

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis preliminar de diversidad genética de una población
de osos andinos (*Tremarctos ornatus*) identificados en el
Corredor Ecológico, al Noroccidente del Distrito
Metropolitano de Quito**

Proyecto de Investigación

María Gabriela Bruque Gutiérrez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de agosto de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Análisis preliminar de diversidad genética de una población de osos andinos (*Tremarctos ornatus*) identificados en el Corredor Ecológico, al Noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito

María Gabriela Bruque Gutiérrez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Firma del profesor

Quito, 4 de agosto de 2016

Derechos de Autor

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

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

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Gabriela Bruque Gutiérrez

Código: 00107083

Cédula de Identidad: 0925460628

Lugar y fecha: Quito, 4 de agosto de 2016

DEDICATORIA

A mi familia, por ser un apoyo incondicional en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal por el apoyo que recibí a lo largo de esta investigación

A la Secretaria de Ambiente, por haber proporcionado los fondos para la realización de este proyecto.

A Santiago Molina, por todo el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto y en el trabajo de campo.

A mis profesores, especialmente a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por permitirme ser parte de este trabajo y por su constante apoyo.

A mi familia y amigos por haberme acompañado a lo largo de mi carrera.

RESUMEN

El oso andino ha sido clasificado como una especie en estado vulnerable debido a la fragmentación y pérdida de hábitat. En especies en estado vulnerable o en peligro de extinción es necesario realizar estudios de diversidad genética para poder diseñar programas de conservación específicos y especializados para las necesidades de la población de estudio. Actualmente, existe poca información disponible acerca de la diversidad genética de las poblaciones de osos en Ecuador. El objetivo de este estudio fue identificar posibles haplotipos y determinar la diversidad genética de una población de oso andino al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito, por medio del análisis de la región D-loop del mtDNA. Para esto se extrajo ADN de muestras de pelo de 13 individuos obtenidas de forma no invasiva en 8 localidades. Se desarrolló un par de primers específicos para la región Hipervariable II (HVII) del D-loop del ADN mitocondrial. Se encontraron cinco haplotipos, H1 presente en dos individuos, H2 en siete, H3 en dos, H4 en uno y H5 en uno. Se identificaron 10 sitios polimórficos (S), todos fueron sustituciones, 5 transversiones y 5 transiciones. La diversidad de genes (H_d : Diversidad de haplotipos) fue alta = 0.7051 y la diversidad de nucleótidos (π) baja 0.01224. Estos datos pueden sugerir que la población de osos ha experimentado una expansión después de un cuello de botella reciente. Esto implicaría que ha pasado suficiente tiempo para recuperar la diversidad de haplotipos pero no suficiente tiempo para acumular mutaciones en las secuencias analizadas. La población de osos andinos del Noroccidente de Quito ha sufrido fragmentación de hábitat por la extensa actividad humana, sin embargo la información obtenida en esta investigación indica que la población todavía es capaz de reproducirse aunque tiene una diversidad de nucleótidos baja.

Palabras clave: *Tremarctos ornatus*, mtDNA, haplotipos, diversidad genética, diversidad de nucleótidos.

ABSTRACT

The Andean bear (*Tremarctos ornatus*) has been classified as a vulnerable species due to habitat fragmentation and habitat loss. In endangered species or species in vulnerable state, genetic diversity studies are necessary to design specific and specialized conservation programs to address the needs of the study population. Currently, there is limited information available about the degree of genetic diversity of Ecuadorian bear populations. The aim of this study was to identify possible haplotypes and to determine the genetic diversity of a population of Andean bears established in the Northwestern region of Distrito Metropolitano de Quito, by the analysis of the D-loop region of the mtDNA. For this purpose, DNA was extracted from hair samples of 13 individuals through non-invasive methods in 8 locations. A pair of primers was designed for the Hypervariable region II (HVII) of the D-loop from the mitochondrial DNA. Five haplotypes were found, H1 was present in two individuals, H2 in seven, H3 in two, H4 in one and H5 in one. Ten polymorphic sites (S) were identified, all of them were substitutions, 5 transitions y 5 transversions. Gene diversity (Hd: haplotype diversity) was high 0.7051 and the nucleotide diversity was low 0.01224. These data could suggest that the bear population has experienced an expansion after a recent bottleneck. Indicating that there has been enough time to recover the diversity of haplotypes, but not enough time to accumulate mutations in the analyzed sequences. The population of Andean bears of Northwestern Quito has suffered habitat fragmentation, but the information obtained in this study indicates that the population is still able to reproduce although it has a low nucleotide diversity.

Key words: *Tremarctos ornatus*, mtDNA, haplotypes, genetic diversity, nucleotide diversity.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	12
1.1	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE: CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA	12
1.2	BIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN	13
1.2.1	<i>Alimentación</i>	13
1.2.2	<i>Reproducción</i>	14
1.2.3	<i>Comportamiento</i>	15
1.2.4	<i>Distribución y hábitat</i>	15
1.3	CORREDOR ECOLÓGICO DEL OSO ANDINO	16
1.4	ANÁLISIS MOLECULARES.....	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GENERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	JUSTIFICACIÓN	19
4	ÁREA DE ESTUDIO	20
5	MATERIALES.....	21
5.1	EXTRACCIÓN ADN DE MUESTRAS DE PELO DE OSOS DE ANTEOJOS	21
5.2	CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	21
5.3	DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA LA REGIÓN D-LOOP DEL MTDNA DE <i>TREMARCTOS ORNATUS</i>	21
5.4	AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA B-ACTINA COMO CONTROL DE CALIDAD DEL ADN	22
5.5	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL MTDNA DE <i>TREMARCTOS ORNATUS</i> PARA ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	22
5.6	ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA PARA PURIFICAR LOS FRAGMENTOS DE LA REGIÓN D-LOOP AMPLIFICADOS	23
5.7	TINCIÓN DEL GEL CON NITRATO DE PLATA	23
5.8	EXTRACCIÓN DE BANDAS DEL GEL DE ACRILAMIDA	24
5.9	SECUENCIAMIENTO DE ADN Y EDICIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE LA REGIÓN D-LOOP	24
5.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	24
6	MÉTODOS	24
6.1	RECEPCIÓN DE MUESTRAS	24

6.2	EXTRACCIÓN DE ADN.....	25
6.3	CUANTIFICACIÓN DE ADN Y VISUALIZACIÓN EN GELES DE AGAROSA.....	26
6.4	DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA LA REGIÓN D-LOOP DEL MTDNA DE <i>TREMARCTOS ORNATUS</i>	26
6.5	AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA B-ACTINA COMO CONTROL DE CALIDAD DEL ADN	28
6.6	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL MTDNA DE <i>TREMARCTOS ORNATUS</i> PARA ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	29
6.7	ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA PARA PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE LA REGIÓN D-LOOP AMPLIFICADOS	29
6.8	EXTRACCIÓN DE BANDAS DE ACRILAMIDA Y REAMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS	31
6.9	SECUENCIAMIENTO DE ADN Y EDICIÓN DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN D-LOOP.....	31
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	32
7	RESULTADOS.....	33
7.1	IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS Y CALIDAD DEL ADN	33
7.2	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL MTDNA DE <i>TREMARCTOS ORNATUS</i>	34
7.3	DETERMINACIÓN DE HAPLOTIPOS Y RED DE HAPLOTIPOS	34
7.4	ESTIMACIÓN DE ÍNDICES DE DIVERSIDAD Y NEUTRALIDAD.....	35
8	DISCUSIÓN	36
8.1	CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE ADN	36
8.2	DISEÑO DE PRIMERS	37
8.3	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	38
9	CONCLUSIONES.....	42
10	RECOMENDACIONES	42
11	BIBLIOGRAFÍA	43
12	FIGURAS.....	47
13	TABLAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa del Corredor Ecológico del Oso Andino. Los límites del Corredor Ecológico del Oso Andino se muestran como líneas amarillas y los límites del DMQ se muestran en naranja. Los puntos marcados en rojo indican las localidades donde se obtuvieron muestras para este estudio, estas están delimitadas por el río Guayllabamba al norte y la carretera Calacalí-Nanegalito al Oeste. 47
- Figura 2:** Diagrama de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Tremarctos ornatus*. La sección inicial (color naranja) corresponde a la región hipervariable II (HVII) y tiene una extensión de 600pb, la sección media (color amarillo) corresponde a una región conservada y repetitiva de 220pb y la sección final (color verde) representa la región hipervariable I (HVI) con 500pb de extensión. En total la región D-loop de *Tremarctos ornatus* tiene aproximadamente 1320pb. 47
- Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las extracciones de ADN de 4 muestras del estudio..... 48
- Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen de B-actina. El tamaño de banda esperado es 300pb. 48
- Figura 5:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación con los primers 1A, 2B, 3C, 4C y 4D, con gradiente de temperatura desde 45.5°C a 48.5°C. Todos los carriles corresponden a la muestra IL01 (Yumbo). Para los primers 1A y 2B el tamaño de banda esperado es 600pb y para los primers 3C, 4C y 4D 500pb. 49
- Figura 6:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación con los primers TORmt2F y TORmt2R. El tamaño de banda esperado para este primer es 615pb. 49
- Figura 7:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reamplificación de las bandas extraídas del gel de acrilamida. El tamaño de banda esperado es 615pb. 50
- Figura 8:** Red de haplotipos generada por el programa TCS (Clement, 2000). El tamaño de los círculos indica la frecuencia de cada haplotipo y la distancia de las ramas indica los cambios que hay entre haplotipos. 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de los primers diseñados para la amplificación de la región D-loop del mtDNA de <i>Tremarctos ornatus</i> con su respectiva Temperatura de melting, %GC, y complemetariedad.	51
Tabla 2: Combinaciones posibles de pares de primers y el tamaño del producto correspondiente según los primers individuales de la Tabla 1.	51
Tabla 3: Concentración y calidad de ADN de las 13 muestras de osos de anteojos estudiadas. Estos parámetros fueron calculados en NanoDrop 2000. Los códigos de las muestras inician con 2 letras representativas de la localidad donde se obtuvo la muestra seguido por el número de muestra colectada.	51
Tabla 4: Secuencias de los haplotipos encontrados junto con las muestras pertenecientes a cada individuo. Los códigos de las muestras inician con 2 letras representativas de la localidad donde se obtuvo la muestra seguido por el número de muestra colectada. ..	52
Tabla 5: Frecuencia de los 5 haplotipos encontrados en 13 individuos del Corredor Ecológico del Oso Andino en el Distrito Metropolitano de Quito. Cada muestra pertenece a un individuo de oso andino diferente. Los individuos tienen un código específico como identificación, la “M” corresponde a un oso macho y la “H” a un individuo hembra.....	52
Tabla 6: Índices de diversidad genética de la región D-loop de <i>Tremarctos ornatus</i> calculados en el programa Arlequin 3.5.....	53

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción de la especie: Clasificación y Morfología

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*), también conocido como Oso Andino pertenece a la familia Ursidae y a la subfamilia Tremarctinae (Pérez, 2001). La subfamilia Tremarctinae es exclusiva de América y abarca 4 géneros: *Plionarctos*, *Arctodus*, *Arctotherium* y *Tremarctos* (Soibelzon, 2007). Es un grupo monofilético y las especies que lo conforman se caracterizan por tener un hocico más pequeño que el resto de osos (Soibelzon, 2007). Las especies más cercanas al oso de anteojos se encuentran extintas y es la última especie existente dentro de la subfamilia Tremarctinae (Kattan, 2004).

Tremarctos ornatus es de tamaño medio y los individuos machos son de mayor tamaño que las hembras (Peyton, 1999). La longitud corporal promedio para un macho adulto es 150 a 180cm con una cola de 7 a 10cm de longitud (Pérez, 2001). El peso varía dependiendo de la edad, pero normalmente pueden llegar a pesar entre 308-385 libras (Peyton, 1999). Las hembras miden aproximadamente 50cm menos de longitud corporal que los machos (1/3 menos) (Peyton, 1999). El pelaje del Oso Andino es largo y grueso, usualmente de color negro o café oscuro. En la cara posee manchas de color claro (blanco, amarillo o café) que se encuentran alrededor de los ojos y por esto recibe el nombre de osos de “anteojos” (Pérez, 2001). Las manchas sirven para identificar a los individuos ya que tienen un patrón distinto dependiendo del individuo. Pueden abarcar los dos ojos, un ojo, orejas, hocico y se pueden extender hasta el pecho (Peyton, 1999).

Como el resto de la familia Ursidae, el oso de anteojos, es plantígrado y las extremidades anteriores son más largas que las posteriores (Peyton, 1999). Esta singularidad les permite trepar arboles con facilidad y alcanzar sus frutos. Su cuerpo está totalmente cubierto por el pelaje y tiene una apariencia robusta (Pérez, 2001). El cuello es corto y grueso, tiene orejas pequeñas y redondas y un hocico corto con pelos vestigiales. Tiene dentadura con 42 dientes: 3 incisivos, 1 canino, 4 premolares y 2 molares en el maxilar y 3 incisivos, 1 canino, 4 premolares y 3 molares en la mandíbula (Peyton, 1999). Los incisivos no están especializados, los caninos son largos y fuertes y los molares son planos. El músculo de la mandíbula de *Tremarctos ornatus* es más fuerte que el del resto de osos (Pérez, 2001).

1.2 Biología y Distribución

1.2.1 Alimentación

A pesar de pertenecer a la familia Ursidae, que es mayoritariamente carnívora, el tipo de dentadura y los músculos de la mandíbula permiten al oso andino basar su alimentación mayoritariamente en plantas fibrosas que necesitan ser trituradas y machacadas (Peyton, 1999). Esta especie es probablemente la más herbívora de todas las especies de osos con solo 5% de su dieta basada en carnes (Pérez, 2001). La dieta del oso de anteojos se basa principalmente en frutos y en las partes fibrosas y suaves de plantas de los bosques donde habita (Yerena, 1994). Entre las plantas más importantes se encuentran las pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* (*Puya*, *Tillandsia*, *Guzmania*) que pueden llegar a representar el 50% de la dieta total (Peyton, 1980). La alimentación con *Bromeliaceae* se da mayoritariamente en alturas superiores a los 2300m, en menores alturas pueden basar su dieta en árboles frutales (Peyton,

1980). Las especies de árboles frutales más destacadas son: *Capparis angulata*, *Ficus* spp. *Cecropia* spp, *Schinus molle* y *Benchesia* spp (Peyton, 1980). También pueden alimentarse de diferentes especies de cactus que funcionan como fuentes de agua, orquídeas y bambú (Pérez, 2001). Adicionalmente pueden consumir madera de árboles como *Bombax discolor* y bayas de *Penettya prostrata*, *Cavandishia* spp, y *Physalis peruviana* (Peyton, 1999). Se ha reportado también el consumo de *Annona cherimolia*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum* y *Cucurbita maxima* (Peyton, 1980). Entre las fuentes de carne se encuentran diferentes tipos de insectos, roedores, pájaros y ganado (Peyton, 1980).

1.2.2 Reproducción

Las parejas reproductivas del oso andino usualmente se observan entre marzo y octubre y el celo de las hembras dura aproximadamente 7 días (Spady, 2007). Por medio del estudio de osos en cautiverio y la observación de crías fuera de la época de reproducción, se sabe que el periodo de gestación es muy variable (de 160 a 225 días) y por esto se especula que esta especie es capaz de realizar implantación tardía (Peyton, 1999). Por consiguiente las crías pueden nacer fuera de estación pero a tiempo para comer las frutas maduras (6 semanas antes de la maduración) (Peyton, 1980). Comúnmente los partos ocurren entre diciembre y febrero, con 1-4 crías siendo 2 el número más común (Peyton, 1999). El tamaño de las crías al nacer varía significativamente de acuerdo a varios factores externos como la disponibilidad de alimento y el tamaño y salud de la madre. No existe mucha información acerca de la reproducción en estado natural, pero en cautiverio la primera gestación se da en hembras de 4-7 años de edad (Peyton, 1996).

1.2.3 Comportamiento

El oso andino es mayoritariamente solitario, pero en ciertas ocasiones se pueden formar grupos de varios individuos al momento de la alimentación (Peyton, 1999). Las crías se mantienen con las madres hasta 1-2 años después del parto donde ya tienen las capacidades necesarias para buscar alimento por su propia cuenta (Spady, 2007). Los avistamientos con cámaras muestran que estos osos son activos durante el día y la noche (Peyton, 1999). Tienen una alta actividad arbórea: trepan árboles para conseguir alimento, derriban pequeños troncos y destruyen ramas para construir “camas” donde se alimentan y duermen (Spady, 2007). Se guían principalmente por la visión y el sentido del olfato (Renner, 2002). Usualmente son osos de comportamiento tranquilo y suelen alejarse en avistamiento de humanos. Sin embargo, se han reportado muchos casos de ataque a ganado y cultivos en los bosques donde habitan (Rodríguez, 2006).

1.2.4 Distribución y hábitat

Este oso es exclusivo de América del Sur, principalmente en los Andes. Se distribuyen desde Venezuela hasta el sur de Bolivia (Kattan, 2004). El rango altitudinal de *Tremarctos ornatus* se encuentra desde 250msnm en las zonas más bajas, hasta 4750msnm en los puntos más altos (Peyton, 1999). Habitan en bosques secos espinosos, bosques húmedos, páramos, bosque andino nublado (Yerena, 1994). El hábitat ideal es el bosque húmedo que llega a tener una altitud de 2700msnm. Se estima que en América del Sur existen alrededor de 20000 osos de anteojos: aproximadamente 2000 en Ecuador (Rodríguez, 2006).

1.3 Corredor Ecológico del Oso Andino

El proyecto “Corredor Ecológico del Oso Andino” está destinado a la conservación y protección del hábitat del oso de anteojos que se encuentra en estado vulnerable debido a la fragmentación y pérdida de hábitat (Goldstein et al, 2008). El Corredor se encuentra en las parroquias rurales de Calacalí, Nanegal, Nanegalito, Nono, San José de Minas, Puéllaro y Perucho, dentro de los límites del Distrito Metropolitano de Quito (SGCMQ, 2013). Aproximadamente abarca una superficie de 64554 hectáreas (SGCMQ, 2013). En los últimos años, dentro de estas zonas, se han realizado diversas actividades humanas que han disminuido el terreno habitable por el Oso Andino, como la construcción de carreteras, la tala del bosque y la extensión de las áreas cultivadas. Las carreteras son altamente transitadas e impiden el paso de los osos entre ambos lados. Las áreas de cultivo y asentamientos humanos continúan extendiéndose y la tala de los bosques no se detiene, lo que fragmenta las poblaciones de osos de anteojos existentes e impide su contacto. Cada individuo de esta especie necesita al menos 800 hectáreas para desarrollarse por lo que es indispensable que el bosque se mantenga en su totalidad (Molina, 2012). Debido a la destrucción de hábitats, el alimento se vuelve escaso y los osos recurren a los cultivos y ganados de los sectores adyacentes. Esto representa un peligro aún mayor ya que las poblaciones humanas asentadas en estos territorios matan a los osos para impedir que ataquen los cultivos y ganado (Rodríguez, 2006). Actualmente, esta especie sigue amenazada por cazadores y comerciantes de carne. Todas estas amenazas hacen que las poblaciones de *Tremarctos ornatus* se reduzcan notablemente y se vean fragmentadas. El Corredor Ecológico del Oso Andino busca que las diferentes poblaciones de osos separadas por carreteras o asentamientos humanos puedan volver a tener contacto y puedan

reproducirse entre si (SGCMQ, 2013). Se ha propuesto la construcción de puentes y túneles que permitan a los osos sortear las barreras impuestas por las carreteras de Calacalí-La Independencia y el Rio Guayllabamba (Molina, 2014).

1.4 Análisis moleculares

Los avances moleculares han permitido tener herramientas eficaces para el análisis genético de poblaciones. El ADN mitocondrial es un marcador molecular comúnmente usado para estudios genéticos y filogeográficos en animales. Este tipo de ADN puede ser amplificado fácilmente por medio de PCR sin necesidad de purificación. Es abundante en las células, debido a su alto número de copias, por lo que puede ser utilizado en muestras degradadas o con poco material como restos de huesos, dientes o pelo (Frankman, 2004). Evoluciona rápido, es fácil de aislar y tiene una tasa de mutación más alta que el ADN nuclear lo que permite ver variación genética en todo tipo de poblaciones. Las mutaciones que se generan en las regiones no codificantes del ADN mitocondrial, como en la región D-loop, son neutrales por lo que los polimorfismos en los haplotipos podrían ser atribuidos a eventos demográficos. La región D-loop es uno de los fragmentes que evoluciona más rápido en el ADN mitocondrial. Debido a la alta tasa de mutación que presenta, la región D-loop es la secuencia más estudiada para análisis de diversidad genética en el mtDNA (Hoelzel, 1999). El mtDNA no sufre recombinaciones y solo proviene de linaje materno, lo cual es útil para la reconstrucción de relaciones históricas entre poblaciones a partir de la distribución y frecuencia de haplotipos (Beebee, 2008). Debido a estas características, el ADN mitocondrial es útil para la determinación de diversidad genética a partir de muestras de pelo de una población de osos de anteojos.

La diversidad genética es necesaria para la supervivencia de una especie. Una variación genética baja hace a los individuos de una población (que son casi idénticos entre sí) más propensos a enfermedades y parásitos, disminuye la flexibilidad de la población de adaptarse a desafíos ambientales y consecuentemente disminuye el fitness de la población (Kahilainen, 2014). Por otro lado, si la diversidad genética es alta, es posible que ciertos individuos puedan responder favorablemente a los desafíos ambientales, se adapten, reproduzcan y la población puede sobrevivir (Lacy, 1997). La diversidad genética se puede ver afectada principalmente por deriva genética y procesos de endogamia. El análisis de diversidad genética de una población es importante cuando una población puede estar en riesgo ya sea por destrucción de hábitat, cambios en el tamaño de la población o porque la población se encuentra geográficamente aislada (Kahilainen, 2014). En especies en estado vulnerable o en peligro de extinción es necesario conocer los datos de diversidad genética para poder diseñar programas de conservación específicos y especializados para las necesidades de la población de estudio.

El presente estudio es un análisis preliminar de la diversidad genética de una población *Tremarctos ornatus* en el Corredor Ecológico del Oso Andino en el Distrito Metropolitano de Quito. En esta investigación se diseñó un par de primers específicos para amplificar la región Hipervariable II del D-loop del ADN mitocondrial de esta especie. Mediante análisis estadísticos se identificaron los haplotipos presentes en la población y se calcularon índices de diversidad genética con el fin de entender el estado actual de esta población de osos de anteojos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar la diversidad genética de una población de *Tremarctos ornatus* en el Corredor Ecológico del Oso Andino, al noroccidente del distrito metropolitano de Quito, por medio de análisis de ADN mitocondrial.

2.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de pelo de osos de anteojos recolectados en campo.
- Diseñar primers específicos para la región D-loop del mtADN de *Tremarctos ornatus* y evaluarlos en individuos de una población de osos de anteojos del Corredor Ecológico del Oso Andino al Noroccidente de Quito.
- Determinar la diversidad genética de una población de osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*) presente en el Noroccidente de Quito mediante el análisis de la región D-loop del ADN mitocondrial (mtADN) .
- Evaluar la región D-loop del mtADN para identificar posibles haplotipos dentro de la población de osos de anteojos en estudio.

3 JUSTIFICACIÓN

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) es la última especie viviente de la subfamilia Tremarctinae (Kattan, 2004). Está exclusivamente distribuida en América del Sur y actualmente se encuentra en estado vulnerable (Peyton, 1999). La población de estos osos se ha visto amenazada principalmente por la destrucción de hábitats por las diversas actividades humanas. La destrucción de bosques para la creación de zonas

de cultivo y ganadería han delimitado el espacio disponible para la supervivencia del oso andino (Rodríguez, 2006). Los asentamientos humanos cerca de los ríos también han desplazado a las poblaciones de osos y han impedido su paso por los mismos (Kattan, 2004). Todas estas actividades han generado que las poblaciones de osos de anteojos se vayan aislando y fragmentando, poniendo en peligro de endogamia a las mismas. La construcción de carreteras y aldeas hace que se pierda la conectividad entre osos de anteojos de diferentes zonas, por lo que tienen una mayor dificultad para reproducirse entre sí (Yerena, 1994). La población de osos de anteojos del Corredor Ecológico del Noroccidente de Quito ha sufrido el efecto de las actividades humanas mencionadas. Debido a estos factores, es necesario tomar acciones para proteger el hábitat de esta especie. El estudio genético de la región D-loop del ADN mitocondrial del oso de anteojos nos permitirá comprender la diversidad genética presente en la población y representará también una base para en el futuro establecer programas de conservación.

4 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado con osos de anteojos identificados en el Corredor Ecológico del Oso Andino al Norooccidente del Distrito Metropolitano de Quito. Se logró identificar 13 osos de 8 localidades diferentes: El Guarumal, Campamento, Pichan, Bellavista 3, El Porvenir, Curipogrio, Horizontes Rivera, Bellavista 2 e Ilitio (Figura 1). Existen dos barreras importantes que pueden estar interfiriendo la movilidad de osos de anteojos en esta región. La primera barrera es el río Guayllabamba y la segunda es la carretera Calacalí-Nanegalito. Hasta el momento, las muestras analizadas son representativas solo de un lado del río (Sur del río Guayllabamba) y del Este de la carretera. Los

análisis moleculares fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito

5 MATERIALES

5.1 Extracción ADN de muestras de pelo de osos de anteojos

- Dneasy Blood & Tissue Mini Spin Column Kit (Qiagen)
- Estereomicroscopio (Wolfe)
- Etanol 96-100%
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Thermomixer 311DS (Labnet)
- Microcentrífuga (Labnet)
- Vortex (IKA)

5.2 Cuantificación de ADN

- Nanodrop 2000 (Thermo Fischer)
- Buffer TE 1X
- Ultra-Pure Distilled Water (ThermoFischer)

5.3 Diseño de primers específicos para la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus*

- Genomas mitocondriales de referencia disponibles en GenBank
- Software MEGA v.6 (Tamura, 2007)
- Software OligoCalc (Kibbe, 2007)
- Software Primer 3 (Untergasser, 2012)

5.4 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN

- 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 1X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 0.2 mM dNTPs (Invitrogen)
- 1uM Primer F β -actina (Invitrogen)
- 1uM Primer R β -actina (Invitrogen)
- 0.5 U Taq polimerasa (Invitrogen)
- 20ng ADN osos de anteojos
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0.2ml

5.5 Amplificación de la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus* para análisis de diversidad genética

- 1.5mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 1X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 0.2mM dNTPs (Invitrogen)
- 0.75 Primer TORmt2F
- 0.75 Primer TORmt2R
- 1U Taq polimerasa (Invitrogen)
- 20ng ADN osos de anteojos
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0.2ml

5.6 Electroforesis en gel de acrilamida para purificar los fragmentos de la región D-loop amplificados

- Ultra Pure Acrylamide (Invitrogen)
- Ultra Pure N,N - Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (Tris – Ácido Bórico – EDTA)
- Ultra Pure TM UREA (Invitrogen)
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure TM TEMED (N-tetramethylethylenediamine) (ThermoFischer)
- Sigmacote (SIGMA)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)
- Bind-Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane) (SIGMA)
- Solución de tratamiento de vidrio (etanol 96 %, ácido acético 0.5%)
- Repelente de agua para vidrio (RainX)
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Buffer de carga (Glicerol , Azul de Bromofenol)
- Etanol 70%

5.7 Tinción del gel con nitrato de plata

- Transiluminador de luz blanca
- Solución Fijación/ Parada (Alcohol Absoluto, 10% v-v, Ácido Acético Glacial 0.5% v-v)
- Solución de Tinción (Nitrato de Plata, 2g/L, Formaldehído, 37% 0.00015% v-v)

- Solución de Revelado (Hidróxido de Sodio 15g/L, Formaldehído 37% 0.0002% v-v)

5.8 Extracción de bandas del gel de acrilamida

- Buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA)
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Vortex (VWR)
- Thermomixer (Labnet 311DS)

5.9 Secuenciamiento de ADN y edición de los fragmentos de la región D-loop

- 30ul producto de PCR
- Software GAP4 (The Gap Group, 2016)
- Software MEGA v.6 (Tamura, 2007)

5.10 Análisis estadísticos

- Software Arlequin 3.5 (Excoffier, 2000)
- Software TCS (Clement, 2000)

6 MÉTODOS

6.1 Recepción de muestras

Después de la recolección de muestras de pelo de oso andino en el campo (actividad realizada por asistentes de campo bajo la supervisión de Santiago Molina, Proyecto “Corredor Ecológico del Oso Andino”), se recibieron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, las muestras de pelo de los diferentes individuos de osos de anteojos en fundas de papel de acuerdo al protocolo de colecta establecido (Comunicación Personal Santiago Molina). Se

recolectó 57 muestras de pelo en el Corredor Ecológico del Oso Andino y 1 muestra de pelo de un oso en cautiverio (Yumbo) proveniente de la localidad Ilitio que se encuentra dentro del Corredor Ecológico del Oso Andino. Se ingresaron las muestras a la base de datos (de acuerdo a información entregada por Santiago Molina) y se las identificó de acuerdo a fotos y videos de las cámaras trampa. Las manchas faciales, específicas para cada oso, permitieron identificar a los individuos y de esta forma se logró identificar las muestras repetidas. Finalmente, se almacenó las muestras en congelación a -20°C hasta su posterior uso.

6.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el Kit de Qiagen Dneasy Blood and Tissue Mini Spin Column. Se seleccionaron 12-15 pelos con folículo de oso de anteojos de cada muestra recibida. En el caso de tener varias muestras del mismo individuo, se seleccionó la muestra con mayor cantidad de pelos y las restantes fueron almacenadas en las condiciones mencionadas anteriormente. Para verificar la presencia de folículo se visualizó en el estereomicroscopio en aumento 30x. Luego se procedió a cortar 0.5-1cm de cada pelo, incluyendo el folículo y se los colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml. Se añadió 180ul de Buffer ATL y 20ul de proteinasa K. Se mezcló por vortex y se incubó a 56°C durante toda la noche en el Thermomixer. Después de la incubación se mezcló por 15 segundos con un agitador vortex y se añadió de forma simultánea 200ul de Buffer AL y 200ul de Etanol (96-100%) a la muestra y se volvió a mezclar por vortex. Luego se pipeteó la mezcla incluyendo cualquier precipitado dentro de la columna provista por el kit con su respectivo tubo de recolección de 2ml. Se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto, se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna y se colocó un nuevo tubo de recolección de 2ml. Posteriormente se añadió 500ul de

buffer AW1 y se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto. Se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna y el tubo de recolección. Luego se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml, se añadió 500ul de buffer AW2 y se centrifugó por 3 min a 14000rpm para secar la membrana. Se descartó el fluido y el tubo de recolección. Para la elución del ADN se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1,5ml, se pipeteó 50ul de buffer AE directamente en la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 1 min a 8000rpm. Se realizó una segunda elución con 25ul de buffer AE para conseguir un volumen final de 75ul. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta que se realizó la cuantificación de ADN.

6.3 Cuantificación de ADN y visualización en geles de agarosa

La calidad de ADN de cada muestra fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Las muestras se corrieron por 45 minutos a 80V. La concentración de ADN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000™ con buffer AE como solución blanco. No se realizó una dilución para llevar a las muestras a una concentración específica debido a que la mayoría de las muestras presentaron una concentración baja de ADN.

6.4 Diseño de primers específicos para la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus*

Para el diseño de primers se utilizaron las 2 secuencias completas de mtDNA de *Tremarctos ornatus* disponibles en GenBank (Número de acceso: FM177764.1 y NC_009969.1). Estas secuencias fueron alineadas en MEGA v.6 (Tamura, 2007) y se identificó la región D-loop que se generó por la unión de los nucleótidos de la posición

1-847 y 16301-16752 de la secuencia completa de mtDNA FM177764.1. En el programa MEGA (Tamura, 2007) se usó la opción "Sequence Data Explorer" para resaltar los sitios variables en ambas secuencias (Comando: Mark Variable Sites) y poder determinar la región donde se acumula el mayor número de mutaciones y diseñar los primers flanqueando las mismas. Una vez que estas fueron identificadas se determinaron regiones conservadas donde los primers podrían hibridar. Debido a que toda la región D-loop es muy extensa (1320pb) para la amplificación con un solo par de primers, se escogieron los dos fragmentos que presentaron el mayor número de mutaciones (analizando las dos secuencias mitocondriales disponibles) para ser amplificados. El primer fragmento representa a la región Hipervariable II (HVII) parte inicial de la región D-loop con un tamaño de aproximadamente 600pb. El segundo fragmento es parte de la región Hipervariable I (HVI) con un tamaño de 500pb y se encuentra después de una región conservada y repetitiva de aproximadamente 220pb (Figura 2). Se escogieron fragmentos de 20-25 nucleótidos que flanqueen las regiones variables (HVI y HVII) y se verificó su viabilidad en el software OligoCalc (Kibbe, 2007), que calcula la Temperatura de Melting (T_m), %GC y capacidad de formar dímeros y hairpins. Los primers que formaban dímeros (interacción intermolecular entre dos primers F o entre un primer F y un R) y hairpins (interacción intramolecular dentro del mismo primer) fueron descartados inmediatamente debido a que reducen la eficiencia de la amplificación y la capacidad de unión del primer al ADN molde (Vinay, 2000). Se escogieron los primers que tenían un %GC cercano a 50 ya que con este porcentaje la T_m estaría entre 60-64°C y esto reduce la posibilidad de que los primers se unan a sitios secundarios (Prediger, 2012). Posteriormente se usó el software Primer 3 (Untergasser, 2012) para verificar que los primers se unan específicamente a la región

de interés y no a otros fragmentos. Con este programa también se estimó el tamaño de los fragmentos por cada combinación de primers. De acuerdo a la T_m , %GC, especificidad, tamaño del fragmento generado y ausencia de formación de dímeros y hairpins, se escogieron 5 primers Forward (1-5) y 4 primers Reverse (A-D) (Tabla 1). Debido a la similitud en la T_m el primer Forward 4 puede ser usado con el primer Reverse C y D. Es por esto que con 9 primers se obtuvieron 6 combinaciones de primers posibles para la región de interés (Tabla 2). De los 6 pares de primers diseñados, la combinación 1A y 2B amplifican el fragmento correspondiente a la región HVII del D-loop, mientras que las combinaciones 3C, 4C, 4D y 5D amplifican el fragmento de la región HVI del D-loop.

6.5 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN

Se amplificó el gen de la β -actina del ADN genómico de osos de anteojos, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El volumen final de la reacción fue 20ul y consistió en: 1.5mM $MgCl_2$, Buffer de PCR 1X, 0.2mM dNTPs, 1uM Primer Forward, 1uM Primer Reverse, 0.5 unidades de Taq polimerasa y 20ng ADN. El programa de PCR se realizó en un termociclador T-Personal (Biometra) con una desnaturalización inicial de 94°C por dos minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 92°C por 50 segundos, annealing a 45°C por 50 segundos, extensión a 72°C por 50 segundos y extensión final a 72°C por 2 minutos. Se utilizó como control positivo una muestra de pelo humano extraída con el mismo Kit. El producto de amplificación fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Se utilizaron 5ul del producto de amplificación y se realizó una corrida por 45 minutos a 80V.

6.6 Amplificación de la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus* para análisis de diversidad genética

Se amplificó la región HVII del D-loop del ADN mitocondrial extraído de las muestras de pelo de osos andino por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El volumen final de la reacción fue de 30ul (volumen estándar para secuenciación en Macrogen Korea). La mezcla de reacción consistió de: 1.5mM MgCl₂, Buffer de PCR 1X, 0.2mM dNTPs, 0.75uM Primer TORmt2F, 0.75uM Primer TORmt2R, 1 unidad de Taq polimerasa y 20ng ADN. El programa de PCR se realizó en un termociclador T-Personal (Biometra) con una desnaturalización inicial de 94°C por 10 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 50 segundos, annealing a 68°C por 50 segundos, extensión a 72°C por 50 segundos y extensión final a 72°C por 2 minutos. Se utilizó como control positivo una muestra de pelo de un oso en cautiverio (Yumbo, que posteriormente fue liberado). El producto de amplificación fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Se utilizaron 3ul del producto de amplificación y se realizó una corrida por 45 minutos a 80V.

6.7 Electroforesis en gel de acrilamida para purificación de los fragmentos de la región D-loop amplificados

Debido a que la secuenciación inicial de los productos de amplificación de la región D-loop tenía múltiples picos superpuestos y ruido, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida para purificar los fragmentos. La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó utilizando el sistema Sequi Gen GT de Biorad. Primero se realizó el lavado y tratamiento del vidrio y la cámara. El vidrio se lavó con Alconox y se

lo limpió con alcohol al 70%, luego fue tratado con Bind-Silane. Para el tratamiento de la cámara se realizó un lavado con Alconox, con alcohol al 70% y se la trató con Rain X y Sigmacote. Se limpiaron todas las partes de la cámara de polimerización con alcohol al 70% y se la armó según las instrucciones del proveedor. Se preparó 100ml de la solución de poliacrilamida (urea 5M, acrilamida: bisacrilamida 19:1, Temed y persulfato de amonio 0.1%) se la añadió a la cámara y se colocó el peine, con los dientes hacia el exterior, para formar el frente de corrida, se dejó polimerizar por 1 hora.

Una vez que el gel se polimerizó se armó la cámara de electroforesis y se añadió 400mL de TBE 1X en la base de la cámara y 1100 ml dentro de la cámara. Se invirtió la orientación del peine (dientes hacia el interior) y se lo insertó en el gel para generar los pocillos. Se retiró el exceso de urea por medio del uso de una pipeta Pasteur. Se cargó 3ul de buffer de carga saltando un pocillo y se realizó la pre corrida por 45 minutos a 80 watts para verificar el estado de los pocillos. Después de la pre corrida, se desnaturalizó el producto de PCR a 90°C por 8 minutos y se cargó 5ul de estas muestras en cada pocillo. Las muestras se corrieron a 80W y 50°C por dos horas y media.

El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó por medio de una tinción con nitrato de plata de acuerdo al protocolo de Benbouza et al.(2006). Primero se colocó el vidrio con el gel hacia arriba en una solución fijadora fría (200 ml de alcohol absoluto, 10 ml de ácido acético glacial y 1790 ml de agua destilada) por 5 minutos. Luego se colocó el vidrio con la misma orientación en una solución de tinción (4 gramos de nitrato de plata, 3 ml de formaldehído al 37% y 2 litros de agua destilada) por 7 minutos con agitación homogénea y constante. Se realizó un lavado con agua destilada

por 8 segundos y se colocó el gel en una solución de revelado (30 gramos de hidróxido de sodio, 4 ml de formaldehído al 37%, y 2 litros de agua destilada) por 7 minutos con agitación suave y homogénea, revisando constantemente que el gel no se desprenda del vidrio. Por último se colocó el vidrio en la solución fijadora por 3 minutos, y se lo lavó con agua destilada. Para extraer las bandas purificadas se dejó reposar el gel por 30 minutos.

6.8 Extracción de bandas de acrilamida y reamplificación de fragmentos

Para la extracción de bandas del gel de acrilamida primero se identificó las bandas de interés. Debido a que el fragmento de la región D-loop mide 600pb, la banda a extraer se encontró en la parte superior del gel con un tamaño >300pb usando el ladder 10bp de Invitrogen. Una vez identificada la banda se humedeció el gel con un poco de agua destilada y con un bisturí fino se fue cortando alrededor de ésta, tratando de cortar la menor cantidad de gel. Con las pinzas se tomó el pedazo de gel deseado y se lo colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml con 50ul de Buffer TE. Luego se mezcló por vortex por 5 minutos en cada muestra para promover el desprendimiento del ADN del gel. Se dejó incubar toda la noche a 37°C y se tomaron 3ul de esta solución como ADN para el PCR. La reamplificación se realizó bajo las mismas condiciones descritas en la sección 5.6 y se verificó el tamaño esperado con una electroforesis en gel de agarosa como se describe en la sección 5.3.

6.9 Secuenciamiento de ADN y edición de secuencias de la región D-loop

Una vez confirmado el tamaño del fragmento de la región HVII del D-loop se cuantificó las muestras con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000TM con agua de PCR como solución blanco. Estas muestras fueron enviadas a MacroGen Inc.

(Seúl, Corea) donde fueron secuenciadas en ambas direcciones con un ABI 3730XLs. Las secuencias fueron preparadas para Gap4 en Pregap4 seleccionando: Estimate Base Accuracies, Trace Format Conversion, Initialise Experiment Files y Gap4 shotgun assembly en la opción Configure Modules. El software Gap4 (The Gap Group, 2016) permite editar (insertar, reemplazar o eliminar bases) las secuencias de acuerdo a los electroferogramas generados por el ABI 3730XLs. Cada base nitrogenada tiene un color específico, en este caso verde corresponde a adenina, negro a guanina, azul a citosina y rojo a timina. La altura de los picos y el valor de confianza indica cual es la base que tiene mayor probabilidad de ser la correcta. En base a estos picos se editó las secuencias y se obtuvo una secuencia consenso y se las alineó en MEGA v.6 (Tamura, 2007). En caso de que la secuencia de las cadena Forward y Reverse no coincidieran, se escogió la cadena que tuvo valores de confianza más altos. Se realizó una búsqueda en GenBank con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en la página web de NCBI (National Center for Biotechnology Information) para comprobar que las secuencias pertenecieran a la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus*. Las secuencias editadas y limpiadas fueron copiadas al programa MEGA v.6. La alineación se realizó con la opción "Align by ClustalW". Debido a que todas las secuencias tuvieron diferente longitud, estas fueron recortadas a 247pb que fue la mayor extensión que se pudo tener.

6.10 Análisis estadísticos

Las secuencias recortadas y alineadas fueron convertidas a formato Nexus (.nex) y fueron ingresadas al software TCS: Phylogenetic network estimation using statistical parsimony (Clement, 2000) para determinar los haplotipos presentes en los individuos analizados. En este programa también se construyó la red de haplotipos que permite

ver la distancia (por cambios en pares de bases) que hay entre cada haplotipo. Para los análisis de diversidad genética se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier, 2000) utilizando la opción Project Wizard y escogiendo los parámetros de Índices Moleculares, Índices de Diversidad y Test de Neutralidad.

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de individuos y calidad del ADN

La identificación de individuos se realizó mediante los videos de las cámaras trampa. De las 58 muestras de pelo obtenidas se lograron identificar 13 individuos en 8 localidades diferentes del Corredor Ecológico del Oso Andino. Estas localidades fueron: El Guarumal, Campamento, Pichan, Bellavista 3, El Porvenir, Curipogrio, Horizontes Rivera, Bellavista 2 e Ilitio. Todas se encuentran dentro del Corredor Ecológico del Oso Andino y están delimitadas por el río Guayllabamba al norte y la carretera Calacalí-Nanegalito al oeste (Figura 1). Durante el proceso de identificación se pudo ver que la mayoría de muestras fueron recapturas de los mismos 13 individuos. Se comprobó que el Kit Dneasy Blood & Tissue Mini Spin Column, funciona adecuadamente para extraer ADN de muestras de pelo, y se estableció que para lograr una extracción de ADN eficiente el número mínimo de pelos es de 12 a 15.

La concentración de ADN obtenida en las muestras de pelo de los 13 osos de anteojos estudiados fue baja (0.2-12.3ng/ul) (Tabla 3). En dos muestras, la cuantificación mostró concentraciones negativas o excesivamente bajas (-1.9 y -0.7) (Tabla 3). Debido a estos resultados se realizó geles de agarosa para confirmar la presencia de ADN y se observó bandas tenues en todas las muestras (Figura 3). Esto indica que a pesar de que la cuantificación con Nanodrop 2000™ reportó

concentraciones negativas, sí hubo presencia de ADN en las muestras pero en concentraciones bajas. La calidad del ADN se observa en las relaciones 260/280 y 260/230, en estos parámetros se obtuvieron valores fuera del rango aceptable (~ 1.8) (Tabla 3). Especialmente en la relación 260/230, los 13 individuos presentaron valores muy lejanos a 1.8 lo que indica contaminación por compuestos fenólicos. Debido a la baja concentración y calidad de ADN que se obtuvo, se realizó un PCR con primers de B-actina para evaluar la calidad de ADN. Se analizaron 10 muestras y en todas se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado para este gen (300pb), 4 de estas muestras se observan en la Figura 4.

7.2 Amplificación de la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus*

Todos los primers diseñados amplificaron correctamente la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus* (Figura 5). Se escogieron los primers TORmt2F y TORmt2R para la amplificación de la región hipervariable II (HVII) ya que la secuenciación con estos primers presentó un electroferograma más claro con menos ruido. Se logró amplificar la región HVII del D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus* en las 13 muestras analizadas. El fragmento amplificado tuvo el tamaño esperado para este par de primers (615pb) (Figura 6). En la electroforesis en gel de acrilamida se observó bandas del tamaño esperado >300 pb. Las bandas fueron extraídas exitosamente y la reamplificación generó fragmentos de 600pb aproximadamente (Figura 7).

7.3 Determinación de haplotipos y red de haplotipos

Mediante el programa TCS se encontraron 5 haplotipos diferentes en las 13 muestras de osos andino analizadas (Tabla 4). Los haplotipos fueron nombrados H1, H2, H3, H4 y H5. Siete individuos de oso andino presentaron el haplotipo H2, siendo éste el más

frecuente. Los haplotipos H1 y H3 tuvieron una frecuencia de 2 individuos, los haplotipos H4 y H5 tuvieron una frecuencia de un individuo cada uno (Tabla 5). La red de haplotipos se determinó usando el mismo programa (Figura 8). En la red de haplotipos se muestran los 5 haplotipos encontrados, el tamaño de los círculos indica la frecuencia de cada uno y la longitud de las ramas indica el número de polimorfismos que hay entre haplotipos (Figura 7). Las ramas de longitud corta indican que los haplotipos en esa rama tienen pocas diferencias de nucleótidos entre sí, por otro lado una rama de longitud larga indica que hay varios cambios nucleótidos entre los haplotipos de la rama. La máxima diferencia entre haplotipos fue de 4 nucleótidos entre H2 y H3, el primer cambio fue en la posición 24 con una sustitución de T por C, el segundo en la posición 57 con sustitución de T por C, el tercero en la posición 106 con un cambio de A por G y por último en la posición 190 una sustitución de C por T. Entre el haplotipo H5 y H6 se presentaron 3 sustituciones: en la posición 9 se cambió una T por una G, en la posición 118 una A por una T y en la posición 222 una A por una G. Entre los haplotipos H1 y H5 igualmente se presentaron 3 sustituciones: en la posición 190 y 117, el cambio fue de una C por una T, mientras que en la posición 20, el cambio fue de una C por una A. La distancia mínima se encontró entre H1 y H2 con solo una sustitución de A por C en la posición 155.

7.4 Estimación de índices de diversidad y Neutralidad

El fragmento que se utilizó para la estimación de índices de diversidad y neutralidad fue obtenido mediante la secuenciación de la región HVII del D-loop del mtDNA. En este fragmento de 247pb se encontraron 10 sitios polimórficos de los cuales todos fueron sustituciones: 5 transversiones, 5 transiciones y ningún indel. La diversidad de genes o diversidad de haplotipos (H_d) fue 0.7051, y la diversidad de nucleótidos (π) fue

0.0113. Debido al bajo número de muestras se aplicó un factor de corrección de $n/(n-1)$, lo que resultó en un valor ajustado de $\pi=0.01224$ (Pasternak, 2005). El test de Neutralidad Tajima's D dio un valor de -0.53 pero un p-value de 0.32, debido a que el p-value es mayor a 0.05, este test se considera no significativo (Tabla 6). Todos estos parámetros fueron calculados usando el software Arlequin 3.5 (Excoffier, 2000).

8 DISCUSIÓN

8.1 Cuantificación y calidad de ADN

La concentración de ADN de las 13 muestras fue baja (<13 ng/ul), 8 de estas muestras tuvieron una concentración menor a 2ng/ul y 2 una concentración negativa (Tabla 3). Debido a que el límite inferior de detección de ADN del NanoDrop 2000 es de 2ng/ul, es posible que la cuantificación de estas 10 muestras (al tener valores fuera del rango detectable del equipo) no haya sido exacta (Thermo Scientific, 2012). Al realizar la amplificación del gen de la B-actina en estas 13 muestras, se observó el fragmento esperado de 300pb (Figura 3). Esto indica que, a pesar de que en la cuantificación por NanoDrop 2000 se obtengan concentraciones bajas o negativas, si existe una cantidad suficiente de ADN para realizar una PCR exitosa. La pureza del ADN extraído se observa en las relaciones 260/280 y 260/230 que tienen que estar dentro de 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente. Los valores obtenidos en este ensayo (Tabla 3) están fuera de los parámetros lo cual indica que puede haber contaminación por proteínas y otros residuos de los reactivos de extracción. Sin embargo, se ha reportado que estos valores pueden ser inespecíficos en concentraciones bajas de ácidos nucleicos (<10ng/ul) (Thermo Scientific, 2012), como es el caso de las muestras analizadas en este estudio.

8.2 Diseño de Primers

Las 6 combinaciones de primers diseñadas amplificaron correctamente la región esperada. El mejor set de primers fue escogido de acuerdo a la calidad de la secuencia que se generó en el proceso de secuenciación. En base a esto se escogió el par de primers TORmt2F y TORmt2R que presentó la menor cantidad de ruido y los valores de confianza más altos. El valor de confianza es un número asignado a cada nucleótido de la secuencia e indica qué tanto se puede confiar en la identidad de esa base. La fórmula designada para este valor es: $QV = -10\log_{10}(Pe)$, donde Pe es la probabilidad de error (Baxenavis, 2004). Los valores van de 0 a 100 y valores mayores a 30 indican un alto nivel de confianza. Cuando estos valores son mayores a 30 la probabilidad de que la base designada por el sistema de secuenciación sea errada es menor al 10% (Baxenavis, 2004). Con el set de primers TORmt2F y TORmt2R se obtuvieron valores de confianza mayores o cercanos a 30 en la mayoría de posiciones. Esto indica que los primers se unen de forma específica al ADN de *Tremarctos ornatus* y que el fragmento se está amplificando con fidelidad. Debido a que se obtuvieron resultados positivos en la secuenciación y se pudieron realizar los análisis estadísticos respectivos, se puede decir que los primers diseñados son adecuados para realizar estudios de diversidad y para identificar haplotipos en esta especie. Los primers que amplificaban la región HVI del D-loop no fueron utilizados ya que no se pudo obtener una secuenciación eficiente. Se puede estimar de forma eficiente la diversidad genética y haplotipos en una población solo con el uso de una región hipervariable. Sin embargo, también es útil analizar ambas regiones para tener mayor información genética y poder establecer posibles relaciones entre los polimorfismos de la región HVI y HVII (Badhan, 2014). Los primers diseñados para la región HVII pueden ser usados en investigaciones futuras en

un mayor número de individuos para tener una visión más amplia y completa de la diversidad genética de la población de osos de anteojos al Noroccidente del Distrito metropolitano de Quito.

8.3 Análisis de diversidad genética

Los cinco haplotipos encontrados son nuevos para esta especie ya que no hay estudios previos de la región D-loop de *Tremarctos ornatus*. La identificación de haplotipos se realizó por medio del método de máxima parsimonia que arroja el set mínimo de haplotipos que explica los cambios a nivel genético en las muestras analizadas (Wang, 2006). Este método es útil cuando se analiza una región genómica pequeña y se tiene una muestra pequeña (<100 individuos) ya que en tamaños mayores la estimación por parsimonia es menos certera (Weale, 2003) (Browning, 2011). La identificación de estos haplotipos permite ver los sitios polimórficos presentes en esta región y asociar posibles haplotipos específicos a una determinada población. Es posible que al analizar varias poblaciones de oso andino, se pueda asociar una región geográfica o poblaciones determinadas a un haplotipo específico. Debido a que en este estudio solo se analizó una población, no se puede hacer esta asociación.

La red de haplotipos (Figura 7), al tener ramas cortas, muestra que hay poca variación entre los 5 haplotipos encontrados, por ende hay una estrecha relación entre éstos. Los haplotipos más cercanos son H1 y H2 con solo 1 nucleótido de diferencia y los más lejanos son H2 y H3 con 4 nucleótidos de diferencia. En general, la diferencia entre haplotipos es poca pero la cantidad de haplotipos presentes en la muestra es alta (5 haplotipos en 13 individuos). Esto se confirma con los índices de diversidad, la diversidad genética o diversidad de haplotipos representa la probabilidad de que dos

haplotipos escogidos al azar sean diferentes entre sí en la muestra analizada (Excoffier, 2000). Se considera una diversidad de genes alta cuando el valor es mayor a 0.5. En este caso se obtuvo un valor de $H_d = 0.7051$, lo que muestra que la diversidad de haplotipos en la población analizada es alta. De acuerdo a estos datos hay un 70% de probabilidad de que al escoger dos haplotipos estos sean diferentes entre sí (Lowe, 2009).

La diversidad de nucleótidos, por otro lado, es la probabilidad de que dos sitios homólogos (misma posición pero en diferentes individuos) difieran entre si en la muestra analizada (Excoffier, 2000). De igual forma, ésta es considerada alta si el valor es mayor a 0.5. En los resultados obtenidos la diversidad de nucleótidos es 0.01224 que es menor a 0.5 y por ende representa una diversidad de nucleótidos baja (Lowe, 2009). Este resultado es comparable con la red de haplotipos ya que se observaron pocos cambios de nucleótidos entre haplotipos.

La población de osos de anteojos al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito tiene una alta diversidad de haplotipos pero baja diversidad de nucleótidos. Usualmente este patrón indica que la población ha sufrido una expansión rápida después de un cuello de botella reciente. Se asume que ha pasado suficiente tiempo para que la población tenga variación de haplotipos por mutaciones pero poco tiempo para que esta pueda acumular grandes variaciones en la secuencia (Lowe, 2009). Es posible que el cuello de botella reciente se haya dado por la colonización humana de los Andes, la fragmentación del hábitat por deforestación y la caza furtiva de la especie. La colonización humana del área Andina empezó hace 500 años y la pérdida de hábitat se ha intensificado en Ecuador en los últimos 100 años, por lo que estos factores pueden representar el cuello de botella reciente (Ruiz, 2003). Este cuello de

botella posiblemente generó una disminución en el tamaño y diversidad genética de la población. Sin embargo, en los últimos 20 años se ha reportado una colonización exitosa de la especie *Nectandra acutifolia* (aguacatillo) en ciertas zonas del Corredor Ecológico del Oso Andino, especialmente en Nanegalito (Molina, 2012). Es posible que debido a la abundancia de alimento, como el aguacatillo, en ciertas estaciones, la población se haya expandido, generando una mayor diversidad de haplotipos pero conservando todavía la baja diversidad de nucleótidos generada por el cuello de botella. En este caso usualmente se ve un haplotipo ancestral del cual se derivan múltiples haplotipos con pocas variaciones entre sí (Allcock, 2012). Adicionalmente se realizó el Tajima's D Neutrality Test que pretende identificar si una secuencia de ADN ha evolucionado de forma randómica (neutral) o si se ha generado por un proceso no randómico influenciado por una expansión demográfica, introgresión u otros factores no neutrales (Yang, 2014). Este test toma en cuenta la diversidad de nucleótidos de la población y el número de sitios polimórficos (Excoffier, 2010). Un valor cercano a 0 en este test, indica que la variación en la población es neutral, si el valor es negativo (<0) la población puede estar en crecimiento y si es un valor positivo (>0) la población puede estar atravesando un cuello de botella y está en decrecimiento. El resultado obtenido para el test de neutralidad en este estudio, fue -0.53 lo que sugiere que la población está en expansión después de un cuello de botella reciente (Holsinger, 2012). Estos resultados concuerdan con la alta diversidad de haplotipos pero baja diversidad de nucleótidos. Para determinar si el resultado del test de neutralidad es estadísticamente significativo, se utiliza el valor p. Cuando este valor es ≤ 0.05 se considera que el test es significativo, si es ≥ 0.05 no es significativo, es decir que no hay suficiente evidencia que apoye el valor encontrado. El valor p del test de neutralidad

realizado fue 0.32 lo que indica que los resultados son no significativos ($p\text{-value} > 0.05$). La no significancia en esta prueba puede estar relacionada al bajo número de individuos analizados por lo que se recomienda aumentar el tamaño de la muestra.

No existen estudios previos que permitan comparar la diversidad de nucleótidos en la región analizada o la presencia de haplotipos diferentes entre la población de osos de anteojos al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito y poblaciones de otras localidades. Sin embargo, se han realizado estudios de diversidad genética en Ecuador utilizando marcadores micro satélites. Ruiz-García (2003) realizó un estudio, en el cual se analizó 42 individuos de 8 provincias (Imbabura, Pichincha, Napo, Tungurahua, Azuay, Loja, Zamora y Morona Santiago). Viteri (2009), por otro lado, analizó 16 individuos provenientes de centros de cautiverio (no hay información de la provincia a la cual pertenece cada individuo). En el estudio de Ruiz-García (2003) se encontró que los osos de anteojos de Ecuador, tuvieron la diversidad genética más baja ($H=0.24$) comparada con osos de anteojos de Colombia y Venezuela. Viteri (2009), por otro lado, encontró un nivel de diversidad más alto ($H=0.45$). Viteri (2009) menciona que el valor de diversidad genética encontrado ($H=0.45$) igualmente es bajo en relación con otras especies de osos. Por ejemplo, hace una comparación con una población aislada de oso pardo en Yellowstone con $H=0.55$. Estos resultados indican que los osos de anteojos presentes en el Ecuador tienen una baja diversidad genética posiblemente por la fragmentación de hábitat y que se necesitan tomar acciones de conservación que protejan a estos osos para lograr mantener la diversidad genética de la población

Con los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que la población analizada tiene una baja diversidad de nucleótidos y alta diversidad de haplotipos y

que la población está en expansión después de haber sufrido un cuello de botella reciente. Para mantener la población en expansión y que se puedan seguir acumulando mutaciones en la región analizada se deben proponer actividades de conservación que protejan a esta población. El Corredor Ecológico del Oso Andino es una iniciativa que puede ayudar a que se preserve el hábitat de esta especie y a futuro que las diferentes poblaciones de oso andino puedan mantener la conectividad entre si promoviendo la diversidad genética para esta especie.

9 CONCLUSIONES

A pesar de haber obtenido concentraciones bajas de ADN en las extracciones a partir de pelo, estas fueron suficientes para realizar los estudios de diversidad.

Los primers diseñados amplificaron exitosamente la región región HVII del D-loop del mtDNA

Se reportaron por primera vez haplotipos para la región D-loop del mtDNA para el oso andino. Se identificaron 5 haplotipos de 247pb en 13 individuos de *Tremarctos ornatus* identificados en el Corredor Ecológico del Oso Andino, al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito.

La diversidad de haplotipos fue alta pero la diversidad de nucleótidos fue baja, esto indica que la población ha sufrido una expansión después de un cuello de botella reciente.

10 RECOMENDACIONES

Aumentar el número de individuos para obtener índices de diversidad genética que caractericen con mayor exactitud a la población de estudio.

Realizar un estudio de la región D-loop del mtDNA de individuos de la zona al Norte del Rio Guayabamba y al lado Oeste de la carretera Calacalí-Nanegalito para poder realizar un estudio comparativo entre poblaciones.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Allcock, L., Strungnell, J. (2012) Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 27, No. 9
- Badhan, A., Eichstaedt, C., Almond, N., Knapp, L., Rose, N. (2014) Analysis of full-length mitochondrial DNA D-loop sequences from *Macaca fascicularis* of different geographical origin reveals novel haplotypes. *J Med Primatol* 44, 125–136
- Baxenavis, A. (2004) *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. John Wiley & Sons.
- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin J., Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10: 77-81.
- Browning, S. (2011) Haplotype phasing: existing methods and new developments. *Nature Reviews*, Volume 12.
- Beebee, T. (2008) *An Introduction to Molecular Ecology*. OUP Oxford.
- Clement, M., Posada, D. Crandall, K. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
- Excoffier, L., Lischer, H. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Frankman, R., Ballou, J., Briscoe, D. (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Genetic Science Learning Center (2014) *Conservation Genetics*. Learn.Genetics. Extraído desde: <http://learn.genetics.utah.edu/content/science/conservation/>
- Goldstein, I., Velez-Liendo, X., Paisley, S. & Garshelis, D.L. (IUCN SSC Bear Specialist Group). 2008. *Tremarctos ornatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008:e.T22066A9355162.
- Hoelzel, A., Hancock, J., Dover, G. (1991). Evolution of the Cetacean Mitochondrial D Loop Region. *Mol. Biol. Evol*, 8(3), 475-493.

- Holsinger, K. (2012) Tajima's D, Fu's FS, Fay and Wu's H, and Zeng et al.'s E. Extraído desde: <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecturenotes/molevol-tajima.pdf>
- Kahilainen, A. (2014) Conservation implications of species–genetic diversity correlations. *Global Ecology and Conservation* (2) 315-323.
- Kattan, et al. (2004) Range fragmentation in the spectacled bear *Tremarctos ornatus* in the northern Andes. *Oryx*, 38(2), 155–163
- Kibbe, W. (2007) 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. *Nucleic Acids Res.* 35
- Lacy, R. (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammology*. 78(2):320-335.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. (2009) *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. John Wiley and Sons.
- Molina, S. (2012) Análisis preliminar de la dinámica poblacional y amenazas del oso andino (*Tremarctos ornatus*) al nor-occidente del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) Ecuador. Universidad San Francisco de Quito
- Molina, S. (2014) en El oso de anteojos vecino desconocido del Distrito. Enfoque, USFQ. Extraído desde: https://www.usfq.edu.ec/publicaciones/enfoque/Documents/enfoque_013.pdf
- Pasternak, J. (2005) *An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases*. Wiley-Liss.
- Perez, J. (2001) Guía para la conservación del oso andino u oso de anteojos *Tremarctos ornatus*. CECAB.
- Peyton, B., Yerena, E., Rumiz D., Jorgenson, J., Orejuela, J., (1998) Status of wild Andean bears and policies for their management. *Ursus*. 10: 87-100
- Peyton, B., (1980). Ecology, distribution, and food habits of Spectacled Bears, *Tremarctos ornatus*, in Peru. *Journal of Mammology*, 61: 639 - 652
- Peyton, B., (1999) Spectacled Bear Conservation Action Plan. In: *Bears: status survey and conservation action plan*. Servheen, C., Herrero, S., Peyton, B., and Pelletier, K., 1999. IUCN/SSC Bear Specialist Group. UK: IUCN
- Prediger, E. (2012) Designing PCR Primers and Probes. Extraído desde: <https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipettips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>

- Renner, M. J., and Lussier. J. P., (2002). Environmental enrichment for the captive spectacled bear (*Tremarctos ornatus*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73: 279-283
- Rodriguez, M, Sanchez, A. (2006) Population management of threatened taxa in captivity within their natural ranges: Lessons from Andean bears (*Tremarctos ornatus*) in Venezuela. *Biological conservation* 129, 134–148
- Ruiz-García, M. (2003) Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the northern Andean area. *Hereditas* 138: 81–93.
- Secretaria General del Concejo Metropolitano de Quito. (2013) Resolución No. C431 (Creación del Corredor Ecológico del Oso Andino). Extraído desde: http://www7.quito.gob.ec/mdmq_ordenanzas/Resoluciones%20de%20Concej/Añ%20%202013/RC-2013-431%20%20CORREDOR%20ECOLÓGICO%20DEL%20OSO%20ANDINO.pdf
- Soibelzon, L. (2007) The fossil record of the short-faced bears (Ursidae, Tremarctinae) from Venezuela. Systematic, biogeographic, and paleoecological implications. *N. Jb. Geol. Paläont Vol.* 244, p. 287-298
- Spady, T. J., Lindburg, D. G., and Durrent, B. S., (2007). Evolution and reproductive seasonality in bears. *Mammal Review.* 37: 21-53
- Thermo Scientific (2012) Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123-Technical Bulletin. Extraído desde: <http://www.nanodrop.com/Library/T123-NanoDrop Lite Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- Thermo Scientific (2010) Nucleic Acid Thermo Scientific Nanodrop Spectrophotometers. Extraído desde: http://www.cuny.edu/research/sr/undergradresearch/forfaculty/AEM/nanodrop_nucleicacid_olv_re_3_11_r.pdf
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.* *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- The GAP Group, GAP -- Groups, Algorithms, and Programming, Version 4.8.3; 2016. (<http://www.gap-system.org>)
- University of Calgary (2010) Quality Value (QV) Scores. Extraído desde: <http://www.ucalgary.ca/dnalab/sequencing/services/QV>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115

- Vinay, K., Govindarajan, R., Naik, S., Kumar, A. (2000) The Effect of Hairpin Structure on PCR Amplification Efficiency. *Molecular biology Today* 1(3): 67-69.
- Viteri, P. Waits, L. 2009) Identifying polymorphic microsatellite loci for Andean bear research. *Ursus* 20(2):102–108
- Wang, L. (2006) Haplotype Inference by Maximum Parsimony. Extraído desde: <http://www-cs-students.stanford.edu/~xuying/papers/hapar.pdf>
- Weale, M. (2003) A survey of current software for haplotype phase inference. *Human genomics*. Vol 1. No 2. 141–144
- Yerena, E., Torres, D. (1994) Spectacled Bear Conservation and Dispersal corridors in Venezuela. *International Association for Bear Research and Management* 9(1): 169 172
- Yang, Z. (2014) *Molecular Evolution: A Statistical Approach*. Oxford University.

12 FIGURAS

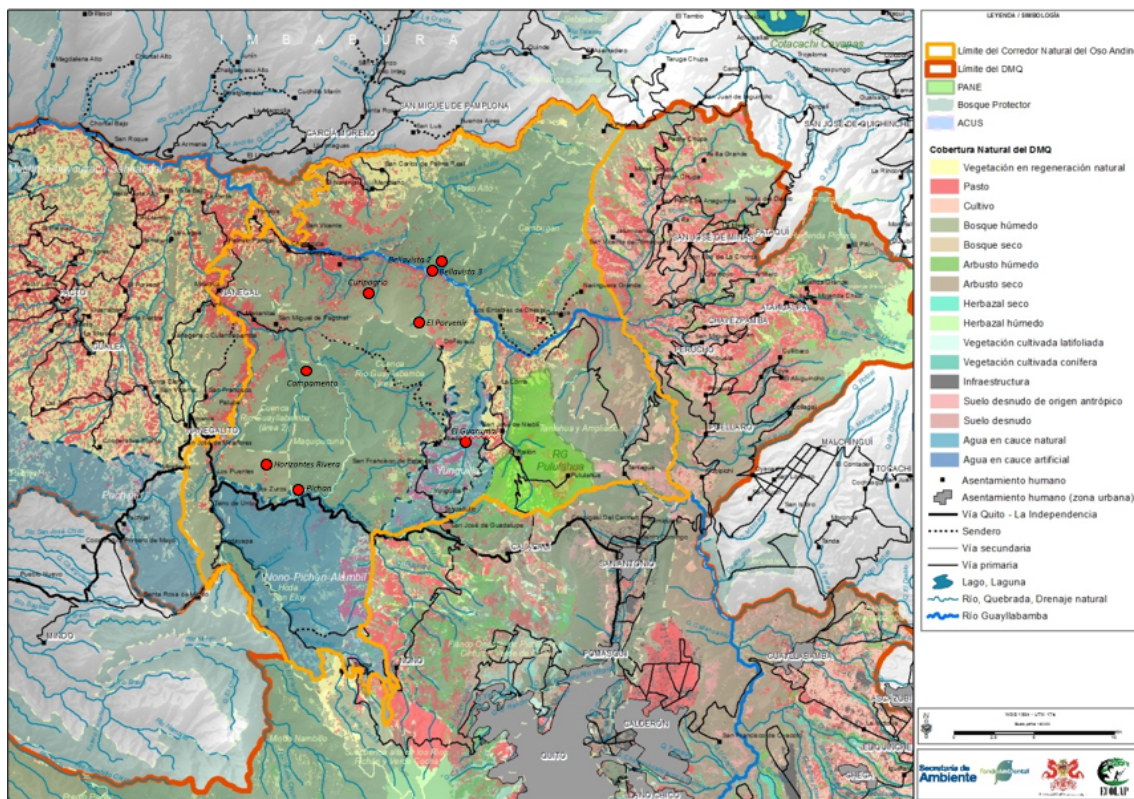


Figura 1: Mapa del Corredor Ecológico del Oso Andino. Los límites del Corredor Ecológico del Oso Andino se muestran como líneas amarillas y los límites del DMQ se muestran en naranja. Los puntos marcados en rojo indican las localidades donde se obtuvieron muestras para este estudio, estas están delimitadas por el río Guayllabamba al norte y la carretera Calacalí-Nanegalito al Oeste.

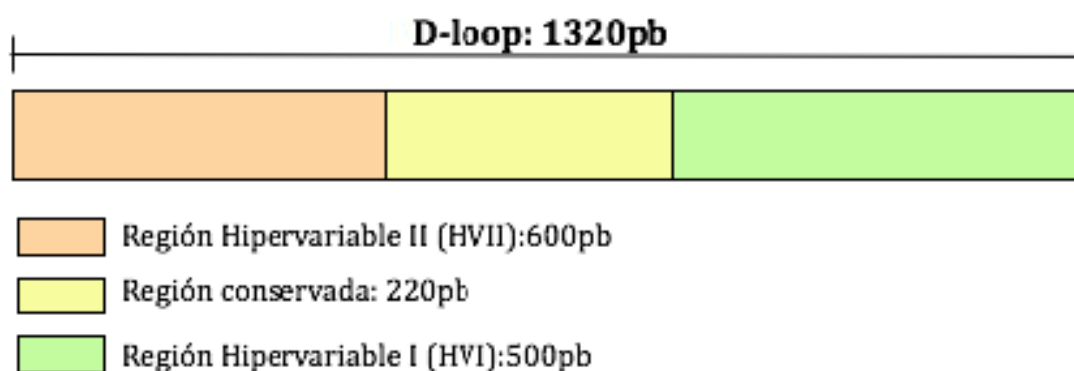


Figura 2: Diagrama de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Tremarctos ornatus*. La sección inicial (color naranja) corresponde a la región hipervariable II (HVII) y tiene una extensión de 600pb, la sección media (color amarillo) corresponde a una región conservada y repetitiva de 220pb y la sección final (color verde) representa la región hipervariable I (HVI) con 500pb de extensión. En total la región D-loop de *Tremarctos ornatus* tiene aproximadamente 1320pb.

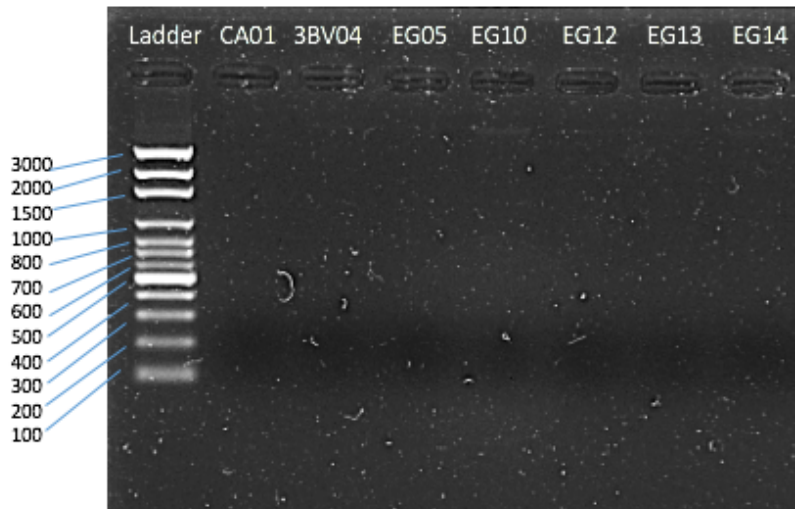


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las extracciones de ADN de 4 muestras del estudio.

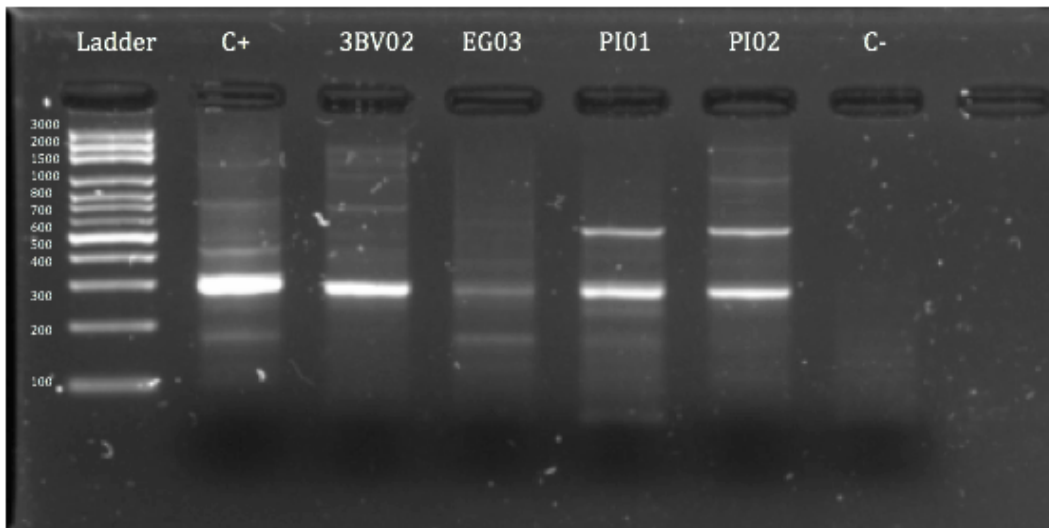


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen de B-actina. El tamaño de banda esperado es 300pb.

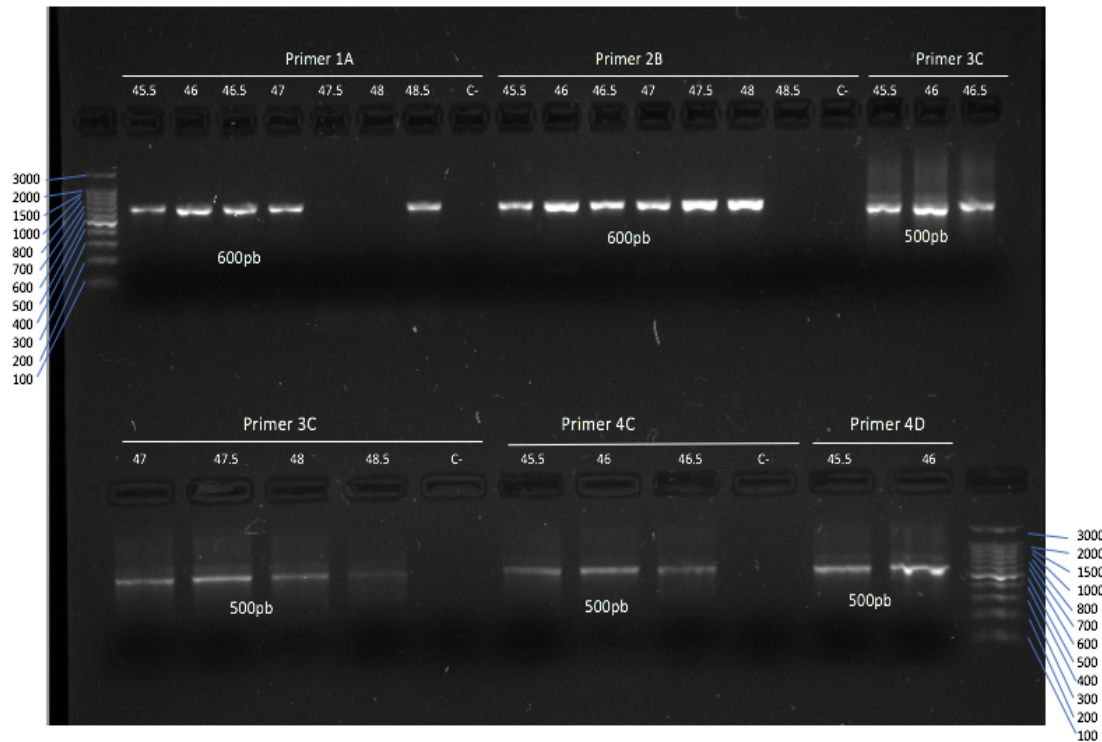


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación con los primers 1A, 2B, 3C, 4C y 4D, con gradiente de temperatura desde 45.5°C a 48.5°C. Todos los carriles corresponden a la muestra IL01 (Yumbo). Para los primers 1A y 2B el tamaño de banda esperado es 600pb y para los primers 3C, 4C y 4D 500pb.

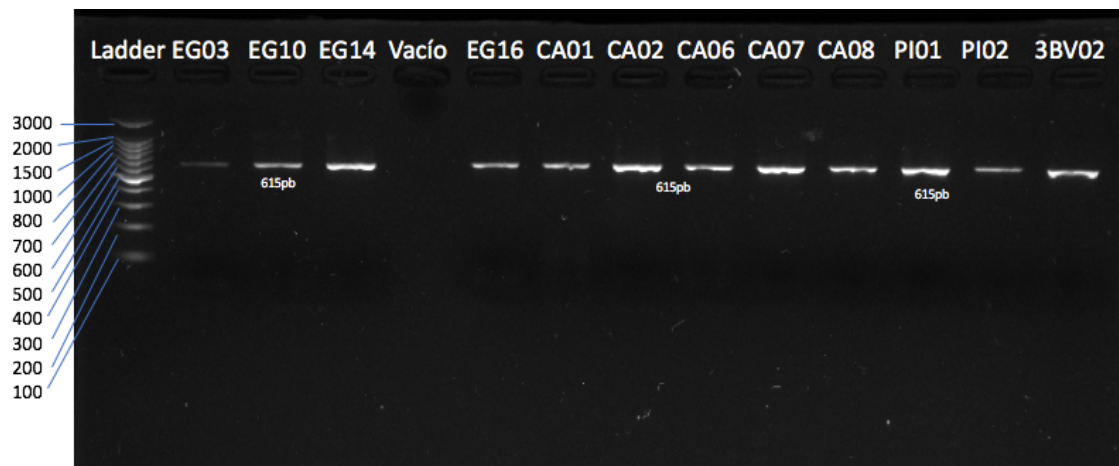


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación con los primers TORmt2F y TORmt2R. El tamaño de banda esperado para este primer es 615pb.

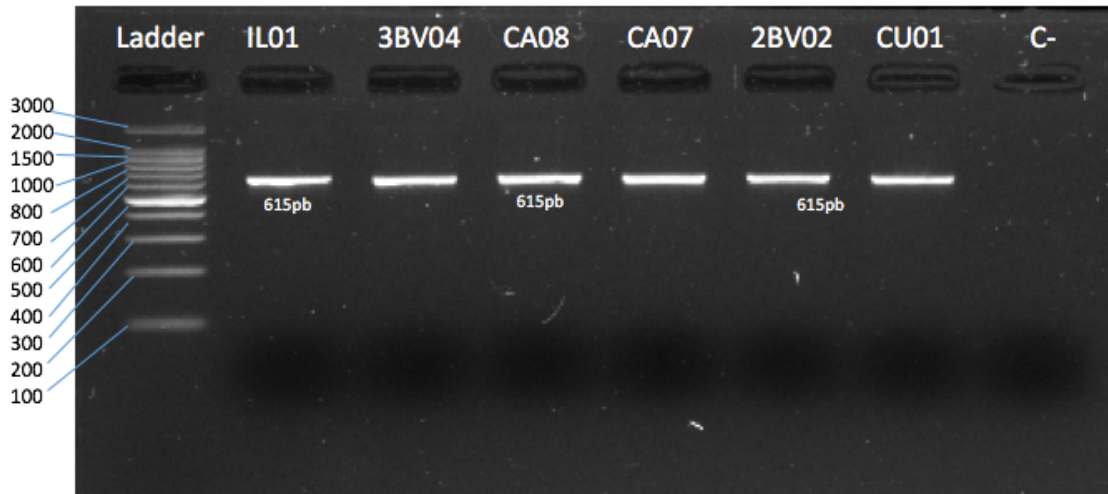


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reamplificación de las bandas extraídas del gel de acrilamida. El tamaño de banda esperado es 615pb.

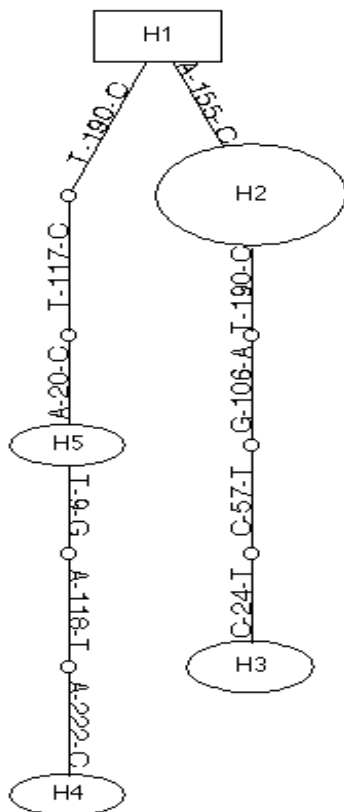


Figura 8: Red de haplotipos generada por el programa TCS (Clement, 2000). El tamaño de los círculos indica la frecuencia de cada haplotipo y la distancia de las ramas indica los cambios que hay entre haplotipos.

13 TABLAS

Tabla 1: Secuencias de los primers diseñados para la amplificación de la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus* con su respectiva Temperatura de melting, %GC, y complementariedad.

Nombre	Codigo	Secuencia (5'- 3')	Tm	%GC	Longitud (pb)	Self Complementary
TORmt1F	1	CTGTAGCATCCTAGTATGTCC	54,73	47,62	21	No hairpin, no dimer
TORmt2F	2	TAGCTCCACCATCAACACCC	59,38	55	20	No hairpin, no dimer
TORmt3F	3	CGCAGTCAATTGATCTGTAGC	57,42	47,62	21	No hairpin, no dimer
TORmt4F	4	GCTATGACCGTAAAGGTCTCG	58,27	52,38	20	No hairpin, no dimer
TORmt5F	5	GTAAAGGTCTCGTCGCAGTCA	60,07	52,38	21	No hairpin, no dimer
TORmt1R	A	GTCCGTGATCTCTACGTATC	54,66	50	20	No hairpin, no dimer
TORmt2R	B	ACTGCGACGAGACCTTTACG	60,11	55	20	No hairpin, no dimer
TORmt3R	C	GGCAAGGCAATCATAAATGCG	58,87	47,62	21	No hairpin, no dimer
TORmt3R	D	GGGTTTGGCAAGGCAATCAT	59,39	50	20	No hairpin, no dimer

Tabla 2: Combinaciones posibles de pares de primers y el tamaño del producto correspondiente según los primers individuales de la Tabla 1.

Combinación	Tamaño del producto (pb)
1A	615
2B	612
3C	506
4C	528
4D	534
5D	525

Tabla 3: Concentración y calidad de ADN de las 13 muestras de osos de anteojos estudiadas. Estos parámetros fueron calculados en NanoDrop 2000. Los códigos de las muestras inician con 2 letras representativas de la localidad donde se obtuvo la muestra seguido por el número de muestra colectada.

No.	Código	Localidad	Concentración ADN (ng/μl)	260/280	260/230
1	2BV02	Bellavista 2	1,7	4,15	0,2
2	3BV02	Bellavista 3	0,8	1,01	0,46
3	CA01	Campamento	1,5	3,07	1,01
4	CA02	Campamento	-0,7	0,42	0,13
5	CA07	Campamento	-1,9	0,7	0,19
6	CA08	Campamento	2,3	2,81	0,21
7	CU01	Curipogrio	1,3	-0,73	-1,44
8	EG14	El Guarumal	1,8	11,12	1,74
9	EP02	El Porvenir	1,5	3,13	0,22
10	EP03	El Porvenir	0,2	-0,06	-0,1
11	HR01	Horizontes Rivera	3,3	5,94	0,27
12	IL01 (Yumbo)	Ilitio	12,3	1,98	0,71
13	PI02	Pichan	1,7	1,45	0,24

Tabla 4: Secuencias de los haplotipos encontrados junto con las muestras pertenecientes a cada individuo. Los códigos de las muestras inician con 2 letras representativas de la localidad donde se obtuvo la muestra seguido por el número de muestra colectada.

Haplotipo	Secuencia	Codigo de muestra
H1	TCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACA TGGACTTCAAAAACGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAA TCACCAGGCCTCGAGAAAACAGCAACCCTTGCGAGTACGTATACCTTTCTCGCTCCGGGCCATAG AAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTT	HR01, EP02
H2	TCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACA TGGACTTCAAAAACGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAA TCACCAGGCCTCGAGAAAACAGCAACCCTTGCGAGTACGTATACCTTTCTCGCTCCGGGCCATAG AAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTT	CA07, 3BV02, CA01, EP03, IL01, 2BV02, PI01
H3	TCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACA TGGACTTCAAAAACGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAGGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAA TCACCAGGCCTCGAGAAAACAGCAACCCTTGCGAGTACGTATACCTTTCTCGTTCCGGGCCATAGA AACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTT	EG14, CA08
H4	TCGTGCATGAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACA TGGACTTCAAAAACGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTTCTTAGTCCGGGAGCTTAA TCACCAGGCCTCGAGAAAACAGCAACCCTTGCGAGTACGTATACCTTTCTCGTTCCGGGCCATAG AAACGTGGGGGTTTCTATCCTGAAACTATACCTGGCATCTGGTT	CU01
H5	TCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGGCTTACATGAGGACA TGGACTTCAAAAACGTTTTGAAGACGTAGTCTGTAAGCATGTATTTCACTTAGTCCGGGAGCTTAA TCACCAGGCCTCGAGAAAACAGCAACCCTTGCGAGTACGTATACCTTTCTCGTTCCGGGCCATAG AAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTT	CA02

Tabla 5: Frecuencia de los 5 haplotipos encontrados en 13 individuos del Corredor Ecológico del Oso Andino en el Distrito Metropolitano de Quito. Cada muestra pertenece a un individuo de oso andino diferente. Los individuos tienen un código específico como identificación, la “M” corresponde a un oso macho y la “H” a un individuo hembra.

Haplotipo	Frecuencia	Muestra	Localidad	Individuo
H1	2	HR01	Horizontes Rivera	Indv 2
		EP02	El Porvenir	25M9
H2	7	CA07	Campamento	5M5
		3BV02	Bellavista 3	21M7
		CA01	Campamento	35I
		EP03	El Porvenir	37M16
		IL01	litio	Yumbo
		2BV02	Bellavista2	23M8
		PI02	Pichan	44M19
H3	2	EG14	El Guarumal	42M18
		CA08	Campamento	33M15
H4	1	CU01	Curipogrio	Indv 1
H5	1	CA02	Campamento	39I

Tabla 6: Índices de diversidad genética de la región D-loop de *Tremarctos ornatus* calculados en el programa Arlequin 3.5

Parámetro	Resultado
Individuos	13
Haplotipos	5
Tamaño del fragmento	247
Sitios polimórficos	10
Diversidad de genes	0.7051
Diversidad de nucleótidos	0.01224
Transiciones	5
Transversiones	5
Sustituciones	10
Indels	0
Tajima's D (Neutralidad)	-0.53