

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primates: Cebidae: Callithrichinae) mediante microsatélites  
(SSR: Short Sequence Repeat)**

**Diego Alejandro Nieto Monteros**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en  
Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre 2009

Universidad San Francisco de Quito  
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primates: Cebidae: Callithrichidae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeats)**

**Diego Alejandro Nieto Monteros**

Venancio Arahana, Ph.D.

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis .....

Stella de la Torre, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis .....

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis .....

**Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales**

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales .....

Quito, diciembre de 2009

**© Derechos de autor**  
**Diego Alejandro Nieto Monteros**  
**2009**

## **Agradecimientos**

A mis abuelas Laura y Marina por darme unos padres (Araceli y Diego) amorosos y luchadores; y a mis hermanos Mauri y Dome.

A mis amigos Pato, Homerin, Ani Lu y Belenchis por su apoyo incondicional a través de todos estos años de carrera.

A Stella de la Torre, Ana Troya y Juan Carlos Escobar por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional y su valiosa ayuda durante la realización de este proyecto.

## Resumen

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y de dieta. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones del leoncillo atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Con el fin de estimar la magnitud de esta amenaza, desde el año 2008, se realizó un estudio piloto para evaluar el nivel de variabilidad genética de cuatro grupos de esta especie de una población a orillas del río Aguarico. Para la realización del análisis genético se utilizó un total de 50 muestras de heces, colectadas durante el período de septiembre 2008 y febrero 2009; el 50% de las muestras correspondió al grupo P4, los grupos P1, P2 y P5 aportaron con el restante 50%. A partir de estas muestras se extrajo ADN con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Mediante la técnica de PCR se amplificaron nueve primers de microsatélites reportados por Nievergelt et al. (1998) para otra especie de Callitrichino. La visualización de bandas se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y Urea 5M. El análisis estadístico fue realizado con el programa GenAlEx 6. Los resultados obtenidos muestran que existen de 3 a 8 alelos/locus, la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg sugiere que en el grupo P4 puede estar sucediendo endogamia, la heterocigocidad esperada en los grupos P1 y P2 posee valores de 0.5, mientras que los valores del grupo P4 varían de 0.5 a 0.836. La distancia genética (Nei 1987) entre los grupos P1 y P2 es de 1.211, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1. Este estudio es pionero en este campo y evidencia la necesidad de continuar con investigaciones para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

## **Abstract**

The pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*) is an Ecuadorian primate species highly specialized in habitat and diet. This high specialization and the increment of human activities in the Ecuadorian Amazonia could cause the population of pygmy marmosets to go through bottle necks, losing genetic diversity. Since 2008, a pilot study was carried out to evaluate the level of genetic diversity in four groups of pygmy marmosets of a population located in the margins of the Aguarico river. From September 2008 through February 2009, 50 fecal samples were collected from four the groups; 50% of the samples were from group P4, groups P1, P2, and P5 contributed to the remaining 50%. DNA was extracted from the samples with QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). PCR was used to amplify nDNA microsatellites with nine primers used by Nievergelt et al. (1998) in other Callithrichine species. Polyacrylamide 6% and urea 5M gels were used to observe the DNA. Statistical analysis were carried out with the software GeanALEx 6. The results showed that there are 3 to 8 alleles/locus. The Hardy-Weinberg equilibrium test suggests that inbreeding could be occurring in group P4. The expected heterocigosity in groups P1 and P2 have values of 0.5; and group P4 has values from 0.5 to 0.836. The genetic distance between the groups P1 and P2 is 1.211, whereas group P4 differs in 0.612 and 0.485 from groups P2 and P1, respectively. This is a pioneer study that evidences the need of continuing with this type or research to evaluate the human impacts on the genetic diversity of this and other Ecuadorian species.

## Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Características generales de la especie <i>Callithrix pygmaea</i> .....	3
1.2. <i>Callithrix pygmaea</i> en el Ecuador.....	6
1.3. Diversidad genética.....	7
1.4. Métodos para medir la diversidad genética.....	8
1.5. Conservación genética.....	3
2. Justificación.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. Área de estudio.....	17
5. Materiales y Métodos.....	17
5.1. Materiales.....	17
5.1.1. Obtención de muestras.....	17
5.1.2. Extracción de ADN.....	17
5.1.3. Cuantificación de ADN.....	17
5.1.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR.....	18
5.1.5. Análisis de microsatélites.....	18
5.1.6. Análisis estadísticos.....	19
5.2. Métodos.....	19
5.2.1. Obtención de muestras.....	19
5.2.2. Extracción de ADN.....	20
5.2.3. Cuantificación de ADN.....	20

5.2.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR.....	20
5.2.5. Análisis de microsatélites.....	21
5.2.6. Análisis estadísticos.....	23
6. Resultados.....	27
6.1. Muestras obtenidas.....	27
6.2. Cuantificación de ADN.....	28
6.3. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR.....	28
6.4. Estadísticos poblacionales.....	28
7. Discusión.....	30
8. Conclusiones.....	34
9. Recomendaciones.....	35
10. Bibliografía.....	36
11. Tablas.....	39
12. Figuras.....	45
13. Anexos.....	52



## 1. Introducción

### 1.1. Características generales de la especie *Callithrix pygmaea*

#### 1.1.1. Distribución

*Callithrix pygmaea* (leoncillo) se distribuye desde el río Caquetá (Colombia), pasando a través del oriente ecuatoriano, y los llanos del sureste peruano hasta el río Ucayali. Además, se los encuentra desde el sur de los ríos Manu y Madre de Dios hasta el norte boliviano, probablemente. Se posee información acerca de poblaciones de leoncillos en el sector sureste de la amazonía brasileña, pero es posible que se encuentren desde el norte del río Purús hasta el norte del río Solimões (Townsend, 2001).

#### 1.1.2. Historia taxonómica

Inicialmente, Gray (1866) propuso *Cebuella* como subgénero del género *Hapale*, y después como género. El leoncillo difiere de otros Callithrichinos en sus orejas sin pelos, ausencia de vasos sanguíneos preauriculares y cola con anillos. El género *Cebuella* no fue aceptado como un genérico de del género *Callithrix*, pero Cabrera (1917) reconoce ciertas características dentales y Thomas (1922) apunta a características craneales que contribuyen a la justificación del género *Cebuella* como genérico del género *Callithrix* (HersHKovitz, 1977). Sin embargo, en la actualidad las técnicas moleculares han ayudado a comprender acerca de la clasificación y filogenia de esta especie. Los estudios realizados por Barroso et al. (1997) en el gen IRBP (interstitial retinol-binding proteína) muestran que *Cebuella pygmaea* (sinónimo de *Callithrix pygmaea*) se encuentra incluido en el género *Callithrix* junto con las especies *C. jacchus* y *C. argentata*. Además,

estudios moleculares basados en los genes ND1 (mtADN) y transferrina (ADN nuclear) realizados por Tagliaro et al. (2000) muestran un clado conformado entre las especies del género *Callithrix* (*C. jacchus*, *C. kuhli*, *C. penicillata*) y *Callithrix pygmaea*. Finalmente, estudios citogenéticos realizados por Dumas et al. (2007) muestran re-arreglos cromosomales que incluyen a *Cebuella pygmaea* dentro del género *Callithrix*.

### 1.1.3. Comportamiento

*Callithrix pygmaea* conforma grupos de 2 a 9 individuos, siendo 6 el número de individuos promedio. La estabilidad de estos grupos se relaciona fuertemente con la presencia de alimento, como exudados de árboles y frutas (Townsend, 2001).

Las actividades diarias del leoncillo se dividen en el consumo y búsqueda de exudados (provenientes de árboles -savia o gomas-) e insectos (artrópodos). Además, durante los períodos del medio día estos se dedican a socializar (Townsend, 2001).

El territorio ocupado por los grupos de leoncillos incluye por lo general 90m a orillas de cualquier río con un rango de 20 a 60m tierra adentro. El promedio de territorio ocupado por los leoncillos es de 0.3 a 0.4 hectáreas, esta pequeña parte de tierra ocupada está relacionada con la cantidad de árboles que proveen exudados para su alimentación (Townsend, 2001).

Los individuos son monógamos, y solamente el macho y la hembra dominantes se reproducen. El macho dominante por lo general sigue a la hembra que se encuentre en estro, esto hace que el macho cambie su comportamiento con menos tiempo en la caza de insectos y el cuidado de las crías. Las obligaciones parentales son distribuidas entre los miembros del

grupo, por ejemplo los infantes son cargados por otras hembras o colocados en lugares seguros (por lo general en árboles que proveen exudados) donde otros integrantes pueden observarlos (Townsend, 2001).

La pareja dominante y sus crías poseen un sitio exclusivo para su alimentación (exudados de árboles), por lo que crías de mayor edad utilizan exudados de fuentes secundarias. Cuando la fuente principal de alimento se acaba, el grupo cambia hacia el segundo recurso o sino se mueven de lugar en busca de nuevas fuentes de alimento (Townsend, 2001).

#### 1.1.4. Reproducción

*Callithrix pygmaea* es una especie que se reproduce cada 6 meses en su hábitat natural, mientras que en cautiverio no muestra un período exacto para su reproducción. El período de gestación dura entre 19.5 hasta 20.3 semanas, con una media de 19.75 semanas. Las hembras dan a luz por lo general gemelos, no tan usuales son alumbramientos de una sola cría y rara vez existen trillizos. Los alumbramientos se dan por las noches (Herskovitz, 1977).

#### 1.1.5. Citogenética

La carga genética del leoncillo es  $2n = 44$  cromosomas, el número más bajo de cromosomas dentro de la familia Callithricidae, compartiendo el puesto con la especie *Callithrix argentata*. El número de cromosomas en las demás especies que integran esta familia es de 46 (Herskovitz, 1977).

#### 1.1.6. Quimerismo

Dentro de los Callithrichinos un fenómeno normal es el quimerismo, el cual usualmente se presenta en dicigosis. El quimerismo es de fácil detección en

gemelos heterosexuales o por la presencia de células sexuales tanto de machos y hembras en los tejidos hematopoyéticos y gonadales. Este intercambio de células se da a través de la unión de los vasos sanguíneos o linfáticos (este proceso es conocido como anastomosis) de las placentas donde se desarrollan los fetos. Además, una manera de conocer si existe quimerismo en crías únicas es a través de los siguientes pasos: (1) intercambio de células entre los fetos seguido de la muerte y reabsorción de uno de ellos; (2) traspaso de células hematopoyéticas desde la madre hasta el feto y (3) una temprana fusión de los blastómeros de los fetos finalizando con una única cría quimérica (Hershkovitz, 1977).

## **1.2. *Callithrix pygmaea* en el Ecuador**

El leoncillo es la especie más pequeña dentro de las 20 especies de primates que habitan los bosques tropicales y subtropicales del Ecuador. Estudios sobre su ecología y comportamiento han sido realizados por de la Torre y colaboradores (2009) en diferentes poblaciones de la Amazonía ecuatoriana; entre ellas, la población San Pablo, que se encuentra ubicada en las orillas del río Aguarico (UTM, 18 Zone, Datum PSAD 56 341767 E, 9969737 N), en la que se realizó también el presente estudio.

La localidad de San Pablo tiene una altitud de 260msnm y originalmente estuvo cubierta de bosques de varzea, inundados temporalmente por aguas blancas que en algunas áreas han sido talados para actividades agrícolas (de la Torre et al., 2009).

El tamaño de los grupos de leoncillos en Ecuador varía de 2 a 8 individuos incluyendo infantes, siendo el tamaño promedio 6 individuos por grupo. Estos se encuentran conformados por una pareja de adultos (macho y hembra), entre 0 a 3 sub-adultos, entre 0 a 2 juveniles e infantes. El área de vida de los grupos es de 0.9

hectáreas (de la Torre et al., 2009). Su principal fuente de alimento son exudados provenientes de las especies de árboles *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, *Inga marginata*, *Parkia balslevii*, entre otras (Yépez et al., 2005).

### **1.3.Diversidad genética**

La diversidad genética a nivel morfológico se ve reflejada entre individuos en diferentes características como color de ojos, piel y cabello en humanos; color de flores en plantas, entre otros (Frankham et al, 2003).

La diversidad genética a nivel molecular es representada por las secuencias de ADN de las diferentes especies. La diversidad genética representa pequeños cambios en las diferentes secuencias de ADN. Estos pequeños cambios pueden resultar en cambios de las secuencias de aminoácidos, lo cual a su vez trae consigo o no cambios en la funcionalidad bioquímica o morfológica de la proteína, produciendo o no diferencias en la tasa de reproducción, en la tasa de sobrevivencia o en el comportamiento y morfología de los individuos (Frankham et al, 2003).

#### **1.3.1. Importancia de la diversidad genética**

Mantener la diversidad genética es el principal objetivo en la conservación de las especies. En la actualidad, el ambiente se encuentra en constante cambio por factores como el cambio climático debido al calentamiento global, contaminación, introducción de nuevas especies, y cambios en las enfermedades, pestes o parásitos. La diversidad genética es necesaria para las poblaciones con el fin de que éstas puedan adaptarse a tales cambios (Frankham et al., 2003). Algunos ejemplos de adaptación de poblaciones a cambios ambientales en los últimos tiempos son: el melanismo industrial que se ha producido en casi 200 especies de mariposas debido a la

contaminación industrial y la resistencia a insecticidas, herbicidas, antibióticos o a cualquier otro agente de biocontrol de algunas especies de plagas. La pérdida de la diversidad genética se relaciona con la reducción de la eficiencia reproductiva y con la endogamia (Frankham et al., 2003).

La importancia de la diversidad genética a largo plazo es mantener la capacidad de evolucionar, a corto plazo es también para mantener la eficiencia reproductiva de los individuos (Frankham et al., 2003).

#### **1.4.Métodos para medir la diversidad genética**

La diversidad genética puede ser medida a partir de:

##### **1.4.1. Características cuantitativas**

Esta es una de las más importantes formas de variación genética, ya que determina la eficiencia reproductiva, lo cual establece la habilidad de evolucionar. Las características que se miden son: altura, peso, número de crías por alumbramiento, longevidad, entre otros. Sin embargo, este tipo de variación genética es difícil de medir debido a la interacción del genotipo y el medio ambiente (Frankham et al., 2003).

##### **1.4.2. Alelos deletéreos**

Gran parte de la variación genética que se encuentra en las poblaciones es dada por alelos deletéreos, ya que son la causa de un sin número de enfermedades en diferentes especies. Para la detección de este tipo de variación genética es necesaria la observación de malformaciones y la pérdida de funciones pero, ya que muchos de estos alelos se encuentran en heterocigosis son de difícil detección. Es por eso que una de las técnicas

más utilizadas para identificar estos alelos es el proceso de endogamia, ya que permite la expresión de alelos recesivos (Frankham et al., 2003).

### 1.4.3. ADN

Una gran variedad de técnicas han surgido para medir la variabilidad genética a nivel del ADN. La técnica a ser utilizada depende del modo de heredabilidad de las características (Frankham et al., 2003).

Los métodos que revelan mayor grado de variabilidad son los más utilizados en la conservación de especies, ya que proveen una alta comparación entre especies amenazadas y no amenazadas, identificación de polimorfismos, entre otros (Frankham et al., 2003).

Las principales técnicas para medir variabilidad genética a partir de ADN se describen a continuación.

#### 1.4.3.1. Microsatélites (Simple Sequence Repeats (SSR) o Short Tandem Repeats (STR))

Los marcadores microsatélites corresponden a una clase de ADN repetido basado en repeticiones de dinucleótidos (Griffiths et al., 2000).

Los microsatélites son secuencias en tándem de 1 a 10 bases, y su alta variabilidad se debe a un mal funcionamiento (por lo general a una mala colocación de nucleótidos) de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN (Frankham et al., 2003).

Para la aplicación de esta técnica es necesario utilizar secuencias flanqueantes conservadas (primers), las cuales permiten la amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) del fragmento de ADN (microsatélite). Los fragmentos de ADN obtenidos son separados en

geles de agarosa o acrilamida, y teñidos con bromuro de etidio o tinciones de nitrato de plata (Frankham et al., 2003).

Los marcadores microsatélites poseen mayor ventaja sobre los demás marcadores ya que combinan una alta variabilidad e identifican co-dominancia (permiten la determinación de individuos heterocigotos). La desventaja que tienen es que para cada especie deben desarrollarse un nuevo set de primers, pero se ha visto que entre especies emparentadas se pueden utilizar los mismos primers, tal es el caso entre humanos y chimpancés (Frankham et al., 2003).

#### 1.4.3.2. ADN Fingerprints (Minisatélites o Variable Number Tandem Repeats (VNTR))

Los marcadores minisatélites son secuencias de 10 a 100 bases, y su variabilidad se genera debido a un crossing-over desigual de las cromátidas. Para la detección de estas secuencias en primer lugar se purifica el ADN, se corta el ADN con enzimas de restricción (cortan afuera de la secuencia minisatélite) y posteriormente las bandas son separadas mediante electroforesis. Después las dos hebras de ADN son separadas, mediante denaturación, y transferidas a una membrana (Southern Blot). La membrana que contiene el ADN es colocada en una solución que contiene ADN complementario marcado radiactivamente (éste se hibrida con el ADN de la membrana por complementariedad de bases). Después la membrana es lavada, secada y auto-radiografiada para detectar las secuencias minisatélites (Frankham et al., 2003).

La ventaja de estos marcadores es que poseen una alta variabilidad y además no es necesario conocer la secuencia de ADN de la especie a ser



estudiada. La desventaja es que no identifican loci individuales, ya que los fragmentos se derivan de varios lugares del genoma y también la herencia de las bandas no es identificada, es decir, no se distingue entre homocigoto ni heterocigoto (Frankham et al., 2003).

#### 1.4.3.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para esta técnica se utiliza un primer (entre 10 y 20 bases de largo) diseñado al azar, el cual amplificará a menudo o por casualidad varias regiones diferentes del genoma. Las secuencias amplificadas poseen un tamaño de entre 100 a 200 bases. El modo de herencia es dominante, los recesivos no pueden ser identificados ya que se presenta ausencia de bandas al momento de observar el gel (Perera et al., 2000).

Estos marcadores tienen la ventaja de que cubren todo el genoma y no es necesario el diseño de primers específicos. Su desventaja radica en que son marcadores que indican dominancia y se necesita mucho cuidado al momento de obtener repetitividad de resultados (Perera et al., 2000).

#### 1.4.3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Para este método el ADN genómico es cortado con enzimas de restricción y a este ADN fragmentado se ligan secuencias conocidas (adaptadores) a los extremos de los fragmentos. Después se lleva a cabo un PCR con primers correspondientes a la secuencia de los adaptadores que adicionalmente poseen nucleótidos selectivos. Al final se obtiene un fingerprint que muestra presencia o ausencia, tal como los marcadores RAPD (Frankham et al., 2003). Esta metodología posee varias ventajas tales como: no se necesita un conocimiento previo del genoma que se está estudiando, presenta una alta reproducibilidad y otorga un alto

número de marcadores. Mientras que sus desventajas es que son marcadores dominantes (no se diferencia entre homocigotos y heterocigotos) y para el desarrollo de esta técnica es necesario ADN de alta calidad (Awise, 1994).

#### 1.4.3.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Para esta técnica el ADN es purificado en primera instancia, luego es cortado con enzimas de restricción y separado por su tamaño en geles. Las hebras de ADN son separadas y transferidas a una membrana. Después la membrana es colocada en una solución que contiene ADN de simple cadena marcado radiactivamente (por lo general con  $^{32}\text{P}$ ), posteriormente la membrana es lavada para eliminar el ADN marcado que no se hibridizó. Finalmente la membrana es secada y autoradiografiada (Frankham et al., 2003).

Las ventajas de esta técnica son: muestran heredabilidad de co-dominancia y son moderadamente variables. Sus desventajas son: se necesita una gran cantidad de ADN y no son tan variables como los microsatélites (Frankham et al., 2003).

### **1.5. Conservación genética**

La biodiversidad (variedad de ecosistemas, especies, poblaciones de especies y la diversidad genética entre especies) del planeta se ha reducido rápidamente debido a las acciones directas o indirectas del ser humano. Los seres humanos adquieren una gran cantidad de recursos para su existencia sin medir su consumo ni tomar en cuenta a los demás organismos que forman parte de este mundo. De ello surge la necesidad de desarrollar acciones de conservación que minimicen esta pérdida que,

de mantenerse, afectaría seriamente a nuestra especie por factores mencionados a continuación (Frankham, 2003):

- ✓ El valor económico de los biorecursos.- Estos incluyen alimentos, compuestos activos para medicinas, algodón para ropa, madera para la construcción, entre otros.
- ✓ Los servicios de los ecosistemas.- Esto comprende las funciones biológicas que proveen los diferentes organismos al planeta, tales como: oxígeno a través de las plantas, control climático por los bosques, ciclos de nutrientes, control natural de plagas, polinización de plantas, entre otros.
- ✓ Los placeres que los humanos obtienen de los organismos.- Como por ejemplo poder sembrar cualquier variedad de plantas ornamentales, visitar zoológicos y reservas naturales, entre otros.
- ✓ Los derechos de los organismos a vivir.- La justificación ética de conservar la biodiversidad es que ningún organismo en la Tierra tiene el derecho de llevar a la extinción a otro.

Para evitar que la biodiversidad desaparezca es indispensable la conservación genética, la cual tiene como objetivo principal minimizar los riesgos de extinción debido a factores genéticos. También, es el uso de la genética con el fin de mantener a las especies como unidades dinámicas las cuales puedan evolucionar con el fin de lidiar con los cambios ambientales y minimizar su riesgo de extinción (Frankham et al., 2003). Los factores genéticos que influyen en la conservación biológica son (Frankham et al., 2003):

- Los efectos deletéreos de la endogamia sobre la reproducción y la sobrevivencia.

- Pérdida de la variabilidad genética, lo cual afecta la capacidad de evolucionar en este mundo cambiante.
- Fragmentación de poblaciones y pérdida de flujo génico.
- Acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas.
- Adaptación genética al cautiverio, lo cual reduce el éxito de reintroducción.

Finalmente, uno de los principales factores por el cual se debe mantener la biodiversidad es la diversidad genética ya que sin ésta los organismos no podrían ser capaces de evolucionar ante un mundo que se encuentra en constante cambio (Frankham, 2003).

En conclusión, *Callithrix pygmaea* es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y de dieta. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones del leoncillo atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Con el fin de estimar la magnitud de esta amenaza, desde el año 2008, se realizó un estudio piloto para evaluar el nivel de variabilidad genética (mediante marcadores moleculares microsatélites -SSR-) de cuatro grupos de esta especie de una población a orillas del río Aguarico (Fig. 1).

## **2. Justificación**

La conservación de las especies de primates es fundamental ya que estas mantienen la estructura y dinámica de los ecosistemas y también cumplen funciones importantes tales como dispersores de semillas, polinizadores, depredadores o presas. Estas especies están actualmente amenazadas por la destrucción de hábitats, la cacería y el tráfico de animales; todo esto con el fin de ampliar los campos de cultivo y para ampliar beneficios económicos, respectivamente. Como consecuencia muchas especies han reducido su número o se han extinguido.

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y de dieta (de la Torre et al., 2009). Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones de leoncillo atravesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Es por estos motivos que el presente estudio tiene como fin evaluar en forma preliminar el nivel de variabilidad genética de una población de la especie *Callithrix pygmaea* (leoncillo), para conocer si esta ha atravesado por cuellos de botella o si en ella se ha dado endogamia, migración de individuos entre grupos, entre otros. La información generada por este estudio, pionero en este campo, es importante para delinear acciones de conservación y manejo de esta especie y para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

- ❖ Contribuir al conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones de leoncillo *Callithrix pygmaea* en la Amazonía ecuatoriana.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Obtener ADN de *Callithrix pygmaea* a partir de heces fecales.
- Establecer y estandarizar un protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) para nueve pares de primers microsatélites (SSR).
- Evaluar la diversidad genética en una población de leoncillos.

### **4. Área de estudio**

Este estudio fue realizado en dos fases: toma de muestras y análisis moleculares. Las muestras de heces fecales fueron colectadas de cuatro grupos de la población San

Pablo (P1, P2, P4 y P5) en el período de septiembre 2008 hasta febrero 2009. Esta población se encuentra ubicada a orillas del río Aguarico y sus coordenadas de referencia son UTM, Zona 18, Datum PSAD 56 341767 E, 9969737 N (de la Torre et al., 2009). Los grupos de leoncillos fueron identificados y estudiados desde el año 2000 (Fig. 1).

El análisis molecular de las muestras (heces fecales) fue realizada entre el período de octubre 2009 y noviembre 2009 en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Obtención de muestras**

- Hojas de plátano grande (*Musa x paradisiaca*)
- Papel filtro
- Frascos
- Sílica gel

#### **5.1.2. Extracción de ADN**

- Heces fecales
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)

#### **5.1.3. Cuantificación de ADN**

- Muestras de ADN
- Agarosa
- Silver green o bromuro de etidio
- NANODROP 1000 Thermo Scientific
- Cámara horizontal de electroforesis THERMO EC

#### **5.1.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR**

- Muestras de ADN
- Primers establecidos por Nievergelt et al., 1998 para la especie *Callithrix jacchus* (Anexo 1)
- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)
- 100mM dNTP set (Invitrogen)
- Termociclador TECHNE TC-412

#### **5.1.5. Análisis de microsatélites**

- Producto de amplificación
- Buffer de carga denaturante
- 30-330 bp AFLP™ DNA Ladder (Invitrogen)
- Solución de poliacrilamida al 6% y 5M
- Persulfato al 10%
- TEMED (Invitrogen)
- RAIN X
- Bind-silane
- TBE 1X
- Solución de fijación (Benbouza et al., 2006)
- Solución de tinción (Benbouza et al., 2006)
- Solución de revelación (Benbouza et al., 2006)
- Agua destilada
- Cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen® GT (BIO-RAD)
- Termociclador TECHNE TC-412
- Transiluminador

### **5.1.6. Análisis estadísticos**

- Software GenAlEx 6 (Peakall y Smouse, 2006)

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Obtención de muestras**

La colección de muestras fecales se realizó entre septiembre de 2008 y febrero de 2009 y consistió en observaciones a cuatro grupos de leoncillos de la población San Pablo localizados en las orillas del Río Aguarico. La colección consistió en ubicar hojas grandes de plátano (*Musa x paradisiaca*) en la base del principal árbol de exudados de cada grupo. Estas hojas fueron revisadas temprano en la mañana y en las últimas horas de la tarde; en estos períodos, un investigador observaba a los leoncillos de cada grupo para tomar datos de tamaño y composición del grupo y para obtener registros visuales de la deposición de excrementos por parte de los animales. Cada observación tuvo una duración promedio de dos horas al término de las cuales se retiraban todas las muestras de heces que habían caído sobre las hojas.

La textura de las heces permitió en la mayoría de los casos separar las muestras provenientes de una sola deposición de un individuo. Posteriormente, cada muestra era colocada en papel filtro y a su vez guardada en un frasco con un desecante (sílica gel). Los frascos con las muestras así conservadas fueron expuestas al sol durante uno o dos días para reducir la proliferación de hongos en las heces. Finalmente, después de ser transportados a Quito, los frascos fueron guardados en un congelador a -20° C.



### **5.2.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN a partir de las muestras de heces fecales fue realizada mediante el protocolo (*QIAamp DNA Stool Handbook*) que se encuentra en el kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit de *QIAGEN*.

### **5.2.3. Cuantificación de ADN**

La cuantificación del ADN en ng/ $\mu$ L se realizó utilizando el espectrofotómetro NANODROP 1000. Además, para verificar la presencia y calidad de ADN a partir de las muestras de heces se elaboraron geles de agarosa al 1% con 2 $\mu$ L de siber green o bromuro de etidio. En cada gel se colocaba un volumen final de 7 $\mu$ L (2 $\mu$ L de buffer de carga y 5 $\mu$ L de ADN). Finalmente, cada gel fue corrido durante 30 minutos a un voltaje de 80 voltios y después fue fotografiado bajo luz ultravioleta.

### **5.2.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR**

La amplificación de los microsatélites se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Se utilizó los primers CJ-1, CJ-6, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-13, CJ-14 y CJ-15 establecidos por Nievergelt et al. (1998) para la especie *Callithrix jacchus*. El volumen final de reacción fue de 25 $\mu$ L el cual incluía buffer 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 $\mu$ M de dNTP`s, 0.24 $\mu$ M de cada primer, 0.5U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5ng de ADN.

El programa de amplificación consistió en 3 minutos de denaturación inicial a 95° C; 40 ciclos de denaturación a 94° C durante 1 minuto, annealing de 50° o 58° C según el primer (Tabla 1) durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto. Extensión final a 72° C durante 5 minutos.

### **5.2.5. Análisis de microsatélites**

La separación de las bandas se realizó mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y urea 5M, en cámaras verticales Sequi-Gen® (BIO-RAD). Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata (Benbouza et al., 2006).

#### **5.2.5.1. Preparación de poliacrilamida**

La solución de poliacrilamida al 6% y urea 5M fue preparada a partir de acrilamida, bisacrilamida, TBE 1X y aforada hasta 100mL con agua destilada (Anexo 2).

#### **5.2.5.2. Armado de la cámara de electroforesis vertical**

Para el armado de la cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen® (BIO-RAD), se trató el vidrio repelente con 5mL de alcohol al 96% y después con 7mL de RAIN X. El vidrio atrayente con 5mL de alcohol al 96% y posteriormente con la solución atrayente (1mL de alcohol al 96% y 0.5% de ácido acético, más 3µL de bind-silane). Se utilizaron separadores de 4mm de grosor y peines del mismo grosor. Se colocaron 90mL de poliacrilamida al 6% y urea 5M, 200µL de persulfato al 10% y 109µL de TEMED.

#### **5.2.5.3. Preparación de muestras amplificadas**

Al producto de amplificación de cada muestra (25µL) se le agregó 8µL de buffer denaturante de carga, esta mezcla fue sometida a 95° C durante 5 minutos para denaturar el ADN. En cada posillo del gel se cargó 4µL de la muestra denaturada y 3µL de ladder 30-330pb (Invitrogen) en el primer y último posillo del gel.

#### 5.2.5.4. Condiciones de migración

Una vez armada la cámara y preparado el gel se colocó TBE 1X como buffer de corrida. Se realizó una precorrida durante 15 minutos para que el gel alcance una temperatura entre 40° y 45° C. Al finalizar la precorrida se limpiaron los posillos de restos de urea y acrilamida, y se cargó 4µL de las muestra previamente denaturadas. La corrida se realizó durante 80 minutos a 80 watts.

#### 5.2.5.5. Tinción con plata

Una vez finalizada la corrida se procedió a desarmar la cámara. Se separó el vidrio atrayente (con el gel) del vidrio repelente. A continuación se trató el vidrio atrayente (junto con el gel), con las siguientes soluciones: solución fijadora durante 6 minutos, solución de tinción durante 8 minutos, agua destilada durante 8 segundos, solución de revelación hasta observar el aparecimiento de bandas y solución de parada durante 2 minutos. Finalmente, se lavó el vidrio con agua destilada durante 5 segundos y se lo dejó secar (Benbouza et al., 2006).

*\*Nota:* después de tratar el vidrio atrayente (con el gel) con cada solución, éste fue secado antes de pasar a la siguiente solución.

#### 5.2.5.6. Lectura de geles de poliacrilamida (toma de datos)

El vidrio atrayente con el gel, ya revelado, era colocado en el transiluminador con luz blanca. Con una regla (graduada en centímetros) se medía la migración de las bandas del marcador de peso molecular y de las muestras (alelos) desde el posillo donde se colocaban las muestras. Las medidas de migración de cada banda eran transferidas a un

computador donde, mediante una regresión lineal en Microsoft Office Excel, se obtenía el peso (en pares de bases (pb)) de cada alelo.

### 5.2.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó una matriz que registraba el peso de cada alelo en pares de bases (pb) por locus para cada muestra. Esta matriz fue sometida a diferentes análisis estadísticos usando el software GenAlEx 6 para determinar los siguientes parámetros poblacionales:

#### 5.2.6.1. Frecuencias alélicas

Este análisis permite determinar la composición genética de cada población (Peakall y Smouse, 2006). La fórmula a través de la cual se calcularon las frecuencias alélicas para los grupos fue:

$$FreqAllele_{-x} = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N}$$

$N_{xx}$  = número de individuos homocigotos  $xx$ .

$N_{xy}$  = número de individuos heterocigotos  $xy$ . Donde  $y$  puede ser cualquier otro alelo.

$N$  = número de muestras.

#### 5.2.6.2. Equilibrio Hardy-Weinberg

Este análisis es crucial en genética de la conservación y de la evolución ya que provee las bases para detectar desvíos de cruces al azar, pruebas para selección, modelos para determinar endogamia y selección, y para determinar frecuencias alélicas en loci que muestran dominancia (Peakall y Smouse, 2006).

En este caso el programa GenAlEx 6 utiliza la prueba Hardy-Weinberg para comprobar las siguientes hipótesis:

$H_0$  = la población se está cruzando al azar, ó

$H_1$  = la población no se está cruzando al azar.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) es aceptada si el valor de  $P$  se encuentra entre 0,05 y 1, lo cual indica que no es estadísticamente significativo. Mientras que si el valor de  $P$  se encuentra entre  $0,05 < P < 0$  se concluye que el resultado es estadísticamente significativo, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se acepta la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) (Peakall y Smouse, 2006).

La prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) es utilizada para determinar si la diferencia entre genotipos observados y esperados ocurriría por azar (Peakall y Smouse, 2006). La fórmula utilizada es:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O-E)^2}{E}$$

$O$  = es el número de individuos observados del  $i$ -ésimo genotipo.

$E$  = el número de individuos esperados.

Los grados de libertad para la prueba de Chi-cuadrado son calculados como:

$$DF = \frac{[Na(Na-1)]}{2}$$

$Na$  = número de alelos por locus.

### 5.2.6.3. Heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigocidad esperada ( $H_e$ )

La heterocigocidad observada ( $H_o$ ) es aquella que se obtiene al momento de registrar los genotipos por cuenta directa en un experimento y es calculada por la siguiente fórmula (Peakall y Smouse, 2006):

$$H_o = \frac{\#heterozigotos}{\#muestras}$$

Mientras que la heterocigicidad esperada ( $H_e$ ) se puede obtener para:

- un locus con dos alelos y frecuencias de  $p$  y  $q$  es obtenida como

$$H_e = 2pq.$$

- O también si existen más de dos alelos por locus, la fórmula a utilizar es:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{\#dealelos} p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.

La heterocigicidad esperada es la más utilizada ya que es menos afectada por el muestreo de datos (Frankham et al., 2003).

#### 5.2.6.4. Estadístico $F_{st}$

Este índice permite determinar la diferencia genética existente entre poblaciones, es decir, la proporción del total de la diversidad genética o heterocigicidad que separa a las poblaciones. Wright (1951) define a  $F_{st}$  como un coeficiente de endogamia, es decir, la probabilidad de que los alelos sean idénticos por descendencia desde una población ancestral. El rango que maneja los  $F_{st}$  es de 0 a 1 (Peakall y Smouse, 2006). La fórmula que se aplica es:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H_e}}{H_T}$$

$H_T$  = total de heterocigicidad esperada

$H_e$  = heterocigicidad esperada

### 5.2.6.5. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Este análisis tiene como objetivo producir un gráfico de pocas dimensiones, que abarque la mayor cantidad posible de la variación total, en donde las distancias entre los puntos dentro del plot sean los más cercanos a la matriz original. La matriz utilizada para este análisis fue la distancia genética de Nei de 1987 (Peakall y Smouse, 2006).

### 5.2.6.6. Distancia genética de Nei (1987)

Este coeficiente de disimilaridad se basa principalmente en la mutación y la deriva génica. Con esta medida se estima el promedio de sustituciones de codones por locus. Este modelo se basa en el modelo de alelos infinitos donde se asume que de una población ancestral se originaron varias sub-poblaciones, que divergieron por deriva genética y mutación (Peakall y Smouse, 2006). La fórmula a través del cual se calcula la distancia genética es:

$$Nei\_D = -\ln(I)$$

Para el cálculo de la distancia genética de Nei es necesario conocer la identidad o similaridad genética de Nei ( $I$ ), la cual se obtiene a partir de (Peakall y Smouse, 2006):

$$Nei\_I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_x J_y)}}$$

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^k P_{ix} P_{iy}$$

Donde,  $P_{ix}$  y  $P_{iy}$  = son las frecuencias alélicas en las poblaciones  $x$  y  $y$ .

Cuando las frecuencias alélicas son similares en ambas poblaciones ( $P_{ix} = P_{iy}$ ) la similaridad genética se acerca a 1, mientras que la distancia genética se acerca a 0. Pero cuando ambas poblaciones no comparten alelos, la similaridad genética es 0 y la distancia genética es infinito (Frankham et al., 2003).

## **6. Resultados**

### **6.1. Muestras obtenidas**

Un total de 53 muestras fueron obtenidas para los cuatro grupos de leoncillos, de éstas las que se utilizaron fueron: 8 para el grupo P1, 13 para el grupo P2, 25 para el grupo P4 y 7 para el grupo P5.

El peso promedio de las muestras de heces para el grupo P1 fue de 0.073g, para el grupo P2 fue de 0.069g, para el grupo P4 fue de 0.088g y para el grupo P5 fue de 0.078g (Tabla 2).

### **6.2. Cuantificación de ADN**

Una cuantificación aproximada se realizó en geles de agarosa al 1% y se pudo determinar que para ciertas muestras se obtuvo una cantidad moderada de ADN, mientras que para otras hubo cantidades menores; esto se identificó mediante la intensidad de las bandas (Fig. 2).

La cuantificación espectrofotométrica de ADN se realizó utilizando el equipo NANODROP 1000; para las muestras del grupo P1 se obtuvo una concentración de ADN promedio de  $11.85^{ng}/_{uL}$ , para el grupo P2  $12.21^{ng}/_{uL}$ , para el grupo P4  $18.75^{ng}/_{uL}$  y para el grupo P5  $6.46^{ng}/_{uL}$  (Tabla 2). Las bajas concentraciones de ADN de este último grupo impidieron que fuera incluido en los análisis estadísticos.



### 6.3. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

Siete de los nueve primers establecidos por Nievergelt et al. (1998) para la especie *Callithrix jacchus* fueron transferidos a la especie *Callithrix pygmaea*. Los primers que amplificaron bandas del tamaño esperado fueron CJ-1, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-14 y CJ-15. Para cada primer, el rango de los pesos de bandas que se obtuvo se muestran en la Tabla 1 y las imágenes de los mismos se muestran en las Figuras 3, 4 y 5.

### 6.4. Estadísticos poblacionales

Para el análisis estadístico no se incluyeron las muestras para las que no se obtuvo amplificación. También se redujo el número de loci a ser analizados (Tabla 3), debido a que en los loci *CJ-10* y *CJ-14* se obtuvo un bajo número de muestras amplificadas por grupo. Además, se descartó el uso del grupo P5 ya que no se obtuvo ninguna amplificación de ningún primer.

Para los cinco loci analizados (*CJ-1*, *CJ-7*, *CJ-11*, *CJ-12* y *CJ-15*) se obtuvo un total de 26 alelos (Tabla 4). Con respecto a las frecuencias alélicas (dentro de los tres grupos) el locus *CJ-1* posee un rango de 0.056 a 1.00 (Fig. 6), el locus *CJ-7* de 0.25 a 0.5 (Fig. 7), el locus *CJ-11* de 0.056 a 0.667 (Fig. 8), el locus *CJ-12* de 0.167 a 0.5 (Fig. 9) y el locus *CJ-15* de 0.063 a 1.00 (Fig. 10).

Los resultados del test de equilibrio *Hardy-Weinberg* muestran que los grupos P1 y P2 se encuentran bajo condiciones de cruces al azar, ya que no se obtiene significación estadística ( $P=0.083-0.317$ ) para ningún locus. Mientras que en el grupo P4 se obtuvo tres  $P$  significativos para tres locus (*CJ-7*,  $P=0,046$ ; *CJ-12*,  $P=0,001$  y *CJ-15*,  $P=0,047$ ) lo cual indica que en este grupo no se están dando cruces al azar (Tabla 5).

En el grupo P1 la heterocigocidad esperada para el locus *CJ-7* fue de 0.5 igual que para el locus *CJ-12*. En el grupo P2 las heterocigocidades esperadas obtenidas fueron de 0.5 para el loci *CJ-7* y *CJ-15* y de 0.722 para el locus *CJ-12*. Las heterocigocidades esperadas en el grupo P4 fueron de 0.815, 0.625, 0.512, 0.836 y 0.5, para los locus *CJ-1*, *CJ-7*, *CJ-11*, *CJ-15* y *CJ-12*, respectivamente (Tabla 6).

La distancia genética obtenida a partir del índice  $F_{st}$  entre los grupos P1 y P2 es de 0.569; entre los grupos P1 y P4 es de 0.265, y entre los grupos P2 y P4 es de 0.306 (Tabla 7).

Estos resultados se corroboran con los cálculos de la distancia genética de Nei (1987) que muestran que existe una distancia genética de 1.211 entre el grupo P1 y P2, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1, respectivamente (Tabla 8). El PCoA calculado a partir de esta matriz indica que los grupos P1 y P4 difieren en un 93.02% del grupo P2 (considerando el Eje 1), mientras que los grupos P2 y P1 difieren en un 6.98% del grupo P4 (considerando el Eje 2) (Fig. 11).

## 7. Discusión

En este estudio se pudo apreciar que el ADN obtenido para los cuatro grupos fue escaso (Fig. 12). Esto se debe a que las cantidades de muestras fecales utilizadas (Tabla 2) fueron inferiores a las recomendadas por el QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) (entre 180mg y 220mg); el tamaño de las muestras se debe al pequeño tamaño de los animales de la especie en estudio (aprox. 12cm los individuos adultos). Además, mediante los geles de agarosa al 1% se pudo detectar una alta degradación de las muestras de ADN (Fig. 2). Estos resultados son confirmados por otros estudios en los cuales el ADN obtenido a partir de muestras no invasivas, por lo general heces fecales, posee baja calidad (ADN degradado, inhibidores para PCR y contaminación por otro

ADN) y cantidad (el ADN que se obtiene se encuentra en el rango de picogramos). Esto trae como consecuencia errores en otras técnicas posteriores como el PCR, ya que puede presentarse la pérdida de alelos o la presencia de alelos falsos y a su vez da como resultado una falsa genotipificación de la especie en estudio (Chu et al., 2006). Para evitar estos problemas algunos autores sugieren el uso de múltiples tubos en el PCR con el fin de mejorar la confiabilidad de la genotipificación cuando se utilizan microsatélites (SSR) y muestras de heces, pero esto trae consigo un aumento en el costo y el trabajo en laboratorio en comparación cuando se utilizan muestras de tejido y sangre. Es por eso que cuando se realizan pruebas piloto es importante considerar la toma de muestras (invasivas o no invasivas) y las técnicas a ser utilizadas en laboratorio (Chu et al., 2006).

Por otro lado, para obtener un alto éxito en la amplificación de ADN a partir de la técnica de PCR algunos autores recomiendan la conservación de las muestras de heces fecales en primera instancia en etanol y luego desecados en sílica. Además, se sugiere el uso de muestras frescas de heces fecales o conservadas durante cortos períodos de tiempo, esto incrementa el éxito de amplificación de un 51% a un 95%, lo cual a su vez reduce el número de muestras a ser utilizadas y los costos en laboratorio (Chu et al., 2006).

De los nueve pares de primers establecidos por Nievergelt et al. (1998), siete fueron transferidos a la especie en estudio (*Callithrix pygmaea*), equivalente al 78%. Esto corrobora lo reportado en otros estudios sobre la posibilidad de que los marcadores moleculares microsatélites (SSR) pueden ser utilizados entre especies del mismo género o hasta de la misma familia (Clisson et al., 2000; Muniz and Vigilant, 2008; Nievergelt et al., 1998).

En los análisis estadísticos se utilizó un menor número de muestras al recolectado (Tabla 3), debido a que no se obtenía presencia de bandas al momento de realizar la lectura de los geles de poliacrilamida. Esto pudo deberse a la escasa cantidad de ADN obtenido en cada muestra (Tabla 2), y a que éste en ocasiones pudo estar parcialmente degradado.

El número de alelos por locus varió entre 3 y 8, estos valores son similares a los obtenidos en la especie *Callithrix jacchus* (2-6alelos/locus) (Nievergelt et al., 2000). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en el presente estudio solo se muestrearon 5 loci mientras que en *Callithrix jacchus* fueron 11 loci los analizados (Nievergelt et al., 2000), lo cual según Nievergelt et al. (2000) los resultados obtenidos en *Callithrix jacchus* sugieren una reducida variabilidad genética.

Los resultados del test de equilibrio *Hardy-Weinberg* sugieren que los grupos P1 y P2 se encuentran bajo condiciones de cruce al azar, mientras que en el grupo P4 se puede estar produciendo endogamia, la cual sucede cuando individuos emparentados se aparean en una proporción mayor que los apareamientos al azar, reduciendo de cierta manera la heterocigocidad y aumentando la homocigocidad. Esto produce, a su vez, una reducción en la diversidad genética por depresión endogámica, si los alelos recesivos deletéreos o letales se representan en estado homocigoto (Frankham, 2003). Además, hay que considerar que la cantidad de muestras por cada grupo puede estar influyendo los resultados de este análisis (P1, n = 3; P2, n = 3 y P4, n = 12).

Al analizar la heterocigocidad esperada, para los grupos P1 y P2 se obtienen valores de  $H_E = 0.5$  mientras que los valores de heterocigocidad observada son de 1.00 ( $H_O = 1.00$ ), esto sugiere que se está dando una fijación de alelos en ambos grupos, pero hay que tomar en cuenta el número de muestras por grupo (P1, n = 3 y P2, n = 3) ya que pueden estar influyendo en este análisis. Con respecto al grupo P4 los valores

obtenidos de heterocigocidad esperada son de 0.5 a 0.836, los cuales son cercanos a los de heterocigocidad observada. En este caso se podría decir que no se está dando una fijación de alelos, pero hay que considerar el número de muestra para este grupo (P4, n = 12).

Estos niveles de heterocigocidad son altos en comparación con la heterocigocidad de 0.35 obtenida en *Callithrix jacchus*, la cual según Nievergelt et al., (2000) indica un bajo nivel de variabilidad genética. Pero de igual forma hay que considerar que en este estudio se utilizó un total de 5 primers para los estadísticos poblacionales, además del número de muestra para cada uno de los grupos (P1, n = 3; P2, n = 3 y P4, n = 12) lo cual puede estar influyendo la realización de este análisis.

Al analizar el índice  $F_{st}$  se ve que existe una diferencia genética moderada entre los grupos P1 y P2, mientras que el grupo P4 no se diferencia mayormente de los grupos P1 y P2 (Tabla 8). Por otro lado, el PCoA (a partir de Nei 1987) (Fig. 11) realizado sugiere que existe una mayor relación entre el grupo P1 y P4. Estos patrones parecen estar relacionados con barreras físicas para la dispersión entre los grupos: los grupos P1 y P2, que son los más distantes genéticamente, tienen áreas abiertas, casas y cultivos como barreras entre sus áreas de vida. Los grupos P1 y P4 (que tienen las menores distancias genéticas) hasta hace aproximadamente 2 años tenían un bosque que conectaba las áreas de vida de ambos grupos. Entre las áreas de vida de los grupos P2 y P4 (distancia genética intermedia) existen áreas abiertas con algunos árboles pero no existen viviendas.

Los bajos niveles de variabilidad genética en grupos de *Callithrix* son consistentes con la composición de los grupos y los patrones de reproducción encontrados en otros estudios (Digby y Barreto, 1993; Ferrari y Digbi, 1996; Rylands, 1982). Los bajos niveles de inmigración, altos niveles de reclutamiento después de los nacimientos y una

posible sucesión de estatus reproductivos entre hembras relacionadas (madre-hija o madre-hermana) traen consigo un alto grado de relación entre los integrantes de los grupos y a su vez una baja variabilidad genética (por endogamia) (Nievergelt et al., 2000). También la pérdida de variabilidad genética en estos grupos analizados pueden deberse a la destrucción de los hábitats de esta especie (de la Torre et al., 2009), lo cual ha producido que sus grupos sean desplazados hacia otros lugares y por ende se aíslen de otros grupos o poblaciones afectando al flujo génico.

En estos años la conservación de la biodiversidad ha entrado en un período crítico, especialmente en las áreas tropicales (Región Amazónica). Nuevas especies y subespecies de plantas y animales son descritas mientras otras no llegan a serlo, ya que se extinguen debido a acciones directas o indirectas del hombre. Es por eso que la genética molecular es una herramienta esencial para evaluar la biodiversidad y para tomar decisiones con respecto a la conservación de especies que se encuentran en riesgo de extinción (Tagliaro, 2000).

La conservación de las especies requiere una intervención activa. Esto puede realizarse a través del monitoreo de la variabilidad genética con el fin de mantener la capacidad de las especies de evolucionar ante los cambios ambientales. El monitoreo de la variabilidad genética permite dar a conocer si las especies se encuentran bajo procesos de endogamia, lo cual trae consigo un incremento en la homocigocidad de alelos. Además, permite determinar el nivel de heterocigocidad como un indicativo del nivel de diversidad genética de las poblaciones. También ayuda a conocer la existencia de flujo génico entre grupos o poblaciones (Woodruff, 1990).

## **8. Conclusiones**

- Se obtuvo ADN a partir de muestras de heces fecales de *Callithrix pygmaea*, pero en pocas cantidades.

- Se estandarizó y estableció un protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) para siete pares de primers SSR en la especie *Callithrix pygmaea*.
- Siete de nueve pares de primers usados para *C. jacchus* fueron transferidos hacia *C. pygmaea*, lo cual muestra que los marcadores moleculares microsatélites (SSR) pueden ser utilizados entre miembros del mismo género.
- Los marcadores moleculares microsatélites (SSR) prueban ser de gran ayuda para evaluar el nivel de variabilidad genética existente en animales silvestres; en este caso para la especie *Callithrix pygmaea*.
- El bajo nivel de variabilidad genética encontrado en la especie *Callithrix pygmaea*, puede deberse a la estructura de su grupo, a sus patrones de reproducción y a la incursión humana dentro de sus hábitats.
- La genética molecular es una herramienta fundamental para determinar la taxonomía de especies, para evaluar la biodiversidad y para tomar decisiones con respecto a especies en peligro de extinción.

## **9. Recomendaciones**

- Para futuros estudios se recomienda la utilización de muestras de pelo para la obtención de ADN, ya que así se asegura un ADN mejor conservado y exclusivo de la especie. Si se continúa utilizando muestras de heces fecales, se recomienda primero guardarlas en etanol para luego ponerlas en el desecante y llevarlas lo más pronto posible al laboratorio para evitar su degradación y contaminación.
- Se sugiere la utilización de un número mayor de primers con el fin de abarcar en mayor proporción el genoma de esta especie. En otros estudios se han logrado transferir primers (D5S111, D5S117, D8S165, D14S51, MOG-C, MOG-E y D1S207) establecidos para humanos hacia *C. jacchus* los cuales podrían ser

utilizados de igual manera para futuros estudios en *C. pygmaea* (Clisson et al., 2000 y Nievergelt et al., 1998).



## 10. Bibliografía

- Avise, J. Molecular markers, natural history and evolution. Charpan & Hall. New York: 1994.
- Barroso, C. et al. 1997. Update on the Phylogenetic Systematics of New World Monkeys: Further ADN Evidence for Placing the Pygmy Marmoset (*Cebuella*) within the Genus *Callithrix*. International Journal of Primatology. Vol. 18, No. 4.
- Benbouza, H., Jacquemin, J. and Baudoin, J. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Vol. 10, No. 2.
- Chu, J., Lin, Y., and Wu, H. 2006. Applicability of Non-invasive sampling in population genetic Study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*). Taiwania, 51(4): 258-265.
- Clisson, M., Lathuilliere, M. and Crouau-Roy, B. idem. 2000. Conservation and Evolution of Microsatellite Loci in Primate Taxa. American Journal of Primatology. 50:205 – 214.
- Dumas, F. et al idem. 2007. Phylogenomics of species from four genera of New World monkeys by flow sorting and reciprocal chromosome painting. BMC Evolutionary Biology.
- de la Torre, S. Yépez, P., and Snowdon, C. 2009. Conservation Status of Pygmy Marmosets *Callithrix (Cebuella) pygmaea* in Ecuador. The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico Radiation.
- de la Torre, S. and Snowdon, C. 2009. Dialects in Pygmy Marmosets? Population Variation in Call Structure. American Journal of Primatology. Pp. 333-342.

- de la Torre, S., Snowdon, C. y Bejarano, M. 2000. Effects of human activities on wild pygmy marmoset in Ecuadorian Amazonia. Biological Conservation. Pp. 153-163.
- de la Torre, S., Yépez, P., Snowdon, C., and Payaguaje, A. 2005. Ecología, Comportamiento y Conservación del Leoncillo *Callithrix (Cebuella) pygmaea* en Tierras Secoya.
- Frankham, R., Ballou, J., and Briscoe, D. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. United Kingdom: 2003.
- Griffiths, A. et al. 2000. Genética Moderna. McGraw-HILL – INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U. España.
- Hershkovitz, P. 1977. Living New World Monkeys (Platyrrhini) with an Introduction to Primates. Volume 1. The University of Chicago Press. Chicago.
- Muniz, L. and Vigilant, L. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (*Cebus capucinus*) and cross-species amplification in other New World monkeys. Molecular Ecology Resources. 402 – 405.
- Nievergelt, C., Mundy, N. and Woodruff, D. 1998. Microsatellite primers for genotyping common marmoset (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids. Molecular Ecology.
- Nievergelt, C., Digby, L., Ramakrishnan, U., and Woodruff, D. 2000. Genetic Analysis of Group Composition and Breeding System in a Wild Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Population. International Journal of Primatology. Vol. 21, No. 1.

- Peakall, R. and Smouse P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6, 288 – 295.
- Perera, J. et al. Ingeniería Genética. Volumen 1. EDITORIAL SÍNTESIS, S. A. España: 2000.
- Tagliaro, C., Cruz, M., Schneider, H., Sampaio, I, and Stanhope, M. 2000. Molecular studies of *Callithrix pygmaea* (Primates, Platyrrhini) base on transferrin intronic and ND1 regions: implications for taxonomy and conservation. Genetics and Molecular Biology. 23, 4, 729-737.
- Tirira, Diego. 2006. Mamíferos del Ecuador, Diversidad: *Callithrix pygmaea* (Spix, 1823). Página en internet (Enero 2006). Versión 1.1. Ediciones Murciélagos Blanco. Quito.  

<http://www.terraecuador.net/mamiferosdelecuador/diversidad.htm> [Consulta: fecha de visita (2009-04-07)]
- Townsed, W. 2001. *Callithrix pygmaea*. Mammalian Species. No. 665, pp. 1-6.
- Woodruff, D. 1990. Genetics and demography in the conservation of biodiversity. J. Scl. Soc. Thailand, 16. 117-132.
- Yépez, P., de la Torre, S., and Snowdon, C. 2005. Interpopulation Differences in Exudate Feeding of Pygmy Marmosets in Ecuadorian Amazonia. American Journal of Primatology. Pp. 145-158.

## 12. Tablas

**Tabla 1.** Temperaturas de annealing, número de muestras amplificadas y pesos de bandas (pb) para los primers transferidos a la especie *C. pygmaea*. Se observa que siete primers fueron transferidos y que sus temperaturas de annealing son de 50° y 58° C.

<b>Primer</b>	<b>Temperatura óptima de annealing (°C)</b>	<b>Total de muestras amplificadas</b>	<b>Rango de peso de bandas obtenidas (pb)</b>
<b>CJ-1</b>	58	11	128 - 176
<b>CJ-6</b>	58	0	-
<b>CJ-7</b>	50	13	119 - 127
<b>CJ-10</b>	50	4	217 - 243
<b>CJ-11</b>	50	14	106 - 142
<b>CJ-12</b>	58.4	27	132 - 168
<b>CJ-13</b>	50	0	-
<b>CJ-14</b>	56.2	9	156 - 184
<b>CJ-15</b>	50	15	124 - 138

**Tabla 2.** Peso en gramos (g) y concentración de ADN de muestras de heces fecales de los grupos de leoncillos P1, P2, P4 y P5

<i>Muestra</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>[ ] ng/uL</i>
P1-B	0,0149	14,33
P1-C	0,0406	17,02
P1-D	0,076	20,82
P1-E	0,1395	12,22
P1-F	0,1045	10,64
P1-G	0,0634	2,68
P1-H	0,124	5,27
<b>Promedio</b>	0,08	11,85
P2-A	0,0538	13,31
P2-B	0,0409	11,47
P2-C	0,0716	26,07
P2-D	0,0732	15,51
P2-E	0,0367	28,06
P2-F	0,0464	4,55
P2-G	0,0894	1,8
P2-I	0,0489	1,78
P2-J	0,0709	9,14
P2-K	0,0774	3,69
P2-L	0,1105	24,65
P2-M	0,0806	6,46
<b>Promedio</b>	0,07	12,21
P5-A	0,1142	13,75
P5-B	0,1008	3,88
P5-C	0,0518	4,96
P5-D	0,0407	6,04
P5-E	0,0862	3,41
P5-F	0,0661	2,81
P5-G	0,0982	10,34
<b>Promedio</b>	0,08	6,46

<i>Muestra</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>[ ] ng/uL</i>
P41-A	0,0744	28,8
P41-B	0,0745	15,95
P41-C	0,0417	16,55
P42-A	0,113	86,4
P42-B	0,1076	9,45
P42-C	0,1061	20,97
P42-D	0,1508	9,14
P42-E	0,1217	17,31
P42-F	0,1294	37,33
P42-G	0,0806	23,11
P42-H	0,137	12,13
P43-A	0,0581	9,03
P43-B	0,0884	9,14
P43-C	0,075	4,79
P43-D	0,0435	7,08
P43-E	0,0592	19,2
P43-F	0,0758	13,97
P43-G	0,1115	14,81
P43-H	0,057	9,55
P43-I	0,1215	19,03
P43-J	0,0494	12,17
P43-K	0,1059	27,79
P43-L	0,1204	7,48
<b>Promedio</b>	0,09	18,75

**Tabla 3.** Matriz utilizada para los distintos análisis poblacionales realizados en los grupos de leoncillos P1, P2 y P4 con los cinco primers que presentaron mayor número de muestras amplificadas. Se muestra el peso de los alelos (pb) por locus para cada muestra.

		CJ-1		CJ-7		CJ-11		CJ-15		CJ-12	
P1-B	pop1	154	154	0	0	0	0	0	0	168	166
P1-G	pop1	0	0	123	110	0	0	0	0	168	166
P1-H	pop1	0	0	0	0	0	0	126	126	168	166
P2-A	pop2	0	0	127	123	0	0	132	130	168	166
P2-F	pop2	0	0	0	0	0	0	132	130	168	166
P2-J	pop2	0	0	0	0	0	0	132	130	134	132
P42-B	pop3	154	154	123	110	126	122	126	124	168	166
P42-C	pop3	0	0	123	110	142	126	126	126	168	166
P42-E	pop3	0	0	127	123	142	126	0	0	168	166
P42-G	pop3	142	142	127	123	126	122	130	128	168	166
P42-H	pop3	144	142	0	0	0	0	0	0	168	166
P43-B	pop3	158	154	123	110	126	126	132	130	168	166
P43-C	pop3	150	146	0	0	0	0	0	0	168	166
P43-D	pop3	156	154	0	0	126	126	124	124	168	166
P43-E	pop3	158	156	0	0	134	126	138	136	168	166
P43-G	pop3	0	0	123	110	126	126	138	136	168	166
P43-H	pop3	154	154	127	123	126	122	138	136	168	166
P43-J	pop3	176	176	127	123	0	0	0	0	168	166

*\*Nota:* Primera fila: locus analizados. Cada locus posee el tamaño en pares de bases de los alelos (0 = no amplificación). Primera columna: muestras analizadas de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4.

**Tabla 4.** Peso en pares de bases (pb) de alelos y número total de alelos por locus para los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se destaca que el número de alelos/locus varía de 3 a 8.

<b>Alelos (pb)</b>	<b>CJ-1</b>	<b>CJ-7</b>	<b>CJ-11</b>	<b>CJ-12</b>	<b>CJ-15</b>
<b>110</b>	0	1	0	0	0
<b>122</b>	0	0	1	0	0
<b>123</b>	0	1	0	0	0
<b>124</b>	0	0	0	0	1
<b>126</b>	0	0	1	0	1
<b>127</b>	0	1	0	0	0
<b>128</b>	0	0	0	0	1
<b>130</b>	0	0	0	0	1
<b>132</b>	0	0	0	1	1
<b>134</b>	0	0	1	1	0
<b>136</b>	0	0	0	0	1
<b>138</b>	0	0	0	0	1
<b>142</b>	1	0	1	0	0
<b>144</b>	1	0	0	0	0
<b>146</b>	1	0	0	0	0
<b>150</b>	1	0	0	0	0
<b>154</b>	1	0	0	0	0
<b>156</b>	1	0	0	0	0
<b>158</b>	1	0	0	0	0
<b>166</b>	0	0	0	1	0
<b>168</b>	0	0	0	1	0
<b>176</b>	1	0	0	0	0
<b>Total de Alelos</b>	8	3	4	4	7

**Tabla 5.** Análisis *Hardy-Weinberg* para cada locus en los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. En esta se observa que los grupos P1 y P2 no presentan valores significativos, mientras que en el grupo P4 se observan tres valores significativos.

Grupo	Locus	Grados de Libertad	Chi-cuadrado	Probabilidad (P)	Significancia
P1	CJ-1	Monomorphic			
P1	CJ-7	1	1,000	0,317	ns
P1	CJ-11	Monomorphic			
P1	CJ-15	Monomorphic			
P1	CJ-12	1	3,000	0,083	ns
P2	CJ-1	Monomorphic			
P2	CJ-7	1	1,000	0,317	ns
P2	CJ-11	Monomorphic			
P2	CJ-15	1	3,000	0,083	ns
P2	CJ-12	6	9,000	0,174	ns
P4	CJ-1	28	39,500	0,073	ns
P4	CJ-7	3	8,000	0,046	*
P4	CJ-11	6	2,250	0,895	ns
P4	CJ-15	21	32,889	0,047	*
P4	CJ-12	1	12,000	0,001	***

\*ns = no significativo; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .



**Tabla 6.** Heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), número de muestras amplificadas y número de alelos por locus para los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se observa que los grupos P1 y P2 poseen valores de  $H_e$  de 0,5 y 0,72, mientras que el grupo P4 presenta valores de 0,5 a 0,83.

Grupo	Locus	# de Muestras	# de alelos (Na)	$H_o$	$H_e$
P1	CJ-1	1	1	0,000	0,000
	CJ-7	1	2	1,000	0,500
	CJ-11	0	0	0,000	0,000
	CJ-15	1	1	0,000	0,000
	CJ-12	3	2	1,000	0,500
P2	CJ-1	0	0	0,000	0,000
	CJ-7	1	2	1,000	0,500
	CJ-11	0	0	0,000	0,000
	CJ-15	3	2	1,000	0,500
	CJ-12	3	4	1,000	0,722
P4	CJ-1	9	8	0,556	0,815
	CJ-7	8	3	1,000	0,625
	CJ-11	9	4	0,667	0,512
	CJ-15	8	7	0,750	0,836
	CJ-12	12	2	1,000	0,500

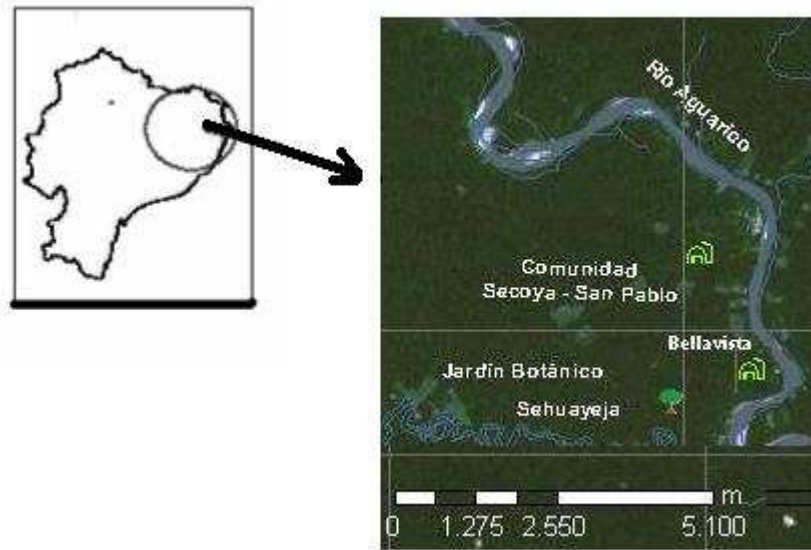
**Tabla 7.** Diferencia genética mediante  $F_{st}$  entre los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se distingue una mayor diferencia genética entre los grupos P1 y P2.

P1	P2	P4	Grupo
0,000			P1
0,569	0,000		P2
0,265	0,306	0,000	P4

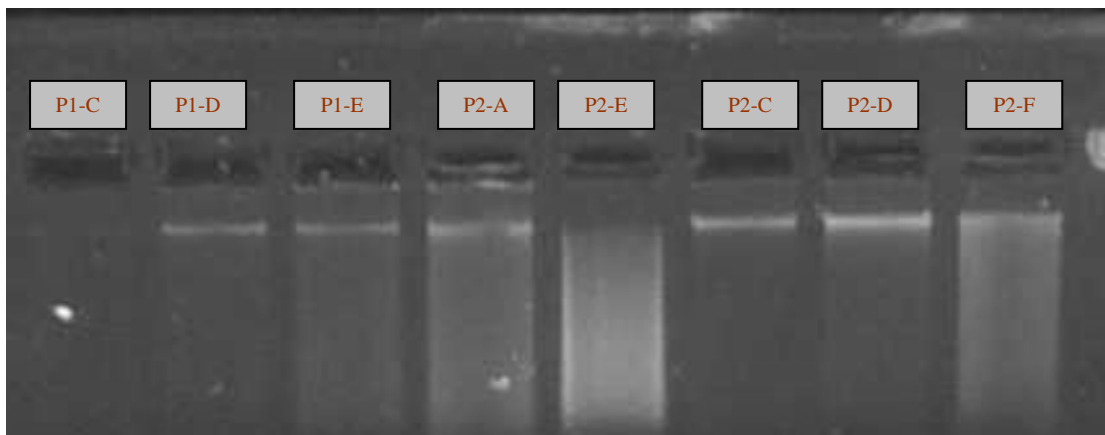
**Tabla 8.** Distancia genética de Nei entre los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se destaca una mayor distancia genética entre los grupos P1 y P2.

P1	P2	P4	Grupo
0,000			P1
1,211	0,000		P2
0,485	0,612	0,000	P4

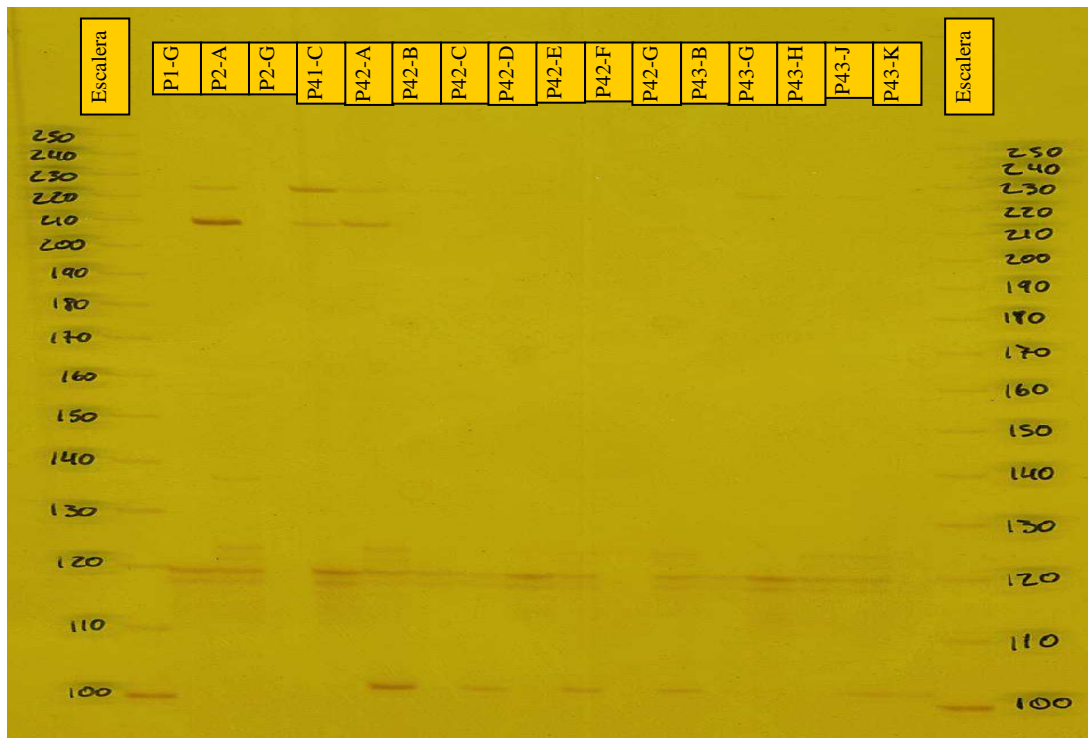
## 13.Figuras



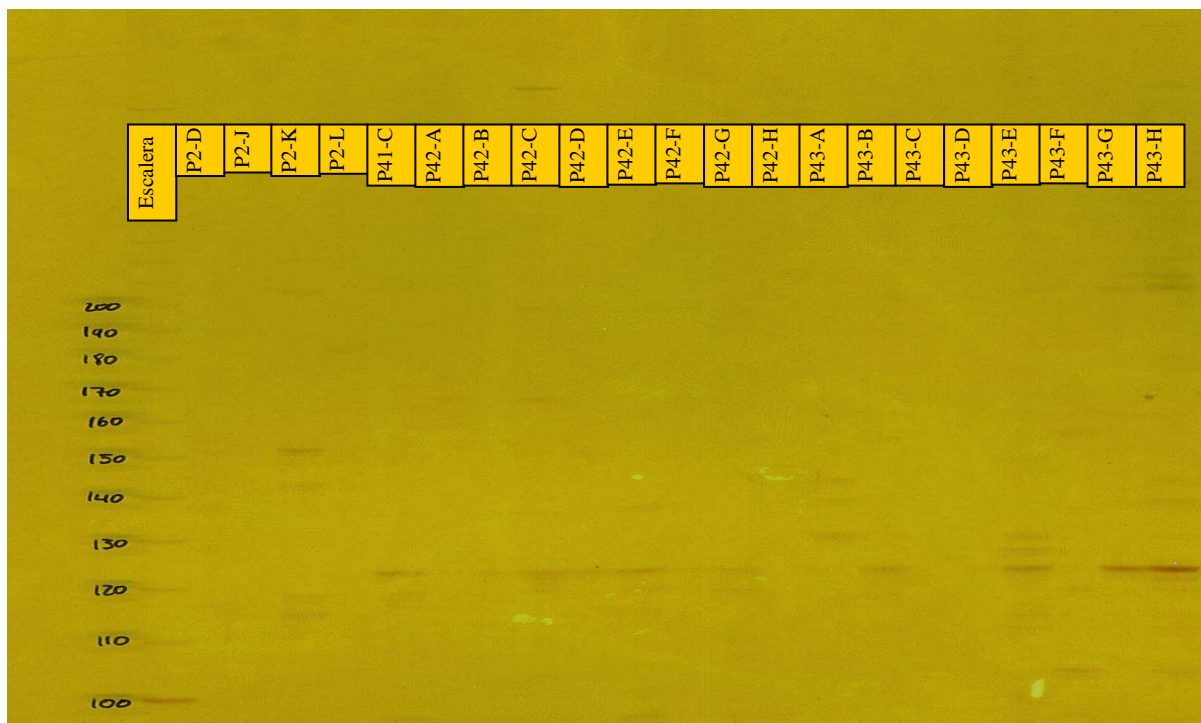
**Figura 1.** Localización de los grupos de leoncillos P1, P2, P4 y P5 (población San Pablo). Ubicados en el sector de Bellavista a orillas del río Aguarico y cuyas coordenadas son UTM, Zona 18, Datum PSAD 56 341767 E, 9969737 N



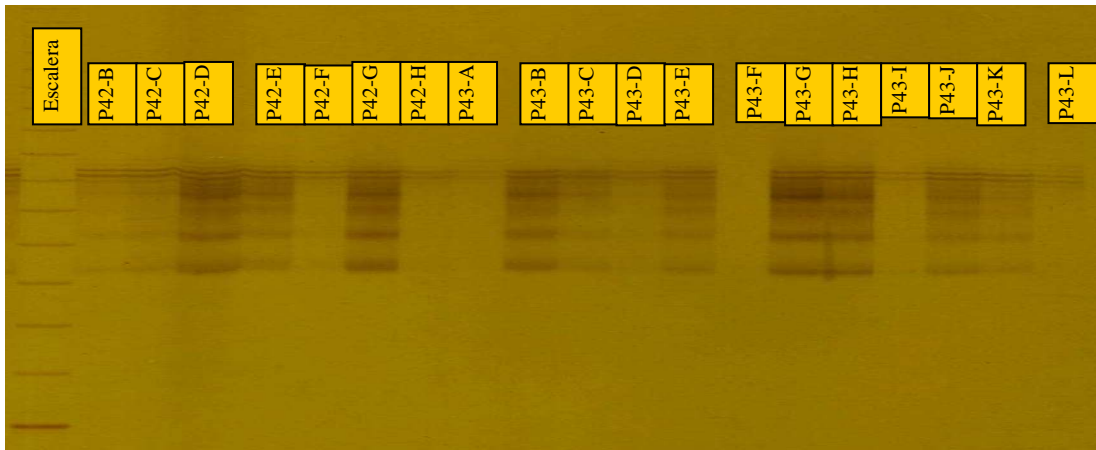
**Figura 2.** Electroforesis de ADN extraído a partir de heces de *C. pygmaea* de los grupos P1 y P2 en geles de agarosa al 1%, para evaluar la concentración y calidad de ADN



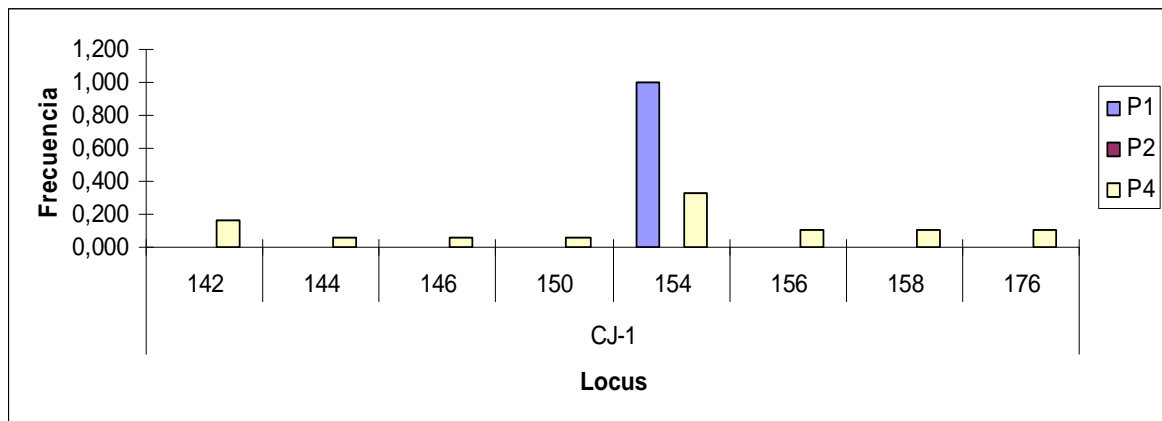
**Figura 3.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de ADN microsatélite (bandas) amplificado mediante PCR con el primer *CJ-7* para muestras de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se observa la presencia de bandas de un peso aproximado de 120 pb.



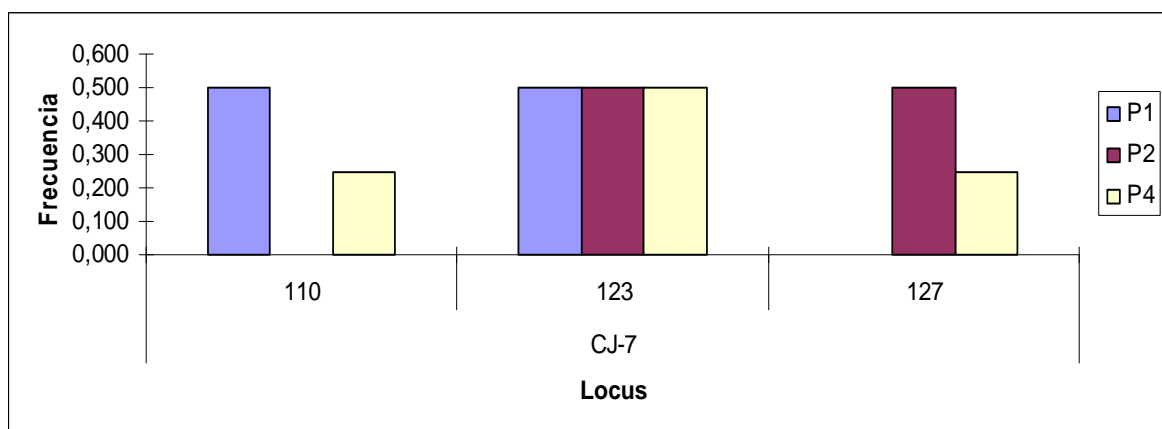
**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de ADN microsatélite (bandas) amplificado mediante PCR con el primer *CJ-11* para muestras de los grupos de leoncillos P2 y P4. Se visualiza la presencia de bandas de un peso aproximado de 140 pb.



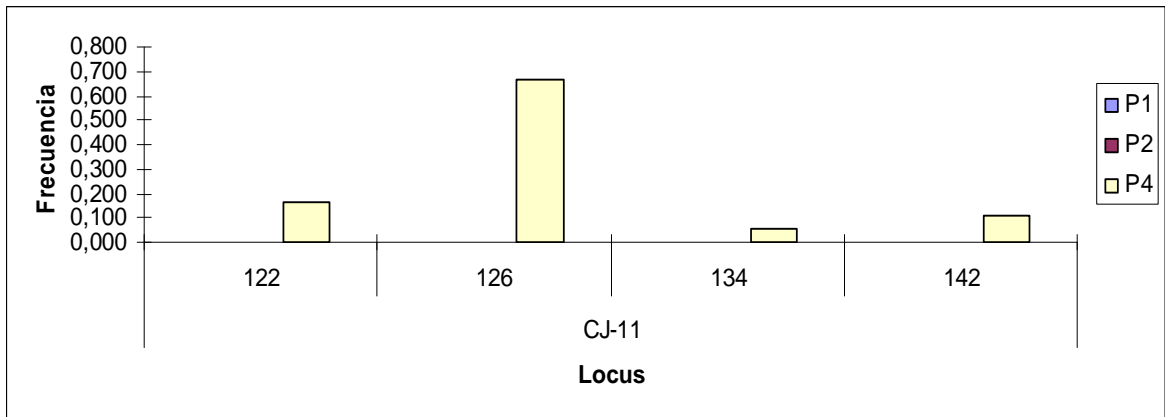
**Figura 5.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de ADN microsatélite (bandas) amplificado mediante PCR con el primer *CJ-12* para muestras del grupo de leoncillos P4. Se observa la presencia de bandas de un peso aproximado de 160 pb.



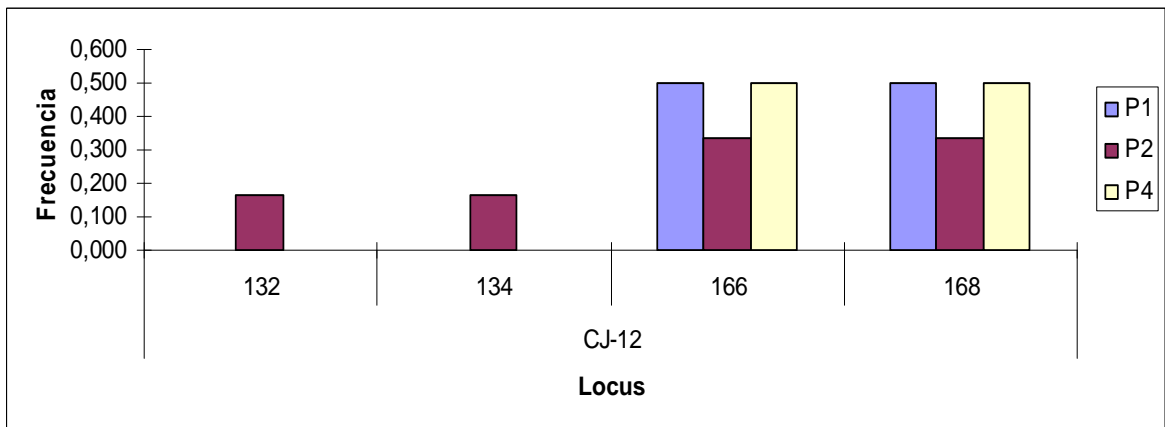
**Figura 6.** Frecuencias alélicas para el locus *CJ-1* de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se destaca la presencia de varios alelos para el grupo P4, un único alelo para el grupo P1 y ningún alelo para el grupo P2.



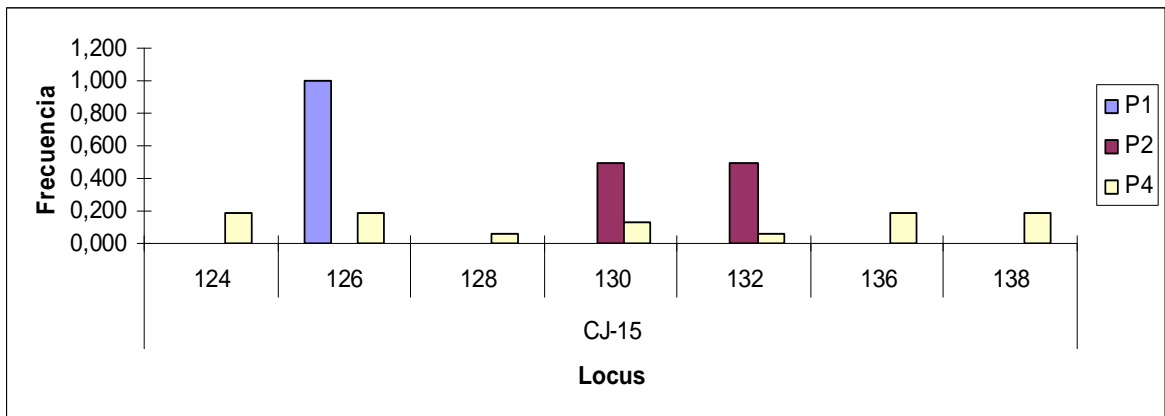
**Figura 7.** Frecuencias alélicas para el locus *CJ-7* de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se visualiza la presencia de un alelo en común para los grupos P1, P2 y P4.



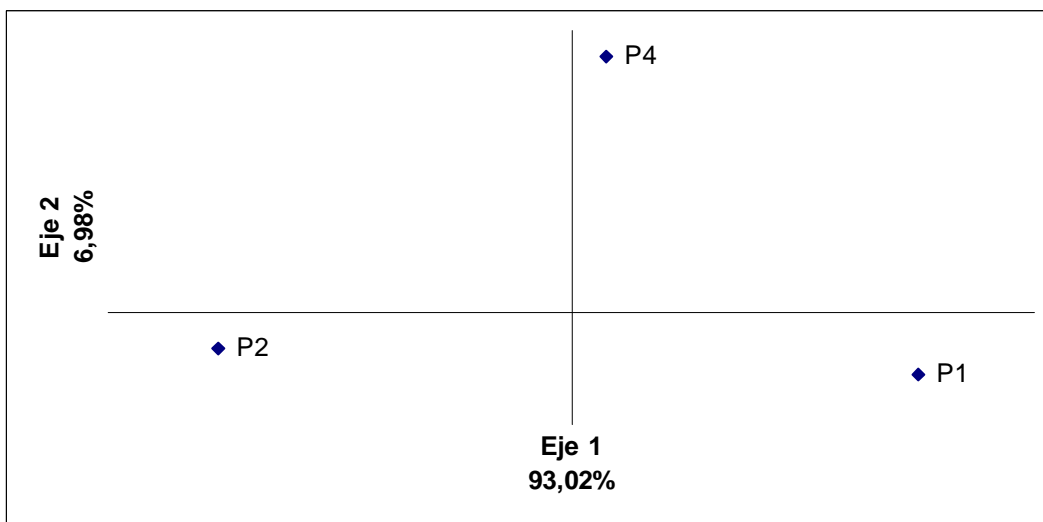
**Figura 8.** Frecuencias alélicas para el locus *CJ-11* de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se visualiza la presencia de varios alelos para el grupo P4 y ninguna para los grupos P1 y P2.



**Figura 9.** Frecuencias alélicas para el locus *CJ-12* de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se observa la presencia de dos alelos en común para los grupos P1, P2 y P4.

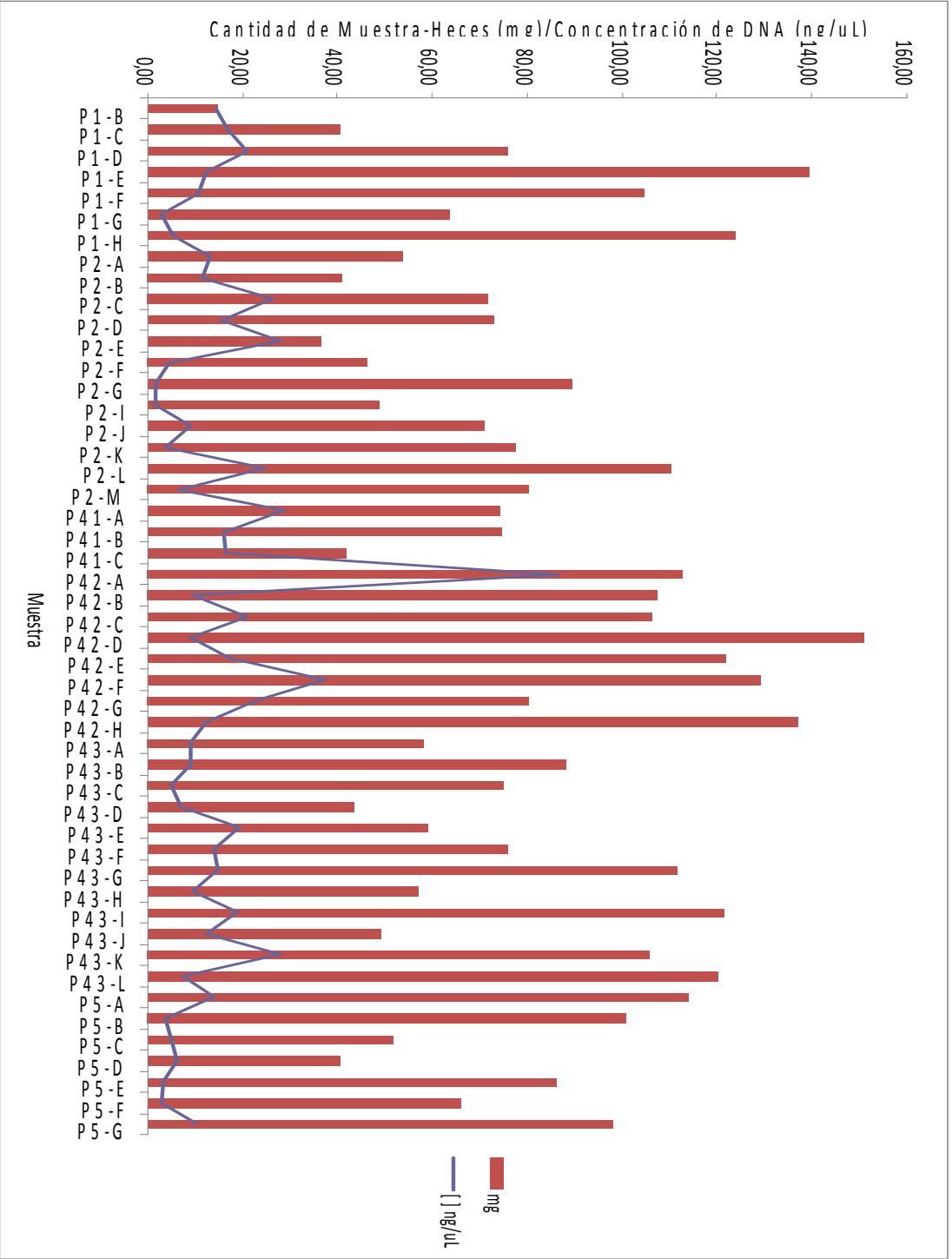


**Figura 10.** Frecuencias alélicas para el locus *CJ-15* de los grupos de leoncillos P1, P2 y P4. Se observa la presencia de varios alelos para el grupo P4, dos alelos para el grupo P2 y un único alelo para el grupo P1.



**Figura 11.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) entre los grupos de leoncillos P1, P2 y P4 a partir de la distancia genética de Nei (1987). Se observa una diferencia de 93,02% de los grupos P1 y P4 con el grupo P2, tomando en cuenta el Eje 1.

**Figura 12.** Concentración de ADN (ng/μL) obtenido por peso (mg) de muestra de heces para los grupos de leoncillos P1, P2, P4 y P5. Se destaca que no existe una relación directa entre el peso de muestra y la cantidad de ADN que se obtiene.



## 14. Anexos

### Anexo 1

Secuencias y motivos de repetición de los primers establecidos por Nievergelt et al. (1998) para la especie *Callithrix jacchus*

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')
CJ1	(CA) <sub>21</sub>	AGCATGGCACTTTCGTTTCT GCAACAGAGCAACTGCAT
CJ6	(CA) <sub>17</sub>	ATCATTGTGCACTCTATGCATGT AGAATGAAAAACATGGAAAGGC
CJ7	(CA) <sub>13</sub>	TCTCTTCCATGAAGCCTTCAA GGTTGCTATTTGCCAAGCAT
CJ10	(CA) <sub>19</sub>	GAGCCAAGATTATGCCGTT TGTGTAAGGAGGATTTGTGTTG
CJ11	(CA) <sub>11</sub>	GATCCTGGGATGCACGTG GAATGCTGCATTGATTTAGGGA
CJ12	(CA) <sub>9</sub>	GCTCCAAGGAACTGTTAGAACC TGATGGTGCATTCTTAGAGGG
CJ13	(CA) <sub>13</sub> (TC) <sub>14</sub>	CAAGGAAACATAAGTGTGGCTC CAGACATTTTAGCCCCTTCC
CJ14	(TC) <sub>21</sub> (CA) <sub>5</sub>	CTTGTGACAGTGGGGGAGTT CAAGTGTGAACATCCATGCC
CJ15	(CA) <sub>13</sub>	CCATCCTGAGCAACAGGG GAGTGAGCTTGAATTTCAACCC



## **Anexo 2**

Cantidades para la elaboración de un gel de 100mL de poliacrilamida al 6% y 5M

Agua Deionizada	30mL
Acilamida	5.7g
Bisacrilamida	0.3g
TBE 10X	10mL
Urea 5M	30.03g

*\*Completar hasta un volumen de 100mL*