loci SSR a bajas concentraciones y calidad del ADN, así como también a la presencia de contaminantes en la muestra (Kovach et al., 2003; Martellini et al., 2005; Broquet et al., 2007; Murphy et al., 2000). Estudios llevados a cabo en otros osos (*Ursus arctos* y *U. americanus*) en los cuales usan ADN extraído a partir de excremento, se observa la tendencia a tener mayor éxito en amplificaciones de ADNmt en comparación a ADN nuclear (Broquet et al., 2007). Además, se ha reportado que la amplificación de regiones SSR con motivos mayores a 2 nucleótidos suelen presentar dificultades en la amplificación de los loci (Broquet et al., 2007), lo que también podría explicar la dificultad al amplificar los marcadores nucleares en este estudio pues todos los motivos diseñados por Cueva (2018) y amplificados en el presente estudio eran de 4 nucleótidos.

4.2 Diversidad genética

Pocos estudios realizados usando marcadores mitocondriales se han realizado en *T. ornatus* pues solamente Cueva et al. (2018) y Ruiz-García (2020) han implementado este marcador en estudios realizados a *T. ornatus*. Cueva et al. (2018) realizaron una investigación en la región norte de los Andes ecuatorianos usando los mismos marcadores genéticos de este estudio en el cual reportan una mayor diversidad de haplotipos ($H = 0.705$), pero menor diversidad de nucleótidos ($\pi = 0.0019$) a la encontrada en el sur del Ecuador, región en donde se reporta una diversidad de haplotipos de 0.526 y una diversidad de nucleótidos de 0.00691.

El hecho de que la diversidad de haplotipos en el norte sea mayor a la del sur del Ecuador concuerda con el número de haplotipos encontrados en cada estudio, pues en el norte se determinaron 4 haplotipos mientras que en este estudio se encontraron 3 haplotipos (Figura 2). Asimismo, el hecho de que en el sur se haya encontrado una mayor diversidad de nucleótidos que en el norte del Ecuador coincide con el número de sitios polimórficos de los 4 haplotipos (HTOQ1, HTOQ2, HTOQ3 y HTOQ4) reportados en el DMQ (norte del Ecuador), era de tan solo 2; comparado con los 7 sitios polimórficos encontrados en el sur (HTOQ1, HTOQ3 y HTOL1). Por otro lado, las distancias por pares reportadas por Cueva et al. (2018) corresponden a 0.002 mientras que en la diferencia de los 3 haplotipos encontrados en el sur es de 3.194. Estos índices dependen principalmente del número de sitios polimórficos encontrados (Rozas, 2009). Es por esto que la diversidad de nucleótidos y las distancias por pares en el sur son más altos que en el norte del Ecuador, pues se encontraron más sitios polimórficos en las secuencias de los 3 haplotipos identificados en las muestras obtenidas de la provincia de Loja y la provincia del Azuay, sur del Ecuador. Por otro lado, la diversidad de haplotipos depende del número de haplotipos encontrados en el análisis (Rozas, 2009) y es por ello que en el sur este índice es menor que en el norte del Ecuador. Recientemente se publicó un estudio en *T. ornatus* llevado a cabo por Ruiz-García et al., (2020), quienes evaluaron marcadores mitocondriales y nucleares diferentes a los usados en esta investigación. Este estudio se lleva a una escala mayor pues comprende gran parte del rango de distribución del oso andino. Se centra en definir Unidades Evolutivas Significativas (ESU) y sugiere que existen dos: el primero comprendido por individuos pertenecientes a Venezuela, Colombia, Ecuador y el norte del Perú llamado NAC y el segundo que comprende a individuos ubicados en el sur de Perú y norte de Bolivia llamado SAC; cuya separación se estima que fue hace 500 000 años (Ruiz-García et al., 2020). Considerando que el área geográfica muestreada y el número de individuos es mucho mayor, así también como el uso de regiones diferentes para el análisis; este estudio reporta 120

haplotipos y consecuentemente la diversidad de haplotipos, de nucleótidos y diferencia por pares del ESU al que corresponderían las muestras de Ecuador (NAC) son mucho más altas que las reportadas en este estudio y los reportados por Cueva et al. (2018) por lo que una comparación directa de resultados resulta difícil. Un hallazgo comparable de cierta forma es la presencia de 5 haplotipos diferentes en la provincia de Loja al muestrear 5 individuos, sugiriendo que una mayor cantidad de polimorfismos fueron detectados en la zona (Ruiz-García et al., 2020). El hecho de haber encontrado más haplotipos muestreando menor cantidad de individuos en la misma provincia en la que se evalúa en este estudio se explica por la mayor cantidad de loci usados para construir estos haplotipos (pues para ello usan los genes mitocondriales ND5, 12s, rRNA y COI) mientras que en el presente estudio se usa un locus. Un estudio realizado en otros osos respalda esta diferencia al señalar que mientras más grande es la región analizada del ADNmt, mayor cantidad de información es obtenida para posteriores análisis (Keis et al., 2013).

Otros estudios similares se han llevado a cabo en otras especies de oso. Un análisis de 15 osos pardos pertenecientes al norte y oeste de Irán mediante el análisis de una región control del ADN mitocondrial encontró 12 haplotipos que exhibían altos índices de diversidad de haplotipos (1 y 0.994) y una diversidad de nucleótidos aún más baja que la que se encontró en este estudio (Ashrafzadeh et al., 2016). De la misma forma, un estudio realizado en 402 osos negros pertenecientes a 15 áreas geográficas de Norteamérica, usando para su análisis una región que comprendía parte del gen citocromo b y parte de la región D-loop, reportó 13 haplotipos; reportando alta diversidad de haplotipos pero baja diversidad de nucleótidos, que son iguales o menores a las encontradas en el sur del Ecuador (Van Den Bussche et al., 2009). Los datos presentados sugieren que se debe tener cuidado al realizar comparaciones de índices de diversidad obtenidos a partir de marcadores mitocondriales pues estos varían significativamente dependiendo del número de muestras y tamaño del fragmento analizado.

Además, las otras especies de osos tienen historias evolutivas diferentes (Kumar et al., 2017). Otro tipo de marcadores como SSR, podrían complementar los hallazgos obtenidos a partir del ADN mitocondrial.

Lamentablemente, debido a la baja eficiencia en la amplificación de loci SSR, se pudo recuperar información de un pequeño grupo de muestras ($n=9$). Se analizaron únicamente 4 loci en conjunto con la matriz alélica de estudios previos realizados en el norte del Ecuador. Con la información que se logró obtener de este marcador, fue posible calcular índices de riqueza alélica e índices de riqueza de alelos privados para las poblaciones del sur y norte del Ecuador. La riqueza alélica es un parámetro informativo acerca de la diversidad de una población pues indica la cantidad de alelos esperados en una población con un tamaño de muestra determinado, mientras que la riqueza de alelos privados funciona como una medida de separación entre poblaciones. Para contrarrestar la sobre-representación del norte vs del sur del país, el análisis de riqueza alélica y riqueza de alelos privados se realizó por rarefacción. La rarefacción permite calcular estos parámetros ajustando los resultados a la población con menor número de observaciones. Esto es necesario debido a que la riqueza alélica depende estrechamente del tamaño de la muestra pues es de esperar que en poblaciones más grandes se tienda a encontrar mayor número de alelos. Estos parámetros son de especial interés para la implementación de programas de conservación pues las poblaciones que presentan mayor riqueza alélica son aquellas que deberían ser protegidas; mientras que aquellas con menor riqueza alélica son consideradas para manejo especial. Otras medidas de diversidad alélica como la heterocigocidad esperada también son útiles, pero no son sensibles a la presencia de alelos raros, a diferencia de la riqueza alélica (Kalinowski, 2004). La población del sur del Ecuador tiene una riqueza alélica de 1.87, la cual es menor a la riqueza alélica de la población ubicada en el Norte; que es de 3.43. Cabe recalcar que estos índices están determinados por los loci utilizados

para el análisis, por lo que un nuevo estudio que use más marcadores puede llegar a obtener valores mayores o menores a lo reportado, resaltando así la importancia de este tipo de estudios.

4.3 Eventos demográficos

Además, se realizaron pruebas de neutralidad las cuales suelen usarse para evaluar si han ocurrido eventos demográficos de expansión o reducción de la población de estudio. Conceptualmente, estas pruebas se usan para descartar si la teoría neutral de mutación puede explicar la diversidad encontrada en las secuencias analizadas y en caso de no ser así, generar hipótesis de qué eventos demográficos la explican. La teoría neutral de mutación postula que la mayoría de las mutaciones que han contribuido a una variación significativa de las poblaciones son neutras, es decir que no han actuado fuerzas evolutivas sobre ellas (Li et al., 2003). En estudios de ADN mitocondrial, las pruebas más usadas corresponden al estadístico D de Tajima y F_s de Fu y Li. Ambos estadísticos se basan en diferentes parámetros: mientras que F_s de Fu y Li se basa en la distribución de haplotipos, D de Tajima se basa en la frecuencia de sitios segregados (de Jong et al., 2011). La mayoría de los estudios utilizan estos estadísticos para evidenciar cambios demográficos, usualmente cuellos de botella y expansión poblacional (Dogan & Dogan, 2017). Cuando los valores del estadístico F_s son negativos indica un exceso de haplotipos raros de los que se esperaría bajo neutralidad; mientras que D de Tajima indica un exceso de nucleótidos raros comparado con los esperados; ambos sugiriendo una expansión de la población en estudio (de Jong et al., 2011; Zhang et al., 2017). Por otro lado, cuando estos valores son positivos sugieren recientes cuellos de botella debido a una deficiencia de haplotipos y nucleótidos respectivamente. Los resultados obtenidos de la población de osos ubicados en el sur del Ecuador muestra que los valores de los estadísticos tanto para F_s de Fu y Li (5.914), como para D de Tajima (2.26849) tienen valores de magnitud positiva inusualmente alta (Dogan & Dogan, 2017); lo que sugeriría que la población de oso de anteojos ubicada al sur del Ecuador ha sufrido un cuello de botella durante su historia evolutiva. Sin embargo, los

valores de significancia de estos estadísticos (0.98 para ambos aproximadamente) indican que estos valores no son significativos y por tanto no se puede concluir que haya evidencia con peso estadístico que indique la población de estudio haya sufrido un cuello de botella. Estas pruebas también fueron realizadas en individuos pertenecientes al Distrito Metropolitano de Quito, en el norte del Ecuador; en donde tampoco hubo significancia de los estadísticos obtenidos, que también tenían magnitud positiva (Cueva et al., 2018). Ningún otro estudio llevado a cabo en *T. ornatus* ha realizado este tipo de pruebas por lo que no se pueden realizar más comparaciones.

Por ello es necesario evaluar si estas pruebas se han llevado a cabo en otras especies de oso. De hecho, un estudio llevado a cabo con un tamaño de muestra similar a la de esta investigación en osos pardos en Irán, determinó que sus estadísticos sugieren que han sufrido una expansión poblacional (Ashrafzadeh et al., 2016); mientras que estudios que han usado todo el mitogenoma del oso pardo en Eurasia han determinado también que se las poblaciones sufrieron una expansión poblacional (Keis et al., 2013). Estos reportes indican que otras poblaciones de osos diferentes a *T. ornatus* han sufrido expansiones demográficas mientras que los estudios llevado a cabo en el oso andino tienden a sugerir eventos contrarios (cuello de botella), pero sin peso estadístico que lo respalde. Es necesario ampliar el estudio de esta especie pues de encontrar evidencia de eventos tipo cuello de botella ayudarían a relacionarlo con niveles bajos de diversidad genética (Leberg, 1992), para ello podrían usarse marcadores tipo SSR que ayuden a recopilar la evidencia necesaria para realizar tales conclusiones.

La riqueza alélica mencionada anteriormente arrojada por el análisis de los marcadores SSR, también tienen relación con eventos demográficos que pudo tener la población estudiada. La riqueza alélica es un parámetro que es afectado en mayor medida por eventos de reducción poblacional como cuellos de botella que otros parámetros como la heterocigocidad y por tanto es un índice útil para monitorear fenómenos de reducción poblacional (Kalinowski, 2004). Tanto la riqueza alélica del norte y el sur del Ecuador calculado en el presente estudio (1.87 y

3.43 respectivamente) son bajos comparados con otros estudios llevados a cabo en osos polares en donde su riqueza alélica es casi el doble (6.9) (Cronin et al., 2006). Se recomienda que se realicen estudios que comparen la riqueza alélica en diferentes épocas; así como también ampliar el número de muestras analizadas y el rango geográfico de recolección de estas, pues podrían evidenciar cuellos de botella en poblaciones de oso andino como ya se ha hecho en poblaciones de otros mamíferos como el león (Dures et al., 2019).

4.4 Estructura poblacional

El análisis de patrones de distribución de los haplotipos en diferentes localidades puede ser indicio de separación poblacional. Específicamente se ha relacionado la ocurrencia de diferentes haplotipos como un posible reflejo de la existencia de estructura poblacional (Vyse, 1991). En el presente estudio se podría inferir la presencia de esta estructura entre individuos del norte y sur del Ecuador. Esto se basa en que en el norte se han descrito dos haplotipos (HTOQ2 y HTOQ4) que no se han encontrado en el sur del Ecuador. Mientras que por otra parte HTOL1 no ha sido descrita tampoco en poblaciones del norte. Por otro lado, la ocurrencia del mismo haplotipo en dos áreas geográficas podría ser indicador de flujo genético u otra conexión histórica; que en este caso es lo que sucede con los haplotipos HTOQ1 y HTOQ3 que se presentan tanto al norte como al sur del Ecuador (Figura 2). Este fenómeno no es común en mamíferos grandes, pero hay evidencia de que esto podría pasar con algunas poblaciones de osos en Norteamérica (Vyse, 1991; Cronin et al., 2006). Para confirmar esta teoría, ampliar el estudio en la especie es requerido ya que los haplotipos hasta ahora exclusivos del norte podrían ser identificados en el sur del Ecuador y viceversa al analizar mayor cantidad de individuos. Sin embargo, el análisis de marcadores microsatélites suelen poseer más información acerca de la estructura poblacional que podría haber entre individuos del norte y sur de Ecuador y ayudar a evidenciar la presencia de estructura poblacional.

El primer parámetro revelado por SSR que se puede analizar es la riqueza de alelos privados. Este parámetro es útil para realizar distinciones genéticas entre grupos y distinguir qué tan diferente es una población de otra. Al igual que la riqueza alélica, depende del tamaño de la muestra tomada (Kalinowski, 2004). Por tanto, los mismos ajustes con rarefacción fueron realizados para calcular la riqueza de alelos privados en ambas poblaciones del Ecuador. Los valores para la riqueza de alelos privados en el sur y el norte de este país fueron de 0.48 y 2.24 respectivamente. Los alelos privados son aquellos alelos que están presentes en un grupo, pero no en otro (Szpiech y Rosenberg, 2011). Por tanto, estos valores sugieren que ambas poblaciones son genéticamente distintas pues hay la presencia de alelos privados en cada región (Kalinowski, 2004). Específicamente, dado a que en el norte del Ecuador hay una mayor riqueza de alelos privados, se puede inferir que hay una mayor cantidad de alelos que se presentan en el norte y no en el sur del país. Por otro lado, aunque en menor cantidad, también hay alelos que se presentan en el sur, pero no en el norte del territorio. Dado a que los 4 loci SSR analizados solamente se han reportado en el presente estudio y aquel realizado por Cueva (2018), no es posible realizar más comparaciones.

Por último, los marcadores microsatélite también permitieron realizar un análisis de separación genética en ambas especies como lo son las distancias genéticas de Lynch. Por un lado, el análisis de coordenadas principales (Figura 4) muestra un relativo patrón de agrupamiento entre los individuos pertenecientes al norte (DMQ) y sur del Ecuador. Por otro lado, el análisis de Structure (Figura 5) muestra dos acervos genéticos que separan a los individuos de ambas poblaciones. Estos resultados en conjunto apoyan la separación genética de ambas poblaciones sugerida por la red de haplotipos.

Existen muchos factores que explicarían la presencia de estructura poblacional. Estos factores pueden ser tanto bióticos como abióticos y evidencia debe ser aportada para poder concluir que un determinado hecho explica tal estructura poblacional. Es así que existen

múltiples perspectivas con las cuales se puede explicar la presencia de estructura genética en una población (Bohonak, 1999). El uso de análisis moleculares que evidencien la presencia de estructura poblacional entre poblaciones discontinuas permite analizar patrones de conectividad (Horne et al., 2008). Es importante conocer la conectividad de ciertas poblaciones por las implicaciones que esto significa; por ejemplo, el conocimiento del flujo génico constante entre dos poblaciones de osos polares ha servido anteriormente para determinar que la reducción en el número de individuos de una población podría ser compensada por la inmigración de individuos de la otra (Cronin et al., 2006). Este fenómeno no podría suceder entre las poblaciones de osos de anteojos del norte y sur del Ecuador evaluadas en este estudio pues los resultados sugieren que no hay flujo entre estas, evidenciando otra problemática para la especie dentro del país. Esto crea la necesidad de ampliar las poblaciones de oso estudiadas a lo largo del territorio ecuatoriano, lo cual serviría para conocer más acerca de la conectividad entre estas localidades y tomar mejores decisiones de manejo de la especie.

5 CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de una porción de la región hipervariable I del ADN mitocondrial del oso de anteojos determinó la presencia de 3 haplotipos en las muestras analizadas. Uno de estos es nuevo y no ha sido descrito anteriormente para esta especie.

Los índices de diversidad obtenidos a partir del análisis del marcador mitocondrial usado en este estudio lograron evidenciar una baja diversidad de haplotipos y de nucleótidos en comparación con otras especies de oso; además, la riqueza alélica obtenida a partir del análisis SSR indica que la población del sur del Ecuador posee menor diversidad genética que la población analizada previamente en el norte del país.

La distribución de haplotipos sugiere una diferenciación genética entre las poblaciones del sur y norte del Ecuador, mientras que los índices de riqueza alélica privada y análisis preliminares de PCoA y Structure apuntan a que existe una estructura genética entre estas dos poblaciones que las diferencia entre sí.

Se recomienda realizar estudios en los que se amplíen las localidades de muestreo, que se monitoreen a lo largo del tiempo las poblaciones ya estudiadas, así como también uso de regiones más grandes del ADN mitocondrial para obtener información más comprensiva acerca del estado del oso de anteojos en el Ecuador.

6 REFERENCIAS

- Ashrafzadeh, M., Kaboli, M., & Reza, M. (2016). Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. *Mammalian Biology*, 81(1), 1-9.
- Beck, M. (2019). ggord: Ordination Plots with ggplot2. *R package version 1.1.4*.
- Bellemain, E., Swenson, J., Tallmon, D., Brunberg, S., & Taberlet, P. (2005). Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter-Collected Feces: Four Methods for Brown Bears. *Conservation Biology*, 19(1), 150-161.
- Bohonak, A. (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *The quarterly review of biology*, 74(1), 21-45.
- Broquet, T., Ménard, N., & Petit, E. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping errors rates. *Conserv Genet*, 8, 849-860.
- Castellanos, A. (2010). Guía para la rehabilitación, liberación y seguimiento de osos andinos. *Imprenta Anyma*.
- Clark, L., & Jasieniuk, M. (2011). Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562-566. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
- Crespo-Gascón, S., & Guerrero-Casado, J. (2019). The role of the spectacled bear (*Tramarcos ornatus*) as an umbrella species for Andean ecoregions. *Wildlife Research*, 46, 176-183.
- Cronin, M., Amstrup, S., & Scribner, K. (2006). Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in polar bears (*Ursus maritimus*) from the Beaufort and Chukchi seas, Alaska. *Can. J. Zool.*, 84, 655-660.
- Cuesta, F., Peralvo, M., & Sánchez, D. (2001). Métodos para investigar la disponibilidad del hábitat del oso andino: el caso de la cuenca del río Oyacachi, Ecuador. (F. EcoCiencia, Ed.) *Serie Biorreserva del Cóndor 1*.
- Cueva, D. (2018). Diversidad genética del oso de anteojos (*Tremarcos ornatus*) en el Distrito Metropolitano de Quito mediante análisis de la región D-loop del ADN mitocondrial y marcadores SSR. *Universidad San Francisco*.
- Cueva, D. G., Bruque, G., Molina, S., & Torres, L. T. (2018). Mitochondrial DNA reveals low genetic diversity in Ecuadorean Andean bears. *Bio One*, 29(1), 43-50.
- de Jong, M., Wahlberg, N., Eijk, M., Brakefield, P., & Zwaan, B. (2011). Mitochondrial DNA signature for range-wide populations of *Bicyclus anynana* suggests a rapid expansion from recent refugia. *PlosOne*, 6(6), e21385.
- Dogan, I., & Dogan, N. (2017). Statistical Tests for Neutrality: A Review. *Turkiye Klinikleri J Biostat*, 9(2), 167-74. doi:10.5336/biostatic.2016-53446
- Dray, S., & Dufour, A. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4), 1-20.

- Dures, S. G., Carbone, C., Loveridge, A. J., Maude, G., Midlane, N., Aschenborn, O., & Gottelli, D. (2019). A century of decline: Loss of genetic diversity in a southern African lion-conservation stronghold. *Diversity and distributions*, 970-879.
- Earl, D., & vonHoldt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361. doi:<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, K., Regnault, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (versión 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Fernando, P., Vidya, T. N., Rajapakse, C., Dangolla, A., & Melnick, D. J. (2003). Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality. *J Hered*, 115-123.
- FLUXUS-ENGINEERING. (2017). Free phylogenetic network software. Retrieved from <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- Format Converter. (2016, Junio Jueves). Retrieved from HIV Sequence Database: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html
- Fu, Y. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925. doi:<https://doi.org/genetics.org/147/2/915>
- García-Rangel, S. (2012). Andean bear Tremarctos ornatus natural history and conservation. *Mammal Review*, 42, 85-119.
- Garshelis, D. (2009). Family ursidae. In E. Wilson, & R. Mittermeier (Eds.), *Handbook of the Mammals of the World: Carnivores* (pp. 448-497). Barcelona: Lynx Editions.
- Goldstein, I. (2002). Spectacled bear-cattle interactions and tree nest use in Bolivia and Venezuela. *Ursus*, 13, 153-156.
- Gupta, A., Bhardwaj, A., Supriya, Charma, P., Pal, Y., Mamta, & Kumar, S. (2015). Mitochondrial DNA- a Tool for Phylogenetic and Biodiversity Search in Equines. *Biodivers Endanger Species*(S1:006), 1-8.
- Harrison, R. G. (1989). Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 7(4), 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. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01565.x>
- Horne, J., Herwerden, L., Choat, J., & Robertson, D. (2008). High population connectivity across the Indo-Pacific: Congruent lack of phylogeographic structure in three reef fishes congeners. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 629-638.
- Institut Pasteur. (2018). *Qubit 2.0 – DNA/RNA quantification*. Retrieved from Equipment: <https://research.pasteur.fr/en/equipment/dnarna-quantification/>

- IUCN. (2019). The iucn red list of threatened species. Retrieved from <https://www.iucnredlist.org/es/species/22066/123792952>
- Jambart, T. (2008). Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403-1405. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Kalinowski, S. (2004). Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation genetics*, 5, 539-543.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T., & Crozier, W. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. doi:<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Keis, M., Remm, J., Ho, S. Y., 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, 915-927.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191. doi:<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Kovach, A., Litvaitis, M., & Litvaitis, J. (2003). Evaluation of fecal mtDNA analysis method to determine the geographic distribution of rare lagomorph. *Wild Soc Bull*, 31, 1061-1065.
- Krause, J., Unger, T., Noçon, A., Malaspinas, A., Kolokotronis, S., Stiller, M., . . . Hofreiter, M. (2008). Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evolutionary Biology*, 220. Retrieved from <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. *Briefing in Bioinformatics*, 9, 299-306.
- Leberg, P. (1992). Effects of population bottleneck on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 46(2), 477-494.
- Li, H., Zhang, Y., Zhang, Y., & Fu, Y. (2003). Neutrality test using DNA polymorphism from multiple samples. *Genetics*, 163(3), 1147-1151.
- Lischer, H., & Excoffier, L. (2012). PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298-299. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39, 541-548.
- Murphy, M., Waits, L., & Kendall, K. (2000). Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin*, 28(4), 951-957.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.*, 41(2), 225-233.

- Oliveira, E., Padua, J., Zucchi, M., Venkovsky, R., & Cameiro, M. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307.
- Paisley, S., & Saunders, N. (2010). A god Forsaken: the sacred bear in Andean iconography and cosmology. *World Archaeology*, 245-260.
- 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. (1999). Spectacled bear conservation action plan. In C. H. Servheen (Ed.), *Bears: Status Survey and Conservation Action Plan* (pp. 157-198). Gland.
- Piggott, M., & Taylor, A. (2003). Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Res*, 30, 1-13.
- Quinque, D., Kittler, R., Stoneking, M., & Nasidze, M. (2006). Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. *Analytical Biochemistry*, 353(2), 272-277.
- 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/>.
- Randall, R. (1982). Qoyllur Rit'i, an Inca fiesta of the Pleiades: reflections on time and space in the Andean world. *Bulletin de l'Institut Francais d'Etudes Andines*, 11, 37-81.
- Rivadeneira-Canedo, C. (2008). Estudio del oso andino (*Tremarctos ornatus*) como dispersor legítimo de semillas y elementos de su dieta en la región de Apolobamba-Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 29-39.
- Rozas, J. (2009). DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. In *Bioinformatics for DNA sequence analysis* (pp. 337-350). Humana Press.
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-delBarrio, J., Messeguer, X., & Rozas, R. (2010). DNAsp, version 5.10.01, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. Retrieved from <http://www.ub.edu/dnasp/>
- Ruiz-García, M. (2003). Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the northern Andean area. *Hereditas*(138), 81-93.
- Ruiz-García, M., Orozco-terWengel, P., Castellanos, A., & Arias, L. (2005). Microsatellite Analysis of the Spectacled Bear (*Tremarctos ornatus*) Across its Range of Distribution. *Genes Genet. Syst.*, 80(1), 57-69. doi:<https://doi.org/10.1266/ggs.80.57>
- Ruiz-García, M., Vásquez, J., Castellanos, A., Kolter, L., & Shostell, J. (2020). Molecular Evolution (Mitochondrial and Nuclear Microsatellites Markers) in the Andean Bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora): How Many ESUs Are There? In *In Conservation Genetics in Mammals* (pp. 165-194). Springer, Cham.
- Sandoval, P., & Yáñez, M. (2019). Biological and ecological aspects of the spectacled bear (*Tremarctis ornatus*, Ursidae) in the ecuadorean andean zone and conservation

- perspectives under the landscape species approach. *La Granja: Revista de ciencias de la vida*, 30(2), 18-26.
- Selkoe, K., & Toonen, R. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-129. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Sidransky, D. (1992). Identification of rare mutations in the stools of patients with curable colorectal tumors. *Science*, 256, 102-105.
- Sierra, R., Campos, F., & Chamberlin. (1999). *Áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad en el Ecuador continental. Un estudio basado en la biodiversidad de ecosistemas y su ornitofauna*. Quito: Ministerio del Ambiente Proyecto INEFAN/GEf/BIRF, EcoCiencia y Wildlife Conservation Society.
- Solomon, S. M., Matei, M. N., Badescu, A. C., Jelihovschi, I., Martu-Stefanache, A., Teusan, A., . . . Iancu, L. S. (2015). Evaluation of DNA extraction methods from saliva as a source of PCR-amplifiable genomic DNA. *Rev. Chim.*, 66(12), 2101-2103.
- Staden, R. (1996). The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3), 233. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02900361>
- Sun, F., & Reichenberger, E. (2014). Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: Review of current methods and applications. *Oral Health Dent Manag*, 13(2), 217-222.
- Szpiech, Z., & Rosenberg, N. (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theor. Popul. Biol.*, 80(2), 100-113.
- Tajima, F. (1989). statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595. doi:<https://doi.org/PMC1203831>
- Thermo Fisher Scientific, Madison. (2009). Technical Bulletin: 260/280 and 260/230 Ratios. *Wilmington, Delaware, USA*. Retrieved from <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilitiesstaff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>
- Titira, D. (2017). *Guía de campo de los mamíferos del Ecuador*. Quito: Ediciones Murciélagos Blanco.
- Van Den Bussche, R. A., Lack, J. B., Onorato, D. P., Gardner-Santana, L. C., McKinney, B. R., Villalobos, J. D., . . . Hellgren, E. C. (2009). Mitochondrial DNA phylogeography of black bears (*Ursus americanus*) in central and southern North America: conservation implications. *Journal of Mammalogy*, 90(5), 1075-1082.
- Viguera, E., Canceill, D., & Ehrlich, S. (2001). In vitro Replication Slippage by DNA Polymerases from Thermophilic Organisms. *Journal of Molecular Biology*, 312, 323-333. doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4943>
- Vyse, E. (1991). Inter an intra-specific mitochondrial DNA variation in North American Bears. *Can. J. Zool.*, 69, 2985-2992.
- Waleed, A., & Radstrom, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostics PCR in the presence of blood, feces and meat. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4463-4470.

- Wasser, S., Houson, C., Koehler, M., Cadd, G., & Fain, S. (1997). Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, 6, 1091-1097.
- Wehausen, J. D., Ramey, R., & Epps, C. W. (2004). Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. . *Journal of Heredity*, 95(6), 503-509.
- Yu, L., Li, Y., Ryder, O., & Zhang, Y. (2007). Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 198-208. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-21487-198>
- Zhang, J., Duan, J., Zhou, Y., & Peng, J. y. (2017). Genetic diversity of mitochondrial control region (D-loop) polymorphisms in *Coilia ectenes taihuensis* inhabiting Taihu Lake, China. *Genet. Mol. Res.*, gmr16019457.

7 TABLAS

Tabla 1. Código, lugar de recolección, origen y haplotipo al que pertenecen las muestras analizadas.

| Muestra | Lugar de recolección | Origen | Haplotipo |
|----------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| utpl001 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl002 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl003 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl004 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl005 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl006 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl009 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl010 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl011 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl012 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl013 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl014 | Reserva Madrigal | Excremento | HTOL1 |
| utpl016 | Reserva Madrigal | Saliva | HTOL1 |
| utpl018 | Parque Nacional Podocarpus | Saliva en hisopo | HTOL1 |
| utpl019 | Reserva Madrigal | - | HTOL1 |
| utpl021 | Yanochoca Ladera finca Puchaicela | Excreta en Vial | HTOL1 |
| utpl023 | El Capulí- Loja | Saliva en hisopo | HTOL1 |
| utpl028 | Reserva Madrigal | Excreta en hisopo | HTOQ3 |
| utpl024 | Reserva Madrigal | Saliva en hisopo | HTOQ3 |
| utpl030 | - | Excreta en hisopo | HTOQ3 |
| utpl031 | Reserva Madrigal | Excreta en hisopo | HTOQ3 |
| utpl032 | Parque Nacional Podocarpus | Excreta en hisopo | HTOQ3 |
| utpl035 | Sevilla | Excreta en hisopo | HTOQ3 |
| utpl017 | Reserva Madrigal | Excreta en hisopo | HTOQ1 |
| utpl020 | Parque Nacional Podocarpus | Saliva en hisopo | HTOQ1 |
| utpl022 | Reserva Madrigal | Excreta en Vial | HTOQ1 |

Tabla 2. Información acerca de las secuencias de cada resultado obtenido de la secuenciación. Se muestra también cuántas muestras presentan la misma secuencia y el número de accesión en la base de datos del NCBI

| n | Resultado | Secuencia | Accesión NCBI |
|----|-----------|---|---------------|
| 17 | HTOL1 | TTTACTTATTTTCATATATATCATCCCACGTAAGTCTGTAGCATCCT AGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTTCCCCCCT ATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCA TGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACATGGACTTCA AAAACCTCGTTTCTGAAGACGTAGTCTGCAAGCATGTATTTTCA TTAGTCCGGGAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCA ACCCTTGCAGTACGTATACCTTCTCTCGCTCCGGGCCATA GAAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACTGGCATCTG GTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTA CTAACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAAT CAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCATTGG | MT425202 |
| 6 | HTOQ3 | TTTACTTATTTTCATACATATATCATCCCACGTAAGTCTGTAGCATCCT AGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTTCCCCCCT TATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGC ATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACATGGACTTC AAAAACTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCA CTTAGTCCGGGAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGC AACCCCTGCGAGTACGTATACCTTCTCTCGCTCCGGGCCAT AGAAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACTGGCATCT GGTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCT ACTAACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAA TCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCATTGG | KX812514.1 |
| 3 | HTOQ1 | TTTACTTATTTTCATACATATATCATCCCACGTAAGTCTGTAGCATCCT AGTATGTCCCCGAACAAGGAAACCTTTCTTTTTTTTTCCCCCCT ATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCA TGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACATGGACTTCA AAAACCTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTTCA TTAGTCCGGGAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCA ACCCTTGCAGTACGTATACCTTCTCTCGCTCCGGGCCATA GAAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACTGGCATCTG GTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTA CTAACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAAT CAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCATTGG | KX812512.1 |

Tabla 3. Sitios polimórficos encontrados dentro de la secuencia de cada haplotipo dentro de la región hipervariable 1 dentro de D-Loop del ADN mitocondrial del oso andino. Se muestran los 7 sitios polimórficos encontrados localizados en a 104, 168, 236, 237, 270, 286 y 318 pares de bases desde el primer nucleótido perteneciente a la región codificante para el ARN de transferencia de prolina del ADN mitocondrial. También se detalla el número de individuos encontrados dentro de cada haplotipo

| Haplotipo | n | Posición de nucleótidos | | | | | | | |
|------------|----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 104 | 168 | 236 | 237 | 270 | 286 | 318 |
| FM177764.1 | | tRNA-Pro | T | T | T | T | C | C | G |
| HTOL1 | 17 | tRNA-Pro | T | - | T | C | C | C | G |
| HTOQ1 | 3 | tRNA-Pro | C | - | C | T | T | T | A |
| HTOQ3 | 6 | tRNA-Pro | C | T | C | T | T | T | A |

8 FIGURAS

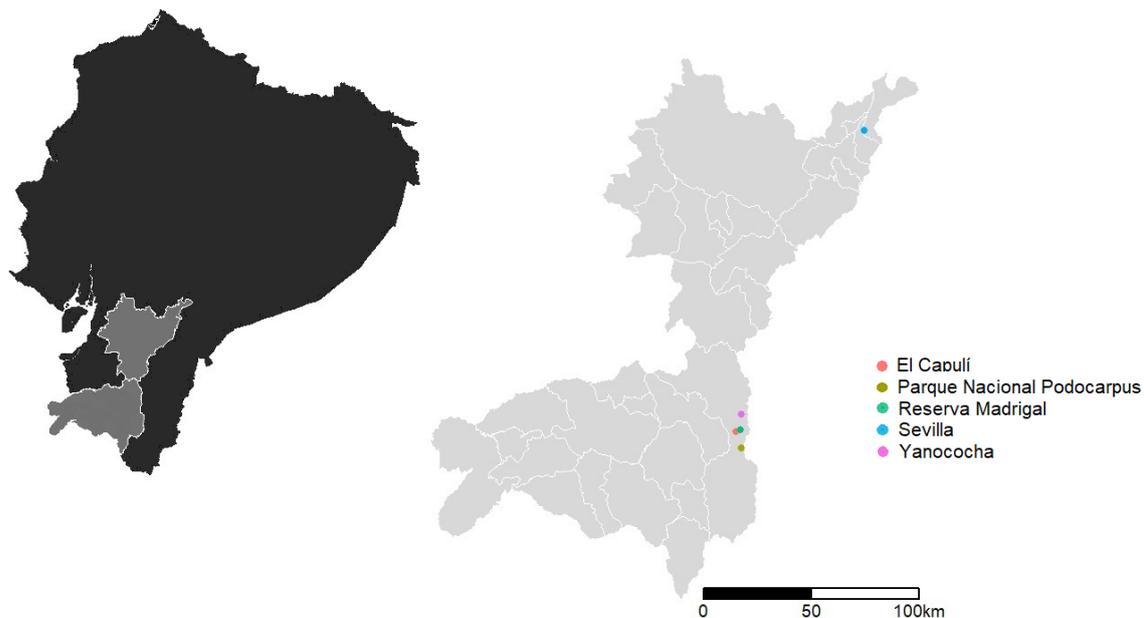


Figura 1: Mapa de las localizaciones de recolección de muestras. Se muestra las dos provincias de donde se obtuvieron las muestras. Cada punto representa las áreas de recolección de las muestras. En color rojo se muestra la localidad El Capulí, en verde el Parque Nacional Podocarpus, en turquesa la Reserva Madrigal, en celeste Sevilla (del oro) y en púrpura Yanococha.

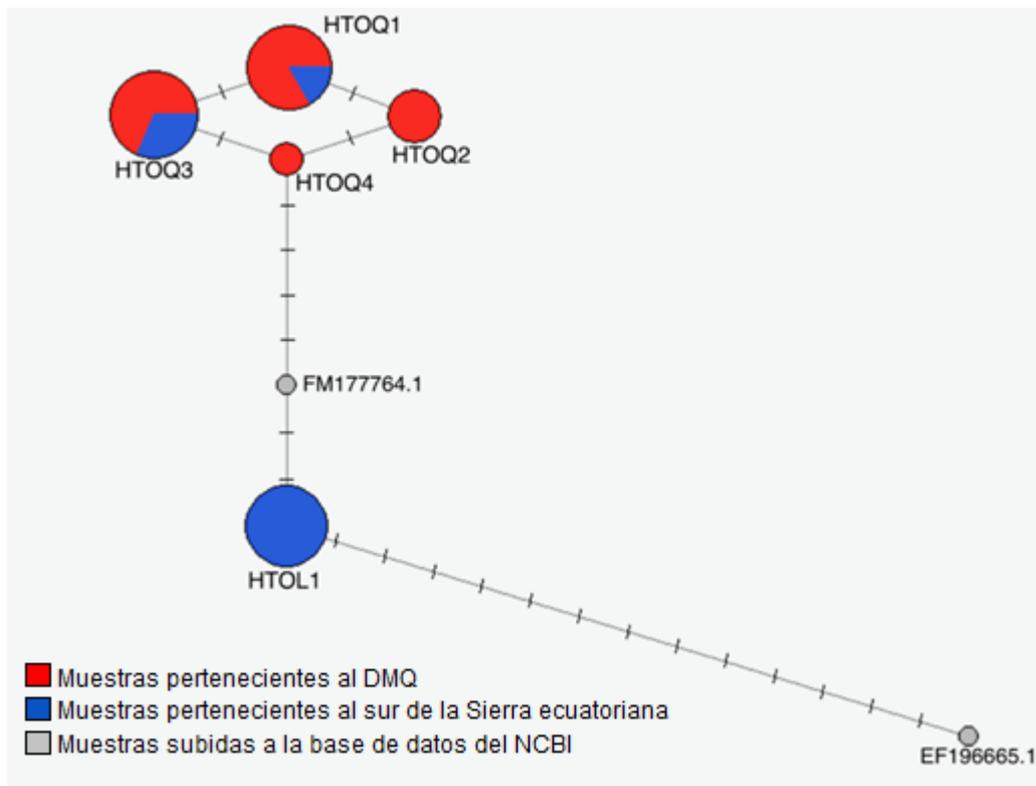


Figura 2: Red de haplotipos generado en Phylogenetic Network representado como Median Joining contruido bajo Maximum Parsimony method. Cada haplotipo se representa por un círculo o nodo y el tamaño de este es proporcional a la frecuencia en la que se encontró cada haplotipo. El color representa al estudio en el que se analizó cada muestra. Además, se incorporó al análisis las regiones homólogas al fragmento de la región D-Loop analizada de las accesiones FM177764.1 y Ef196665.1 pertenecientes a *T. ornatis* pero cuyo origen es desconocido. Cada guión que fragmenta las líneas que conectan a cada haplotipo representan una posición nucleotídica en donde ha habido una mutación.

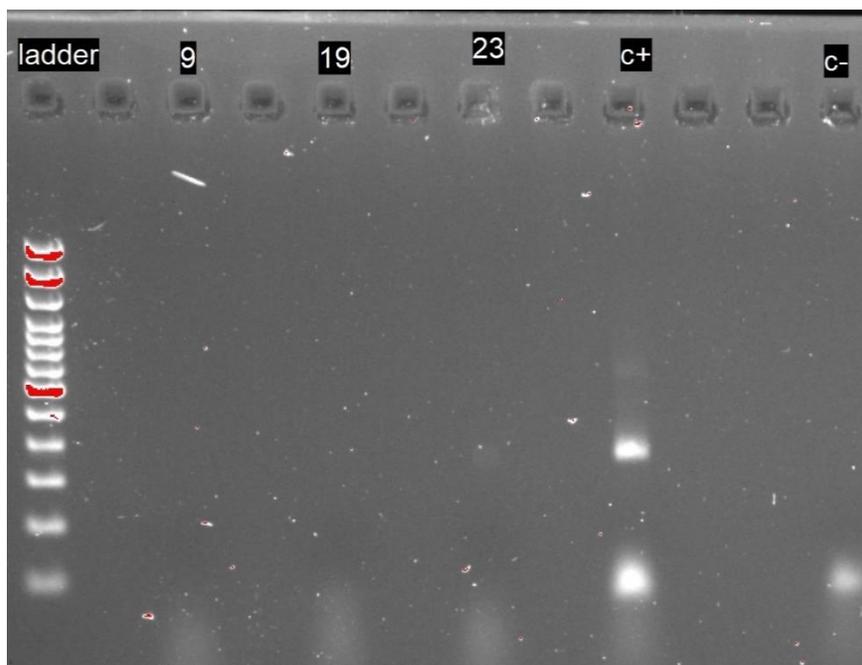


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de amplicones obtenidos a partir de la amplificación del ADN nuclear de marcadores SSR. El gel de 1.5 % en agarosa muestra la ausencia de bandas definidas producto de la amplificación en las muestras señaladas en los pocillos 9 y 19, mientras que una banda tenue puede verse en el pocillo correspondiente al pocillo rotulado 23. Como control positivo se usó ADN extraído a partir del folículo del pelo del oso obtenido en trabajos anteriores.

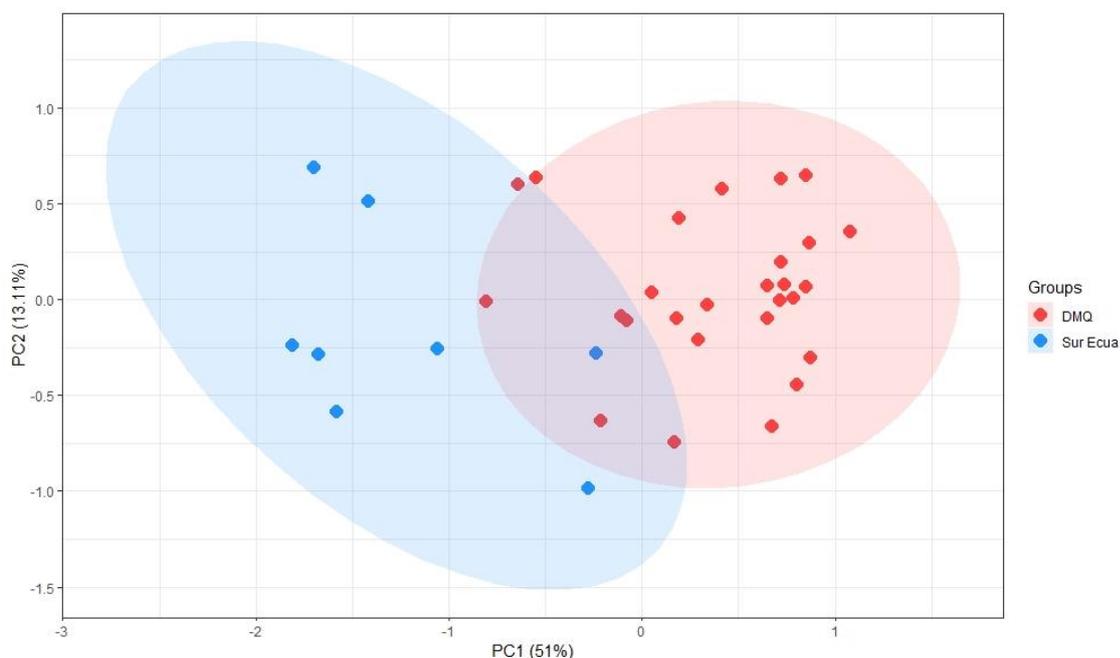


Figura 4: Análisis de coordenadas principales. El componente principal mostrado en el eje de las abscisas es aquel que explica el 51% de la variabilidad mientras que el componente principal representado en el eje de las ordenadas explica el 13%. No existe una separación total de ambas poblaciones

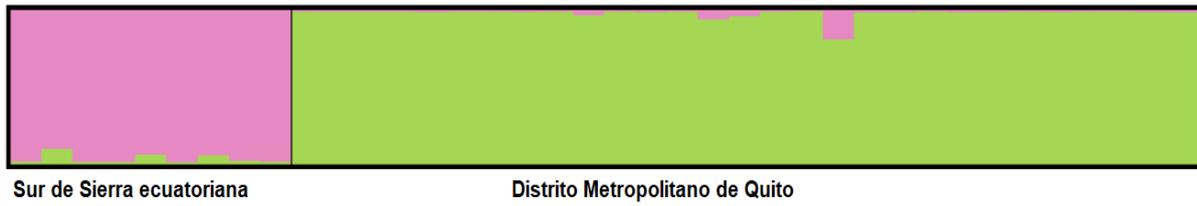


Figura 5: Modelo de estructura poblacional basado en análisis bayesianos en software STRUCTURE. El resultado mostrado es el consenso de 10 repeticiones y se muestra el valor óptimo $k=2$ que corresponde a los acervos genéticos (señalados con diferentes colores) encontrados en el sur de la Sierra ecuatoriana y en el Distrito Metropolitano de Quito.