

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**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.**

David Gustavo Vallejo Caldes

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**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**

David Gustavo Vallejo Caldes

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Quito, 14 de mayo de 2021

© 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: David Gustavo Vallejo Caldes

Código: 00139926

Cédula de identidad: 1720740768

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 el único representante vivo de la subfamilia Tremarctinae en toda Sudamérica. Este se encuentra a lo largo de la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia. Se trata de una especie única en su género cuyo rol ecológico resulta fundamental para los variados ecosistemas en los que habita. Posee un papel imprescindible como dispersor de semillas y modulador de hábitat. Lastimosamente, la degradación de su hábitat ha incrementado en los últimos años, por lo que la UICN ha catalogado a esta especie como vulnerable dentro de su lista roja de especies amenazadas. Por esta razón, resulta de interés el analizar la situación actual del oso andino en el Ecuador. Estudios previos han evaluado la diversidad de haplotipos al norte y sur del país, presentando índices de diversidad moderados a bajos, por lo que se requieren estudios adicionales que permitan esclarecer la situación del oso andino en el Ecuador. En este trabajo se analizó la región hipervariable II del D-Loop mitocondrial en 12 individuos de osos provenientes de la provincia de Zamora-Chinchipe. Se encontraron 2 haplotipos nuevos, HTOZ1 y HTOZ2, para esta provincia. Así mismo, se obtuvo índices de diversidad de haplotipos (Hd) y de nucleótidos (π) los cuales dieron como resultado una diversidad moderada de $Hd = 0,530$ y baja de $\pi = 0,00115$ respectivamente. Los índices de neutralidad D_T y F_S presentaron valores positivos, sugiriendo una reducción poblacional. Se sugiere que dichos índices podrían deberse a la fuerte degradación de hábitat en Zamora-Chinchipe durante el último siglo. Se propone continuar con esta investigación aumentando el número de muestras e implementando otros marcadores moleculares como los microsatélites. Los resultados de este estudio preliminar del oso andino en Zamora-Chinchipe esperan contribuir para la conservación de esta importante especie andina.

Palabras clave: Oso andino, *Tremarctos ornatus*, ADN mitocondrial, haplotipos, fragmentación de hábitat.

ABSTRACT

The Andean bear (*Tremarctos ornatus*) is the only living representative of the Tremarctinae subfamily in all of South America. This is found along the Andes mountain range from Venezuela to Bolivia. It is a unique species of its kind whose ecological role is fundamental for the various ecosystems in which it inhabits. It has an essential part as a seed disperser and habitat modulator. Unfortunately, the degradation of its habitat has increased in recent years, which is why the IUCN has classified this species as vulnerable within its red list of threatened species. For this reason, it is of interest to analyze the current situation of the Andean bear in Ecuador. Previous studies have evaluated the diversity of haplotypes in the north and south of the country, presenting moderate to low diversity indices, for which additional studies are required that can clarify the situation of the Andean bear in Ecuador. In this work, the hypervariable region II of the mitochondrial D-Loop was analyzed in 12 individuals of bears from the province of Zamora-Chinchipe. 2 new haplotypes, HTOZ1 and HTOZ2, were found for this province. Likewise, haplotype (Hd) and nucleotide (π) diversity indices were obtained, which resulted in a moderate diversity of $Hd = 0.530$ and a low diversity of $\pi = 0.00115$ respectively. The neutrality indices $D\tau$ and F_s present positive values, suggesting a population reduction. It is suggested that the moderate/low diversity indices found could be due to the strong degradation of habitat in Zamora-Chinchipe during the last century. It is proposed to continue with this research by increasing the number of samples and implementing other molecular markers such as microsatellites. The results of this preliminary study of the Andean bear in Zamora-Chinchipe hope to contribute to the conservation of this important Andean species.

Key words: Andean Bear, *Tremarctos ornatus*, mitochondrial DNA, haplotypes habitat fragmentation.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1 | Generalidades del oso andino | 10 |
| 1.1.1 | Historia evolutiva..... | 10 |
| 1.1.2 | Morfología | 10 |
| 1.1.3 | Distribución y rol ecológico..... | 11 |
| 1.1.4 | Factores de riesgo y estado de vulnerabilidad | 11 |
| 1.2 | Fragmentación de hábitat en el sur del Ecuador | 12 |
| 1.3 | Marcadores moleculares y análisis de diversidad | 13 |
| 2 | METODOLOGÍA..... | 14 |
| 2.1 | Recepción y selección de muestras | 14 |
| 2.2 | Extracción, cuantificación y análisis de calidad de ADN..... | 14 |
| 2.3 | Amplificación de la región mitocondrial D-Loop | 15 |
| 2.4 | Procesamiento de datos y análisis de secuencias mitocondriales | 15 |
| 2.5 | Confirmación de haplotipos | 16 |
| 3 | RESULTADOS..... | 17 |
| 3.1 | Concentración y calidad de ADN | 17 |
| 3.2 | Amplificación y secuenciación de la región D-loop..... | 17 |
| 3.3 | Análisis de haplotipos, índices de diversidad y pruebas de neutralidad | 17 |
| 4 | DISCUSIÓN | 19 |
| 4.1 | Calidad de las muestras..... | 19 |
| 4.2 | Diversidad de haplotipos y de nucleótidos | 19 |
| 4.3 | Eventos demográficos | 21 |
| 4.4 | Fragmentación del hábitat y su impacto en el oso andino | 22 |
| 5 | CONCLUSIONES | 23 |
| 6 | TABLAS | 24 |
| 7 | FIGURAS | 28 |
| 8 | REFERENCIAS..... | 33 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Información de las secuencias de los haplotipos y número de individuos por haplotipo..... | 24 |
| Tabla 2. Número de muestras, código, zona de recolección, haplotipo al que pertenecen las muestras analizadas y número de individuos por haplotipo. | 25 |
| Tabla 3. Resumen de los haplotipos, frecuencias por haplotipos y mutaciones presentes en los haplotipos reportados en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), Loja y Zamora-Chinchipe.. | 26 |
| Tabla 4. Resumen de índices de diversidad reportados en el DMQ, Loja y Zamora-Chinchipe..... | 27 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Zonas de muestreo en Zamora-Chinchipe para el presente estudio..... | 28 |
| Figura 2. Diagrama del proceso no invasivo de recolección de muestras de pelo en osos andinos..... | 29 |
| Figura 3. Red de haplotipos generado en Phylogenetic Network v10.2 representado como Median-Joining construido bajo el método de Maximum Parsimony..... | 30 |
| Figura 4. Mapa de fragmentación de hábitat en Zamora-Chinchipe en los últimos 30 años.... | 31 |
| Figura 5. Carreteras y vías del Ecuador en el último siglo..... | 32 |

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del oso andino

1.1.1 Historia evolutiva

El oso de anteojos también conocido como oso andino (*Tremarctos ornatus*), es el único representante vivo de la subfamilia Tremarctinae (Carnivora: Ursidae) en Sudamérica (Soibelzon, 2004). La subfamilia a la cual pertenece esta especie se separó del resto de úrsidos hace aproximadamente 13 millones de años. Esto dio como resultado un grupo separado endémico del continente americano, del cual se derivan cuatro géneros: *Arctodus*, *Arctotherium*, *Plionarctos* y *Tremarctos* (García-Rangel, 2012). Distintos autores coinciden que el oso andino emergió a partir de su ancestro *Tremarctos floridanus* hace no más de 130.000 años, lo que lo convierte en la especie de osos más joven de todas (Soibelzon et al., 2008). Por otro lado, gracias a estudios moleculares más recientes se piensa que su origen pudo ser hace mucho más tiempo del estipulado pues se calcula una expansión poblacional a lo largo de los Andes hace 690.000 años (Ruíz-García et al., 2020).

1.1.2 Morfología

El oso andino se caracteriza por tener un cuerpo robusto llegando a pesar entre 60 a 175 kg. Mide entre 1,10 a 2,20 m de largo (Sandoval Guillén & Yáñez Moretta, 2019). Poseen un cuello corto, extremidades anteriores más largas que las posteriores, 5 dedos posicionados hacia el frente, garras largas no retráctiles, pelaje grueso color marrón oscuro y una ornamenta característica de color amarillento, específica de cada individuo (Vela-Vargas et al., 2011). Esta se encuentra alrededor de su rostro, específicamente en sus ojos, mejillas, hocico, barbilla e incluso la garganta. Este particular rasgo le otorgó el nombre de “*ornatus*”(García-Rangel, 2012).

1.1.3 Distribución y rol ecológico

Como su nombre lo indica, el oso andino se distribuye a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde Venezuela hasta Bolivia, por un recorrido de más de 4.600 km de largo y entre 200 a 650 km de ancho. Es decir, ocupa aproximadamente un área de 260.000 km² (Kattan et al., 2004). Esta amplia distribución hace que el oso se encuentre en un rango de altitudes que van desde los 200 hasta los 4600 msnm, ocupando una gran variedad de ecosistemas entre estos: bosques húmedos, bosques secos, praderas, bosques nublados, páramos e incluso desiertos costeros (Ruiz-García, Vásquez, et al., 2020). El oso andino tiene un rol ecológico importante en sus distintos ecosistemas dado que, al alimentarse prioritariamente de plantas, cumple un papel esencial como podador de las ramas de los árboles, a los que trepa en busca de alimento. Es así como promueve la renovación de los bosques al generar huecos en el dosel, permitiendo el paso de luz a las plantas más jóvenes de estratos inferiores (Vela-Vargas et al., 2011). Así mismo, debido a su dieta, el oso andino representa un excelente dispersor de semillas, incluso favoreciendo la germinación de cierto tipo de estas, siendo un modulador de su hábitat (García-Rangel, 2012). Al tratarse de una especie amenazada, implementar estrategias para su conservación crea un efecto de paraguas, conservando indirectamente todas aquellas especies con las cuales comparte su espacio (Isasi, 2011).

1.1.4 Factores de riesgo y estado de vulnerabilidad

La distribución del oso andino hace que este ejemplar esté seriamente amenazado. Su cercanía con los crecientes asentamientos humanos, la caza y el desplazamiento causado por el incremento de la frontera agrícola son los principales motivos de la disminución de estos ejemplares (Ruiz-García, 2007). Hoy en día, se calcula que existe una población decreciente de aproximadamente 10.000 adultos (de un total aproximado de 20.000 individuos) en toda su

distribución (Velez-Liendo & García-Rangel, 2017). En Ecuador, sus números se limitan a un total de 1.200 a 2.000 osos (Narváez, 2017). Para los próximos 20 años se estima una tasa de pérdida de ecosistemas habitados por el oso andino mayor al 30%, y con ello, la reducción de sus números. Bajo este panorama la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha clasificado a *T. ornatus* en su lista roja de especies amenazadas, otorgándole un estado de vulnerabilidad A3c+4c (Velez-Liendo & García-Rangel, 2017). Se clasifica dentro de la categoría A3 y A4 a aquellas especies, que después de modelamientos bioclimáticos, se sospeche una disminución de al menos un 20 % de su población por razones climáticas dentro de las 3 siguientes generaciones (IUCN, 2019).

1.2 Fragmentación de hábitat en el sur del Ecuador

En Zamora, para el año 2014, el 67 % del territorio correspondía a bosque nativo, un 22 % a pastizales y un 6,9 % páramos (MAE, 2012). Entre los principales ecosistemas se encuentran Bosques Siempreverde Montano, Bosque Siempreverde Piemontano y Arbustales Siempreverdes (Cartuche Toledo, 2016). Dada la gran fuente de biodiversidad presente en Zamora, se encuentran áreas protegidas como el Parque Nacional Podocarpus, Parque Nacional Yacuri, Bosque Protector Alto Nangaritza, Bosque Protector Corazón de Oro y el Bosque Protector el Cóndor. En esta provincia también existen zonas de explotación de recursos no renovables, sobre todo minería de oro y plata, con una extensión superior a las 225.000 ha (PDOT, 2019).

Lastimosamente, organizaciones como la Food and Agriculture Organization (FAO) reportó en 2011, que Ecuador es el país con la tasa de deforestación más alta de toda Sudamérica en los últimos 20 años (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011). Este panorama resulta preocupante para provincias como Zamora-Chinchipe, la cual alberga gran cantidad de la biodiversidad ecuatoriana con 568 de las 4.011 especies endémicas reportadas (Valencia et al.,

2000). La deforestación al sur ecuatoriano se ha tomado un 46 % del área de vegetación original, un proceso que se ha acelerado durante la última década, principalmente dado al descubrimiento de yacimientos de petróleo y el incremento de tierras de cultivo (Tapia-Armijos et al., 2015).

1.3 Marcadores moleculares y análisis de diversidad

En los últimos años se han realizado avances en el área de la genética, gracias a las técnicas de secuenciación y de marcadores moleculares (Oliveira et al., 2006). El ADN mitocondrial (ADNmt) se caracteriza por ser una secuencia de aproximadamente 16.5 kb, circular y bien conservada entre especies (Rojansky et al., 2016). Presenta una herencia materna, prácticamente excluyente de eventos de recombinación (McWilliams & Suomalainen Anu, 2019). Las altas tasas de mutación y el alto número de copias facilitan su análisis y han hecho del ADNmt una herramienta ampliamente utilizada en estudios genéticos (Stoneking, 2000).

El genoma mitocondrial en mamíferos consiste en 13 genes codificantes de proteínas, 2 genes de ARNr, 22 genes de tARN, además de 2 regiones no codificantes. Estas dos regiones antes mencionadas, son: (1) la región D-loop, encargada de la replicación y transcripción de moléculas, y (2) la región OL, asociada con el inicio de la transcripción (Silva et al., 2011). El D-Loop mitocondrial se divide en región hipervariable 1 (HVRI) e hipervariable 2 (HVRII). Estas son dos de las secciones más analizadas del ADNmt en estudios de diversidad genética e historia evolutiva en mamíferos (DeSalle et al., 2017). Su alta variabilidad causada por la constante acumulación de mutaciones permite rastrear cambios recientes entre individuos (Stoneking, 2000). Es así como el presente trabajo tiene como objetivo identificar la diversidad de haplotipos del oso andino en la provincia de Zamora-Chinchipe, mediante el análisis de la región D-loop mitocondrial.

2 METODOLOGÍA

2.1 Recepción y selección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en los puntos marcados en la Figura 1. Se implementó un método de muestreo no invasivo para la obtención de pelo, actividad que fue realizada por un equipo de campo supervisado por Santiago Molina. La metodología consistió en la implementación de un palo con cebo dentro de un corral cercado con alambres que permitieron capturar rastros de pelos una vez que los oso ingresan a este corral (Figura 2). Se colocaron cámaras trampas para identificar a qué individuo pertenece cada pelo. De los videos obtenidos, se distinguió entre individuos mediante características físicas como las manchas u ornamentas faciales.

Las muestras recolectadas se almacenaron en sobres de papel y se las transportó al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en donde se ingresaron en una base de datos y se almacenaron a -20 °C. De las 44 muestras originalmente recolectadas se seleccionaron 12 muestras que pertenecen a individuos distintos según la foto identificación.

2.2 Extracción, cuantificación y análisis de calidad de ADN

Se identificaron pelos con folículos mediante un estereomicroscopio. De los pelos seleccionados, se recortó aproximadamente 0,5 cm incluyendo el folículo y se los insertó en un tubo Eppendorf de 1,5. mL. Se usaron 7 pelos por muestra. La extracción de ADN se la realizó mediante el protocolo de purificación de ADN Sherlock AX (A&A biotechnolgy). Se cuantificó y analizó la calidad del ADN mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000TM (Thermo ScientificTM) y Qubit 3.0 (InvitrogenTM). Debido a las bajas concentraciones no se realizaron diluciones. Se buscó confirmar la presencia de ADN mediante un gel al 1 % (p/p), con el uso de

SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™), y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Adicionalmente, la amplificación del ADN fue evaluada con el uso de marcadores universales COI y CytB.

2.3 Amplificación de la región mitocondrial D-Loop

Se emplearon los primers Tormt2F (5'-TAGCTCCACCATCAACACCC-3') y Tormt2R (5'-ACTGCGACGAGACCTTTACG-3') desarrollados por Bruque (2016), posteriormente validados por Cueva (2018). Los primers Tormt2F y Tormt2R permiten amplificar la región hipervariable II de la región D-Loop de *Tremarctos ornatus* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el protocolo de PCR se implementó un volumen total de 25 µL con 1 U de Platinum Taq Polimerasa (Invitrogen, Waltho, MA, EE. UU.), buffer de PCR 1X, cloruro de magnesio 1,5 mM, 0,2 mM dNTPs, 0,75, mM primer reverse, 0,75 mM primer forward y aproximadamente 3 ng/ul de ADN molde. El protocolo de amplificación fue el siguiente: denaturación inicial por 7 minutos a 94 °C seguida de 55 ciclos de 30 segundos de denaturación a 94 °C, 30 segundos de hibridación a 68 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C, seguido de una extensión final durante 5 minutos a 72 °C. Las amplificaciones resultantes se revelaron en geles de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) 1.5 % (p/p) y SYBR™ Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), usando un programa de 45 minutos a 80 V. Los resultados se revelaron en un fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los productos de amplificación fueron sellados con Parafilm en tubos Eppendorf de 0,2 mL, y fueron enviados para su secuenciación en ambas direcciones a Macrogen Inc., Corea. en un secuenciador ABI 3730 XL.

2.4 Procesamiento de datos y análisis de secuencias mitocondriales

Se curaron las secuencias mediante los programas PreGap y Gap 4 presentes en el paquete informático Staden (Staden, 1996). De cada individuo, se obtuvo una secuencia consenso a partir de la información de las dos hebras secuenciadas. Posteriormente, se recortó aquellos extremos no informativos de las secuencias y se igualaron a un mismo tamaño para los análisis subsecuentes. Las secuencias obtenidas se alinearon en MEGA 7.0 mediante el método de Clustal (Kumar et al., 2008). Se generó un archivo con formato *.fasta* de las secuencias alineadas y se lo transformó a formato *.nexus* mediante el software online HIV Sequence Database (NCBI, n.d.). El archivo con extensión *.nexus* se cambió manualmente a *.nex* para ser leído por el Software Network v10.2 (*Fluxus Technology Ltd*, 2020). Usando este programa se generó una red de haplotipos basado en el método de median-joining (MJ). Los índices de diversidad nucleotídica (π) y de haplotipos (Hd) se estimaron utilizando el software DNAsp v5.10.01 (Rozas, 1995). Los índices de neutralidad D_T de Tajima (Tajima, 1989) y F_s de Fu y Li (Fu, 1997) se los obtuvo empleando el software Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier et al., 2007).

2.5 Confirmación de haplotipos

Se realizó una segunda secuenciación en aquellos individuos que sugerían la presencia de un nuevo haplotipo para su confirmación. Se siguió el mismo procedimiento de amplificación, secuenciación y análisis de datos antes mencionados. Se tomaron como referencia 3 individuos (C5LA, D5LBC, I4C) para el haplotipo HTOZ1 y 3 individuos (A4LA, A2CL1, R2LA2I) para el haplotipo HTOZ2. Se alinearon las nuevas secuencias con las obtenidas en primera instancia confirmando así la presencia de los dos haplotipos.

3 RESULTADOS

3.1 Concentración y calidad de ADN

El rango de concentraciones de ADN de las 12 muestras fue bajo, con valores entre 4,3 y 23,9 ng/μl, de las cuales el 50% presentó valores menores a 10 ng/μl. Los índices de calidad se midieron mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, con un promedio de 1,7 y 0,47 respectivamente. El índice 260/280 presentó valores cercanos al ideal de 1,8 mientras que el índice 260/230 mostró valores por debajo de 1 en todas las muestras, lo que indicaría una alta presencia de contaminantes orgánicos (Thermo Scientific, 2000). Se observó una amplificación de los marcadores universales COI y CytB en las muestras de osos de anteojos analizadas.

3.2 Amplificación y secuenciación de la región D-loop

Todas las muestras amplificaron con los primers TORmt2F y TORmt2R específicos para la región hipervariable II (HVRII). Todas las amplificaciones dieron como resultado bandas alrededor de los 600 pb, en concordancia a lo reportado por Bruque (2016) y Cueva (2018). Tras la limpieza de las secuencias se obtuvo como resultado secuencias de 396 pb usadas para los análisis posteriores.

3.3 Análisis de haplotipos, índices de diversidad y pruebas de neutralidad

Se encontró un total de 2 haplotipos en los 12 individuos de osos analizados provenientes de la provincia de Zamora (Tabla 1, Tabla 2, Figura 1). Dichos haplotipos no habían sido reportados hasta la fecha y se les otorgó el nombre de HTOZ1 y HTOZ2, siguiendo la nomenclatura otorgada por Cueva (2018). Las secuencias se encuentran disponibles en NCBI con números de acceso MZ191063 y MZ191064 para HTOZ1 y HTOZ2, respectivamente. Dentro de los 12 individuos, 7 pertenecen al haplotipo HTOZ1 mientras que 5 pertenecen al haplotipo HTOZ2.

En el análisis de las secuencias se encontró tan solo una mutación entre los individuos de Zamora, a comparación de las 2 y 7 reportadas por Cueva (2018) y Moreta (2020) en el DMQ y Loja, respectivamente (Tabla 2). Este cambio único se observa en la posición 160 presentando una inserción/delección de una timina (T).

En base a estas secuencias se realizaron los análisis de diversidad, los cuales reportaron una diversidad de haplotipos (Hd) de 0,530 y una diversidad nucleotídica (π) de 0,00115. El promedio de diferencias nucleotídicas por pares fue de 0,6. Este valor se obtiene al calcular una media aritmética, que demuestre en un solo dato, la cantidad de cambios presentes (Lowe et al., 2004). Por otro lado, las pruebas de neutralidad que permiten determinar cambios poblacionales como reducciones o expansiones por razones demográficas (Lowe et al., 2004), presentaron valores de 1,381 para la prueba de D_T con un valor p de 1,00, mientras que el estadístico de F_s fue de 1,152 con un valor p de 0,64 (Tabla 4).

4 DISCUSIÓN

4.1 Calidad de las muestras

Con el afán de generar el menor estrés posible en los osos analizados, se utilizó una técnica de muestreo no invasiva que consiste en la recolección de pelos de oso dejados en corrales trampa (Figura 2). Estas técnicas presentan ciertas limitaciones, entre éstas, riesgos de contaminación y rápida degradación del material genético (Kelly et al., 2012). Es por esta razón que, normalmente, las concentraciones de ADN son bajas y los índices de calidad no son siempre los esperados (Taberlet et al., 1999). Las 12 muestras evaluadas en este estudio presentaron concentraciones bajas de ADN e índices de calidad no óptimos. Koetsier et al. (2019), sugieren que estos índices (280/260 y 260/230) pueden presentar una alta variabilidad en concentraciones de ADN menores a 20 ng/μl. No obstante, las concentraciones resultantes fueron similares a las obtenidas en proyectos previos con muestras de pelo y heces provenientes de osos (Bruque, 2016; Cueva, 2018; Moreta, 2020).

El presente estudio se enfocó en el análisis de ADNmt. Este tipo de ADN sobrepasa las 100.000 copias por célula (McWilliams & Suomalainen Anu, 2019). Su alto número de copias favorece su fácil aislamiento y amplificación, superando así las limitaciones del método de muestreo de este estudio, es decir, las bajas concentraciones y pobres índices de calidad. Esto hace del ADNmt una molécula extensamente utilizada en estudios filogeográficos de especies de osos como el oso pardo, *Ursus arctos* (Taberlet & Bouvet, 1994) y el oso andino (Cueva, 2018; Moreta, 2020).

4.2 Diversidad de haplotipos y de nucleótidos

Se encontraron dos haplotipos, HTOZ1 y HTOZ2, en los 12 individuos de osos provenientes de la provincia de Zamora-Chinchipe. Un estudio similar realizado en el Distrito Metropolitano de

Quito (DMQ) por Cueva (2018), describió 4 haplotipos en 38 individuos (HTOQ1, HTOQ2, HTOQ3, HTOQ4). En la provincia de Loja, Moreta (2020), con 26 individuos, obtuvo 2 haplotipos previamente reportados por Cueva (HTOQ3 y HTOQ1), además del haplotipo HTOL1.

La diversidad de haplotipos (Hd) se define como la probabilidad de que, al escoger dos individuos al azar, estos presenten un haplotipo distinto (Lowe et al., 2004) La diversidad de nucleótidos (π) se define como la probabilidad de que, al escoger dos sitios homólogos de la secuencia en dos individuos al azar, estos presenten nucleótidos distintos (Lowe et al., 2004)

Tanto Cueva (2018) como Moreta (2020) reportaron una mayor diversidad de nucleótidos que la encontrada en el presente estudio ($\pi = 0,0011$), con $\pi = 0,0019$ y $\pi = 0,0069$, respectivamente. Por otro lado, la diversidad de haplotipos en las muestras de osos de la provincia de Zamora fue moderada con $Hd = 0,530$, la cual resultó ser muy similar a la reportada en Loja con $Hd = 0,526$, pero menor en relación con la presente en el DMQ con $Hd = 0,750$ (Tabla 3). En este estudio, así como los logrados por Cueva (2018) y Moreta (2018) se reportan pocos cambios entre las secuencias (Tabla 3), lo que explicaría los moderados índices Hd y bajos índices de π obtenidos. Estos cambios se reflejan en la red de haplotipos (Figura 3).

Por otro lado, Ruíz-García et al. (2020), en un estudio realizado en osos de anteojos a lo largo de Ecuador, presentó valores más altos para los índices analizados ($Hd = 0,845$ y $\pi = 0,014$). Esto, en cambio, podría deberse al número de locus mitocondriales e individuos estudiados. Se ha evidenciado en estudios previos en osos pardos (*Ursus arctos*), que, a mayor número de locus analizados, mayor cantidad de información encontrada. Con esto se amplía la posibilidad de hallar nuevos y mayor cantidad de cambios genéticos en las secuencias, lo que podría resultar en valores más altos para los índices de diversidad (Hd y π) (Keis et al., 2013).

Estudios mitocondriales de la región D-loop en osos pardos en regiones como Irán y Norte América presentan índices moderados o altos para Hd , pero bajos para π (Ashrafzadeh et al., 2016; Miller et al., 2006), como lo encontrado en este estudio. Este patrón de valores de Hd y π pueden indicar una rápida y reciente expansión poblacional (Awise, 2000; Ashrafzadeh et al., 2016; Miller et al., 2006).

4.3 Eventos demográficos

Para entender mejor el significado de los índices de diversidad de Hd y π encontrados en este trabajo es importante analizar los resultados de las pruebas de neutralidad. Éstas permiten evaluar posibles escenarios de expansión o reducción poblacional basados en el principio de neutralidad (Perfectti et al., 2009). Este postulado indica que, en condiciones normales, la mayoría de las mutaciones que contribuyen a la variación genética son mutaciones neutrales y no adaptativas, causadas por eventos demográficos (Li et al., 2003).

Para ADNmt los estadísticos más utilizados son D_T de Tajima y F_s de Fu y Li. Estos se basan en el número de variantes haplotípicas y nucleotídicas (respectivamente), en relación con un modelo neutral de evolución (Fu, 1997). En ambos estadísticos, valores positivos sugieren una posible reducción poblacional, mientras que, valores negativos sugieren una posible expansión poblacional (de Jong et al., 2011).

Los valores obtenidos en esta investigación fueron positivos para D_T (1,381) y F_s (1,152), lo que sugeriría una posible reducción poblacional. Cueva (2018) y Moreta (2020), también obtuvieron valores positivos (Tabla 4). Por otro lado, en un estudio realizado por Ruíz-García (2020), se presentaron valores negativos tanto para D_T (-2.37) como para F_s (-44,51), aludiendo a una posible expansión poblacional del oso andino a lo largo del territorio ecuatoriano. En ese estudio argumentan que esta expansión se debería al aumento de tierras de cultivo y ganadería, las

cuales han incrementado las fuentes de alimento para el oso en los últimos siglos. Además, proponen que la disminución de los bosques andinos podría promover la migración del oso de anteojos hacia nuevos territorios.

4.4 Fragmentación del hábitat y su impacto en el oso andino

Se conoce que los Andes han sufrido modificaciones por influencia humana por más de 7.000 años, especialmente en el último siglo (Peters et al., 2013). Para el año 2008, el sur ecuatoriano habría perdido un 46% de su vegetación original debido a yacimientos de petróleo, minería y la construcción de carreteras (Tapia-Armijos et al., 2015). De estos, las carreteras han aumentado exponencialmente en los últimos años (Figura 5) (Peters et al., 2013). Morrell et al (2021), demostró con estudios satelitales, que la densidad poblacional del oso andino disminuye en relación con su cercanía a carreteras. Así mismo, Barkmann et al. (2013), al analizar los parques Podocarpus y Yacuambi reportan que una sola vía puede afectar sustancialmente la conectividad entre distintas poblaciones de osos. Desde este punto de vista, los valores positivos de neutralidad obtenidos en este estudio podrían ser el reflejo del alto grado de fragmentación de hábitat en la provincia de Zamora (Figura 4). A pesar de esto, debido a la baja significancia estadística de los índices de neutralidad, no es posible concluir la presencia de un cuello de botella (Tabla 4).

De esa manera, es necesario continuar con estudios de diversidad genética del oso andino tanto en Zamora como en diferentes regiones del país, para esclarecer la situación de las poblaciones de osos de antejojo en el Ecuador. Además, sería interesante aumentar el número de muestras y probar marcadores moleculares más sensibles como los microsatélites, lo que podría contribuir a estimar con mayor resolución la diversidad genética y estructura poblacional del oso andino (Selkoe & Toonen, 2006).

5 CONCLUSIONES

Se reportaron 2 nuevos haplotipos (HTOZ1 y HTOZ2) para la provincia de Zamora-Chinchipec al analizar la región hipervariable 2 (HVRII) del D-Loop mitocondrial. Estos se diferencian por una inserción/delección a los 160pb.

Se obtuvieron índices de diversidad genética moderada/alta en relación con la diversidad de haplotipos ($Hd=0,53$) y baja para la diversidad de nucleótidos ($\pi=0,0011$).

Los índices de neutralidad fueron positivos para F_s (1,152) de Fu y Li y D_T (1,381) de Tajima, lo que sugiere una reducción poblacional. Estos valores podrían ser el reflejo de las altas tasas de degradación de hábitat presente al sur del Ecuador, sin embargo, los valores P (de significancia) no soportan dicho evento demográfico.

Se sugiere analizar un mayor número de muestras en diferentes regiones del Ecuador además de utilizar marcadores moleculares más sensibles como los microsatélites que permitan esclarecer la situación de las poblaciones de osos de anteojos en Zamora y resto del país.

6 TABLAS

Tabla 1. Información de las secuencias de los haplotipos y número de individuos por haplotipo. Las secuencias reportadas se encuentran disponibles en el NCBI.

| Haplotipo | Secuencia | Accesión NCBI | Nº muestras |
|-----------|---|---------------|-------------|
| HTOZ1 | TCCCCGAACAAGGAAACCTTTC/TTTTTTTTCCCCCCT ATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATAT AAGCATGTACATACCTTGCTTGGTTTTACATGAGGAC ATGGACTTCAAAAACCTCGTTCTGAAGACGTAGTCTGC AAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACC AGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTA TACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGG TTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTAC TTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTA ACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTA ATCAGCCCATGATCACACATAACTG | MZ191063 | 7 |
| HTOZ2 | TCCCCGAACAAGGAAACCTTCTTTTTTTTTCCCCCCT ATGTACGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATAT AAGCATGTACATACCTTGCTTGGTTTTACATGAGGAC ATGGACTTCAAAAACCTCGTTCTGAAGACGTAGTCTGC AAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACC AGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTA TACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGG TTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTAC TTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTA ACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTA ATCAGCCCATGATCACACATAACTG | MZ191064 | 5 |

Tabla 2. Número de muestras, código, zona de recolección, haplotipo al que pertenecen las muestras analizadas y número de individuos por haplotipo.

| # | Muestras | Código | Zona recolección* | Haplotipo | # |
|----|---|--------|-------------------|-----------|---|
| 1 | C5 LADO A | C5LA | 5 | HTOZ2 | 5 |
| 2 | C5 LADO B | C5LB | 5 | HTOZ2 | |
| 3 | D5 L-B CORRAL | D5LBC | 4 | HTOZ2 | |
| 4 | I4 CEBO | I4C | 3 | HTOZ2 | |
| 5 | D5 LADO A (A) | D5LAA | 4 | HTOZ2 | |
| 6 | A4 LETRERO (A) | A4LA | 6 | HTOZ1 | 7 |
| 7 | ARENAS 2 CEBO | A2C | 1 | HTOZ1 | |
| 8 | ARENAS 2 A2B2 | A2A2B2 | 1 | HTOZ1 | |
| 9 | ARENAS 2 LADO C2 | A2LC2 | 1 | HTOZ1 | |
| 10 | ARENAS 2 LADO C1 | A2LC1 | 1 | HTOZ1 | |
| 11 | RIO NEGRO 2 LADO A ALAMBRE 2 IZQUIERDA 1 | R2LA2I | 2 | HTOZ1 | |
| 12 | ARENAS 2 A1 | A2A1 | 1 | HTOZ1 | |

*Ver Figura 1

Tabla 4. Resumen de índices de diversidad reportados en el DMQ, Loja y Zamora-Chinchipe. Se reportan los índices de diversidad de haplotipos (Hd), diversidad de nucleótidos (π), e índices de neutralidad D_T de Tajima y F_s de Fu y Li, con sus respectivos valores P de cada región.

| Población estudiada | Diversidad de Haplotipos (Hd) | Diversidad de Nucleótidos (π) | (D_T) de Tajima | Valor p | (F_s) de Fu y Li | Valor p | Referencia |
|----------------------------|---|---|-------------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------------|-------------------|
| DMQ (n = 38) | 0,705 | 0,00197 | 0,975 | 0,87 | 0,356 | 0,58 | Cueva, 2018 |
| Loja (n = 26) | 0,526 | 0,00691 | 2,268 | 0,98 | 5,914 | 0,98 | Moreta, 2020 |
| Zamora (n = 12) | 0,53 | 0,00115 | 1,381 | 1,00 | 1,152 | 0,64 | Presente estudio |

7 FIGURAS

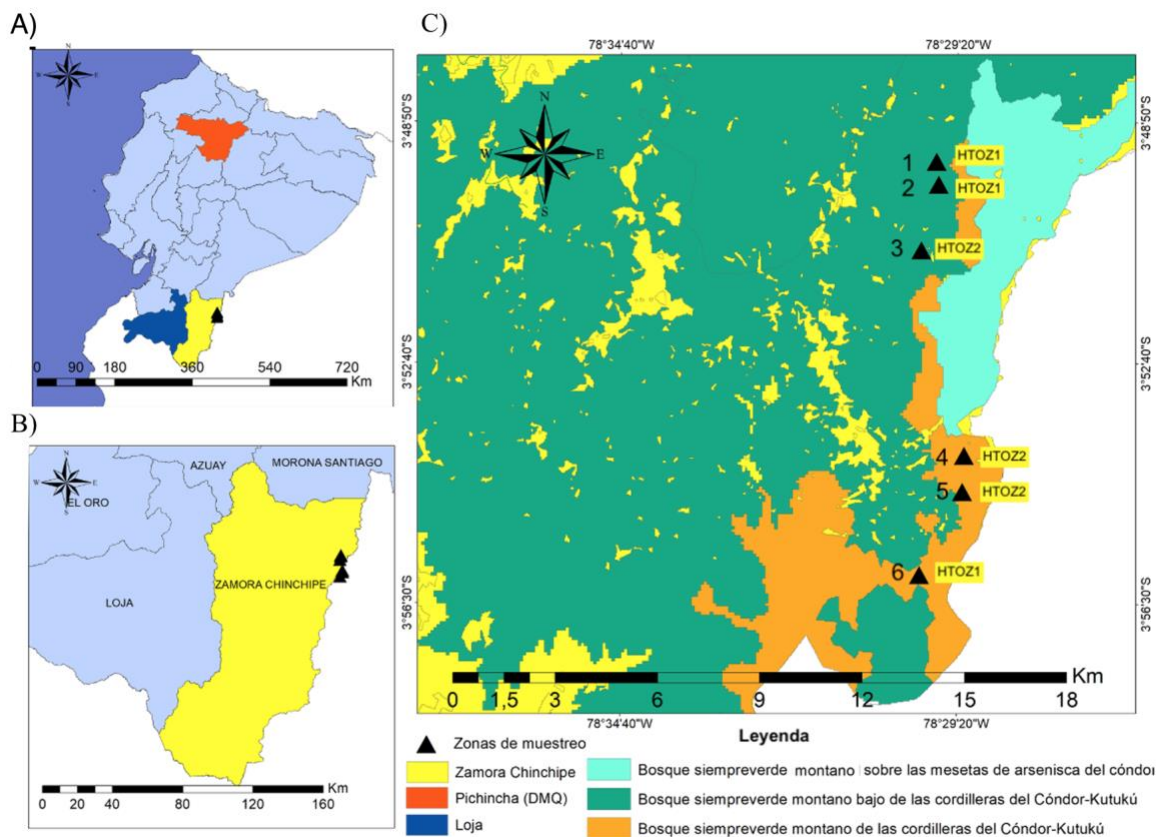


Figura 1. Zonas de muestreo en Zamora-Chinchipe para el presente estudio. A) Mapa del territorio ecuatoriano, se resaltan por códigos de color las provincias de Pichincha, Loja y Zamora-Chinchipe en donde se han realizado estudios de diversidad del oso andino. B) Provincia de Zamora-Chinchipe, se observa la zona de recolección de las muestras, correspondientes al cantón Paquisha. C) Número y zona de recolección exacta de las muestras y ecosistemas presentes en la región. Los mapas se generaron mediante el software ArcGis 10.5 con capas del Ministerio del Ambiente Ecuatoriano (MAE)

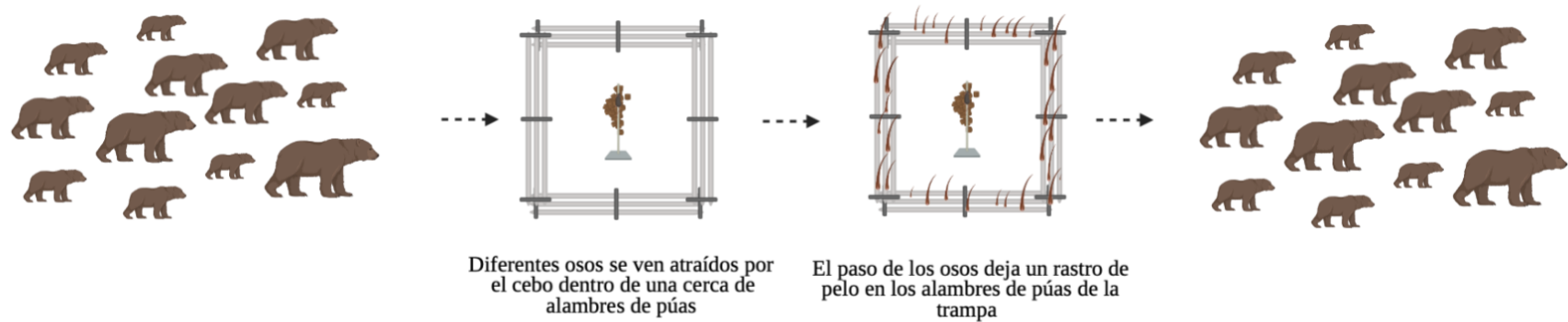


Figura 2. Diagrama del proceso no invasivo de recolección de muestras de pelo en osos andinos. El método de recolección no invasivo utilizado en este estudio busca generar el mínimo estrés posible en el animal. A pesar de esto, éste presenta limitaciones como baja concentración y calidad de ADN.

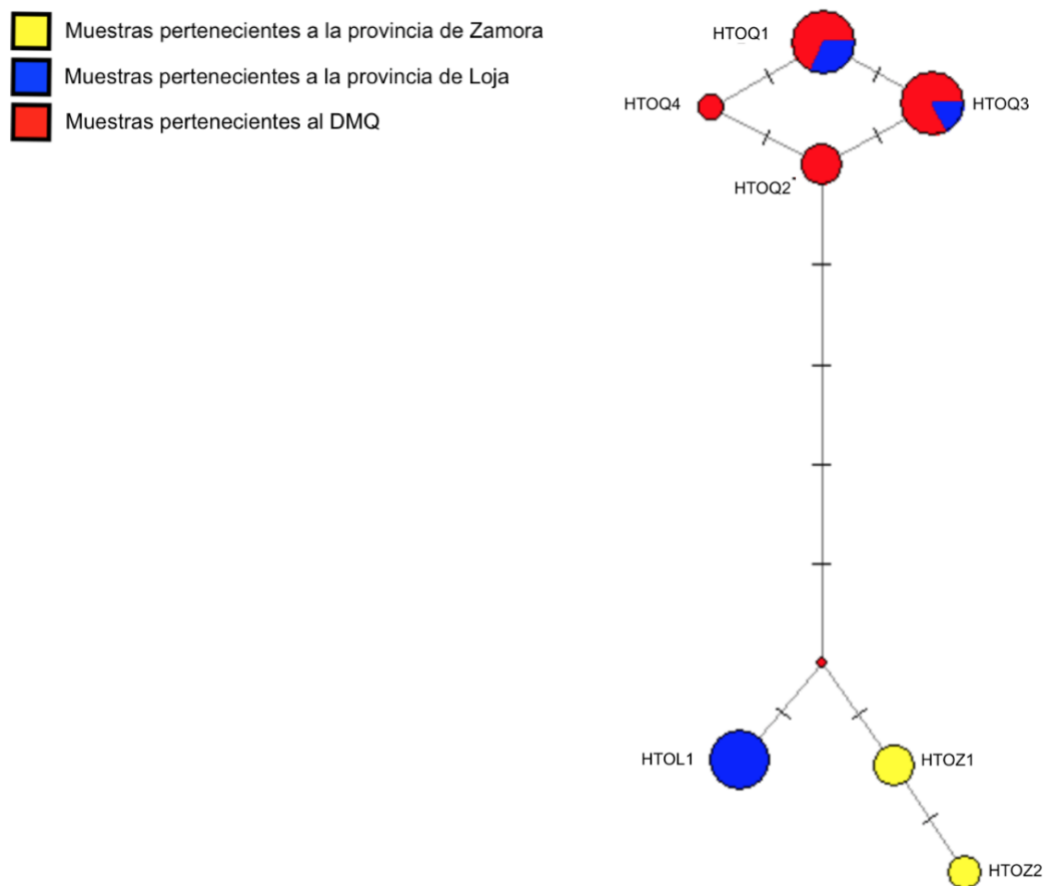


Figura 3. Red de haplotipos generado en Phylogenetic Network v10.2 representado como Median-Joining construido bajo el método de Maximum Parsimony La red de haplotipos generada por el método Median-Joining presenta los haplotipos descritos en este estudio junto con los reportados previamente por Cueva (2018) y Moreta (2020). Cada división entre las ramas representa un cambio de nucleótido entre los haplotipos. Los haplotipos HTOZ1 y HTOZ2 tienen 1 cambio. El punto en rojo hace referencia a un haplotipo desconocido del cual se derivaron los haplotipos encontrados en este estudio.

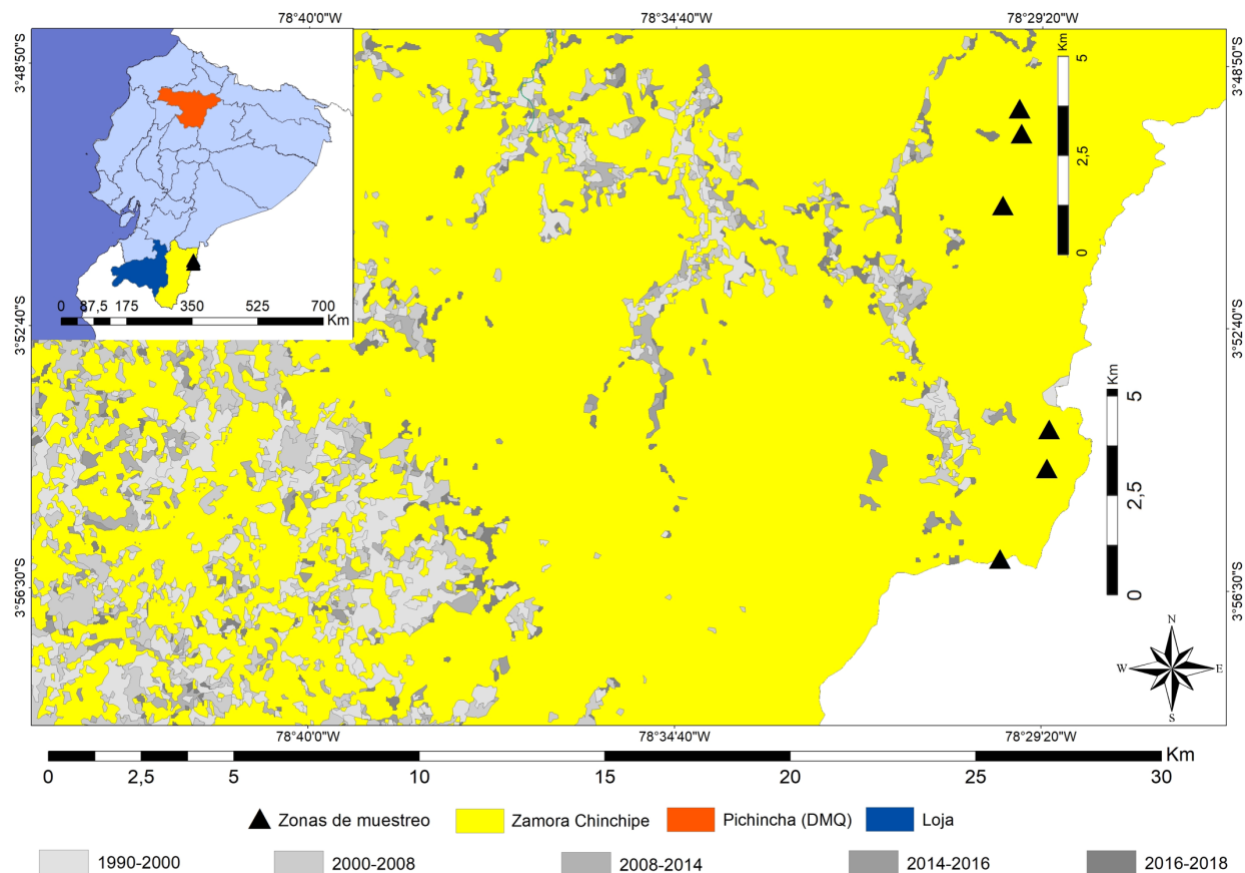


Figura 4. Mapa de fragmentación de hábitat en Zamora-Chinchipe en los últimos 30 años. Se observa la fragmentación de hábitat en Zamora durante los últimos 30 años. La fragmentación del hábitat se representa en gris. Esta se muestra de acuerdo con los diferentes años en los que ha ocurrido. También, se observan las zonas de muestreo en relación con estas regiones fragmentadas y la distancia entre muestras. Este mapa se generó mediante el software ArcGIS 10.5 con capas del Ministerio del Ambiente Ecuatoriano (MAE).

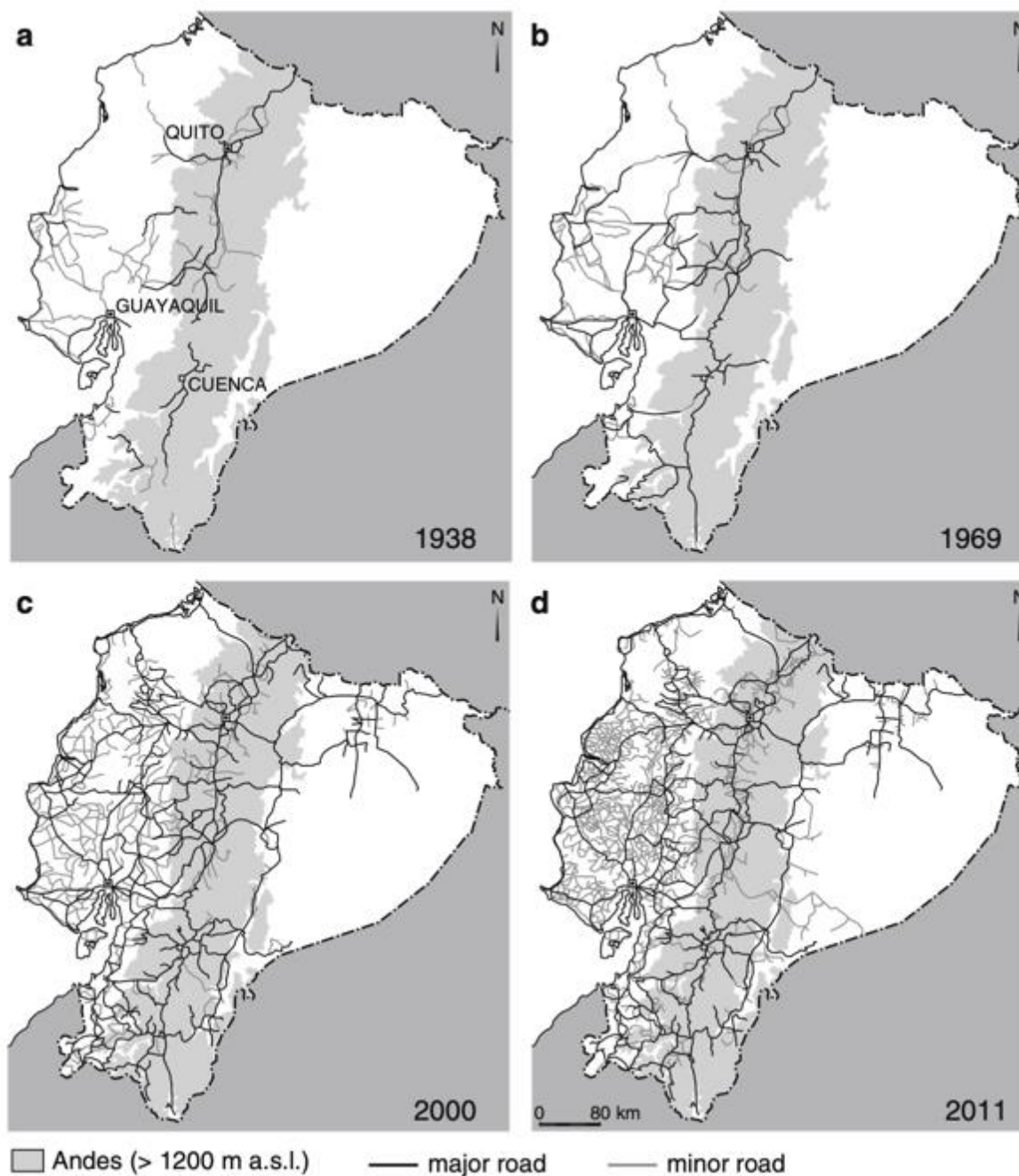


Figura 5. Carreteras y vías del Ecuador en el último siglo (Peters et al., 2013). Se observa la red de vías y carreteras a lo largo del Ecuador en los últimos 100 años (aproximadamente), sobre todo, la aparición de éstas en ecosistemas Andinos y demostrando la alta fragmentación de hábitat.

8 REFERENCIAS

- Ashrafzadeh, M. R., Kaboli, M., & Naghavi, M. R. (2016). Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. *Mammalian Biology*, 81(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.09.001>
- Barkmann, J., Eichhorn, S., Maza, B., Walter, F. v., & Olschewski, R. (2013). *The Challenges of Sustainable Development in the Podocarpus-El Cóndor Biosphere Reserve*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38137-9_3
- Bruque, M. G. (2016). *Análisis preliminar de diversidad genética de una población de osos andinos (Tremarctos ornatus) identificados en el Corredor Ecológico , al Noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito*.
- Cartuche Toledo, N. N. (2016). *Identificación de tipos de bosques y análisis de riqueza, diversidad y productividad en la provincia de Zamora Chinchipe*.
- Cueva, D. F. (2018). Universidad San Francisco De Quito Usfq Colegio De Ciencias Biológicas Y Ambientales. In *Diversidad genética del oso de anteojos (Tremarctos ornatus) en el Distrito Metropolitano de Quito mediante análisis de la región D-loop del ADN mitocondrial y marcadores SSR Proyecto*.
- de Jong, M. A., Wahlberg, N., van Eijk, M., Brakefield, P. M., & Zwaan, B. J. (2011). Mitochondrial DNA signature for range-wide populations of *Bicyclus anynana* suggests a rapid expansion from recent refugia. *PLoS ONE*, 6(6), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021385>
- DeSalle, R., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2017). MtDNA: The small workhorse of evolutionary studies. In *Frontiers in Bioscience - Landmark* (Vol. 22, Issue 5, pp. 873–887). Frontiers in Bioscience. <https://doi.org/10.2741/4522>

- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2007). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Fluxus Technology Ltd. (2020). Free Phylogenetic Network Software.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011). *State of the World's Forests* (Issue September 2004). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.74.2694>
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925.
- 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>
- Isasi, C. (2011). Los Conceptos De Especies Indicadoras ., *Interciencia*, 36(1), 31–38.
- IUCN. (2019). IUCN Standards and Petitions Committee. *Standards and Petitions Committee*, 1(August), 1–60. <http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/RedListGuidelines.pdf>
- Kattan, G., Hernández, O. L., Goldstein, I., Rojas, V., Murillo, O., Gómez, C., Restrepo, H., & Cuesta, F. (2004). Range fragmentation in the spectacled bear *Tremarctos ornatus* in the northern Andes. *Oryx*, 38(2), 155–163. <https://doi.org/10.1017/S0030605304000298>
- Keis, M., Remm, J., Ho, S. Y. W., Davison, J., Tammelaht, E., Tumanov, I. L., Saveljev, A. P., Männil, P., Kojola, I., Abramov, A. v., Margus, T., & Saarma, U. (2013). Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. *Journal of Biogeography*, 40(5), 915–927. <https://doi.org/10.1111/jbi.12043>

- Kelly, M. J., Betsch, J., Wulsch, C., Mesa, B., & Mills, L. S. (2012). Noninvasive sampling for carnivores. In *Carnivore Ecology and Conservation* (Vol. 15, Issue 1, pp. 47–69). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199558520.003.0004>
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New England Biolabs*, 1(1), 1–8. https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- Li, H., Zhang, Y., Zhang, Y. P., & Fu, Y. X. (2003). Neutrality tests using DNA polymorphism from multiple samples. *Genetics*, 163(3), 1147–1151. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.3.1147>
- Lowe, A., Harris, S., & Ashton, P. (2004). *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*.
- MAE. (2012). Leyenda Ecosistemas Ecuador 2. *Subsecretaría de Patrimonio Natural*, 186. https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/LEYENDA-ECOSISTEMAS_ECUADOR_2.pdf
- McWilliams, T. G., & Suomalainen Anu. (2019). Fate of a father's mitochondria. *Nature*, 565, 296–297. <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00093-1>
- Miller, C. R., Waits, L. P., & Joyce, P. (2006). Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) populations in the contiguous United States and

- Mexico. *Molecular Ecology*, 15(14), 4477–4485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03097.x>
- Moreta, E. A. (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 Erick*.
- Morrell, N., Appleton, R. D., & Arcese, P. (2021). Roads, forest cover, and topography as factors affecting the occurrence of large carnivores: The case of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*). *Global Ecology and Conservation*, 26, e01473. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01473>
- Narváez, J. (2017). *Estimación del tamaño poblacional del Oso Andino (Tremarctos Ornatus) en las estribaciones occidentales de la Reserva de Biosfera Macizo del Cajas*.
- NCBI. (n.d.). *Format Converter*. HIV Sequence Database.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294–307. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>
- PDOT. (2019). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de Zamora Chinchipe. In *Gobierno Provincial Zamora Chinchipe*.
- Perfectti, F., Picó, F., & Gómez, J. (2009). La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18(1), 10–16. <https://doi.org/10.7818/re.2014.18-1.00>
- Peters, T., Drobnik, T., Meyer, H., Rankl, M., Richter, M., Rollenbeck, R., Thies, B., & Bendix, J. (2013). *Environmental Changes Affecting the Andes of Ecuador*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38137-9_2

- Rojansky, R., Cha, M. Y., & Chan, D. C. (2016). Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *ELife*, 5(NOVEMBER2016), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.17896>
- Rozas, J. R. and R. (1995). DnaSP, DNA sequence polymorphism: *Computer Applications in the Biosciences*, 11(September), 621–625.
- Ruiz-García, M. (2007). *Genética de poblaciones : Teoría y aplicación a la conservación de mamíferos neotropicales (oso andino y delfín rosado) Genetics of populations : Theory and application to the conservation of neotropical mammals*. 102(December 2007), 99–126.
- Ruiz-García, M., Castellanos, A., Arias-Vásquez, J. Y., & Shostell, J. M. (2020). Genetics of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*; Ursidae, Carnivora) in Ecuador: when the Andean Cordilleras are not an Obstacle. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 31(5), 190–208. <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1769088>
- Ruiz-García, M., Vásquez, J. Y. A., Castellanos, A., Kolter, L., & Shostell, J. M. (2020). *Molecular Evolution (Mitochondrial and Nuclear Microsatellites Markers) in the Andean Bear (Tremarctos ornatus; Ursidae, Carnivora): How Many ESUs Are There? BT - Conservation Genetics in Mammals: Integrative Research Using Novel Approaches*. 165–194. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33334-8_8
- Sandoval Guillén, P., & Yáñez Moretta, P. (2019). Biological and ecological aspects of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*, Ursidae) in the Ecuadorean Andean zone and conservation perspectives under the Landscape Species approach. *Granja*, 30(2), 18–26.

- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Silva, A., Artiles, A., Suárez, W., & Silva, G. (2011). Sequence and structure of the mitochondrial control region of the Cuban rodent *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae). *Biotechnología Aplicada*, 28(3), 136–141.
- Soibelzon, L. H. (2004). Revisión sistemática de los Tremarctinae (Carnivora , Ursidae) fósiles de América del Sur. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, 6(1), 107–133.
- Soibelzon, L. H., Romero, M. R., Aguilar, D. H., & Tartarini, V. B. (2008). A Blancan (Pliocene) short-faced bear from El Salvador and its implications for Tremarctines in South America. *Neues Jahrbuch Fur Geologie Und Palaontologie - Abhandlungen*, 250(1), 1–8. <https://doi.org/10.1127/0077-7749/2008/0250-0001>
- Staden, R. (1996). The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3), 233. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>
- Stoneking, M. (2000). Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *American Journal of Human Genetics*, 67(4), 1029–1032. <https://doi.org/10.1086/303092>
- Taberlet, P., & Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 255(1344), 195–200. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0028>
- Taberlet, Pierre, Luikart, G., & Waits, L. P. (1999). Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8), 323–327. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01637-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01637-7)

- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, *123*(3), 585–595.
- Tapia-Armijos, M. F., Homeier, J., Espinosa, C. I., Leuschner, C., & de La Cruz, M. (2015). Deforestation and forest fragmentation in south Ecuador since the 1970s - Losing a hotspot of biodiversity. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133701>
- Thermo Scientific. (2000). *NanoDrop 2000 / 2000c Spectrophotometer*. 97.
- Valencia, R., Pitman, S., León-Yáñez, & Jørgensen, P. M. (2000). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/home>
- Vela-Vargas, I. M., Domínguez, G. V., Galindo, J., & Pérez-Torres, J. (2011). El oso andino sudamericano, su importancia y conservación. *Ciencia*, *62*(2), 44–51.
- Velez-Liendo, X., & García-Rangel, S. (2017). *Tremarctos ornatus*, Spectacled Bear (version published in 2018). *The IUCN Red List of Threatened Species*, 8235.