

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Determinación de la diversidad genética de la población de
tortugas *Podocnemis unifilis* en la zona de la Estación de
Biodiversidad Tiputini (EBT)**

ANA SOFIA CARRANCO

Venancio Arahana, PhD, Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciada
en Biotecnología

Quito, mayo de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Determinación de la Diversidad genética de la población de tortugas *Podocnemis unifilis* en la zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini.

Ana Sofía Carranco Narváez

Venancio Arahana, Ph.D.,

Director de la tesis y Miembro de Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.,

Miembro del Comité de Tesis

David Romo, Ph.D.,

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.,

Decano del Colegio de Ciencias Biológicas
y Ambientales

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: Ana Sofía Carranco Narváez

C. I.: 0401304365

Fecha: Quito, mayo 2015

Al esfuerzo y a la perseverancia, mía y de mis padres.

A mis hermanas por sus estímulos.

A la vida.

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a mi madre, por la vida que me dio, por su amor y sus cálidos brazos. A mi padre, por su apoyo incondicional, por la confianza y por creer en mí. A Domenica, por sus abrazos, su calor y su dulzura. A Sarita, por sus consejos, por su sabiduría, por su alegría y por su fortaleza. A Ma. Belén, por tomarme de la mano cuando era pequeña y enseñarme a volar, por mi sobrina Amelia. Y en general les agradezco a las 3 por los juegos, los enojos, las paces y la confianza. A mi Amelia, por su sonrisa y por su vida. A Mamarina, por su dulce regazo. A mi abuelito Gonzalo, por la sonrisa más hermosa y sincera. A toda mi familia, por los buenos y malos momentos vividos. A mi tío Nelson y a mi tío Chicho, por su alma libre. A mi tío Hugo y a mi tía Sandra, por el apoyo incondicional, por los abrazos, por los consejos y por la alegría. A mi negra, por la compañía. A Pamela, por compartirme un momento de su vida. A Flavio, por su amistad, por su amor, por su apoyo, por su guía, por su ayuda, por sus consejos, por su sabiduría y por su primer beso en la Isla del Sol. A Anita, por ser mi polo opuesto, por su apoyo incondicional en la U y en la vida. A mis amigos, por las cervezas y las conversas. A mis canes Gorda y Marley, por mover la colita y por estar siempre presentes. A todas las personas que se han cruzado en mi vida, que algún aprendizaje me han dejado. Quiero agradecer a David Romo por confiarme este proyecto. A Ma. de Lourdes Torres por permitirme realizar el estudio

genético en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. A Venancio Arahana, por la guía y las conversaciones. Al Rodri, al Andrés, a la Vivi, a la Estefy, a la Meche y al Berni por todo la ayuda práctica y técnica que me brindaron durante todo el proyecto, sin ellos no sería lo mismo. A todo el grupo del lab de Biotec Vegetal! Finalmente quiero agradecer a todos mis profesores, que paso a paso, con su enseñanza y sabiduría me han llevado a la meta final. Millón gracias!

Resumen

Podocnemis unifilis (Testudines) es una de las tortugas de agua dulce ampliamente distribuida en los ríos del Orinoco, Amazonas y la parte oriental de las Guayanas. Esta tortuga y sus huevos son parte principal de la dieta alimenticia de las comunidades indígenas. Actualmente esta tortuga representa un recurso económico para los nativos y colonos de las regiones amazónicas. Desafortunadamente la sobreexplotación y la destrucción del hábitat han causado una disminución drástica de las poblaciones a lo largo de la Amazonía. *P. unifilis* está clasificada como Vulnerable (VU) en el libro rojo de la IUCN y se encuentra en el Apéndice II del CITES. Se han realizado varios estudios sobre diversidad genética y estructura poblacional en algunas poblaciones de esta especie a lo largo de la Amazonía de Venezuela, Colombia, Perú y Brasil. En Ecuador se han realizado proyectos de anidación en cautiverio debido a la disminución de poblaciones de la especie. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la diversidad genética de 10 grupos de la población de *P. unifilis* que se encuentran en la zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini, mediante el uso de marcadores microsatélites. Se analizó un total de 73 muestras con 9 pares de primers específicos para la especie. Se identificaron 52 alelos en los 9 loci, un promedio de 3.378 alelos para cada uno. Los indicadores de diversidad genética (heterocigocidad esperada, índice de Shannon, índice de fijación) muestran una tendencia hacia la heterocigocidad y una diversidad genética alta. Se calculó el número de migrantes efectivos (N_m) a partir del valor de F_{ST} , el resultado sugiere que existe un migrante por generación de cada grupo. Las distancias genéticas de Wright y Nei muestran una distancia genética baja entre la mayoría de los grupos. El análisis de AMOVA muestra que el 88% de diversidad genética corresponde a la variabilidad intragrupal y 12% a la variabilidad intergrupala. Los resultados de estructura poblacional de *P. unifilis* indican la presencia de 2 líneas ancestrales distintas en la población. Es importante ampliar esta investigación para poder conocer mejor la estructura genética de *P. unifilis* en la región del Tiputini. El presente estudio es el primer estudio sobre diversidad genética y estructura poblacional que se ha llevado a cabo en el país en esta especie. Por lo tanto representa una fuente de información para futuros estudios y para la conservación y buen manejo de esta especie.

Abstract

Podocnemis unifilis (Testudines) is a freshwater turtle widely distributed in the Orinoco, Amazon and Eastern Guianas. This turtle and its eggs are the main food source for several indigenous communities. At present, this species represents an important economic resource for local inhabitants and settlers in the Amazon region. Unfortunately, overexploitation and habitat destruction have caused drastic population declines for this species throughout the Amazon. *P. unifilis* is classified as Vulnerable by the IUCN Red Data Book and it is included in Appendix II of CITES. Several studies of genetic diversity and population structure have been carried out in Venezuela, Colombia, Perú and the Brazilian Amazonia. Despite the fact that some acclimation in captivity projects have been carried out in the Ecuadorian Amazon, there is a lack of genetic studies involving *P. unifilis* populations in this region. The main objective of the present study was to characterize the genetic diversity in 10 groups of *P. unifilis* individuals along a stretch of the Tiputini River, surrounding the Tiputini Biodiversity Station, by means of microsatellite molecular markers. A total of 73 samples were analyzed using 9 specific primers for *P. unifilis*. In the 9 loci analyzed, 52 alleles were identified, with an average of 3.378 alleles per locus. Genetic diversity indicators (expected heterozygosity, Shannon index, fixation index), show a tendency for high heterozygosity and genetic diversity levels. The number of effective migrants has been calculated based on F_{ST} values, suggesting the existence of one migrant for each generation in each group. Wright and Nei genetic distances show minor genetic differentiation among groups. The results of an AMOVA analysis show that 88% of the genetic variability can be found within individuals and 12% between groups. Population structure was inferred through Bayesian methods. These results suggest the presence of 2 different clusters. A wider investigation about the genetic diversity of *P. unifilis* in the Amazonian region of Ecuador is fundamental for the determination of the overall genetic diversity and population structure of this species in our country, as well as the management of this species in captivity.

This study is the first investigation focusing on genetic diversity and population structure of *P. unifilis* in Ecuador. Therefore, it represents a new source of information for future studies, as well as the conservation and adequate management of this species.

Índice general

Lista de Tablas	VI
Lista de Figuras	VI
1. Introducción	1
1.1. Generalidades, importancia y distribución de <i>Podocnemis unifilis</i>	1
1.2. Taxonomía de <i>P. unifilis</i>	2
1.3. Morfología	2
1.4. Hábitos alimenticios	3
1.5. Ecología reproductiva	4
1.6. Potenciales predadores de nidos y causas de pérdida	6
1.7. Diversidad genética	7
1.8. Marcadores moleculares	8
1.9. Microsatélites	9
1.10. Estudios genéticos de <i>Podocnemis unifilis</i> con marcadores moleculares microsatélites	10
2. Objetivos	11
3. Justificación	12
4. Area de Estudio	13
5. Materiales y Métodos	14
5.1. Materiales	14
5.1.1. Extracción de ADN	14

5.1.2.	Cuantificación de ADN	14
5.1.3.	Electroforesis en geles de Agarosa	14
5.1.4.	Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR	15
5.1.5.	Análisis de microsatélites en geles de poliacrilamida	15
5.1.6.	Tinción de Geles con Nitrato de Plata	17
5.1.7.	Análisis Estadísticos y Estructura Poblacional	17
5.2.	Métodos	17
5.2.1.	Obtención de Muestras	17
5.2.2.	Extracción de ADN	18
5.2.3.	Cuantificación y calidad de ADN	19
5.2.4.	Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR	19
5.2.5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción	20
5.2.6.	Lectura del gel y registro de datos	22
5.2.7.	Análisis de datos	22
6.	Resultados	24
6.1.	Extracción de ADN y cuantificación	24
6.2.	Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR	24
6.3.	Diversidad alélica de <i>P. unifilis</i>	25
6.4.	Diversidad genética de <i>P. unifilis</i>	25
6.5.	Diversidad genética entre individuos de <i>P. unifilis</i>	25
6.6.	Diversidad genética entre grupos de <i>P. unifilis</i>	26
6.7.	Estructura poblacional de <i>P. unifilis</i> en la EBT	26
7.	Discusión	28
7.1.	Amplificación de microsatélites con primers específicos de <i>P. unifilis</i>	28
7.2.	Diversidad alélica de <i>P. unifilis</i>	29
7.3.	Diversidad genética de <i>P. unifilis</i>	29
7.4.	Estructura poblacional	32

8. Conclusiones	34
9. Recomendaciones	35
10. Bibliografía	36
11. Tablas	41
12. Figuras	46
13. Anexos	53

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Lista de Anexos

Anexo 1: Muestras de <i>P. unifilis</i>	53
Anexo 2: Cuantificaciones de ADN extraído	55

1. Introducción

1.1. Generalidades, importancia y distribución de *Podocnemis unifilis*

Cinco especies de *Podocnemis*: *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. lewyana*, *P. sextuberculata* y *P. erythrocephal*, se encuentran en la cuenca del Amazonas y el Orinoco, cuatro de ellas están en la misma área. Están ampliamente distribuidas en la región Amazónica de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Guayanas y Brasil. Su hábitat natural son lagos, planicies inundadas, pantanos y cochas de agua a lo largo de la Amazonía (Fantin et al., 2007).

En Ecuador, *P. unifilis* se encuentra en las provincias de Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza y Morona Santiago. A lo largo del río Tiputini se han observado grupos mayores de 12 adultos o juveniles tomando sol en troncos flotantes o a lo largo de la vegetación cerca de las orillas (Fantin et al., 2007; Cisneros-Hereida, 2005). Las tortugas de río del género *Podocnemis* (familia Pelomedusidae) han sido el alimento tradicional de los habitantes de la Amazonía de Sudamérica durante siglos. Existen tres especies de este género (*P. expansa*, *P. unifilis* y *P. lewyana*) que en la actualidad están siendo sobreexplotadas. *P. expansa* es la especie más vulnerable debido a su comportamiento de anidación en grupo. Por otro lado *P. unifilis*, la segunda especie más grande es explotada cuando *P. expansa* escasea (Bock et al, 2001).

P. unifilis representa una importante fuente alimenticia, cultural y económica para los pueblos indígenas. Desafortunadamente la sobreexplotación antropogénica, el alto consumo de carne y huevos de esta especie por colonos de la Amazonía y la destrucción de su hábitat ha causado una declinación drástica de sus poblaciones. *P. unifilis* está clasificada como vulnerable por el libro rojo de la IUCN, amenazada por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos, y está incluida en el Apéndice II del CITES (Convention on International Trade of Endangered Species) (Escalona et al., 2009).

1.2. Taxonomía de *P. unifilis*

Según Cevallos (2000), la clasificación taxonómica de las especie es la siguiente:

Orden: Testudines

Suborden: Pleurodira

Superfamilia: *Pelomedusoidea*

Familia: *Podocnemididae*

Supergenero: *Podocnemis*

Género: *Podocnemis*

Especie: *P. unifilis*

1.3. Morfología

P. unifilis presenta una morfología característica que la diferencia de otras especies de su género. Su caparazón unicarenado esta compuesto por 12 escudos marginales, cinco vertebrales y ocho escudos costales. Es ovalado y moderadamente convexo con una quilla ligeramente elevada en los escudos vertebrales. El color del caparazón puede variar de marrón oscuro a negro (Campos, 2012; Escalona et al, 2012).

Esta tortuga presenta manchas amarillas-naranjas en la cabeza, en la parte superior del hocico, adelante de cada ojo, en el tímpano y en el borde lateral del interparietal. En la parte posterior de la órbita ocular presenta una mancha que se extiende hacia la parte inferior de la mandíbula (Neill, 1965). Tiene también una o dos bárbulas de color amarillento sobre el mentón. Mandíbulas de color marrón oscuro o negras y mandíbula superior presenta indentación (Campos, 2012).

El plastrón es más pequeño que el caparazón y de color amarillo, puede también presentar manchas oscuras. La región anterior del plastrón es más ancha, larga y redondeada que la región posterior; en esta última se puede distinguir la muesca anal que varía de forma de acuerdo a la edad y el sexo (Campos, 2012).

Juveniles y neonatos presentan caparazón de color marrón o verde grisáceo, cuyo mar-

gen está rodeado por una línea amarilla, visible especialmente en los neonatos. El caparazón es convexo y tiene una elevación en una escama vertebral. El plastrón es gris rosáceo, la cabeza es de color oliva o marrón con manchas amarillas-naranjas y ojos de color verde (Campos, 2012).

Las hembras adultas son más grandes que los machos sexualmente reproductivos, alcanzan un tamaño de hasta 42.8 cm. El plastrón de los machos no es cóncavo, la muesca anal es en forma de U, a comparación del plastrón de las hembras que es más ancho y la muesca anal en forma de V. La coloración de la cabeza en las hembras es marrón claro, los machos presentan un color más oscuro. El iris de los machos es de color verduzco, el de las hembras es de color negro. Neonatos y juveniles no presentan diferencias en el sexo a simple vista, debido a que las características sexuales externas no están desarrolladas (Campos, 2012).

El tamaño medio de la especie es de 47 cm con un peso de 4.5 kg hasta 12 kg. Se ha registrado una longitud de 42.8 cm en hembras y un peso que varía de 5 a 12 kg. El macho alcanza un máximo de 37 cm, aunque se han registrado tamaños de 50 a 51.8 cm y 4.3 kg de peso. Los neonatos nacen con una longitud y ancho de caparazón promedio de 41 mm y 37 mm respectivamente, y peso promedio de 18.2g (Escalona et al, 2012).

1.4. Hábitos alimenticios

La información sobre los hábitos alimenticios de *P. unifilis* en la naturaleza es limitada, debido a su hábitat acuático, lo cual dificulta su observación. La mayoría de datos sobre el tema corresponde a individuos en cautiverio. Consumen principalmente plantas, semillas y frutas. En baja frecuencia pueden consumir peces y moluscos, especialmente las hembras para satisfacer los requerimientos de calcio que ayuda a la formación de la cáscara de los huevos. No obstante esto no define la preferencia alimenticia de la especie (Fachin et al, 1995).

En un estudio realizado por Fachin et al en 1995, sobre la conducta alimenticia de *P. unifilis* en una región de la Amazonía en Brasil (río Guapore), determinó que no

existen distinciones en el tipo de alimento de acuerdo a las diferentes estaciones de los ríos de la Amazonía (seca y lluviosa). Las hembras consumen más frutas, mientras que los machos consumen más tallos de Poaceas. La alimentación de esta especie también varía de acuerdo al tipo de hábitat en el que se encuentren, río, brazo muerto de río y bosque inundado. Por lo general cuando el nivel del río es alto, el alimento principal son frutas, semillas y hojas. Semillas y frutas son más consumidas en los bosques inundados, brotes y tallos en los brazos muertos de río y hojas en los ríos. Por otro lado cuando el nivel del río es bajo la preferencia alimenticia varía, las frutas y semillas son más consumidas en los brazos muertos y en los bosques inundados, mientras que en el río las hojas son el principal alimento (Fachin et al, 1995).

1.5. Ecología reproductiva

La reproducción de *Pelomedusidae* se relaciona con los niveles del río: la puesta y la incubación de huevos ocurren en época seca y el nacimiento de las crías cuando el nivel del río crece. Comportamiento beneficiado rápidamente por la selección natural, para que los huevos puedan desarrollarse cuando las subidas de río no destruyan los nidos (Soini, 1994; Neill, 1965).

Las señales que usan las tortugas para escoger el lugar de anidación son: la temperatura del suelo, la humedad del suelo, la composición del suelo, la vegetación sobre el suelo, la inclinación del sitio, la distancia al agua o a la vegetación, la distancia a las mareas altas o bajas y/o la altura del agua o el nivel del río. Esta elección determina la sobrevivencia de las siguientes generaciones (Escalona et al, 2009; Rivera, 2010).

Las condiciones de incubación determinan el sexo de los neonatos, la tasa de crecimiento, la termorregulación, el comportamiento, la masa después del nacimiento, los patrones de pigmentación, el desempeño en la locomoción, la supervivencia y en consecuencia el éxito reproductivo de las nuevas hembras (Escalona et al, 2009; Rivera, 2010). La temperatura óptima para el desarrollo de los huevos es de 28 a 34 °C, para la determinación del sexo, temperaturas altas generan hembras y temperaturas bajas

machos (Souza y Vogt; 1994).

Se han registrado posturas en los meses de julio, agosto y diciembre en la Amazonía ecuatoriana, siendo el mes de diciembre donde se han registrado mayor cantidad de posturas (Grefa, 2006).

Después de escogido el lugar de desove la hembra excava un hoyo con un diámetro externo de 23.4 cm, un diámetro de entrada de 11.9 cm y de 18,2 cm a 20 cm de profundidad; finalmente desova y lo tapa. Este proceso puede durar de 34-63 minutos (Soini, 1994; Fachín Terán y Matheus von Mülhen, 2003).

Otra alternativa para la anidación es la facilitación social. Las hembras listas para desovar escogen el sitio siguiendo a otras anidadoras (Escalona et al, 2009; Rivera, 2010). Este comportamiento confiere una ventaja en el fitness de las crías, ya que los nidos pueden estar menos expuestos a la depredación aumentando el número de huevos eclosionados (Escalona et al, 2009; Soini 1994).

El "Ground-Nuzzling" realizado por las hembras ponedoras es un comportamiento típico que se exhibe durante el periodo de anidación, donde la cabeza y la zona ventral del cuello están presionadas sobre la superficie del suelo antes de escoger el sitio de anidación (Morjan y Valenzuela, 2001). Es probable que este mecanismo usado por las hembras ponedoras sea una ayuda para otras hembras para facilitar la decisión del lugar de anidación (Escalona et al, 2009).

El tamaño medio de la anidada está determinado por varios factores como la presencia de depredadores naturales y la distribución geográfica de la especie, que determina la calidad de nutrientes que se encuentran en el suelo. El tamaño medio de huevos en cada nido varía de 20 a 35.7, siendo 20 un número bajo. En el río Tiputini se ha registrado una media de 27.7 huevos por nido. En Perú y en Brasil se ha reportado un tamaño medio de huevos de 34.5 y 35.7 por nido respectivamente (Grefa, 2006; Terán y von Mülhen, 2003).

Cuando el desove finaliza, la hembra se dirige a la orilla y se sumerge en el agua, muchas veces se ha observado a hembras que descansan varios minutos junto al nido o en el borde del río (Soini, 1994).

El microclima del lugar donde se encuentra el nido determina el tiempo de incubación de los huevos. En un lugar donde el sol llega de manera constante, el tiempo de incubación será menor al de nidos que se encuentran de alguna manera con sombra. El periodo de incubación reportado por varios estudios es de 55 a 97 días. En cautiverio los tiempos de incubación son mayores, ya que las playas de arena son construidas sobre sustrato húmedo y vegetación arbórea cercana, lo cual disminuye el número de horas de sol sobre los nidos, siendo el tiempo medio de incubación de 112 días (Terán y von Mülhen, 2003).

El sistema de apareamiento en las poblaciones animales es un parámetro de suma importancia en la conservación debido a que tiene una influencia directa en el tamaño efectivo de la población. En un estudio de Fantin et al (2008) se reportó poliandria y múltiple paternidad en *P. unifilis*. Es posible que hasta más de 3 machos fecunden los huevos de una puesta. Se sabe que las hembras almacenan los espermatozoides de la última estación de puesta para la próxima estación. Son algunos los beneficios de la múltiple paternidad: la disponibilidad de espermatozoides para fertilizar los huevos, el maximizar el fitness de la nueva generación y los beneficios genéticos indirectos para la especie, como mantener el tamaño efectivo de la población, ya que un número limitado de machos fecundando a un gran número de hembras puede llevar a un decline genético (Fantin et al, 2008).

En *P. unifilis* se considera la elección del lugar de anidación como cuidado parental pre-anidación, debido a todos los beneficios que conlleva el lugar de anidación para los neonatos. En *P. expansa* se ha reportado cuidado parental a través de vocalizaciones por parte de neonatos y adultos (Ferrara et al, 2012).

1.6. Potenciales predadores de nidos y causas de pérdida

Los principales predadores naturales de nidos de *P. unifilis* a lo largo de la Amazonía son: el lagarto overo (*Tupinambis teguixin*), el gavián cangrejo grande o urubitinga

(*Buteogallus urubitinga*), el ocelote nocturno (*Felis pardalis*), el caracara negro (*Daptrius ater*), las hormigas y el ser humano (Cisneros-Hereida, 2005; Carvajal et al, 2011). La mayor tasa de pérdida natural de nidos se debe a la inundación repentina de los sitios de anidación. Sin embargo este acontecimiento puede variar entre años en función del clima (Terán von Mülhen, 2003).

Al salir del cascarón los neonatos van en dirección al río donde los esperan varios predadores, como el *Caiman crocodilus* y varias especies de peces, donde las pirañas (*Serrosalamus spp*) son las más importantes. Se han encontrado crías mutiladas o parcialmente devoradas por pirañas (Soini 1994).

1.7. Diversidad genética

La diversidad genética es la variación de alelos y genotipos dentro de los organismos vivos. Esto es, diferencias genéticas entre las poblaciones de la misma especie y entre los individuos de dichas poblaciones. La diversidad genética es la base de la evolución ya que permite a las especies adaptarse con el tiempo a las presiones ambientales que enfrentan. A mayor diversidad genética, mayor probabilidad para una especie de colonizar nuevos nichos ecológicos. Al contrario, una disminución en la diversidad genética hace que disminuya la posibilidad de persistencia de una especie en el ambiente, a largo plazo. No todos los individuos o poblaciones tienen el gen o la combinación de genes que les permita sobrevivir en un ambiente particular. La pérdida de individuos y poblaciones, la destrucción de los hábitats disminuye la base genética de las especies (Glowka et al., 1996; Rogers y Montalvo, 2004).

En animales silvestres, el consumo y la caza en general pueden cambiar dramáticamente la abundancia de la población, afectando a procesos como la selección natural, el flujo génico y la deriva génica. Esto hace que exista una alta posibilidad de que se altere la estructura de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de las especies que han sido explotadas. La pérdida de alelos es preocupante en la declinación de algunos taxa. Esto puede reducir su habilidad para adaptarse al medio en presencia de algún

cambio (Escalona et al., 2008).

Para evaluar la diversidad genética existen varias medidas, como el Índice de Shannon o la heterocigosidad esperada, la heterocigosidad observada, entre otras; actualmente las medidas cuantitativas más usadas son el polimorfismo, la heterocigosidad promedio y la diversidad alélica, que indican el número de alelos en un locus, la proporción promedio de individuos heterocigotos y el número medio de alelos por locus respectivamente (Van Dyke, 2008).

La determinación de la diversidad genética de una población es de gran importancia para entender el estado de la población y decidir medidas de conservación de considerarse apropiadas. Una herramienta de uso frecuente para determinar la diversidad genética es la actualidad son los marcadores moleculares basados en el ADN.

1.8. Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una entidad genética que manifiesta polimorfismo y se hereda de manera mendeliana. Los marcadores moleculares han sido tomados en años recientes para detectar secuencias específicas que sean diferentes entre dos o más individuos (Langridge y Chalmers, 2005). Los marcadores moleculares generalmente no representan a los genes objetivo en sí mismos, pero actúan como señalizadores, ya que son secuencias específicas ligadas a los genes (Londoño, 2011).

Surgen de diferentes clases de mutaciones, como sustituciones (puntos de sustitución), reordenamientos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación de ADN repetido en tándem (Londoño, 2011).

Existen varios marcadores moleculares, entre ellos están los RFLPs (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción); los AFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados); los RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar); los microsatelites o SSRs y los ISSRs (secuencias repetidas intersimples) (Rentarías, 2007).

1.9. Microsatélites

Los microsatélites o SSR (secuencias simples repetidas) son regiones de ADN repetido no codificante compuestas por motivos repetidos en tándem de 10 a 100 veces; pueden ser mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n o tetranucleótidos (AAGG)_n. Están ampliamente distribuidos en el genoma de eucariotas y procariotas, se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN, sufren altas tasas de mutación en comparación con el resto del genoma y por esto son ampliamente usados (Londoño, 2011; Rentarúa 2007).

Aunque fueron inicialmente diseñados para la investigación en humanos, los SSRs se han convertido en una poderosa herramienta para la investigación en animales y plantas (Londoño, 2011). Se han detectado microsatelites en múltiples grupos de plantas y animales, lo cuál ha sido fundamental para estudios de variación genética intra e interespecífica (Rentarúa, 2007). Además de esto, los SSRs proveen información relevante para la identificación y conservación de unidades genéticas y para la investigación de procesos genéticos cómo flujo génico y deriva génica (Londoño, 2011).

Las ventajas de los SSRs sobre otros marcadores moleculares se deben a su alto grado de polimorfismo, a su codominancia y a la presencia de un solo locus genético por microsatélite, lo que hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar. Para trabajar con este marcador es necesario conocer la secuencia de la región que se analizará. Esto permitirá el uso de primers específicos que amplifiquen en la región repetitiva responsable de la variación, que además es homóloga para diferentes especies e inclusive géneros (Rentarúa, 2007).

Los microsatelites son utilizados en diversos estudios, como análisis forenses, identificación de especies, determinación de patrones migratorios, construcción de mapas genéticos, análisis poblacional, variabilidad genética, entre otros (Barbadilla, 2010).

1.10. Estudios genéticos de *Podocnemis unifilis* con marcadores moleculares microsatélites

Hace aproximadamente 20 años se han realizado estudios de manejo de la terecaya a lo largo de la Amazonía de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. La mayoría de los proyectos se han enfocado en proteger playas de anidación o en transferir los nidos para protegerlos de las inundaciones y la depredación (Bock et al, 2001).

Se han realizado estudios de diversidad, estructura poblacional y poliandria usando marcadores moleculares SSR. Se han realizado estudios de genética poblacional con isoenzimas (Bock et al, 2001) para definir una estructura poblacional de *P. unifilis* en Colombia, Brasil y Perú.

También se han realizado estudios de genética poblacional y estimación de cuellos de botella con SSRs en *P. unifilis* (Escalona et al, 2008) donde se determinó la estructura genética de esta especie a lo largo del Amazonas y el Orinoco. Se dió a conocer cual es la situación actual de esta especie a partir de los datos genéticos, ya que la alta depredación antropogénica que sufren las poblaciones de estas tortugas a lo largo de toda la Amazonía puede alterar su estructura poblacional. Fantin et al., (2007), desarrolló 16 primers específicos para esta especie de los cuales 10 fueron probados en el presente estudio. A partir de estos SSRs específicos para *P. unifilis* se han realizado estudios de poliandria en esta especie (Fantin et al, 2008), para poder comprobar comportamientos reproductivos como la múltiple paternidad.

En el Ecuador se han realizado únicamente estudios de manejo de nidos; es por esto que el presente estudio tiene como objetivo la caracterización de la diversidad genética de 10 grupos de esta especie ubicados en un rango de 35.56 km dentro de la zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT).

2. Objetivos

General

Determinar la diversidad genética de la población de la tortuga de agua dulce (*Podocnemis unifilis*) en la zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT).

Específicos

- Conocer la diversidad genética de 10 grupos de *Podocnemis unifilis* que se encuentran en la población la EBT.
- Determinar la estructura poblacional de *P. unifilis* en la EBT.

3. Justificación

La tortuga de agua dulce *P. unifilis* se encuentra ampliamente distribuida en los países sudamericanos que comprenden la Amazonía. Está considerada como la segunda especie más consumida en la región Amazónica, resultado que llevó a considerar a la especie como vulnerable en la lista roja de la IUCN (Fantin et al, 2008). Esta tortuga representa un importante recurso cultural y económico para los habitantes de la región Amazónica. En Ecuador se han registrado extracciones ocasionales en la región del río Tiputini por los nativos, pese a que esta actividad sea ilícita en esta zona. Lamentablemente, la sobreexplotación (carne y huevos), la destrucción de su hábitat y el tráfico ilegal de la especie, han producido un drástico declive de las poblaciones de *P. unifilis* a lo largo de la Amazonía (Grefa, 2006; Escalona et al, 2008).

La caza o recolección desmesurada de especies silvestres, puede cambiar la distribución y abundancia de las poblaciones. Esto puede afectar procesos como la selección natural, flujo génico y deriva génica. Es por esto, que para este tipo de especies, los estudios moleculares son una herramienta importante, no solo para comprender la estructura genética o la biogeografía de las especies, sino también para evaluar los efectos antropogénicos sobre la diversidad genética de las especies amenazadas, para así implementar programas de manejo que sean efectivos (Escalona et al, 2008).

Este estudio tuvo la finalidad de determinar la diversidad genética de *P. unifilis* en 10 grupos de la población de la EBT. Esta información nos permitirá entender el estado en el que se encuentra esta especie y tener una fuente de información útil para futuros estudios poblacionales y de manejo de *P. unifilis*.

4. Area de Estudio

Las muestras empleadas en el presente estudio fueron tomadas de las playas del río Tiputini a lo largo de 35.56 km, en la zona de influencia de la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT - 0°37'05"S, 76°10'19"W, 190-270 msnm), que se encuentra en la provincia de Orellana-Ecuador, a 280 km ESE de Quito.

La determinación de la ubicación geográfica de las playas cuyas poblaciones de tortugas fueron estudiadas en el río Tiputini, se realizó con el buscador satelital de Google.Maps (Figura 1). Para esto se usaron las coordenadas reportadas por Rivera (2010) y Grefa (2006). Adicionalmente se elaboró una tabla de distancias entre playas (Tabla 1).

A lo largo del río Tiputini las playas están descubiertas en la temporada seca, tienen una extensión máxima de 100 m y son de arena (Cisneros-Hereida, 2005).

Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Extracción de ADN

- Tejido de caparazón de neonatos de tortuga.
- Buffer de lisis (10mM NaCl - 10mM Tris - 25mM EDTA - pH 8 - Proteinasa K de Invitrogen)
- Acetato de Amonio 7.5 M
- Etanol 100 % frío
- TE 1X (10mM Tris Base - 1mM EDTA - pH8)
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)
- Cámara de flujo laminar (Labconco)
- Incubadora con agitación (Barnstead)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415D)

5.1.2. Cuantificación de ADN

- Muestras de ADN de tejido de *P. unifilis*
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- NANODROP 2000TM (Thermo Scientific)

5.1.3. Electroforesis en geles de Agarosa

- SeaKem LE Agarose

- TBE 1X (89.15mM Tris base - 88.95mM ácido Bórico - 2.54mM EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 100bp (Invitrogen)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- Fuente de poder EPS-300 II (C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador GelDoc XR (Biorad)

5.1.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

- DNA de *Podocnemis unifilis*
- Primers (Tabla 1)
- Taq DNA polimerasa 5U/ μ l (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

5.1.5. Análisis de microsatélites en geles de poliacrilamida

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)

- UltraPure™N,N' - Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (89,15 mM Tris base - 88,95 mM Ácido Bórico - 2,54 mM EDTA)
- UltraPure™UREA (Invitrogen)
- Detergente Alconox
- Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- Etanol 70 %
- RainX™
- Sigmacote®(SIGMA)
- Solución para tratamiento de vidrios: etanol 96 % y ácido acético glacial 0.5 %.
- Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-propyl-methacrylate 98 %) (SIGMA-ALDRICH).
- Persulfato de amonio 10 % (J.T. Baker)
- UltraPure™TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Invitrogen)
- TBE 1X (89.15mM Tris base - 88.95mM ácido Bórico - 2.54mM EDTA)
- Buffer de carga para pre-corrida (25 % Glicerol + 0.1 % Azul de Bromofenol)
- Producto de amplificación
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 10bp y 100bp (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T100 Thermal Cycler (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)

5.1.6. Tinción de Geles con Nitrato de Plata

- Solución de fijación y parada (Benbouza et al., 2006)
 - 200 de ml alcohol absoluto (J.T. Baker)
 - 10 ml de ácido acético glacial (MERCK)
 - 1790 ml de agua destilada
- Solución de tinción (Benbouza et al., 2006)
 - 4 g de nitrato de plata (FISHER)
 - 3 ml de formaldehído 37 % (MERCK)
 - 2000 ml de agua destilada
- Solución de revelación (Benbouza et al., 2006)
 - 30 g de hidróxido de sodio (MERCK)
 - 2000 ml de agua destilada

5.1.7. Análisis Estadísticos y Estructura Poblacional

- Software GenAlEx 6.501 (Peakall, 2012)
- DARwin 5.0.158 (Perrier Jacquemoud-Collet, 2006)
- Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000)

5.2. Métodos

5.2.1. Obtención de Muestras

Las tortugas de *P. unifilis* desovan en promedio 27.7 huevos por nido (Grefa, 2006). Los nidos colectados en el estudio de Rivera (2010) fueron trasladados a la EBT y ubicados en camas de arena para la incubación ex situ. Cada nido fue etiquetado con

el número de playa de donde fue colectado y cada huevo con un número entero de acuerdo a la cantidad de huevos por nido. Después de los primeros días de eclosión se colectaron muestras del tejido de caparazón de todos los individuos de cada nido en el 2008. Para el presente estudio se seleccionó 10 playas. Las muestras de tejido de las tortugas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Se escogió 8 muestras por cada playa. De las playas 8 y 14 se tomó únicamente 7 y 2 muestras respectivamente. En total se analizaron 73 muestras. En este estudio cada muestra representa un individuo, y las muestras de una misma playa se denominan grupo.

5.2.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se efectuó a partir de tejido de caparazón de neonatos de tortugas. Se usó el protocolo de Broderick et al., 1984 (citado en Kashiwagi et al. 2012). El protocolo fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Se colocó un pedazo de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml etiquetándolo con un código predeterminado por individuo y grupo. Se añadió 495 μ l de buffer de lisis y 5 μ l de Proteinasa K. Se mezcló por inversión y se incubó la mezcla por 16 h a 56°C con agitación de aproximadamente 150 rpm. Luego se agregó 250 μ l de acetato de amonio frío y se mezcló varias veces por inversión. Se centrifugó durante 20 minutos a 13200 rpm a una temperatura de 4 °C.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml etiquetado con el código correspondiente. Posteriormente se añadió 750 μ l de etanol 100 % frío y se mezcló por inversión; se centrifugó por 20 min a 13200 rpm a una temperatura de 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 500 μ l de etanol 100 % frío. Este lavado se realizó hasta que el pellet se desprendió de la base del tubo; luego se centrifugó durante 20 minutos a 13200 rpm a 4 °C.

Se descartó la mayoría del etanol con la ayuda de una micropipeta. Se colocó los tubos con la tapa abierta en una cámara de flujo laminar hasta que se evapore el etanol.

Finalmente se resuspendió el DNA extraído en 50 μl de TE 1X y se almacenó a -20 °C hasta ser usado.

5.2.3. Cuantificación y calidad de ADN

Se cuantificó el ADN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000TM (Thermo Scientific). Para valorar la pureza del ADN se usaron los índices de absorbancia 260/280 con un valor de 1.8 y 260/230 con un valor de 2.2. Adicional a esto, se elaboraron geles de agarosa al 1.5% con 3 μl SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) para verificar la calidad de ADN extraído. En cada pocillo del gel se colocó 2 μl de buffer, 3 μl de agua de PCR y 5 μl de ADN. Se corrió cada gel durante 45 min con una carga de 80 voltios. Finalmente el gel fue fotografiado bajo luz ultravioleta con el fotodocumentador GelDoc XR de Biorad (Figura 2).

Las muestras con una concentración mayor a 15 ng/ μl se diluyeron a una concentración de 10 ng/ μl .

5.2.4. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

Previo a la ejecución del estudio se realizó una investigación bibliográfica que permitió elegir 10 primers específicos (Tabla 2) diseñados por Fantin et al. (2007). El criterio usado para la elección de estos primers fue principalmente la alta heterocigosidad observada y esperada. Los primers forward reportados en el estudio de Fantin et al., (2007) poseían una cola M13 en el externo 5', la cual no se usó en este estudio; por lo tanto se restó 18 pb al tamaño esperado de cada amplicón.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 μl , constituidos por Buffer de PCR 1X, 1.75 mM de MgCl₂, 0.2 μM de dNTP's, 0.2 μM de cada primer, 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 ng de ADN. Se usó un termociclador de gradiente Biometra ®. El ciclaje térmico comprendió los siguientes pasos: denaturación inicial 94 °C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos a la temperatura específica de annealing de cada primer (Tabla 2), y una extensión final de

20 min a 72 °C.

Se realizó una secuenciación para dos pares de primers escogidos (Puni 1C3 y Puni 1E1) que presentaron fragmentos amplificados fuera del rango esperado (Figura 3). Para esto se cargaron las muestras que presentaron los alelos fuera del rango esperado en un gel de acrilamida, se extrajeron las bandas de los fragmentos amplificados posterior al proceso de tinción, se resuspendieron las muestras en 50 μ l de TE y se las mantuvo en agitación por 16 horas a 37 °C. Se reamplificó cada banda extraída y se la corrió en un gel de acrilamida, se extrajeron nuevamente las bandas de los fragmentos amplificados y se envió a secuenciar a Functional Bioscience (Madison - Wisconsin, EE.UU).

5.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 % y 4 % y Urea 5M, en cámaras verticales Sequi-Gen®(BIO-RAD). Los geles se revelaron mediante tinción con nitrato de plata (Benbouza et al., 2006).

Para realizar este proceso se empezó preparando las soluciones de poliacrilamida 6 % urea 5M. Se mezclaron 100 ml de agua destilada con 50 ml de TBE 10X, se diluyó 150.15 g de úrea denaturante y en oscuridad total se disolvieron 28.5 g de acrilamida y 1.5 g de bisacrilamida. Esta mezcla se aforó a 500 ml con agua destilada. Para la elaboración de la solución de acrilamida al 4 % urea 5 M se mezcló 44 ml de la solución de acrilamida al 6 % con 29.6 ml de agua destilada y 4.4 ml de TBE 10X.

Se armó la cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen®(BIO-RAD). Para esto se trató la cámara con 5 ml de alcohol al 96 %. Posteriormente se trató con 3 ml de RAINX y finalmente con 0.8 ml de Sigmacote. El vidrio se lavó 4 veces con el detergente Alconox®; casi seco se lo limpió con 5 ml de alcohol al 96 % y finalmente con la solución de alcohol ácido acético (1 ml de alcohol al 96 % y 0.5 % de ácido) más 3 μ l de bind-silane. Para separar el vidrio de la cámara se usaron separadores y peines de 4 mm de grosor.

Una vez armada la cámara se colocó 100 ml de acrilamida al 6 % y urea 5M en un vaso de precipitación, se añadieron 545 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 109 μ l de TEMED. Se pasó la mezcla a una jeringuilla de 150 ml y se inyectó la solución a la cámara. Se introdujo el peine con los dientes hacia fuera para formar un frente de corrida. Se esperó aproximadamente 45 min hasta la polimerización.

Se pasó la cámara de la base de polimerización a la base de corrida. Se calentó 1.5 l de TBE 1X durante 4 min en el horno microondas. Se colocaron 400 ml en la base de polimerización y 1.1 l en la cámara. Se retiró el peine, se limpió el exceso de urea con una pipeta Pasteur y se introdujo el peine para formar los pocillos. Nuevamente con la pipeta Pasteur se retiró el exceso de urea. Se puso 1 μ l de buffer de pre-corrida saltando un pocillo para descartar filtraciones entre los mismos. Se programó la fuente de poder a 80 Watts y se pre-corrió durante 30 minutos.

Para la preparación de las muestras, se agregó 1 μ l de Blue Juice 10X (Invitrogen) a cada uno de los productos de PCR para una concentración final de 1X. Se preparó también ladder con 27.5 μ l de agua, 2.5 μ l de blue juice y 5 μ l de ladder 10 bp (Invitrogen). Se centrifugaron los preparados y se denaturaron a 95 °C por 5 min en el termociclador. Finalizada la denaturación y la pre-corrida se cargó 5 μ l de cada muestra y 3 μ l de ladder 10 bp. La electroforesis consistió en 2 h 30 minutos a 80 Watts y de 45-50 °C.

Durante la corrida del gel se prepararon las soluciones de tinción. Se preparó la solución de tinción en oscuridad total, diluyendo 4 g de nitrato de plata en 500 ml agua destilada, finalmente se aforó con 1.5 l de agua destilada y se agregó 3 ml de formaldehído 37 %. Se disolvió 30 g de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada para la solución de revelado, se aforó a 2 l de solución y se agregaron 4 ml de formaldehído 37 %. Para la solución fijadora y de parada se midió 1790 ml de agua destilada, se mezcló con 200 ml de alcohol absoluto y 10 ml de ácido acético glacial.

Finalizada la corrida se procedió a la tinción del gel. Se separó el vidrio de la cámara. Se puso el vidrio en un recipiente con la solución fijadora/parada durante 5 min. En seguida, en oscuridad total, se puso el vidrio durante 7 min en un recipiente con solución de tinción y se realizaron movimientos suaves y continuos. Se lavó el vidrio durante 8

segundos en 2 l de agua destilada fría. En seguida se puso el vidrio en un recipiente con la solución de revelado durante 7 min, moviéndolo suavemente y de manera continua. Luego se pasó el vidrio al recipiente de la solución fijadora/parada durante 3 min y finalmente se lo lavó en otro recipiente durante 8 segundos; se quitaron los excesos de acrilamida en los bordes del vidrio, se dejó reposar de 16 h a 24 h para que se seque totalmente el gel y poder analizarlo en el transiluminador de luz blanca.

5.2.6. Lectura del gel y registro de datos

Para la lectura y registro de datos se colocó el vidrio, con el gel impregnado, sobre el transiluminador de luz blanca. Los alelos fueron identificados de acuerdo al tamaño esperado reportado por Fatin et al., (2007) (Tabla 2). Se codificó cada alelo nuevo con una letra mayúscula del alfabeto de forma sucesiva (Figura 4 y 5). Se midió la distancia en centímetros de las bandas del ladder 10bp (de tamaño conocido en pares de bases) y de cada alelo, respecto al frente de corrida, para estimar por interpolación lineal el tamaño en pares de bases de los alelos encontrados.

En un libro de Excel se elaboró un cuadro para cada primer, el cual incluyó la muestra con el/los alelos encontrados, el tamaño de la banda esperada en cm y el de los alelos encontrados. Se realizó una regresión lineal para obtener los tamaños de los alelos exactos usando como base el tamaño de los fragmentos del ladder.

Se elaboró una matriz alélica, la cual fue usada por cada software en el análisis de diversidad genética y estructura poblacional.

5.2.7. Análisis de datos

Para la determinación de la diversidad genética se usó el software GenALEX 6.501 (Peakall Smouse, 2012) con el cual se calculó la frecuencia alélica, el número de alelos (Na), el número de alelos efectivos (Ne), el índice de Shannon (I), la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He), el índice de fijación (F), las distancias genéticas de Nei y los estadísticos F de Wright (F_{ST}).

Se usó también el software DARwin 6.04 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) con el cual se realizó una matriz de distancia con el método de simple matching con 1 000 bootstraps a partir de una matriz alélica elaborada específicamente para este software. A partir de esto se creó un dendrograma con el método de Neighbor Joining (unweighted) para conocer las agrupaciones genéticas de los individuos. Finalmente se hizo un PCoA con métodos factoriales, con el cuál se visualizó la diversidad y la dispersión de *P. unifilis* basado en distancias Euclidianas.

Para determinar la estructura poblacional se usó el software Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) basado en inferencias bayesianas. Se hizo un análisis de un número supuesto de agrupaciones (valor K), del cual se realizaron varias repeticiones. La prueba final fué con 5 valores K (1-5), con 15 interacciones c/u, 100 000 pasos de burning y 100 000 pasos de cálculo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). De este análisis se obtuvo el K óptimo (número de agrupaciones) mediante el doble logaritmo natural de la probabilidad de cada valor K (delta K), calculado en un programa en línea Structure Harvester. Los datos que se usaron en con el programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) fueron generados en los software CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) y Distruct 1.1 (Rosenberg, 2002).

6. Resultados

6.1. Extracción de ADN y cuantificación

Se extrajo ADN de 73 muestras provenientes de 10 grupos de *P. unifilis* de la población de la EBT. Se escogieron 8 muestras por grupo, con excepción del grupo 8 (7 muestras) y 14 (2 muestras) (Anexo 1). Debido a que algunas muestras no presentaban una cantidad aceptable de ADN, se las reemplazó con otras de la misma población, hasta lograr concentraciones de ADN mayores a 3 ng/ μ l (Anexo 2). Se obtuvieron 3 muestras (P3T1, P8T6 y P8T7) con concentraciones menores a 2 ng/ μ l (Anexo 2), no obstante la baja cantidad de ADN, se obtuvo amplificación con estas muestras. Las muestras con más de 15 ng/ μ l se diluyeron hasta 10 ng/ μ l. Los valores para los índices de absorbancia 260/280, 260/230 variaron entre -11.85 - 4.48 y -5.82 - 6.78 respectivamente. De acuerdo a estos datos, no todas las muestras presentaban ADN de alta calidad. Sin embargo, en los geles de agarosa se observó ADN sin degradaciones (Figura 2).

6.2. Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

Se amplificó ADN microsatélite con 10 pares de primers específicos para *P. unifilis* (Fantin et al, 2007), pero se analizó únicamente 9, dado que el tamaño de los fragmentos amplificados con el Primer 4 (Puni_1_C3) se encontraban fuera del rango esperado. La secuenciación de los fragmentos extraídos del gel para este locus demostraron que no correspondían a microsatélites. Para los 9 loci analizados se realizó un PCR de gradiente para determinar una temperatura de annealing adecuada (Tabla 2), ya que cuando se realizó la amplificación con la temperatura reportada se observaron muchas bandas inespecíficas. De igual manera se modificó el programa de PCR: denaturación inicial (94 °C- 1 min) seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos de la temperatura de annealing de cada primer (Tabla 2), y una extensión final por 20 minutos a 72°C.

6.3. Diversidad alélica de *P. unifilis*

Se obtuvo 52 alelos para los 9 loci en las 73 muestras analizadas (Tabla 3). Todos los loci fueron polimórficos. El número de alelos por locus varió de 3-10 y la media general fue 3.378 (Tabla 4). El locus más informativo fue Puni_2A9 (Primer 8) con 10 alelos. De las 73 muestras, 6 no amplificaron para diferentes loci. La muestra P12T8 no amplificó para el locus 1, P3T6 y P8T2 no amplificaron para el locus 5, P2T2 y P2T4 no amplificaron para el locus 9 y P13T5 no amplificó para el locus 8. El número medio de alelos efectivos (N_e) por cada playa fue de 2.497 (Tabla 4).

6.4. Diversidad genética de *P. unifilis* en la EBT

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que el 88 % de toda la variabilidad genética está asociada a la diferenciación entre individuos, mientras que el 12 % se atribuye a variación entre grupos (Figura 6).

6.5. Diversidad genética entre individuos de *P. unifilis* en la población de la EBT

Los resultados de las diferentes medidas de diversidad genética intergrupales usadas (Tablas 4 y 5) muestran un valor alto de heterocigosidad esperada (H_e), con una media de 0.525. La heterocigosidad observada, también mostró un valor alto con una media de 0.599. Los valores promedio de H_e y H_o indican que existen altos niveles de diversidad genética en todos los grupos.

El índice de Shannon muestra una alta variabilidad entre los individuos de *P. unifilis* con una media de 0.944 (Tabla 4). El índice de fijación (coeficiente de inbreeding) varió en algunos grupos, la media fue de -0.147 (Tabla 4), valor que indica que puede existir apareamiento al azar. Se realizó una prueba de chi-cuadrado para saber si los loci se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. De 9 loci probados 8 se encontraban en equilibrio con un rango de 0.567 y 0.049 por locus (Tabla 5). El valor más bajo perteneció al Loci Puni_1D9.

6.6. Diversidad genética entre grupos de *P. unifilis* en la población de la EBT

Se generó una matriz de distancia genética de Wright (F_{ST}) (Tabla 6) y una matriz de distancia genética de Nei (Tabla 7). A partir del valor de F_{ST} se pudo calcular la tasa de migración (Nm) (Tabla 3).

La mayoría de grupos presentan valores de F_{ST} y de Nei que establecen distancias genéticas bajas entre ellos. Sin embargo, existen tres grupos, Playa 12, 13 y 14 que muestran valores altos de F_{ST} y de Nei con los demás grupos (Tabla 6 y 7). Vale mencionar que la Playa 14 está representada únicamente por dos individuos, lo que puede sesgar este resultado.

Se construyó un dendrograma basado en el método de Neighbor Joining (Figura 7) el cual nos indica agrupamiento por similitudes genéticas. El dendrograma no muestra una agrupación congruente: 73 individuos de *P. unifilis* se mezclan entre sí. Sin embargo, se puede observar una tendencia de agrupamiento con los individuos del grupo Playa 12 y la Playa 13.

El PCoA (Figura 8) corrobora lo observado en el dendrograma. Los individuos de la playa 13 (color azul) se agrupan en el cuadrante izquierdo superior, sin mezclarse con individuos de otras playas. Por otro lado, los individuos de la playa 12 (color negro) se agrupan en el cuadrante izquierdo inferior. En general la distribución es discontinua en los grupos. Existe una tendencia del grupo playa 11 y Playa 8 a alejarse de los otros grupos. Mientras que los grupos playa 1,2,3,4 y 6 se mantienen dispersos sin mostrar ningún agrupamiento.

6.7. Estructura poblacional de *P. unifilis* en la EBT

El valor óptimo de K obtenido en este estudio fue K2, mediante la evaluación por el método de Evano et al., 2005 (Tabla 8). Como se puede observar en la Figura 9, el resultado sugiere que los individuos de la población estudiada se separan en dos líneas ancestrales. El agrupamiento representado por el color morado incluye a los individuos

de las playas 1,2,3,4,6,8,11 y 14; mientras que el agrupamiento representado por el color verde incluye a los individuos de las playas 12 y 13. Este resultado indicaría que los grupos estudiados vienen de líneas ancestrales diferentes. Sin embargo, si son dos líneas ancestrales se debería hacer más estudios sobre esta población, para que estos resultados preliminares se confirmen.

7. Discusión

7.1. Amplificación de microsatélites con primers específicos de *P. unifilis*

En este estudio se probaron 10 pares de primers microsatélites, diseñados específicamente para *P. unifilis*. Se logró amplificación con todos los primers. Sin embargo, con uno de ellos (Puni_1C3) se obtuvo un amplicón de tamaño más bajo del reportado y 16 muestras no amplificaron de un total de 73. Para comprobar que este amplicón de menor tamaño correspondiera a una región microsatélite de *P. unifilis*, se realizó una extracción y purificación de la banda del gel que posteriormente se envió a secuenciar. Los resultados de la secuenciación fueron negativos, por lo cual se decidió descartar este primer. En el estudio realizado por Fatin et al (2007), se reporta al primer Puni_1C3 como un primer con fallas de amplificación, pues el valor para el Equilibrio de Hardy-Weinberg fue menor a 0.01. La sugerencia en Fatin et al (2007) es realizar pruebas adicionales para comprobar si se trata de la presencia de alelos nulos.

Por otro lado, el primer Puni_1E1 (Primer 6) presentó 2 alelos ubicados 20 pb más arriba del rango esperado (Figura 3). Para asegurar que estos amplicones correspondían a regiones microsatélites se procedió de la misma manera que en el caso anterior. El resultado de la secuenciación fue positivo, por lo cual estos 2 alelos se incluyeron en la matriz de datos y se modificó el rango de tamaño del amplicón esperado para este primer.

En el presente estudio se reporta una temperatura de annealing diferente a la reportada por Fatin et al (2007). Posiblemente esto se deba al uso de una cola M13 de 18pb en cada primer forward en el estudio mencionado. Se sabe también que la temperatura de annealing se ve muchas veces afectada por la concentración de sales presentes en el buffer y por los requisitos de funcionamiento de la polimerasa usada (New England Biolabs, 2014).

7.2. Diversidad alélica de *P. unifilis* en la EBT

El número promedio de alelos obtenidos en este estudio fue de 3.37 por locus. Este valor es bajo en comparación con el obtenido en el estudio de Fantin et al., (2007), en el cual se reporta un rango alelos de 4 a 11 por locus, y en el estudio de Escalona et al, (2008), donde se reporta un número medio de alelos de 24.5. El número promedio de alelos (N_a) observados sobre una gama de loci probados en diferentes poblaciones es de suma importancia, ya que es considerado un indicador razonable de diversidad genética. Sin embargo el tamaño de la muestra no siempre será el mismo, por lo que esta medida no es suficiente para indicar la variabilidad de alelos en las poblaciones (Ojango et al, 2011). En el estudio de Escalona et al, (2008) se analizaron varias poblaciones a lo largo del Orinoco y el Amazonas, por lo cual el número medio de alelos obtenidos tiende a ser mayor, a comparación del presente estudio donde se analizaron varios grupos de una sola población. Se puede decir que el resultado del número medio de alelos de este estudio demuestra que existe una moderada variación genética. No se puede aludir que la población no tiene diversidad genética, ya que no se han muestreado todos los grupos presentes en esta población.

7.3. Diversidad genética de *P. unifilis* en la EBT

Los resultados del AMOVA (Figura 6) en este estudio indican una alta variabilidad intragrupal en *P. unifilis* (88%), mientras que el 12% restante indica la variabilidad intergrupala. Estos resultados sugieren que existe interacción entre individuos de varios grupos, por lo tanto migración. Se sabe que en épocas de reproducción los machos y hembras adultas se mueven de sus localidades para aparearse. También se conoce que las tortugas del género *Podocnemis* están en constante migración a lo largo del río donde se encuentra su población (Fachin y Vogt, 2004; Pearse et al, 2006).

La heterocigosidad observada promedio en este estudio fue 0.599, resultado menor al calculado en el estudio de Escalona et al., (2008), donde se reporta una H_o de 0.69.

Escalona et al., (2008), analizó 9 loci heterologos, a diferencia de los 9 loci homólogos usados en el presente estudio. Además se analizaron muestras provenientes de varias poblaciones, a diferencia de las 73 muestras de una población, que se analizaron en este estudio. De acuerdo al resultado obtenido se puede sugerir que existe una tendencia hacia individuos heterocigotos. Estos resultados pueden verse favorecidos a la presencia de múltiple paternidad reportada por Fantin et al (2008), donde se comprobó la presencia de varios padres (mínimo 2) para un solo nido de *P. unifilis*.

La heterocigosidad esperada promedio en este estudio fue 0.525 similar a la observada (0.599). En un estudio realizado por Bock et al (2001) en *P. unifilis* y *P. expansa* con aloenzimas se obtuvo una H_e de 0.071, 0.059 y 0.069 para Perú, Brasil y Colombia respectivamente, un valor más bajo comparado con el resultado obtenido en este estudio y el reportado por Escalona et al., (2008), con un valor de H_e de 0.70. En el estudio de Escalona et al., (2008) se usaron las mismas muestras de Perú y Colombia usadas por Bock et al (2001), por lo tanto se habría esperado valores similares. Sin embargo, muchas veces los niveles de heterocigosidad en una especie pueden variar de acuerdo a la técnica molecular usada. Las aloenzimas tienen un bajo índice de mutaciones lo que puede afectar los resultados de heterocigosidad (Escalona et al., 2008).

El valor del índice de fijación fue negativo ($F = -0.147$). Este índice indica si dos alelos de un mismo locus en un individuo son idénticos por descendencia. Este resultado puede estar relacionado con el comportamiento de las hembras a copular con varios machos, lo cual puede indicar que en esta población existe paternidad múltiple.

En el presente estudio, 8 de 9 loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual nos indica que, en una población donde no existe presión de selección, el número de heterocigotos está relacionado con la frecuencia de alelos. El único locus en desequilibrio (Puni 1_D9) mostró un valor de 0.049 para el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3). Este resultado podría deberse a un déficit de heterocigotos, o a la presencia de alelos nulos o al mal acoplamiento de los primers al ADN (Casalla, 2003). En una población panmíctica (donde los individuos se aparean al azar) de gran tamaño y donde todos los individuos son viables y fecundos, el proceso de herencia no cambia las frecuencias

alélicas ni genotípicas de un determinado locus de una generación a otra (Cabrero y Camacho, 2002). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos se podría observar que dentro de la población no existen grandes cambios en las frecuencias alélicas y la heterocigosidad se estaría manteniendo de generación en generación.

A partir de los estadísticos F de Wright es posible efectuar comparaciones entre pares de poblaciones y establecer valores de diferenciación genética para cada locus (Eguiarte et al, 2010). El valor promedio de F_{ST} en el presente estudio fue de 0.175 (Tabla 3), valor mayor al obtenido en el estudio de Escalona et al., (2009) el cual fue de 0.127. Estos valores muestran que existe moderada diferencia en frecuencias alélicas entre los grupos. Por lo tanto se puede decir que existe intercambio de alelos entre los grupos de la población.

Otro valor calculado a partir de F_{ST} (siguiendo el modelo de Wright) es el número de migrantes efectivos (Nm) (Tabla 3). Este modelo de migración asume que una población grande se divide en muchos grupos dispersos geográficamente. Se reconoce que la migración se produce de tal forma que los migrantes pueden dispersarse con la misma probabilidad de cualquier grupo, independientemente de su situación geográfica (Barahona et al, 2008). El resultado de Nm en el presente estudio fue de 1.386, lo que indica que existe al menos un migrante por generación de cada grupo.

Los análisis usados para estimar la diversidad intergrupala de *P. unifilis* en el presente estudio fueron las distancias Nei y de Wright (F_{ST}). Los resultados de estos análisis variaron de un rango de 0.034 a 0.187 (distancias de Wright) (Tabla 6) y de 0.125 a 0.544 (distancias de Nei) (Tabla 7). Los valores obtenidos son bajos, por lo que se podría sugerir que existen distancias genéticas bajas entre la mayoría de los grupos, con excepción de los grupos de las playas 12, 13 y 14, cuyos valores sugieren una moderada diferenciación genética con la mayor parte de las playas (Tabla 6). De igual manera se puede observar en el dendrograma (Figura 7) y en el PCoA (Figura 8), los grupos de las playas 12 y 13 se agrupan de manera independiente en relación a las otras playas. Se puede sugerir que la falta de agrupación entre la mayoría de las playas, este relacionada con el comportamiento migratorio de *P. unifilis*.

7.4. Estructura poblacional

Para determinar la estructura poblacional se usó el software STRUCTURE 2.3.4, el cual aplica un método bayesiano basado en análisis probabilísticos que se utilizan ampliamente para la agrupación de datos genéticos (Pritchard et al., 2000). De acuerdo al número de clusters (K) dado, suponiendo un equilibrio de Hardy-Weinberg y un equilibrio de ligamiento dentro de los grupos, STRUCTURE calcula frecuencias alélicas en cada grupo y la composición genética para cada individuo, generando resultados para la estructura poblacional (Pritchard et al., 2000).

El resultado de K2 obtenido en el presente estudio (Figura 9) sugiere una división de dos grupos. El primer grupo está compuesto por las playas 1, 2, 3, 6, 11 (Playas ubicadas al oeste de la EBT), 4 y 14 (ubicadas al este de la EBT) (Ver mapa Figura 1). Mientras que el otro grupo está formado por las playas 12 y 13 (ubicadas al este de la EBT). Los resultados son consistentes con la distribución geográfica de las playas muestreadas, con excepción de las playas 4 y 11, las cuales se encuentran cercanas a las playas 12 y 13. Se esperaría un único agrupamiento de las playas mencionadas. Sin embargo, aunque las playas 4 y 11 se encuentren ubicadas al este de la EBT, genéticamente se agrupan con las playas que se encuentran al oeste de la EBT. Esta diferencia de agrupamiento sugiere la presencia de dos líneas ancestrales en la población. Es probable que exista una línea ancestral diferente para los dos agrupamientos. Sin embargo, para poder reforzar esta información, es necesario un estudio genético de toda la población y de las posibles poblaciones presentes en la región del río Tiputini. Es importante también, tomar en cuenta los movimientos migratorios de *P. unifilis* en la EBT.

En un estudio previo se ha comprobado la diferencia entre poblaciones que se encuentran en un mismo río, resultado que refleja el aislamiento por distancias debido al ambiente variable del río (Escalona et al, 2008). Se esperaría que la estructura observada en los resultados, haya sido causada por repiquetes de río, los cuales causan pérdidas

de playas, forzando la migración de las tortugas. En un estudio realizado por Bock et al (1998) con radiotelemetría, se analizaron los desplazamientos de tres hembras de *P. unifilis*, el estudio sugiere que las hembras pueden abandonar sus nidos cuando existen inundaciones en el lugar de la puesta, trasladándose a otros sitios. Se registró también la distancia más larga de migración, la cual fue de 11km. De acuerdo al estudio de Bock et al (1998), se puede decir que existe la posibilidad de que algunos individuos hembras hayan migrado desde el oeste hacia el este (playas 4 y 11) (Ver distancias entre playas: Tabla 1), explicando así la estructura poblacional que se observa en los resultados. Bock et al (1998) enfatiza que la inundación de los ríos puede ocasionar la migración y/o creación de nuevos grupos.

No se sabe con exactitud cuál es la época seca o lluviosa en la zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini. Por lo general las estaciones de la provincia de Orellana donde se encuentra ubicada la EBT son: seca de Diciembre a Marzo e inundada de Marzo a Noviembre (Cisneros-Hereida, 2005; Grefa, 2006). No obstante, es necesario tener información adicional para poder entender de manera más completa la estructura poblacional de *P. unifilis* en la EBT.

8. Conclusiones

- De los 10 pares de primers microsátélites escogidos para el presente estudio 9 fueron exitosos en su amplificación.
- Existe un nivel alto de diversidad genética en los grupos de *P. unifilis*. Diversidad representada en los valores de heterocigosidad ($H_e = 0,525$) y el índice de Shannon ($I = 0,944$).
- Se observó que el 12% de la diversidad encontrada pertenece a la diversidad intergrupala y el 88% a la diversidad intragrupal.
- Los resultados del índice de fijación (F) o coeficiente de consanguinidad (-0.147), sugieren que existen cruces al azar entre los individuos de la población.
- Con el valor de migrantes efectivos ($N_m = 1.38$) se determinó la probabilidad de que exista un migrante de cada grupo en cada generación.
- Los métodos de distancias genéticas (F_{ST} , PCoA y Neighbor Joining) muestran poca estructura genética, con excepción de dos grupos (Playas 12 y 13) que se agrupan entre si. Estos resultados sugieren que existe constante movimiento de los individuos dentro de la población.
- De acuerdo al comportamiento poliándrico de las hembras de *P. unifilis* se podría explicar la alta diversidad genética entre individuos.
- Se determinó la estructura poblacional de *P. unifilis* mediante inferencia bayesiana, donde los resultados indican la presencia de dos líneas ancestrales diferentes.

9. Recomendaciones

- Es necesario que en los estudios de manejo de esta especie, la liberación de neonatos se haga en las mismas playas donde se realizó la recolección de los huevos, para poder analizar la estructura poblacional original.
- Se recomienda realizar un estudio de diversidad genética de las próximas generaciones para poder relacionarlo con los resultados obtenidos en este estudio y así tener un mejor conocimiento sobre la situación actual de la especie en la población de la EBT.
- Se recomienda realizar estudios de diversidad genética, presencia de múltiple paternidad y cuellos de botella de otras poblaciones de *P. unifilis* en el Ecuador, para saber cuál es el estado de esta tortuga en el país.
- Realizar estudios sobre los movimientos de las tortugas hembras juveniles y adultas y de los machos en edad reproductiva, para poder comprender mejor el comportamiento de la especie en este tema.

10. Bibliografía

- [1] Barahona, A., Eguiarte, L., Salas, R., Rocha Olivares, A., y Piñero, D. (2008). *La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México*. Capital natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad , I, 415-435.
- [2] Barbadilla, A. (2010), *La Genética de Poblaciones*, en línea. citado marzo 22 de 2015. *<http://158.109.215.191/base/base.asp?sitio=geneticapoblacionesanar=concep>.
- [3] Bock, B. C., Páez, V. P., y Pérez , N. F. (1998). *Estudio preliminar con radiotele-metría sobre los desplazamientos de hembras de las tortuga Podocnemis unifilis en el río Caquetá, Amazonas, Colombia*. Actual. Biol , 20 (68), 29-36.
- [4] Bock, B. C., Páez, V. P., y White, M. M. (2001). *Genetic Population Structure of Two Threatened South American River Turtle Species, Podocnemis expansa and Podocnemis unifilis*. Chelonian Conservation and Biology , 4 (1), 1-6.
- [5] Cabrero, J. y Camacho, J. (2002). *Capítulo 6: Fundamentos de genética de poblaciones*.pp: 84 - 126. Recuperado el 3 de Enero de 2015, de: <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1808>.
- [6] Campos, A. C. (2012). *ReptiliaWebEcuador*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2014, de Podocnemis unifilis: * <http://www.sesbe.org/sites/sesbe.org/files/recursos-sesbe/fundamentos.GdeP.pdf>.
- [7] Carvajal, P., Miranda, G., y Wallace, R. (2011). *Parámetros reproductivos de Podocnemis unifilis en el Río Beni, Bolivia*. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental , 29, 23-32.
- [8] Casalla Daza, R. H. (2003). *Medición de distancias genéticas en poblaciones de camaron blanco Litopenaeus vannamei en la costa ecuatoriana*. Tesis, Guayaquil.
- [9] Cevallos, C. P. (2000). *Tortugas (Testudinata) Marinas y Continentales de Colombia*. Biota Colombiana , 1 (2), 187-194.
- [10] Cisneros-Hereida, D. F. (2005). *Turtles of the Tiputini Biodiversity Station with*

remarks on the diversity and distribution of the Testudines from Ecuador. *Biota Neotropical* , 6 (1), 1-16.

- [11] Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A., y Souza, V. (2010). *Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Ecología Evolutiva, Mexico DF.
- [12] Escalona, T., Engstrom, T. N., Hernandez, O. E., Bock, B. C., Vogt, R. C., y Valenzuela , N. (2008). *Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, Podocnemis unifilis, inferred from microsatellite DNA data*. Recuperado el 7 de septiembre de 2013, de Tibusay Escalona Publications: <http://www.public.iastate.edu/escalona/pdfs/Escalona-et-al-2009.pdf>.
- [13] Escalona, T., Valenzuela, N., y Adams, D. C. (2009). *Nesting ecology in the freshwater turtle Podocnemis unifilis: spatiotemporal patterns and inferred explanations*. *Functional Ecology* , 23, 826-835.
- [14] Escalona, T., Conway, K., Morales, M., Arbeláez, F., y Antelo, R. (2012). *Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia, Podocnemis unifilis*. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros continentales de Colombia. pp: 387 - 399.
- [15] Fachin Terán, A., y Matheus von Mülhen, E. (2003). *Reproducción de la Taricaya Podocnemis unifilis Troschel 1848 (Testudines: Podocnemididae) en la várzea del medio Solimões, Amazonas, Brasil*. *Ecología Aplicada* , 2 (001), 125-132.
- [16] Fachin Terán, A., Vogt, R. C., y Soares Gomez, M. d. (1995). *Food Habits of an Assemblage of Five Species of Turtles in the Rio Guapore, Rondonia, Brasil*. *Journal of Herpetology* , 29 (4), 536-547.
- [17] Fachin Terán, A., y Vogt, R. C. (2004). *Estrutura populacional, tamanho e razao sexual de Podocnemis unifilis (Testudines, Podocnemididae) no rio Guaropé (RO), norte do Brasil*. *Phyllomedusa*, 3 (1), 29-42.
- [18] Fantin, C., Carvalho, C. F., Hrbek, T., Sites JR, J. W., Monjeló, L., Astolfi-Filhos, S., y otros. (2007). *Microsatellite DNA markers for Podocnemis unifilis, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle*. *Molecular Ecology Notes* (7), 1235-1238.

- [19] Fantin, C., Santos Viana, L., dos Santos Monjeló, L. A., y Farias, I. P. (2008). *Polyanidry in Podocnemis unifilis (Pleurodira; Podocnemididae), the vulnerable yellow-spotted Amazon River turtle*. *Amphibia-Reptilia* (29), 479-486.
- [20] Ferrara, C.R., y Souza - Lima, R.S. (2012). *Turtle Vocalizations as the first evidence of Posthatching Parental care in Chelonians*. *Journal of Comparative Psychology*. Advance online publication. doi: 10.1037/a0029656.
- [21] Grefa, J. (2006). *Colección e Incubación de huevos de Charapa (Podocnemis unifilis) en la zona de influencia de la Estación de Biodiversidad Tiputini (USFQ)*. Tesis, Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- [22] Glowka, L. et al., (1996). *Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. UICN Gland y Cambridge. xii, 179pp. 3.5mm
- [23] Jakobsson, M., Rosenberg N.A. (2007). *CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure*. *Bioinformatics* 23: 1801-806.
- [24] Kashiwagi, T., Broderick, D., Lance, S., Bennett, M., Ovenden, J. (2012). *Development and characterization of ten microsatellite loci for the reef manta ray Manta alfredi*. *Conservation Genet Resour*, Author's personal copy. DOI 10.1007/s12686-012-9705-7.
- [25] Langridge, P., y Chalmers, K. (2005). *The Principle: Identification and Application of Molecular Markers*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* , 55, 3-7.
- [26] Londoño, J. M. (2011). *Estructura poblacional y Diversidad genética de Frijol común (Phaseolus vulgaris L) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes*. Tesis, Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias básicas y Tecnológicas, Armenia.
- [27] Morjan, C., y Valenzuela, N. (2001). *Is Ground-Nuzzling by Female Turtles Associated with Soil Surface Temperatures?* *Journal of Herpetology* , 35 (4), 668-672.
- [28] Nei, M. (1973). *Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* , 70 (12), 3321-3323.
- [29] Neill, W. T. (1965). *Notes on the five amazonian Species of Podocnemis (Testudinata: Pelomedusidae)*. *Herpetologica* , 21 (4), 287-294.

- [30] New England Biolabs. (2014). Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase. <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>.
- [31] Ojango, J. M., Mpofo, N., Marshall, K., y Andersson-Eklund, L. (2011). *Quantitative methods to improve the understanding and utilization of animal genetic resources*. Animal Genetics Training Resource , 3, 1-39.
- [32] Peakall, R., Smouse, P. (2012) *GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research - an update. Bioinformatics.
- [33] Pearse, D. E., Arndt, A. D., Valenzuela, N., Miller, B. A., Cantarelli, V., y Sites Jr, J. W. (2006). *Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, Podocnemis expansa (Chelonia; Podocnemididae)*. Molecular Ecology (15), 985-1006.
- [34] Perrier, X., Jacquemoud-Collet, JP. (2006). *DARwin software*. [http://darwin.cirad.fr/Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., Feldman, M. W. \(2002\). Genetic structure of human populations. Science 298: 2381 ?2385](http://darwin.cirad.fr/Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., Feldman, M. W. (2002). Genetic structure of human populations. Science 298: 2381 ?2385).
- [35] Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly. P. (2000) *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics 155: 945 ?959.
- [36] Rankham, R., Ballou, J., y Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- [37] Rentaría Alcántara, M. (2007). *Breve Revisión de los Marcadores Moleculares*. En L. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre, Ecología Molecular (Vol. 1, pág. 594). México DF, México: Instituto Nacional de Ecología.
- [38] Rivera, M. (2010). *Análisis de una estrategia de conservación para Podocnemis unifilis en la Estación de Biodiversidad Tiputini*. Tesis, Universidad San Francisco de Quito, Cociba, Quito.
- [39] Rogers y A.M. Montalvo (2004). *Genetically appropriate choices for plant materials*

to maintain biological diversity. D.L. University of California. Report to the USDA Forest Service, Rocky Mountain Region, Lakewood, CO. Online.

- [40] Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., y Feldman, M. W. (2002). *Genetic structure of human populations*. Science 298: 2381 Ú 2385.
- [41] Soini, P. (1994). *Ecología Reproductiva de la Taricaya (Podocnemis unifilis) en el río Pacaya, Perú*. Folia Amazonica , 6 (1-2), 111-133.
- [42] de Souza, R. R., y Vogt, R. C. (Diciembre de 1994). Incubation Temperature Influences Sex and Hatchling Size in the Neotropical Turtle Podocnemis unifilis. Journal of Herpetology, 28, 453-464. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/1564958>.
- [43] Van Dyke, F. (2008). Conservation Biology. Foundations, concepts, applications (2 ed.). Springer.

11. Tablas

Distancia (km)	<i>Playa 1</i>	<i>Playa 2</i>	<i>Playa 3</i>	<i>Playa 6</i>	<i>Playa 8</i>	<i>Playa 14</i>	<i>EBT</i>	<i>Playa 4</i>	<i>Playa 13</i>	<i>Playa 11</i>	<i>Playa 10</i>
<i>Playa 1</i>		3.15	6.04	6.92	9.59	9.96	11.21	27.22	32.10	33.35	35.56
<i>Playa 2</i>	3.15		2.89	3.77	6.44	6.81	8.06	24.07	28.95	30.20	32.41
<i>Playa 3</i>	6.04	2.89		0.88	3.55	3.92	5.17	21.18	26.06	27.31	29.52
<i>Playa 6</i>	6.92	3.77	0.88		2.67	3.04	4.29	20.30	25.18	26.43	28.64
<i>Playa 8</i>	9.59	6.44	3.55	2.67		0.37	1.62	17.63	22.51	23.76	25.97
<i>Playa 14</i>	9.96	6.81	3.92	3.04	0.37		1.25	17.26	22.14	23.39	25.60
<i>EBT</i>	11.21	8.06	5.17	4.29	1.62	1.25		16.01	20.89	22.14	24.35
<i>Playa 4</i>	27.22	24.07	21.18	20.30	17.63	17.26	16.01		4.88	6.13	8.34
<i>Playa 13</i>	32.10	28.95	26.06	25.18	22.51	22.14	20.89	4.88		1.25	3.46
<i>Playa 11</i>	33.35	30.20	27.31	26.43	23.76	23.39	22.14	6.13	1.25		2.21
<i>Playa 12</i>	35.56	32.41	29.52	28.64	25.97	25.60	24.35	8.34	3.46	2.21	

Tabla 1: Distancias en km entre los grupos estudiados. Las playas numeradas pertenecen a los grupos muestreados en este estudio.

	Locus	Accession number	Secuencia en el GenBank (5'-3')	Tamaño (pb)	T °C	No. Alelos	% de Acrilamida
1	Pumi_1A5	EF455680	F-5'-TCTTCAGCGTTGTGGTCTCG-3' R-5'-GAGGGGAAAGACGACAATGA-3'	138-188	69	7	6
2	Pumi_1B2	EF455681	F-5'-GTAGTGGCACTGGACAAAAT-3' R-5'-CCACTGTCAACATCTCTGAAAC-3'	325-351	59	5	4
3	Pumi_1B11	EF455682	F-5'-CCAGACCTCTCCTGTTTGGG-3' R-5'-GGTTCTGGGCTCCTTACACA-3'	247-269	64	3	4
4 ^a	Pumi_1C3	EF455683	F-5'-CCCTACCGAAACAGCTGTGT-3' R-5'-ATCTGGCTTGGAGCTGTGT-3'	164-200		0	
5	Pumi_1D9	EF455686	F-5'-GCTGGGGAACCTGACTACCT-3' R-5'-CACGAGGTAGGAATGCCCTGT-3'	115-139	69	5	6
6	Pumi_1E1	EF455689	F-5'-GGCCTCTACTGTCTGAAAGTCC-3' R-5'-GAAAGGAGAGCTCCAGGTGAA-3'	167-210	64-68	5	6
7	Pumi_1H9	EF455692	F-5'-GGGGCTACAGAGAAGGAGAA-3' R-5'-ATTTATATGGGCCCCCTACC-3'	153-173	64	5	6
8	Pumi_2A9	EF455693	F-5'-CTGTTCCCAACAGCTGAGAG-3' R-5'-GGTCCCTCAAGAAAGCCCCAAA-3'	143-165	56	10	6
9	Pumi_2C11	EF455694	F-5'-AAGGTGCCCTGGAGAATAGGA-3' R-5'-TGCACCCCTTCCATTTAAGC-3'	253-269	63	7	4
10	Pumi_2E7	EF455697	F-5'-CTGGACCCATATGCAGTGAC-3' R-5'-CACTTGAGCTTCTGAGGGAGA-3'	242-264	68	5	4

^aprimer se descartó en el presente estudio por fallas en la amplificación de bandas en el tamaño esperado.

^bInformación tomada de Fantin et al. (2007).

Tabla 2: Información de los 10 microsátélites seleccionados para el presente estudio: rango de tamaño de los alelos encontrados, temperatura de annealing, número de alelos encontrados y porcentaje del gel de acrilamida que se usó para cada locus.

<i>Locus</i>	<i>No. Alelos</i>	<i>Tamaño (Pb)</i>	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm
Puni_1A5	7	133-188	-0.187	0.026	0.180	1.142
Puni_1B2	5	325-351	-0.164	-0.064	0.086	2.654
Puni_1B11	3	247-269	-0.265	-0.104	0.127	1.719
Puni_1D9	5	115-139	0.720	0.803	0.299	0.585
Puni_1E1	5	168-191	-0.120	0.040	0.143	1.499
Puni_1H9	5	153-173	-0.117	0.113	0.205	0.967
Puni_2A9	10	143-165	-0.287	0.051	0.262	0.702
Puni_2C11	7	253-269	-0.201	-0.061	0.117	1.894
Puni_2E7	5	242-264	-0.314	-0.104	0.160	1.313
Total Alelos	52	-	-	-	-	-
Mean	-	-	-0.104	-0.078	0.175	1.386

Tabla 3: Índices de fijación entre los grupos de *Podocnemis unifilis* dado por 9 loci microsatélites calculados por el software GenALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2012). Descripción: bp: pares de bases. Estadísticos de F: correlación de los genes de varios individuos con los de la población total (F_{IT}); correlación de los genes de los individuos con los del grupo (F_{IS}); correlación de los genes de un grupo con los de la población total (F_{ST}); número de migrantes efectivos (Nm). F_{IT} y F_{IS} deben ser negativos, mientras que F_{ST} no. El grado de diferenciación genética entre subpoblaciones puede ser calculado por F_{ST} (Nei, 1973).

	N	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
Media	7.300	3.378	2.497	0.944	0.599	0.525	-0.147
Error Estándar	0.190	0.140	0.104	0.046	0.034	0.023	0.042

Tabla 3: Parámetros de diversidad genética de *Podocnemis unifilis* obtenidos usando el software GenALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2012). N : número promedio muestras; N_a : número promedio de alelos observados por locus; N_e : número promedio de alelos efectivos observados por locus; I : índice de Shannon; H_o : heterocigosidad observada; H_e : heterocigosidad esperada; F : índice de fijación.

	<i>Locus1</i>	<i>Locus2</i>	<i>Locus3</i>	<i>Locus4</i>	<i>Locus5</i>	<i>Locus6</i>	<i>Locus7</i>	<i>Locus8</i>	<i>Locus9</i>
Na	4.100	4.200	2.200	2.400	3.000	3.200	4.000	4.200	3.100
Ne	3.005	3.232	1.704	1.708	1.955	2.660	3.096	2.977	2.133
Ho	0.761	0.798	0.479	0.088	0.466	0.659	0.763	0.773	0.609
He	0.641	0.686	0.378	0.312	0.416	0.590	0.592	0.644	0.463
F	-0.202	-0.170	-0.230	0.716	-0.120	-0.158	-0.315	-0.207	-0.320
HW	0.390	0.353	0.552	0,049 ^a	0.567	0.249	0.326	0.521	0.473

^a $P < 0.05$; no existe equilibrio para este locus.

Tabla 5: Parámetros de diversidad genética de los 9 loci analizados en *Podocnemis unifilis* obtenidos usando el software GenALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2012). Na: número promedio de alelos observados por locus; Ne: número promedio de alelos efectivos observados por locus; Ho heterocigosidad observada; He heterocigosidad esperada; F: índice de fijación. HW equilibrio de Hardy Weinberg. Existen diferencias significativas entre frecuencias genotípicas observadas y esperadas.

<i>Playa 1</i>	<i>Playa 2</i>	<i>Playa 3</i>	<i>Playa 4</i>	<i>Playa 6</i>	<i>Playa 8</i>	<i>Playa 11</i>	<i>Playa 12</i>	<i>Playa 13</i>	<i>Playa 14</i>	
0.000										<i>Playa 1</i>
0.052	0.000									<i>Playa 2</i>
0.034	0.044	0.000								<i>Playa 3</i>
0.044	0.066	0.050	0.000							<i>Playa 4</i>
0.084	0.081	0.063	0.113	0.000						<i>Playa 6</i>
0.079	0.074	0.079	0.095	0.104	0.000					<i>Playa 8</i>
0.077	0.055	0.059	0.097	0.112	0.079	0.000				<i>Playa 11</i>
0.112	0.115	0.092	0.132	0.107	0.160	0.169	0.000			<i>Playa 12</i>
0.129	0.126	0.121	0.187	0.127	0.148	0.152	0.155	0.000		<i>Playa 13</i>
0.129	0.111	0.118	0.172	0.149	0.138	0.146	0.182	0.168	0.000	<i>Playa 14</i>

Tabla 6: Matriz de distancias genéticas de Wright (F_{ST}) entre individuos de los 10 grupos de *Podocnemis unifilis* en el rango de 35.56 km en la EBT. Valores entre 0.00 y 0.05 sugieren baja diferenciación genética; valores entre 0.05 y 0.15 sugieren moderada diferenciación genética; valores entre 0.15 y 0.25 sugieren alta diferenciación genética; y valores superiores a 0.25 sugieren diferenciación genética muy alta (Wright, 1978).

<i>Playa 1</i>	<i>No.Playa 2</i>	<i>Playa 3</i>	<i>Playa 4</i>	<i>Playa 6</i>	<i>Playa 8</i>	<i>Playa 11</i>	<i>Playa 12</i>	<i>Playa 13</i>	<i>Playa 14</i>	
0.000										<i>Playa 1</i>
0.160	0.000									<i>Playa 2</i>
0.127	0.125	0.000								<i>Playa 3</i>
0.161	0.169	0.170	0.000							<i>Playa 4</i>
0.238	0.168	0.156	0.286	0.000						<i>Playa 6</i>
0.294	0.248	0.293	0.330	0.292	0.000					<i>Playa 8</i>
0.271	0.194	0.194	0.327	0.289	0.267	0.000				<i>Playa 11</i>
0.297	0.234	0.204	0.306	0.232	0.428	0.452	0.000			<i>Playa 12</i>
0.346	0.303	0.328	0.544	0.326	0.443	0.410	0.292	0.000		<i>Playa 13</i>
0.334	0.274	0.317	0.473	0.361	0.360	0.404	0.343	0.377	0.000	<i>Playa 14</i>

Tabla 7: Matriz de distancias genéticas de Nei entre individuos de los 10 grupos de *Podocnemis unifilis* en el rango de 35.56 km en la EBT. El rango de las distancias genéticas de Nei va de 0 a 1, donde 0 representa identidad absoluta y 1 representa distancia absoluta.

K	Reps	Mean lnP(K)	Stdev LnP(K)	$Ln'(K)$	$ ln''(K) $	Delta K
1	15	-1706.06	0.50	-	-	-
2	15	-1623.75	1.07	82.31	55.16	51.31
3	15	-1596.61	8.72	27.15	9.71	1.11
4	15	-1579.17	24.46	17.43	6.15	0.25
5	15	-1555.59	11.37	23.59	-	-

Tabla 8: Valores de estimación del valor K óptimo (método de Evano et al., 2005) a partir del análisis en el software Structure de las 73 muestras de *P. unifilis*. Descripción. K: número de agrupaciones probado. Reps: número de repeticiones realizadas para el K probado. Media $Ln(K)$: valor promedio del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. Stdev $LnP(K)$: Desviación estandar del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. $Ln'(K)$: derivada de primer orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K. $|Ln''(K)|$: derivada de segundo orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K.

12. Figuras

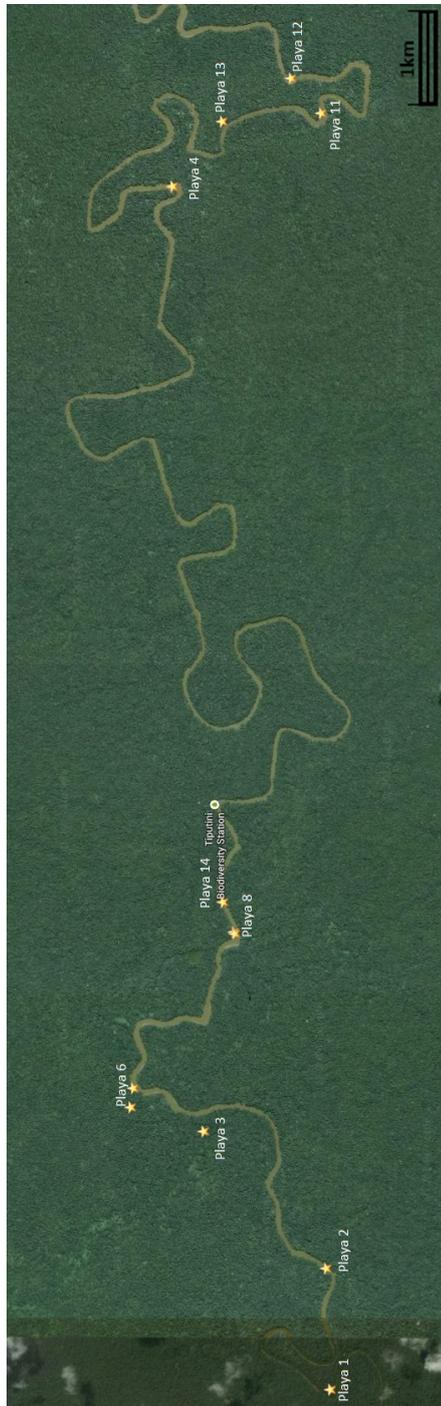


Figura 1: Mapa de la distribución de subpoblaciones muestreadas para este estudio.

Las playas codificadas con números pertenecen al grupo de playas muestreadas para el presente estudio.

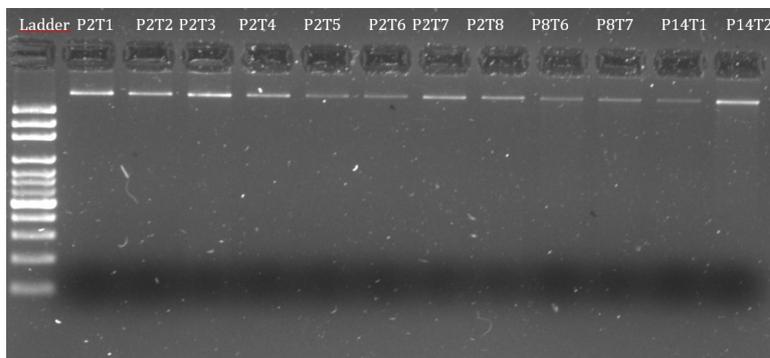


Figura 2: Muestras de ADN extraído a partir de escudos de caparazón de *P. unifilis*. Se observa ADN de alto peso molecular en todas las muestras. Ladder: marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

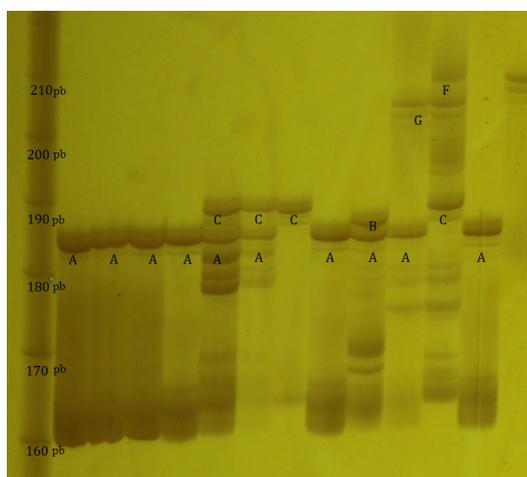


Figura 3: Los productos de amplificación de regiones microsatélite de 12 muestras de ADN de *P. unifilis* usando el primer Puni_1E1 (Primer 6). Se observan 5 alelos (A,B,C,F y G). De estos alelos 2 (F y G) son los alelos nuevos que se encontraron en este locus. Los alelos se encuentran en un rango de 167 a 210 pares de bases. El ladder usado es de 10bp de Invitrogen.



Figura 4: Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 12 muestras de ADN de *P. unifilis* usando el primer Puni_1H9 (Primer 7). Se observan 5 alelos en las muestras analizadas (A-E). Los alelos se encuentran en un rango de 153 a 173 pares de bases. El ladder usado es de 10 bp de Invitrogen.

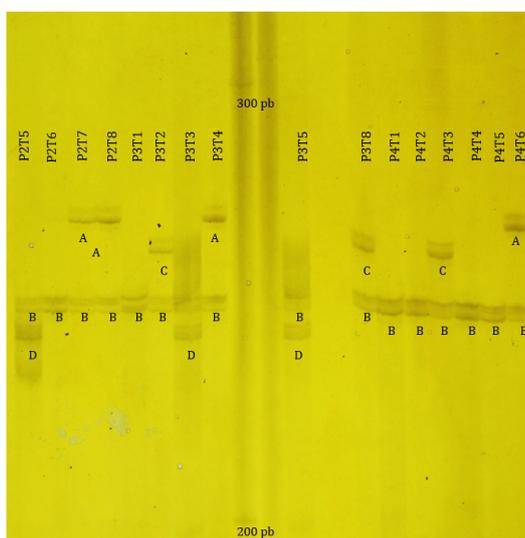


Figura 5: Electroforesis en gel de acrilamida al 4% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 16 muestras de ADN de *P. unifilis* usando el primer Puni_2E7 (Primer 10). Se observan 4 alelos en las muestras analizadas (A-E). Los alelos se encuentran en un rango de 242 a 264 pares de bases. El ladder usado es de 10 y 100 bp de Invitrogen.

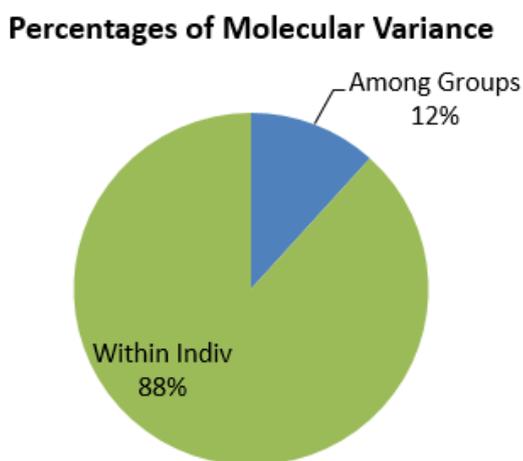


Figura 6: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) representada en función de la distribución de la diversidad genética de *Podocnemis unifilis* entre 10 grupos que se encuentran en un rango de 35.56 km dentro de la zona de la EBT. La variación entre grupos representa la diferenciación genética de los individuos de *P. unifilis* entre los 10 grupos muestreados. La variación dentro de los grupos indica la diferenciación genética entre los individuos de *P. unifilis* en la EBT.

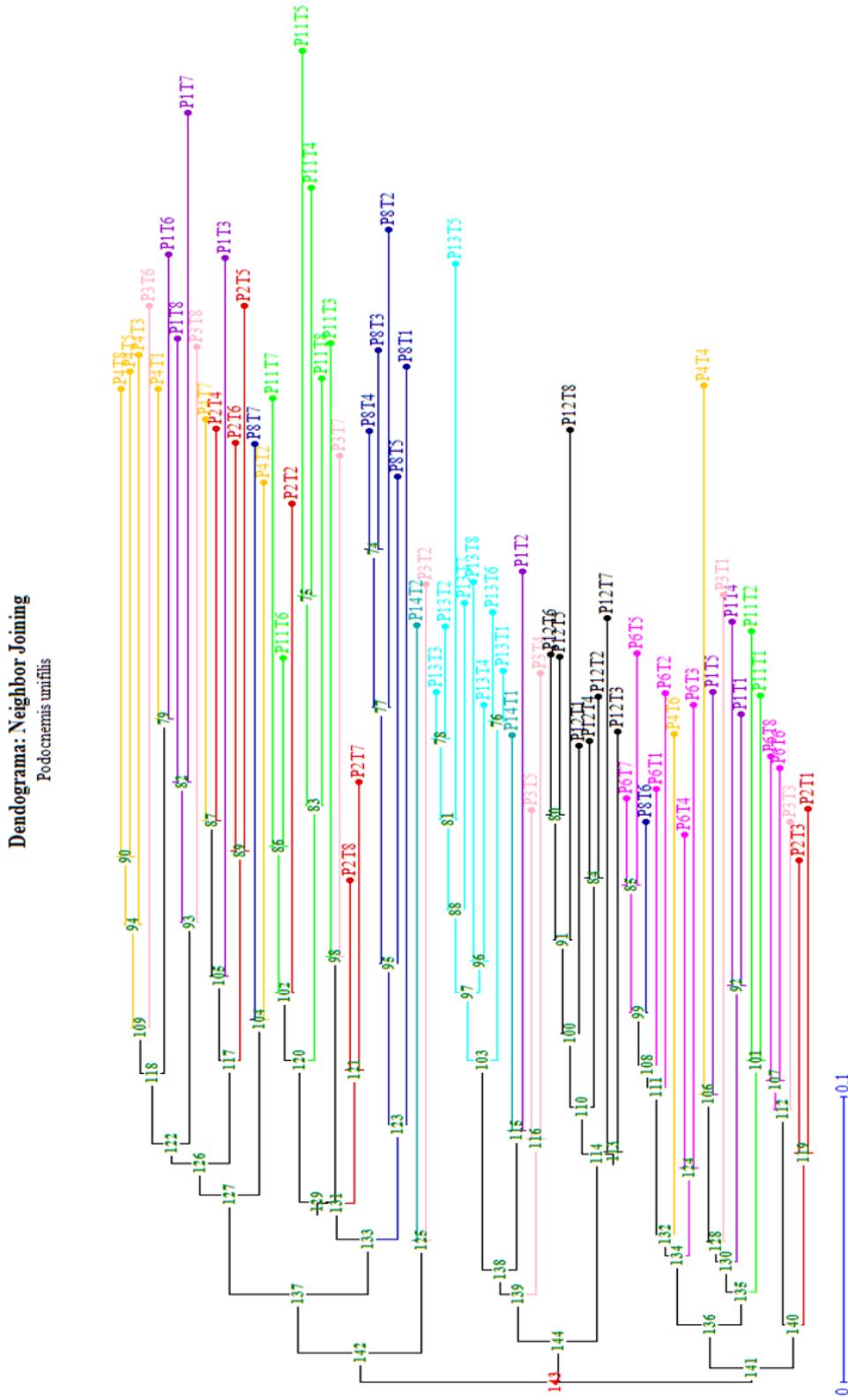


Figura 7: Dendrograma obtenido con el software DARwin mediante el método de Neighbor Joining con 73 muestras de *P. unifilis* de 10 grupos ubicadas dentro de la zona de la EBT. Se observa 3 grandes subgrupos separados donde se mezclan todos los individuos de distintos grupos. Sin embargo, se observa un subgrupo donde se encuentran las playas 12 (color negro) y 13 (color azul); dentro del subgrupo de la playa 13 se encuentran pocos individuos de otros grupos, mientras que la playa 12 no se mezcla con ningún individuo de otras playas.

Análisis Factorial de coordenadas principales (PCoA)

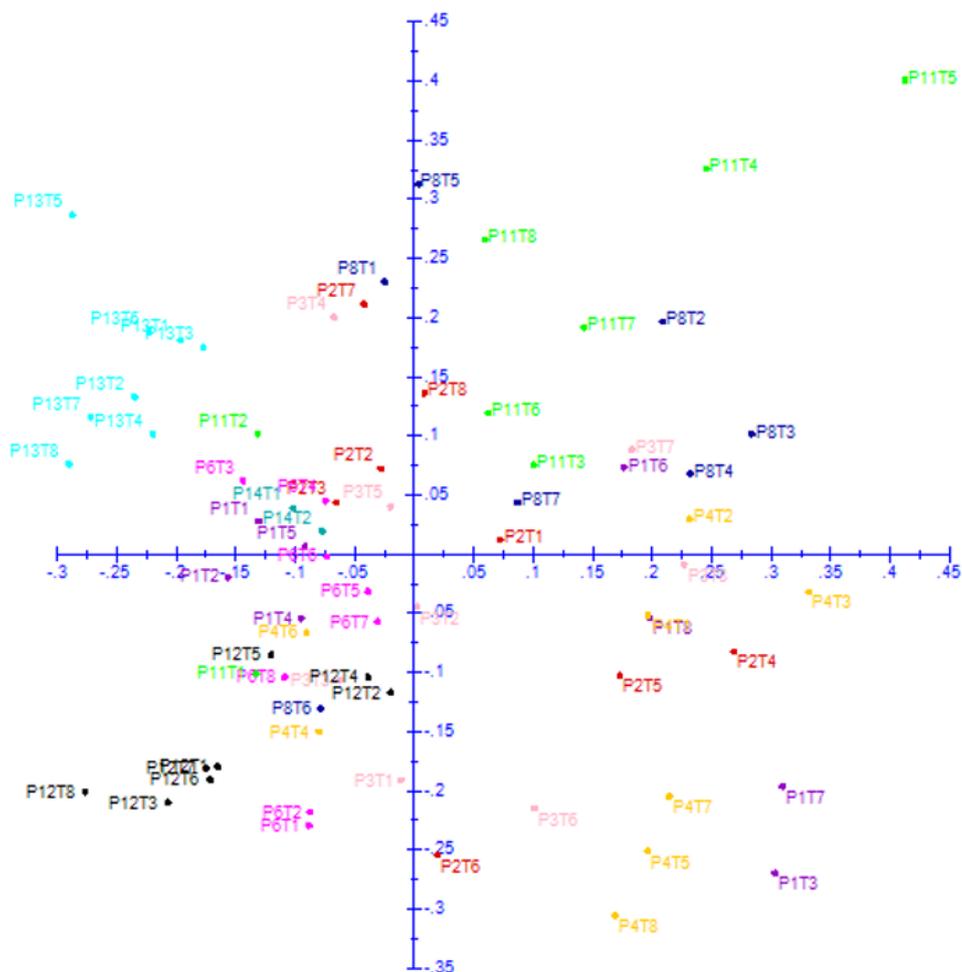


Figura 8: Análisis de componentes principales (PCoA) obtenido a partir de una matriz de disimilitud con 73 muestras de *P. unifilis* de 10 grupos ubicados dentro de la zona de la EBT. Se observa a todos los individuos dispersos en el plano, sin una separación clara, exceptuando los grupos de la Playa 12 (color negro) que se separa en el cuadrante inferior izquierdo; la Playa 13 (color azul) ubicada en el cuadrante superior izquierdo y la Playa 11 (color verde) donde se observa una pequeña tendencia a separarse en el cuadrante superior derecho.

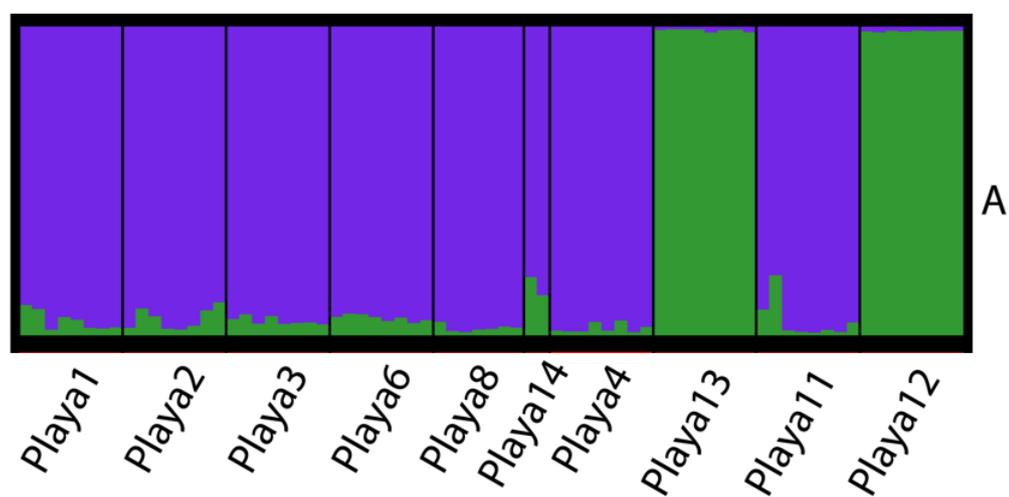


Figura 9: Determinación del número de grupos ancestrales para los individuos de *P. unifilis* dentro del área de la Estación de Biodiversidad Tiputini. (A) está representando una análisis de grupos con un valor óptimo de K2.

13. Anexos

Anexo 1: Muestras de *P. unifilis*

<i>Número</i>	<i>Nomenclatura para el estudio</i>	<i>Playa</i>	<i>Nido</i>	<i>Numeración original</i>
1	P1T1	1	1	12
2	P1T2	1	2	11
3	P1T3	1	3	17
4	P1T4	1	4	27
5	P1T5	1	4	4
6	P1T6	1	5	7
7	P1T7	1	7	13
8	P1T8	1	7	8
9	P2T1	2	1	1
10	P2T2	2	1	5
11	P2T3	2	1	10
12	P2T4	2	1	7
13	P2T5	2	1	12
14	P2T6	2	1	9
15	P2T7	2	1	4
16	P2T8	2	1	11
17	P3T1	3	1	12
18	P3T2	3	1	17
19	P3T3	3	2	1
20	P3T4	3	2	8
21	P3T5	3	3	6
22	P3T6	3	3	1
23	P3T7	3	1	7
24	P3T8	3	2	3
25	P4T1	4	1	3
26	P4T2	4	2	2
27	P4T3	4	3	10
28	P4T4	4	4	18
29	P4T5	4	5	14
30	P4T6	4	6	2
31	P4T7	4	8	7
32	P4T8	4	4	11
33	P6T1	6	1	12
34	P6T2	6	1	7
35	P6T3	6	1	1
36	P6T4	6	1	2
37	P6T5	6	2	17
38	P6T6	6	2	8
39	P6T7	6	2	13
40	P6T8	6	2	25
41	P8T1	8	1	1
42	P8T2	8	1	2
43	P8T3	8	1	3
44	P8T4	8	1	6

<i>Número</i>	<i>Nomenclatura para el estudio</i>	<i>Playa</i>	<i>Nido</i>	<i>Numeración original</i>
45	P8T5	8	1	7
46	P8T6	8	1	8
47	P8T7	8	1	13
48	P11T1	11	1	2
49	P11T2	11	1	3
50	P11T3	11	1	18
51	P11T4	11	1	1
52	P11T5	11	4	12
53	P11T6	11	4	6
54	P11T7	11	4	2
55	P11T8	11	4	3
56	P12T1	12	1	12
57	P12T2	12	1	8
58	P12T3	12	1	6
59	P12T4	12	1	2
60	P12T5	12	1	4
61	P12T6	12	1	5
62	P12T7	12	1	9
63	P12T8	12	1	14
64	P13T1	13	1	6
65	P13T2	13	1	7
66	P13T3	13	1	14
67	P13T4	13	1	11
68	P13T5	13	1	16
69	P13T6	13	1	18
70	P13T7	13	1	9
71	P13T8	13	1	3
72	P14T1	14	2	2
73	P14T2	14	2	3

Anexo 2: Cuantificaciones de ADN extraído

<i>#</i>	<i>Sample ID</i>	<i>Nucleic Acid Conc.</i>	<i>Unit</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>	<i>Sample Type</i>
1	P1T1	8.40	ng/ μ l	2.59	0.28	DNA
2	P1T2	8.00	ng/ μ l	2.42	0.28	DNA
3	P1T3	6.30	ng/ μ l	2.77	0.24	DNA
4	P1T4	29.00	ng/ μ l	2.04	2.1	DNA
5	P1T5	15.80	ng/ μ l	1.82	5.83	DNA
6	P1T6	20.10	ng/ μ l	1.92	3.86	DNA
7	P1T7	2.30	ng/ μ l	2.70	-0.53	DNA
8	P1T8	9.20	ng/ μ l	2.13	0.44	DNA
9	P2T1	6.60	ng/ μ l	2.59	1.65	DNA
10	P2T2	4.50	ng/ μ l	3.31	1.00	DNA
11	P2T3	9.70	ng/ μ l	3.16	1.22	DNA
12	P2T4	4.60	ng/ μ l	3.62	1.36	DNA
13	P2T5	2.20	ng/ μ l	-24.20	0.50	DNA
14	P2T6	2.50	ng/ μ l	6.90	0.29	DNA
15	P2T7	6.60	ng/ μ l	2.77	0.32	DNA
16	P2T8	4.00	ng/ μ l	4.48	0.75	DNA
17	P3T1	1.70	ng/ μ l	2.95	-0.23	DNA
18	P3T2	3.90	ng/ μ l	2.13	-0.78	DNA
19	P3T3	4.40	ng/ μ l	2.29	-3.16	DNA
20	P3T4	8.50	ng/ μ l	1.72	3.08	DNA
21	P3T5	13.80	ng/ μ l	1.84	1.70	DNA
22	P3T6	7.80	ng/ μ l	1.70	2.59	DNA
23	P3T7	22.60	ng/ μ l	1.79	1.54	DNA
24	P3T8	17.40	ng/ μ l	1.87	1.78	DNA
25	P4T1	5.10	ng/ μ l	2.47	0.19	DNA
26	P4T2	13.70	ng/ μ l	2.05	2.78	DNA
27	P4T3	23.40	ng/ μ l	1.83	1.83	DNA
28	P4T4	34.20	ng/ μ l	2.02	2.75	DNA
29	P4T5	4.90	ng/ μ l	2.63	0.18	DNA
30	P4T6	16.40	ng/ μ l	2.15	0.83	DNA
31	P4T7	15.60	ng/ μ l	2.06	2.63	DNA
32	P4T8	7.40	ng/ μ l	2.13	63.61	DNA
33	P6T1	7.80	ng/ μ l	1.75	2.29	DNA
34	P6T2	3.20	ng/ μ l	2.75	-0.89	DNA
35	P6T3	50.60	ng/ μ l	2.08	2.28	DNA
36	P6T4	5.63	ng/ μ l	1.49	1.95	DNA
37	P6T5	7.38	ng/ μ l	1.57	1.12	DNA
38	P6T6	11.53	ng/ μ l	1.79	1.29	DNA
39	P6T7	13.70	ng/ μ l	2.31	6.78	DNA
40	P6T8	13.30	ng/ μ l	1.87	3.64	DNA
41	P8T1	11.10	ng/ μ l	1.55	4.33	DNA
42	P8T2	13.30	ng/ μ l	1.91	3.32	DNA
43	P8T3	7.10	ng/ μ l	2.44	3.55	DNA
44	P8T4	6.30	ng/ μ l	2.39	-0.60	DNA

<i>#</i>	<i>Sample ID</i>	<i>Nucleic Acid Conc.</i>	<i>Unit</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>	<i>Sample Type</i>
45	P8T5	10.40	ng/ μ l	2.12	-2.93	DNA
46	P8T6	1.50	ng/ μ l	-11.85	0.29	DNA
47	P8T7	1.70	ng/ μ l	11.29	0.49	DNA
48	P11T1	5.30	ng/ μ l	1.52	-26.63	DNA
49	P11T2	6.10	ng/ μ l	1.53	1.11	DNA
50	P11T3	4.10	ng/ μ l	1.32	39.04	DNA
51	P11T4	28.30	ng/ μ l	1.98	1.36	DNA
52	P11T5	3.8	ng/ μ l	1.30	-5.82	DNA
53	P11T6	2.9	ng/ μ l	2.21	-0.58	DNA
54	P11T7	29.5	ng/ μ l	1.97	1.88	DNA
55	P11T8	24.3	ng/ μ l	2.01	1.87	DNA
56	P12T1	7.8	ng/ μ l	1.79	1.42	DNA
57	P12T2	5.30	ng/ μ l	1.50	1.21	DNA
58	P12T3	3.30	ng/ μ l	2.29	2.46	DNA
59	P12T4	3.70	ng/ μ l	1.58	1.60	DNA
60	P12T5	4.20	ng/ μ l	2.65	1.33	DNA
61	P12T6	11.80	ng/ μ l	2.27	6.92	DNA
62	P12T7	3.00	ng/ μ l	2.61	2.84	DNA
63	P12T8	8.70	ng/ μ l	1.96	2.06	DNA
64	P13T1	7.10	ng/ μ l	2.15	-4.57	DNA
65	P13T2	6.30	ng/ μ l	2.11	2.14	DNA
66	P13T3	4.40	ng/ μ l	2.22	-0.57	DNA
67	P13T4	2.70	ng/ μ l	2.80	-0.75	DNA
68	P13T5	4.90	ng/ μ l	1.89	2.85	DNA
69	P13T6	5.80	ng/ μ l	2.02	1.15	DNA
70	P13T7	4.90	ng/ μ l	2.05	1.14	DNA
71	P13T8	7.60	ng/ μ l	1.96	1.37	DNA
72	P14T1	2.70	ng/ μ l	2.59	0.30	DNA
73	P14T2	4.90	ng/ μ l	2.79	0.60	DNA

