



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN *EX SITU* DEL MICO LEÓN NEGRO (*LEONTOPITHECUS CHRYSOPYGUS*) (*PRIMATES, CALLITHRICIDAE*), UTILIZANDO MARCADORES HOMÓLOGOS DE TIPO MICROSATÉLITES, EN LA FUNDACIÓN PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO, Y EN EL PARQUE ECOLÓGICO DE SÃO CARLOS, BRASIL.

PAOLA ANDREA AYALA BURBANO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2013

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN *EX SITU* DEL MICO LEÓN NEGRO (*Leontopithecus chrysopygus*) (*PRIMATES, CALLITHRICIDAE*), UTILIZANDO MARCADORES HOMÓLOGOS DE TIPO MICROSATÉLITES, EN LA FUNDACIÓN PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO Y EN EL PARQUE ECOLÓGICO DE SÃO CARLOS, BRASIL

PAOLA ANDREA AYALA BURBANO.

ASESORES

PH. D. EN CIENCIAS, CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO, ASESOR INTERNO.

PH. D. EN ECOLOGÍA Y RECURSOS NATURALES PEDRO MANOEL GALETTI JUNIOR, ASESOR EXTERNO.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2013

## NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Carol Yovanna Rosero Galindo

---

Director

Edith Mariela Burbano

---

Jurado

Carlos Solarte Portilla

---

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo, 2013

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

A mis Padres por apoyarme en todo momento, por sus sabios consejos, sus valores, por la motivación constante que no es más que la continuación de su amor, por la lucha por mis sueños que supieron inculcar desde el comienzo de mi vida. A mis hermanos y sobrinos por el apoyo, la alegría y la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mí querida y amada Rosario por ese amor incondicional, por sus regaños, por sus consejos, por su calor. Por todo lo que es ella significa en vida. A quien le debo todo lo que tengo y todo lo que soy.

A mi Andy panda por el amor, compañerismo, amistad, por la paciencia y la confianza. Por darme fuerza cuando todo parecía imposible e inalcanzable.

A mi asesora Carol Rosero gracias por el tiempo, por apoyo, así como por la sabiduría que me transmitió en el desarrollo de mi formación profesional, por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.

A mi asesor Pedro Manoel Galleti quien me dio la oportunidad de hacer parte del Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Conservación, por su apoyo, cariño y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos de lucha Edna, Stephany, Esteban Herrera, Esteban Durango, Karen Catillo, Nathaly Portillo, Jorge Bolaños, sin quienes toda esta travesía no hubiese tenido sentido.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biodiversidad Molecular y Conservación en especial a: Aline Braga, Bruno, Carol, Carol Miño, Karen, Karla, Fernanda, Mariana, Andiara, Danielly y Carla por la gran ayuda, por las enseñanzas, la paciencia y por tornar cada día en la distancia más amigable.

A los profesores Patricia Domingues de Freitas y Jhon Jairo Calderón por la colaboración, paciencia, apoyo y sobre todo por esa gran amistad que me brindaron, por escucharme y aconsejarme siempre.

Al Zoológico de São Paulo y al Parque Ecológico de São Carlos, por las muestras contribuidas para este estudio. Por apoyar el proyecto de conservación del Mico-León-negro.

Al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) por la beca concedida durante el segundo período de la pasantía.

A todos aquellos que hicieron con que me apasionara por la vida, la genética, la evolución y conservación con sus enseñanzas y sus tantas historias de vida.

*Dedico este trabajo a mis padres Edgar y Rosario, mis hermanos Giovanni, Rolando y Ana María, a quien les debo toda mi vida, les agradezco el cariño y su comprensión, a ustedes quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3. MARCO TEÓRICO .....	20
3.1 PRIMATES DEL NUEVO MUNDO.....	20
3.1.2 Género <i>Leontopithecus</i> Lesson, 1840.....	21
3.1.2.1 El titi león Negro, <i>Leontopithecus chrysopygus</i> . .....	23
3.2 MARCADORES MOLECULARES.....	26
3.2.1 Tipos de marcadores .....	26
3.2.2 Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de la conservación de especies.....	28
3.2.3 Marcadores codominantes tipo Microsatélites.....	29
3.2.3.1 Función Biológica de los microsatélites.....	30
3.2.3.2 Ventajas y Desventajas del Uso de Microsatélites .....	30
3.2.3.3 Aplicación de los marcadores Microsatélites en Conservación .....	31
3.3 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN.....	31
3.4 GENÉTICA DE LAS POBLACIONES EN CAUTIVERIO .....	33
3.5 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	34
3.5.1 MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	35
3.5.1.1 Polimorfismo o Tasa de Polimorfismo (Pj) .....	35
3.5.1.2 Proporción de <i>loci</i> Polimórficos.....	35
3.5.1.3 Abundancia de Variantes Alélicas (A).....	36
3.5.1.4 Número medio de Alelos por locus.....	36
3.5.1.5 Numero Efectivo de Alelos.....	37
3.5.2 Heterocigosidad observada y Esperada: Equilibrio de Hardy y Weinberg. ....	37
3.5.3 Heterocigosidad Esperada o Diversidad Genética de Nei (1987).....	38

3.6	ENDOGAMIA .....	39
3.6.1	Coeficiente de Endogamia.....	39
3.7	ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN .....	41
3.7.1	Índices de fijación.....	41
3.7.2	Rst.....	43
3.8	PARENTESCO GENÉTICO .....	43
3.9	ANTECEDENTES .....	45
4.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	48
4.1	Población <i>ex situ</i> de <i>Leontopithecus chrysopygus</i> . .....	48
4.2	ÁREA DE ESTUDIO.....	48
4.3	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	49
4.4	FASE DE LABORATORIO.....	50
4.4.1	Extracción y Cuantificación de DNA.....	50
4.4.2	Caracterización genética de las Muestras. ....	51
4.4.3	ANÁLISIS DE DATOS .....	54
5.	RESULTADOS .....	56
5.1	Población <i>ex situ</i> de <i>Leontopithecus chrysopygus</i> . .....	56
5.2	Extracción de DNA genómico total. ....	57
5.2	Amplificación y proporción de <i>loci</i> polimórficos.....	58
5.3	Variabilidad Genética.....	58
5.4	Riqueza alélica y Heterocigocidad. ....	63
5.5	Equilibrio Hardy-Weinberg .....	64
5.6	Estructura Poblacional.....	66
5.7	Análisis de Parentesco.....	66
6.	DISCUSIÓN .....	75
6.1	Amplificación de <i>loci</i> homólogos.....	75
6.2	Variabilidad Genética.....	78
6.3	Estructura Poblacional.....	81
6.4	Parentesco Genético .....	82

CONCLUSIONES ..... 84

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 86

ANEXOS..... 99

## LISTA DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Tipos de los marcadores moleculares.	28
Tabla 2. Cantidad de muestras colectadas en cada recinto de estudio.	50
Tabla 3. Secuencias forward y reverse de los cebadores microsatélites específicos para <i>Leontopithecus chrysopygus</i> obtenidos por Pérez <i>et al</i> , 2005.	53
Tabla 4. <i>Loci</i> microsatélites polimórficos en la especie <i>Leontopithecus chrysopygus</i> .	60
Tabla 5. Estimaciones de diversidad genética basadas en los datos de ocho <i>loci</i> Microsatélites homólogos.	64
Tabla 6. Estimativas de las frecuencias de alelos nulos para cada locus según el método descrito por Brookfield 1 (1996), calculado con el programa Micro-Cheker.	66
Tabla 7. Valores del coeficiente <i>Fst</i> y <i>p valor</i> .	67
Tabla 8. Análisis AMOVA de la distribución de los componentes de la variabilidad genética total presente en las poblaciones.	67
Tabla 9. Valores de probabilidad de Identidad (PI) y probabilidad de Exclusión (PE) por locus en las dos poblaciones.	68
Tabla 10. Categorías de relacionamiento ente los pares de individuos estudiados de cada uno de los recinto.	69

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución actual de las cuatro especies de micos leones.	23
Figura 2. Mapa Del Estado de São Paulo en donde se muestra el área de distribución del mico león negro.	25
Figura 3. Mapas satelitales mostrando los sitios de colecta.	50
Figura 4. Muestras de sangre obtenidas por venopuncion femoral.	51
Figura 5. Protocolo de Extracción utilizado para la obtención DNA a partir de sangre y pelo.	52
Figura 6. Esquema de la reacción de amplificación con el uso de la cola universal M13 adaptado de Schuelke (2000).	54
Figura 7. Heredograma mostrando las relaciones de parentesco entre los individuos de los dos recintos.	57
Figura 8. Verificación de la calidad de DNA genómico total en gel de agarosa al 1%.	58
Figura 9. Gel de agarose 1% con DNA microsatélite amplificado probando Un gradiente de temperatura.	59
Figura 10. Electroferogramas mostrando el patrón de algunos dos alelos en cada uno de los <i>loci</i> microsatélites utilizados en este trabajo.	61
Figura 11. Gráfico presentando la distribución de alelos y las frecuencias Alélicas en las dos poblaciones.	62
Figura 12. Gráfico mostrando el patrón alélico de las poblaciones.	79

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Frecuencias Álicas por Población.	100
Anexo B. Comparación entre las Heterocigosidades observadas y esperadas sin considerar el alelo nulo y considerando el alelo nulo.	101
Anexo C. Descripción detallada del protocolo de extracción usado en este trabajo.	102

## RESUMEN

La fragmentación de hábitat puede afectar significativamente algunas especies entre las que se encuentran los primates, las cuales pueden tener el número poblacional reducido y en algunos casos puede resultar en el aislamiento de sus poblaciones, aumentando la tasa de endogamia y reduciendo la variabilidad, como resultado del bajo número de migrantes efectivos. En un intento por minimizar estos impactos, las caracterizaciones genéticas de poblaciones silvestres y en cautiverio se tornan una importante herramienta para la conservación de estas especies, una vez que posibilitan el desarrollo de estrategias de manejo con el objetivo de mantener niveles adecuados de diversidad genética. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la estructura genética de dos poblaciones en cautiverio del mico-león-negro (*Leontopithecus chrysopygus*), procedentes de la Fundación Parque Zoológico de São Paulo (São Paulo, SP) y del Parque Ecológico de São Carlos (São Carlos, SP), utilizando marcadores microsatélites. El DNA fue extraído a partir de sangre, heces y pelo de 20 individuos y amplificados vía PCR. Fueron probados 10 *loci* microsatélites desarrollados específicamente para la población del mico-león-negro. Los *loci* amplificados por PCR fueron posteriormente genotipados, encontrando que 8 de ellos resultaron polimórficos (más de dos alelos). El número de alelos varió desde 2 (en los *loci* 3c20 y 11c72), hasta 4 en la mayoría de los *loci* probados y la heterocigocidad media esperada fue de 0,5 en las dos poblaciones identificadas *a priori*. El análisis de varianza molecular (AMOVA), mostró que la mayor parte de la diversidad está presente dentro de las poblaciones y no entre ellas. El índice *Fst* fue pequeño mostrando una baja diferenciación genética entre los dos recintos. Los resultados sugieren que las poblaciones están poco estructuradas y que ocurre flujo génico direccionado entre ellas. El grado de parentesco fue determinado para 191 pares de individuos pertenecientes a ambos recintos con los datos de 8 de los diez *loci*, siendo posible la clasificación de 133 pares (70%) en una categoría de parentesco. Entre los pares de individuos que fueron clasificados 127 pares (95.5%) no tienen ninguna relación de parentesco, 3 pares (2,3%) son hermanos completos y 3 pares (2,3%) son medio hermanos. Según esas categorías de relacionamiento, se puede inferir que la mayoría de estos individuos son potenciales para el diseño de cruces con el fin de reducir la endogamia y la consecuente pérdida de variabilidad genética de las poblaciones en cautiverio. Estos resultados podrán favorecer futuros planes de manejo que permitan la conservación de esta especie.

Palabras clave: *Leontopithecus chrysopygus*- mico-león-negro, *microsatélites*, variación genética, parentesco

## ABSTRACT

Some groups such as primates are more vulnerable to changes brought about by the gradual degradation of habitats such as fragmentation, a phenomenon that reduces both the total number of individuals, as the genetic variability of populations and even leads to the isolation of subpopulations, promoting long-term inbreeding among individuals that compose them as a result of the low number of effective migrants. In order to minimize these impacts, molecular techniques have become an important tool for generating the basis of existing biodiversity conservation and addressing breeding programs that promote increased gene and genotypic variation (Haig, 1998). So to help achieve this goal, in this study the captive population of *Leontopithecus chrysopygus* Foundation from São Zoo Paulo and the Ecological Park of São Carlos was genetically characterized and classified into a category of kinship (full siblings, half siblings or unrelated), using microsatellite markers. DNA was extracted from the blood, stool and hair of 20 individuals and amplified via PCR. Ten microsatellite loci were tested, developed specifically for the population of black-lion-tamarin. The PCR-amplified loci were subsequently genotyped and eight were found polymorphic (more than two alleles) and two were monomorphic. The number of alleles ranged from two (at loci 3C20 and 11c72) to 4 in most loci tested and average expected heterozygosity was 0.5 in both populations identified a priori. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most of the diversity was present within populations, not between them. The  $F_{st}$  index showed a small low genetic differentiation between the two venues. The results suggest that populations are highly structured and directed gene flow occurs between them. The degree of relationship was determined for 191 pairs of individuals belonging to both enclosures with data from eight of the ten loci, the classification of 133 pairs (70%) in a relationship category having been made possible. Among the pairs of individuals who were classified 127 pairs (95.5%) have no family relationship, 3 pairs (2.3%) are full siblings and 3 pairs (2.3%) are half siblings. According to these categories of relationships, we can infer that most of these individuals experience potential cross design in order to reduce inbreeding and loss of genetic variability, which is probably the most important contribution of genetics to the management of captive populations.

Keywords: Black-lion-tamarins, *Leontopithecus chrysopygus*, microsatellites, genetic variation, kinship.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pérdida del hábitat por fragmentación ha generado graves consecuencias para la vida salvaje, puesto que este proceso genera cambios permanentes para los ambientes que soportan la biodiversidad y para los cuales hay poca probabilidad de restauración y recuperación (Markovchick- Nicholls *et al.*, 2008). Algunos grupos como los primates, son más vulnerables a los cambios generados por el proceso de fragmentación. Análisis de variabilidad del hábitat y poblacionales, han mostrado la necesidad de un manejo efectivo de las poblaciones del mico león negro, especie objeto de este estudio, puesto que las probabilidades de supervivencia de la especie, como consecuencias de este proceso, en los próximos años son remotas (Valladares Padua, 1993; Valladares Padua y Cullen Jr., 1994; Ballou y Valladeres Padua, 1997, tomado de Saddy, 2003).

El mico-león-negro (*Leontopithecus chrysopygus*), hoy en día es una especie considerada en peligro por la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2011) y por el Instituto Brasileiro de Medio Ambiente y los Recursos Renovables (IBAMA). Uno de los parámetros de esta clasificación es la reducción de su tamaño poblacional lo que a su vez conlleva, a la pérdida de la variabilidad genética existente. Las poblaciones de tamaño pequeño como es el caso de las poblaciones en estado de cautiverio que fueron estudiadas en este trabajo, están sujetas a reducciones rápidas en número de individuos y propensas a la extinción local debido a la pérdida de esa variabilidad y problemas relacionados con la depresión endogámica y deriva génica, además de fluctuaciones demográficas ocasionadas por variaciones al azar en las tasas de nacimiento y muerte y al tamaño efectivo de la población (Primack *et al.*, 2001).

Según Torres (2010), para poder comprender mejor los procesos evolutivos relacionados con la disminución de esa variabilidad, se hace relevante conocer la composición genética de la población con fines de conservación. Razón por la cual, el diagnóstico con marcadores genéticos de ADN se justifica toda vez que el uso de estas herramientas moleculares genera una impresión digital de cada individuo y además permite medir la diversidad genética y analizar las fuerzas microevolutivas que modifican las frecuencias alélicas en cada población (Morín y Woodruff 1996, Kohn y Wayne 1997; Miotto *et al.*, 2007a, b, citado por Galetti 2010).

Entre los marcadores moleculares más idóneos para conocer la composición genética de una población se destacan los microsatélites, puesto que generan información sobre hibridación, historia demográfica, detección de cuellos de

botella y endogamia, además de la evaluación de impactos sobre el comportamiento reproductivo, estructura social, dispersión y estructura genética de especies amenazadas (Cuervo, 2010).

Por otra parte, son ideales para el análisis de variabilidad genética y la determinación de parentesco entre individuos de descendencia desconocida, cuando no hay ninguna información en el pedigrí (linaje), puesto que proporcionan resultados que permiten estimativas prudentes del parentesco entre los individuos, lo cual es benéfico para diseñar apareamientos con el fin de maximizar la variabilidad y minimizar la endogamia (Beaumont y Bruford, 1999; Frankham *et al.*, 2002; Russello y Amato, 2004, Citado por Cuervo, 2010).

En este sentido, evaluar el estado genético de las poblaciones y proponer medidas para preservar la diversidad genética así como de prevenir riesgos de naturaleza genética para la estabilidad de las poblaciones han sido los objetivos centrales y fundamentales de la genética de la conservación para los que los marcadores moleculares han resultado enormemente útiles. En este sentido la Fundación Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) y el Parque Ecológico de São Carlos, parque el cual alberga poblaciones críticamente amenazadas o algunas ya extintas, han participado de manera activa en programas de conservación de una diversidad genética representativa. En convenio con algunas Universidades Paulistas, han venido desarrollando proyectos temáticos que tienen por objetivo utilizar herramientas genéticas y moleculares para subsidiar programas de reproducción, manejo y reproducción de especies amenazadas (FPZSP, 2011), del cual este proyecto hace parte.

De esta forma este trabajo fue desarrollado con el fin de entender los patrones y procesos evolutivos que definen la variación genética de las poblaciones del mico león negro que se reportan en cautiverio (*Leontopithecus chrysopygus*), así como también determinar elementos genéticos que sirvan como base, que permitan a futuro tomar medidas de manejo y conservación de esta especie en peligro de extinción

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Caracterizar genéticamente las poblaciones en cautiverio del mico león negro (*Leontopithecus chrysopygus*), en la Fundación Parque Zoológico de São Paulo y del Parque Ecológico de São Carlos, utilizando marcadores homólogos de tipo microsatélite.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en cautiverio.
- ✓ Determinar desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones, en cautiverio, de tití león negro.
- ✓ Determinar la estructura genética y los niveles de endogamia de las poblaciones, en cautiverio, de tití león negro.
- ✓ Determinar con base en los genotipos moleculares, las relaciones de parentesco entre los individuos pertenecientes a la población *ex situ* de *L.chrysopygus*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 PRIMATES DEL NUEVO MUNDO

El orden Primates es uno de los más antiguos, no obstante su registro fósil es muy incompleto ya que la formación de fósiles en las áreas tropicales ha sido más difícil que en las zonas templadas (Morales, 2004). Este orden que incluye lémures, monos y homínidos divergió aproximadamente hace 70 millones de años a partir de pequeños mamíferos insectívoros terrestres, de esta manera los primates componen un punto final de una rama destacada desde sus orígenes en el árbol filogenético de los mamíferos (Daltoé, 2006).

La sistemática de los primates del nuevo mundo ha sido objeto de fuertes debates durante las últimas décadas. Algunos autores dividen a los primates neo tropicales en 15 géneros y con base en evidencias morfológicas y moleculares establecen siete grupos monofiléticos o clados, separados desde el Oligoceno tardío hasta la mitad del Mioceno hace aproximadamente 25 y 17 millones de años. (Escobar, 2002, Citado por Morales, 2004). Estos se agrupan dentro de siete familias, una de las cuales es la familia *Callithricidae* con la subfamilia *Callitrichinae*. Otros autores, proponen que existen tres clados monofiléticos: los grandes monos constituidos por los géneros *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix* y *Brachyteles*; los monos predadores de semillas *Phitecia*, *Chiropotes* y *Cacajao*; y el clado de los pequeños monos con garras del cual *Leontopithecus* presenta otros tres géneros *Saguinus*, *Callithrix*, *Cebuella* (Schneider, 2000, Citado por Daltoé, 2006).

Dentro del clado de los monos pequeños, está la familia *Callithricidae* (familia exclusiva del Neo trópico) está conformada por 42 especies comprendidas en 7 géneros (Morales, 2004), cuatro de estas especies son endémicas de Brasil: *Leontopithecus caissara*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Leontopithecus chrysopygus* y *Leontopithecus rosalia* (Daltoé, 2006).

### 3.1.2 Género *Leontopithecus* Lesson, 1840

Según Fleage (1999), la familia *Callithricidae* incluye los primates más pequeños del Nuevo mundo, con un peso que oscila entre los 100 y 700 gramos, es la más diversa en cuanto a especies y subespecies con 60 taxas reconocidos y está compuesta por seis géneros: *Cebuella*, *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus* y *Callimico*, los cuales se distinguen por adaptaciones en sus hábitos de alimentación.

Los géneros *Cebuella*, *Callithrix* y *Mico* presentan dientes incisivos de similar tamaño a los caninos, mientras que los géneros *Saguinus*, *Leontopithecus* y *Callimico* presentan caninos más prominentes que los incisivos, proporcionando a los primeros la ventaja de abrir huecos en los troncos (Guidorizzi, 2008).

Por otro lado, los micos leones pertenecientes al género *Leontopithecus* (Lesson, 1840), son los micos más grandes de la familia *Callitrichidae* con una masa corporal que puede llegar hasta los 650 gramos en su fase adulta.

En el bosque atlántico de Brasil habitan cuatro especies endémicas: mico león de cara dorada (*L. chrysomelas*) distribuido entre el sur del estado de Bahía y el extremo norte de Minas Gerais; mico león dorado (*L. rosalia*) el cual se encuentra únicamente en región costera de Rio de Janeiro; mico león negro (*L. chrysopygus*) que habita, de forma exclusiva, el oeste del estado de São Paulo y el mico león de cara negra (*L. caissara*) que habita el litoral del norte del estado de Paraná y el litoral sur del estado de São Paulo (Guidorizzi, 2008) (Figura 1). Las cuatro especies se encuentran incluidas en las listas brasileras e internacionales de especies críticamente amenazadas (Pissinatti *et al.*, 2007 Citado por Guidorizzi, 2008).

En general, los micos leones muestran un sistema social de grupos familiares territoriales en donde se observa cuidados cooperativos en relación a las crías (Procópio *et al.*, 2008), bien sea cargándolos en la espalda, defendiéndolos de los depredadores u ofreciéndoles comida diariamente, además sólo hay una pareja reproductora (Precópio *et al.*, 2008; Gudorizzi, 2008).

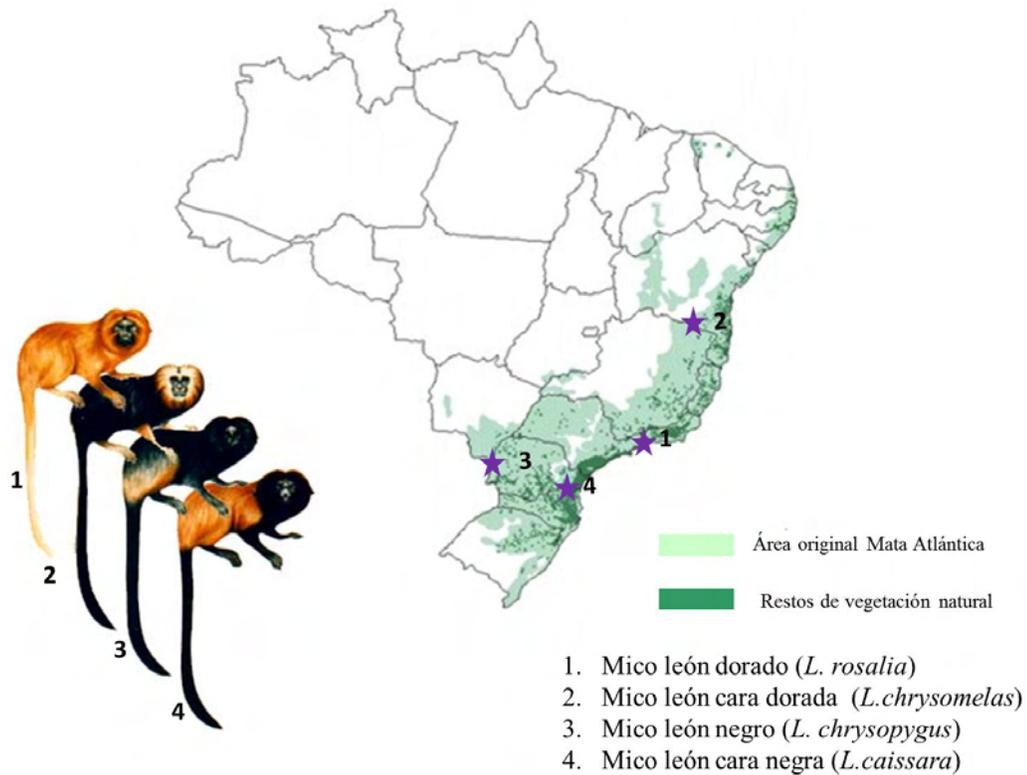


Figura 1. Distribución actual de las cuatro especies de micos leones. Fuente: Ayala *et al.*, 2013

El sistema social parece estar relacionado al hecho de que el 90% de los partos son gemelos, los cuales cuando nacen pesan aproximadamente el 25% del peso de la madre. Precópio y colaboradores en 2008, afirman que existen evidencias que los adultos enseñan a sus crías a buscar presas. Así mismo, respecto al sistema de apareamiento, predomina el tipo monógamo y muchas veces las hembras alfa suprimen a través de feromonas la ovulación de sus crías hembras y en menor proporción los sistemas de poliandria o poliginia (Precópio *et al.*, 2008).

Con respecto a su dieta los micos leones son considerados como fauni-frugívoros, con una dieta compuesta principalmente de frutos maduros, pequeños y dulces, exudados, néctar y pequeños animales como ranas, lagartos y polluelos (Saddy, 2003; Gudorizzi, 2008). Tienen dedos largos que les permite forrajear con facilidad en plantas como bromélias y huecos de troncos de árboles (Coimbra-Filho, 1978). Se ha observado que estos grupos utilizan agujeros en los arboles como lugar para dormir y utilizan estratos intermedios de los bosques ascendiendo en ocasiones a la copa para obtener frutos (Gudorizzi, 2008).

En relación con hábitos de alimentación, forrajeo y descanso, los micos leones utilizan bosques primarios aunque también se ha observado que utilizan áreas secundarias con diferentes grados de alteración, ocupando diferentes hábitats dependiendo de la disponibilidad de recursos, lo que evidencia una gran flexibilidad ecológica y etológica del género *Leontopithecus* (Gudorizzi, 2008).

En este sentido los micos leones presentan un área de vida que está entre 40 y 270 hectáreas, área mucho mayor en comparación con los demás integrantes de la familia *Callithicidae*.

### 3.1.2.1 El titi león Negro, *Leontopithecus chrysopygus*.

El mico león negro es una especie endémica del Bosque Atlántico Brasileño, el cual, después del Amazonas es el mayor bosque en América del Sur, haciendo parte de los cinco principales puntos de diversidad del planeta (*hotspots*), albergando altos niveles de biodiversidad y una alta concentración de especies endémicas (Myers *et al.*, 2000).

El área inicial de distribución incluía las partes bajas del Bosque Atlántico, entre los ríos Tietê y Paranapanema en el estado de São Paulo (Kleiman y Rylands, 2002, Citado por Monteiro, 2006). Sin embargo, la destrucción acelerada del hábitat hizo que la especie fuese considerada extinta durante 65 años, hasta 1970, año en el cual se registra nuevamente en el bosque estadual Morro do Diabo (Coimbra-Filho, 1970 *apud* Coimbra-Filho, 1976, citado por Monteiro, 2006). Posterior a su reaparición, el status poblacional del mico león negro contaba con aproximadamente 200 animales de vida libre los cuales hacían parte de una única población. En los años 90 se estimaba 900 individuos distribuidos en siete poblaciones, cinco de las cuales habitaban en la región Pontal do Paranapanema que comprende el Parque estadual Morro del Diablo junto con cuatro fragmentos que hoy en día hacen parte del Parque estadual mico-leao-preto. En el año 2003 fue encontrada otra población en el límite sur de la distribución de la especie, concluyendo que el nuevo status de la especie consta de 11 poblaciones de las cuales 7 se encuentran en áreas conservadas (Figura 2).

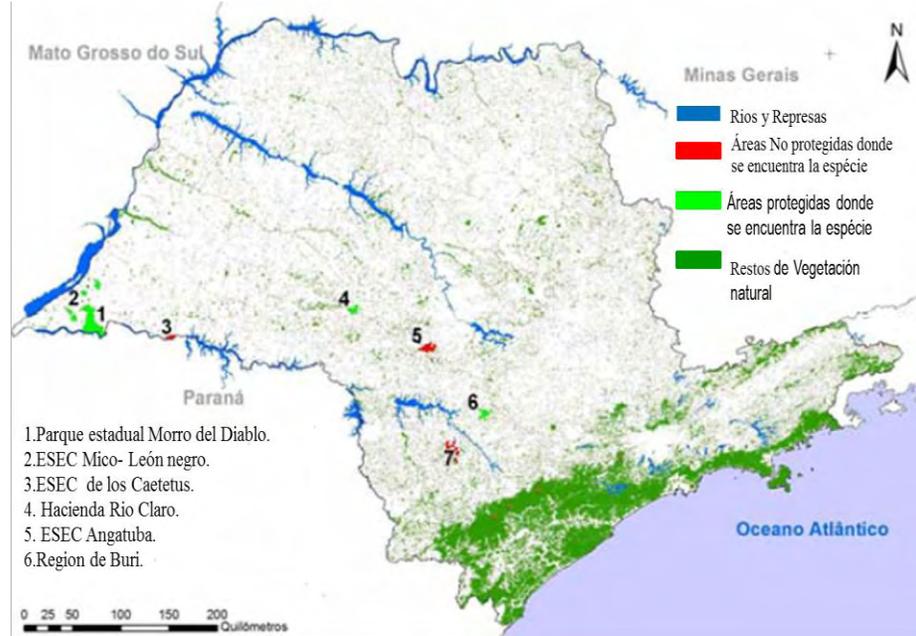


Figura 2. Mapa Del Estado de São Paulo en donde se muestra el área de distribución del mico león negro. Los números indican los sitios, actualmente conocidos, en donde habita la especie. (Fernando Lima –IPÊ, tomado de Monteiro, 2006).

Aunque el tamaño poblacional del mico león negro haya aumentado, esta especie continua clasificada como amenazada según la Lista roja de la IUCN (The worlds Conservation Union, 2011) y el instituto Brasileiro de Medio Ambiente y Recursos Naturales (IBAMA, 2012).

Taxonómicamente pertenece a la Clase *Mammalia*, Orden *Primates*, Familia *Cebidae* Subfamilia *Callitrichinae*, Género *Leontopithecus*, Especie *L. chrysopygus* (NCBI, 2012).

Morfológicamente, *Leontopithecus chrysopygus* es una especie de tamaño pequeño que pesa aproximadamente medio kilogramo. Presenta pelos largos en la cabeza y el cuello, la cola es muy larga y no prensil, excediendo incluso el largo del cuerpo. Su cabeza es negra con algunos visos rubios en la melena, dorso pecho manos y pies de color negro. El pelaje de la frente y del vientre es de coloración amarillo pardo, mientras que las partes inferiores y el uropigio presentan una coloración amarillo ferroso. La cola es negra pero en la base es amarilla dorada (Passos, 1992).

Respecto a su ecología, el mico león negro presenta una dieta influenciada por la estacionalidad de su ambiente, es decir utiliza los recursos alimenticios dependiendo de la disponibilidad (Passos y Alho, 2001).

Aparte de las presas animales, la alimentación es diferencial con la estación del año, así en la estación lluviosa los frutos son consumidos preferencialmente y en la seca prefieren los exudados. (Saddy, 2003). Las especies vegetales que usan como alimento incluyen frutos de 22 especies y exudados de 8 (*Euterpe edulis*, *Syagrus romanzoffiana*, *Pilocarpus pauciflorus*, *Inga marginata*, *Croton floribundus*, *Prunus lewiy*) apenas un tronco y una flor. Aunque, generalmente, solo ingieren la pulpa de los frutos, también se ha observado que ingieren el fruto entero, entre las especies consumibles se encuentran: *Protium widgrenii*, *Rhamnidium elaeocarpum*, *Struthanthus vulgaris*, *Celtis pubescens*, *Celtis iguanae*, *Cordia ecalyculata*, *Cordia superba*, *Tipirira guianensis*, *Mendoncia coccinea* y algunas especies del género *Menispermaceae* (Saddy, 2003).

Con frecuencia forrajea cerca de jaquitibás (*Cariniana estrellensis*), donde buscan sus presas dentro de las capsulas de los frutos secos, en los cuales se establecen una gran cantidad de insectos y arañas. Otros sustratos óptimos en los cuales la especie forrajea son la Palmeras, buscando el alimento entre las hojas, vainas y racimos de frutos (Saddy, 2003).

El mico león alcanza la madurez a los 18 meses de vida. El periodo de gestación es de 125 días. En relación al sistema de apareamiento son considerados monógamos y la reproducción ocurre estacionalmente. Se ha observado grupos con muchas hembras, pero únicamente una es la reproductora. También se ha observado grupos con dos o más machos, pero al parecer solamente un macho es el reproductor (Saddy, 2003).

En cuanto a la dinámica de los grupos esta implica inmigraciones y emigraciones. Son raras las inmigraciones para grupos establecidos y cuando ocurre generalmente son realizadas por machos. Lo más común es la sustitución del individuo dominante sea por muerte o por emigración. La inmigración se observa con más frecuencia en los machos infiriendo que las hembras heredan los territorios de las madres para posteriormente adoptar el papel de reproducción dentro del grupo (Saddy, 2003).

## 3.2 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son características del DNA que diferencian dos o más individuos, presentan herencia Mendeliana simple y sirven para identificar un local o una región de un cromosoma. Así mismo, puede ser considerado como un conjunto de técnicas que permiten visualizar la presencia de variantes alélicas que se producen por algún tipo de mutación las cuales se establece en las poblaciones a través del tiempo evolutivo. Dicha variación detectada se conoce como polimorfismo permitiendo separar grupos, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores (Eizirik, 1996; Hillis *et al.*, 1996; Matioli 2001; Astorga, 2008).

En este contexto, el principal objetivo de la obtención de marcadores moleculares es establecer variantes polimórficas que nos permitan discriminar entre grupos de estudio al nivel que este sea necesario. Estas medidas nos permiten obtener una marca que diferencia un grupo de otro (Astorga, 2008).

Las variantes polimórficas son detectadas utilizando marcadores neutros como microsatélites o marcadores conservados como DNA mitocondrial, puesto que generan datos muy útiles como por ejemplo identificación de procesos histórico-demográficos y de estructura genética, en poblaciones naturales. En conjunto, el uso de marcadores con diferentes tipos de herencia y tasas de mutación permiten un mejor entendimiento de los procesos involucrados en la distribución de la variación genética (Torres, 2010).

### 3.2.1 Tipos de marcadores

La mayoría de los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías de técnicas que se basan en la hibridación o en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los marcadores detectados por hibridación agrupan técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores. Las sondas son fragmentos de DNA o RNA que contienen el código complementario para una secuencia específica del genoma. Las técnicas más usuales son: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Número variable de repeticiones en tandem (VNTR) y ADN-Ships (Oligonucleotide arrays) (Velasco, 2005).

Los marcadores identificados por amplificación del DNA están basados en la reacción en cadena de la polimerasa, tecnología que permite la detección de polimorfismo genético. El polimorfismo se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento de la secuencia iniciadora (primer). Las técnicas basadas en la PCR difieren entre sí en la longitud y secuencia de los primers empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. En esta categoría podemos encontrar entre otras las siguientes técnicas: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (“SSR-Simple Sequence Repeats) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Velasco, 2005).

Así mismo, los marcadores genéticos moleculares pueden dividirse en dos clases según el tipo de variaciones que detectan a) bioquímicos que detectan variaciones en el nivel de producto del gen, tales como cambios en las proteínas y aminoácidos, y b) los marcadores moleculares que detectan la variación a nivel del ADN, tales como cambios de nucleótidos: delección, duplicación, inversión y / o inserción (Valdés y Rodríguez, 2008).

Además, pueden presentar dos modos de herencia, es decir, dominante / recesivo o codominante (Tabla 1). Si el patrón genético de los homocigotos se puede distinguir de la de los heterocigotos, entonces un marcador se dice que es codominante. Si el patrón genético de los homocigotos no se puede diferenciar de los heterocigotos, se dice que el marcador es dominante/recesivo (Valdés y Rodríguez, 2008).

Por lo general los marcadores co-dominantes son más informativos que los marcadores dominantes (Nageswara-Rao y Soneji, 2007) y son más eficientes para estudios de genética de poblaciones, puesto que detectan variaciones directas en el DNA y tienen ventajas tales como el hecho, de desarrollarse de manera estable, de carecer de efectos pleiotrópicos y sobre todo, de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo en estudio, principalmente (Valdés y Rodríguez, 2008).

Tabla 1. Tipos de los marcadores moleculares tomada de Krutovskii y Neale, 2001.

Característica	RFLP	RSS	RAPD	AFLP	Isoenzimas	STS/EST
Origen	Anónimo/ Génica	Anónimo	Anónimo	Anónimo	Génica	Génica

Número máximo teórico de posibles lugares en el análisis	Limitado por el sitio de restricción( nucleótidos )polimorfismo(decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma y el número de repeticiones simples en un genoma(decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma, y por el polimorfismo de nucleótidos(decenas de miles)	Limitado por el sitio de restricción (nucleótidos) polimorfismo (decenas de miles)	Limitado por el número de genes de la enzima y la los ensayos histoquímicas disponibles (30-50)	Limitado por el número de genes expresados (10.000-30.000)
Dominante	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Alelos Nulos	Raro muy raro	Ocasional y frecuente	No aplicable(pre sencia/ausencia tipo de detección)	No aplicable(p resencia/ausencia tipo de detección)	Raro	Raro
Transferibilidad	A través de géneros	Dentro de géneros o especies	Dentro de especies	Dentro de especies	Entre familias e géneros	Entre las especies relacionadas
Reproducibilidad	2.10mg de DNA	10-20ng de DNA	20-10ng de DNA	0.2-1mg de DNA	Varios mg de tejido	10-20ng de DNA
Facilidad de desarrollo	Difícil	Difícil	Fácil	Moderado	Moderado	Moderado

### 3.2.2 Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de la conservación de especies

Las técnicas moleculares permiten, en general, sondear la complejidad y variabilidad del contenido genético de los organismos. Este tipo de información sirve para múltiples objetivos que cubren un amplio rango desde el individuo a las categorías taxonómicas más amplias. En la escala más pequeña, se estudian relaciones de parentesco y pedigrí (genealogía); a mayor escala se pueden estudiar relaciones filogenéticas entre poblaciones, especies y género (Jordano, 2004).

La aplicación de marcadores moleculares junto con la teoría evolutiva aporta un gran número de informaciones acerca de la historia evolutiva, la demografía, la ecología y además el comportamiento de las especies que pueden ayudar a evaluar los riesgos, asignar prioridades, delimitar unidades y diseñar estrategias de conservación eficaces (Godoy, 2009). Así mismo, las técnicas moleculares aportan métodos que cuando se combinan con técnicas de muestreo no invasiva,

aportan herramientas eficientes para la conservación y gestión de especies amenazadas.

Los marcadores moleculares, en combinación con métodos de reconstrucción filogenética, han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies, con la ambición última de reconstruir el árbol de la vida (Maddison *et al.*, 2007, citado por Godoy, 2009).

En el contexto de la conservación, este tipo de enfoques (filogenéticos), permiten tomar en consideración las divergencias evolutivas y así basarse en éstas como criterio para asignar prioridades de manejo y conservación. Al mismo tiempo las filogenias moleculares han sido utilizadas en combinación con el método comparativo para identificar aspectos ecológicos que permitan identificar especies más susceptibles a la extinción (Faith 2002, citado por Godoy, 2009).

### 3.2.3 Marcadores codominantes tipo Microsatélites

También conocidos como marcadores hipervariables o STR (del inglés *Short Tandem Repeats*), los microsatélites son secuencias repetitivas en *tándem* compuestas por unidades de secuencias de 1 a 6 *pb* repetidas lado a lado (Daltoé, 2006; Torres, 2010). El número de las unidades repetidas es altamente variable entre microsatélites localizados en el mismo locus y en locus diferentes, confiriéndoles alto polimorfismo de tal manera que la probabilidad que dos individuos tengan los mismos microsatélites es casi nula (Torres, 2010). Este tipo de marcador presenta mayor contenido informativo, siendo utilizado para evaluar diversidad genética intra e interespecífica.

Respecto a la estructura repetitiva, los microsatélites pueden clasificarse en simples o compuestos, los primeros se refieren a que tienen una sola unidad repetitiva (repeticiones perfectas) y los segundos tienen repeticiones de diferente composición (repeticiones imperfectas) (Cuervo, 2010).

Las regiones flanqueantes, es decir, el DNA que rodea a un locus microsatélite, generalmente están conservadas entre los individuos de la misma especie e incluso muchas veces de diferentes especies, pudiendo así diseñar *primers* que se unan a esta región y de esa forma llevar a cabo la amplificación por medio de PCR (Selkoe y Toonen, 2006).

Un microsatélite posee un total de 100 *pb* y por eso es fácilmente amplificado por PCR y no necesita gran cantidad inicial de DNA molde. Además presente herencia de tipo codominante, característica importante ya que permite diferenciar

individuos heterocigotos de los homocigotos, su tasa de mutación es alta y está entre  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  secuencia/generación, en comparación a la tasa estimada de mutación puntual de cerca de  $10^{-10}$  en el genoma nuclear (Torres, 2010).

### 3.2.3.1 Función Biológica de los microsatélites

Aunque en eucariotas se encuentran en exceso en las regiones no codificantes la función de los STR es importante ya que contribuyen a la estructura del DNA, a la organización de la cromatina, participan en la regulación de los procesos de recombinación, transcripción y traducción, contribuyen también a la expresión génica y a la dinámica del ciclo celular (Cuervo, 2010).

En las regiones codificantes actúan como elementos reguladores de la transcripción y se ha reportado que un cambio en el número de repeticiones causa variación cuantitativa en la funcionalidad de proteínas y actividad génica, llegando incluso a afectar la fisiología y desarrollo del organismo (Cuervo, 2010).

También se ha encontrado que al incidir en la organización espacial de la cromatina y causar cambios en la topología de las regiones adyacentes, inciden en la unión de proteínas reguladoras de la transcripción, modulando de esta forma la unión del complejo de la RNA polimerasa y los factores de transcripción (Richet *et al.*, 1984).

### 3.2.3.2 Ventajas y Desventajas del Uso de Microsatélites

Entre la ventajas cabe resaltar que son altamente polimórficos debido al número de unidades de repetición, presentan herencia de tipo codominante permitiendo identificar heterocigotos de homocigotos, son abundantes y están distribuidos en todo el genoma lo que los hace relativamente de fácil acceso, y además poseen pequeño tamaño por lo que pueden ser fácilmente amplificados por PCR (Landweber y Dobson, 1999; Sunnucks, 2000; Chistiakov *et al.*, 2006).

Dentro de las desventajas se pueden resaltar que en algunos grupos taxonómicos como plantas, algunos insectos y ciertas aves son de difícil obtención. Además pueden haber algunos problemas con la PCR, en primer lugar puede ocurrir que no se amplifiquen ciertos alelos debido a sustituciones, inserciones y deleciones dentro de los sitios de unión de los cebadores llevando a la aparición de alelos nulos. Por otra parte pueden obtenerse productos de diferente tamaño al esperado por el deslizamiento de la *Taq* polimerasa llevando a la incorrecta

genotipificación, además la tendencia de la *Taq* a adicionar dATP a los productos de PCR puede causar cambios de una única base y con ello problemas en la determinación del tamaño de los alelos (Beaumont y Bruford, 1999).

Otras desventajas radican en el desarrollo de *cebadores* para cada especie pero pueden ser utilizados *cebadores* de especies estrechamente relacionadas. La amplificación cruzada brinda la posibilidad de usar microsatélites para estudios genético-poblacionales, análisis de parentesco y otras aplicaciones sin tener que invertir en el aislamiento de microsatélites polimórficos, lo cual resulta costoso (Chambers y Macavoy, 2000; Chistiakov *et al.*, 2006;).

### 3.2.3.3 Aplicación de los marcadores Microsatélites en Conservación

El objetivo central de la genética de la conservación en los últimos años ha sido entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones pequeñas, en este sentido el uso de microsatélites es relativamente reciente y han sido utilizados en estudios de hibridización, historia demográfica, detección de cuellos de botella y endogamia, además de la evaluación de impactos en el comportamiento reproductivo, la estructura social y la dispersión en la estructura genética de especies amenazadas.

En este contexto, los microsatélites ofrecen ventajas apropiadas para la conservación de especies amenazadas puesto que en muchas especies son fáciles de obtener ya sea del aislamiento de marcadores específicos de la especie o empleando marcadores aislados para especies relacionadas (Beaumont y Bruford, 1999)

Así mismo constituyen los marcadores ideales para análisis de variabilidad genética y de determinación de parentesco entre individuos de ancestro desconocido cuando hay ausencia de información en el pedigrí, puesto que proporcionan resultados genotípicos que permiten una estimación prudente del parentesco entre individuos útiles para diseñar apareamientos benéficos para maximizar la variabilidad y minimizar la endogamia (Beaumont y Bruford, 1999; Frankham *et al.*, 2002; Russello y Amato, 2004).

## 3.3 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN

Varios factores primarios han incidido en los aspectos ecológicos y genéticos que contribuyen al riesgo de extinción. El uso de tierras principalmente para

agricultura, minería, ganadería y vivienda resultan en la destrucción masiva de los hábitats y consecuentemente su deterioro y fragmentación.

Así mismo la sobreexplotación de recursos, introducción de especies exóticas que resultan ser competidores o depredadores afectan a las poblaciones locales (Landweber y Dobson, 1999). Los factores genéticos pueden interactuar con fluctuaciones demográficas como tasas de natalidad, mortalidad y proporción de sexos además de fluctuaciones ambientales y en llevar a las especies hacia la extinción (Frankham *et al.*, 2002) por lo que un programa de recuperación pueden no ser exitoso si se ignoran los factores genéticos (Frankham, 2003).

Uno de los principales pasos para el manejo genético de una población en peligro de extinción es reducir la endogamia, puesto que esta, reduce la eficacia biológica (fecundidad /sobrevivencia) aumentando el riesgo de extinción, como consecuencia de la pérdida de diversidad genética, que es un elemento crucial que le confiere a una población la capacidad de evolucionar y enfrentar cambios en el ambiente (Frankham, 2003).

En este sentido se puede citar algunos aspectos que hacen de la genética un elemento esencial para la conservación:

- ✓ Identificación de las poblaciones de interés: los marcadores genéticos pueden identificar poblaciones en las que existan aspectos genéticos que afecten la supervivencia a largo plazo (Frankham *et al.*, 2002).
- ✓ Resolución de estructuras poblacionales: la información correspondiente a la presencia de estructura y al grado de flujo genético entre poblaciones es crítica para determinar la posibilidad de adaptaciones locales, y la necesidad de traslocación de individuos para prevenir endogamia y pérdida de diversidad genética (Frankham *et al.*, 2002).
- ✓ Resolución de unidades de manejo dentro de especies: las poblaciones de una especie pueden estar tan diferenciadas que merecen tratamiento como unidades separadas, ya que por ejemplo están adaptadas a diferentes ambientes y sus híbridos pueden presentar alguna desventaja e incluso mostrar cierto aislamiento reproductivo parcial; así se evita la depresión por exogamia (Frankham *et al.*, 2002; Lacy, 1988).
- ✓ Selección de la mejor población para repoblamiento: las poblaciones con una mayor variabilidad genética son preferidas como fuentes de translocaciones y re-introducciones: la presencia de una mayor variabilidad

permite a la población adaptarse al nuevo ambiente de repoblamiento o translocación (Lacy, 1988).

### 3.4 GENÉTICA DE LAS POBLACIONES EN CAUTIVERIO

Existen poblaciones incapaces de sobrevivir en sus hábitats naturales principalmente debido a impactos antropogénicos ya que éstos son los responsables de cambios climáticos, pérdida y fragmentación de hábitats, contaminación, caza y tráfico ilegal de fauna (García y Marini, 2006; Loreau *et al.*, 2006; Joly, 2007; Frankham *et al.*, 2008, Brasil, 2010).

En este sentido los programas de manutención en cautiverio son una clara opción para conservar una variabilidad genética representativa, de tal manera que estos programas actúan como un seguro contra la extinción en el medio silvestre (Frankham *et al.*, 2002).

No obstante cuando se funda una población en cautiverio existen problemas que llevan a la pérdida de diversidad genética, como los cuellos de botella, y estos problemas se vuelven mayores si la población es pequeña puesto que puede darse depresión por endogamia incrementando así el riesgo de extinción asociada a una pérdida de diversidad por acción de la deriva genética (Ruokonen *et al.*, 2007).

Cuando la población es grande, existe la posibilidad de una adaptación al cautiverio ya que las fuerzas de la selección natural cambian: se controlan los predadores, la mayoría de enfermedades y las pestes, no hay competencia con otras especies y la competencia por encontrar pareja es menor. Tanto la depresión endogámica como la pérdida de diversidad genética y la adaptación genética se espera que se presenten en poblaciones cerradas en cautiverio (Frankham *et al.*, 2002).

El diseño de cruces con el fin de reducir la endogamia y la pérdida de variabilidad genética es probablemente la contribución más importante de la genética al manejo de poblaciones en cautiverio (Frankham *et al.*, 2002). El procedimiento más usado es cruzar individuos con la menor relación de parentesco en la población con lo que se evita la endogamia y se mantiene una variabilidad genética representativa (Frankham *et al.*, 2002). Por tanto según Haig 1998, en poblaciones pequeñas o en cautiverio donde la contribución de cada individuo a la diversidad futura es crítica, es esencial el conocimiento del parentesco

Otro aspecto importante, además del diseño de cruces de individuos no emparentados, es fundamental que todas las parejas aporten en la misma

medida a la siguiente generación (Frankham *et al.*, 2002), lo que ocasionará que haya una mínima distorsión de las frecuencias alélicas y así se maximice la proporción de la diversidad genética que se pasa a la siguiente generación. Teóricamente, la igualdad en el tamaño de las familias posibilita que la representación de los alelos presentes en la generación de parentales sea igual en su descendencia (Frankham *et al.*, 2002), lo que permite disminuir los efectos de la selección en cautiverio ya que potencialmente no hay diferencias en el éxito reproductivo (Allendorf, 1993; Avise, 2004).

### 3.5 DIVERSIDAD GENÉTICA

Las poblaciones permiten estudiar la diversidad genética. Una población genética se refiere a un grupo de individuos que pertenecen a una especie, dentro de la cual ocurren apareamientos reales o potenciales y las cuales comparten un acervo genético. La población genética es considerada como una entidad abierta, es decir puede intercambiar genes con otras poblaciones de la misma especie (Cabreto y Camacho, 2002).

La diversidad genética se define como toda la variación biológica hereditaria acumulada durante el proceso evolutivo, generada fundamentalmente, por mutaciones en las secuencias nucleotídicas durante la replicación del DNA. La cantidad y tipo de diversidad genética en una población es influenciada por varios factores, como la selección, la endogamia, la deriva genética, el flujo génico y la mutación, cada uno de los cuales ejercen efectos diferentes, en cuanto que la deriva y la endogamia reducen la variación, la mutación aumenta y la selección y el flujo dependiendo de la situación pueden aumentar o disminuir esta variación (Freenan y Herron, 2002).

Cuando esta variación ocurre entre individuos de la misma especie, es conocida como polimorfismo o diversidad intraespecífica. Cuando esta variación ocurre entre especies, siendo fijada en cada taxón es conocida como substitución de carácter, y que a su vez puede ser nucleotídica (DNA) o aminoacidica (proteína). Las variaciones intraespecíficas, son estudiadas cuando se busca comprender relaciones entre individuos y poblaciones de cada especie. En este sentido, cuando el interés es saber cuál es el parentesco entre individuos, si existe flujo genético, o saber cuál es el estatus de conservación de una especie en particular se estudia este tipo de variación (Santos, *et al.*, 2009)

La diversidad genética interespecífica, se tiene en cuenta cuando se quiere comprender relaciones filogenéticas en distintos niveles taxonómicos o cuando se quiere caracterizar especies empleando marcadores conservados, como los mitocondriales que permitan su diferenciación.

La comprensión de la diversidad genética intra como interespecífica, es importante para el conocimiento y monitoreamiento de la biodiversidad. A su vez, la variabilidad genética intraespecífica que es la que se tiene en cuenta en este estudio, es sin duda fundamental para la manutención de las especies en la naturaleza. El diagnóstico de cuanta variación existe y de cómo ésta es distribuida geográficamente en cada especie es necesario para la caracterización de su *status* de conservación (Santos, *et al.*, 2009)

La diversidad genética es sin lugar a dudas la materia prima para la evolución, ya que de ella dependen tanto la adaptación como la especiación. Los niveles altos de diversidad pueden dar la habilidad para responder a cambios medio ambientales. De esta forma la diversidad genética es crucial para la supervivencia a largo plazo de las especies en peligro, ya que es útil para que las poblaciones se adapten a cambio en el medio. Por otro lado, generalmente se asume que la reducción en la diversidad se correlaciona con la endogamia, generando esta, reducción en la adecuación (Rocha y Gasca, 2007).

### 3.5.1 MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

#### 3.5.1.1 Polimorfismo o Tasa de Polimorfismo ( $P_j$ )

Es el promedio de locus polimórfico. El polimorfismo genético es la coexistencia en una misma población de dos o más alelos en un mismo locus.

Un locus es considerado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente no pasa de 0.99 o 0.95, caso contrario es considerado monomórfico (Gazel, 1999, Citado por Aliaga 2004).

#### 3.5.1.2 Proporción de *loci* Polimórficos

Es el número de *loci* polimórficos entre el número total de *loci*. Esta medida expresa el porcentaje de *loci* variables en una población. Su cálculo se basa en contar directamente *loci* polimórficos y total.

Se puede utilizar con marcadores codominantes y, de manera muy restrictiva, con marcadores dominantes. Esta medida se la calcula de la siguiente manera

$$P = npj/ntotal$$

Dónde

$P$  es proporción de *loci* Polimórficos  
 $N_{pj}$  es el número de *loci* polimórficos  
 $N_{total}$  es el número total de *loci*.

### 3.5.1.3 Abundancia de Variantes Alélicas (A)

Hace referencia al número de alelos en una muestra poblacional. La medida de la diversidades (A-1) variantes porque, dentro de una población monomórfica, el grado de diversidades igual a cero (A-1 = 0).

Para un determinado gen en una muestra, esta medida indica el número de variantes alélicas pueden ser encontradas. La medida sólo puede aplicarse con marcadores codominantes.

### 3.5.1.4 Número medio de Alelos por locus

Se refiere a la sumatoria todos los alelos detectados en todos los *loci*, entre el número total de *loci* y se expresa de la siguiente manera:

$$n = (1/K) \sum_{i=1}^k ni$$

Dónde

$K$  es el número de *loci*  
 $ni$  es el número de alelos detectados por *locus*

Se aplica mejor con marcadores codominantes, puesto que los marcadores dominantes no permiten la detección de todos los alelos.

### 3.5.1.5 Numero Efectivo de Alelos

Es el número de alelos que pueden estar presentes en una población. Se lo expresa de la siguiente manera

$$Ae = 1/(1 - h) = 1/\sum pi^2$$

Dónde

$pi^2$  Es la frecuencia de  $i^{th}$  Alelo en un locus específico

$h = 1 - \sum pi^2$  Es la heterocigosidad en un locus determinado.

Se aplica mejor con marcadores codominantes.

### 3.5.2 Heterocigosidad observada y Esperada: Equilibrio de Hardy y Weinberg.

Teóricamente el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) establece dos conclusiones: la primera es que en una población en donde los individuos se aparean al azar, es de gran tamaño y en donde los individuos son igualmente viables y fecundos (en ausencia de fuerzas que causen evolución, selección, deriva génica, flujo génico y mutación) después de una generación las frecuencias genotípicas no cambian en el tiempo.

La segunda es que las frecuencias genotípicas de un locus pueden representarse en función de las frecuencias alélicas.

Particularmente este teorema permite considerar solo las frecuencias de los  $n$  alelos de un locus para describir a la población, en vez de las frecuencias de los  $n(n+1)/2$  diferentes genotipos formados por los  $n$  alelos. (Cabreto y Camacho, 2002).

En un sistema bialélico la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas se pueden describir algebraicamente así: si  $p$  es la frecuencia de  $A1$  y  $q$  es la de  $A2$ , se cumple que  $p+q=1$ .

Si Consideramos organismos diploides, tendremos tres genotipos posible en la población  $A1A1$ ,  $A1 A2$  y  $A2A2$  que están presentes en las frecuencias  $P$ ,  $H$ , y  $Q$  respectivamente ( $P + H + Q =1$ ), si partimos de que todos los alelos en los individuos homocigotos serán  $A1$  o  $A2$  y la mitad de los alelos en los individuos

heterocigotos son  $A_1$  y la otra mitad  $A_2$ , las frecuencias alélicas para los alelos  $p$  y  $q$  en términos de las frecuencias genotípicas son:

$$p = P + \frac{1}{2}H$$

$$q = Q + \frac{1}{2}H$$

Después de una generación apareada al azar las frecuencias genotípicas de equilibrio vienen dadas por:  $p^2$  ( $A_1A_1$ ),  $2pq$  ( $A_1A_2$ ),  $q^2$  ( $A_2A_2$ ) (Cuervo, 2010).

Para alelos múltiples, la frecuencia de un alelo es igual a la suma de la frecuencia de su homocigoto más la mitad de la frecuencia de cada heterocigoto que contenga ese alelo. Así, la frecuencia del alelo  $A_1$ ,  $p_1$  es:

$$p_1 = P_{i1} + \frac{1}{2} \sum_j^n P_{ij}$$

Donde  $j \neq i$  es el número de alelos en el locus  $A$

Las frecuencias genotípicas son  $p_i^2$  para los homocigotos y  $2p_i p_j$  para los heterocigotos. Cuando las proporciones están bajo EHW, la frecuencia de todos los heterocigotos esperados puede escribirse como uno menos la proporción esperada de homocigotos:

$$HE = 1 - \sum_i^n p_i^2$$

### 3.5.3 Heterocigosidad Esperada o Diversidad Genética de Nei (1987)

Es la heterocigosidad esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg para una población en un locus en particular con  $n$  alelos. Se la calcula de la siguiente forma

$$He = 1 - \sum_i^n p_i^2$$

Lo que es  $1$  menos la homocigosidad bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick, 2005).

### 3.6 ENDOGAMIA

El término endogamia es usado para describir varios fenómenos relacionados, todos ellos referentes a situaciones en donde los apareamientos ocurren entre parientes (endogamia biparental) que tienen como consecuencia que dos alelos homólogos heredados a la progenie sean idénticos entre sí por descendencia de un alelo ancestral en común, es decir, los eventos que tienen como consecuencia apareamientos endogámicos, incrementan los niveles de homocigosis en una población los cuales tienen una mayor probabilidad de exponer alelos deletéreos (Eguiarte *et al.*, 2007; García y Villalobos, 2007;). La endogamia es relevante en la biología de la conservación ya que lleva a la reducción de la heterocigosidad, a la depresión por endogamia (reducción en la reproducción y sobrevivencia) y con ello a un aumento en el riesgo de extinción (Cuervo, 2010).

En poblaciones en cautiverio la endogamia y la depresión por endogamia son inevitables como consecuencia del pequeño tamaño de estas poblaciones y debido a que se han formado a partir de unos pocos fundadores, facilitando apareamientos entre individuos emparentados a medida que aumenta el número de generaciones (Frankham *et al.*, 2003).

Según Hedrick (2005), la endogamia como tal no causa la variación en las frecuencias alélicas, pero sí una reorganización de los genotipos, ya que en una población endogámica la proporción de homocigotos aumenta y la proporción de heterocigotos disminuyen con respecto a las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los cambios en las frecuencias genotípicas por la endogamia afectan a todo el genoma; la deriva genética y el flujo también influyen a todos los loci, mientras que la selección y la mutación a locus individuales. Además, el efecto en las frecuencias genotípicas puede ser efímero si el sistema de apareamiento cambia (Hedrick, 2005).

#### 3.6.1 Coeficiente de Endogamia

El coeficiente de endogamia determina el grado en que dos alelos de un individuo son “idénticos por descendencia” (IBD), es decir que son copias de un mismo alelo

ancestral presente en un antepasado de ese individuo (Cabreto y Camacho, 2002). Por ejemplo, para formar un individuo diploide se toman dos alelos al azar del pool de alelos disponible.

Después de que se toma el primer alelo, hay una probabilidad  $f$  de que el segundo alelo tomado sea igual al primero. Si la probabilidad de que el primer alelo sea  $A_1$  es  $p$  y la probabilidad de que el segundo alelo sea  $A_1$  es  $f$ , entonces la probabilidad de tener dos alelos  $A_1$  que son IBD es  $pf$  (Cuervo, 2010)

Por otra parte, también cabe la posibilidad de que ambos alelos sean  $A_1$  pero que no sean idénticos por descendencia, en este caso sería idénticos en estado, es decir son iguales pero no descienden del mismo alelo ancestral (Cuervo, 2010).

La probabilidad de identidad en estado es  $p^2(1-f)$ , donde  $p^2$  es la probabilidad de tomar dos alelos  $A_1$  consecutivos y  $(1-f)$  es la probabilidad de que el segundo alelo no sea IBD con el primero. En este sentido la frecuencia del genotipo  $a_1a_1$  se la calcula de la siguiente manera:

$$P = p^2(1-f) + pf$$

$$= p^2 + fpq$$

De forma general las siguientes formulas muestran el cálculo de la proporción de los tres diferentes genotipos cuando existe un nivel de endogamia  $f$ :

$$P = p^2 + fpq$$

$$H = 2pq - 2pqf$$

$$Q = q^2 + fpq$$

Donde el primer término hace referencia a la proporción bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y el segundo las desviaciones con respecto a este (Wright, 1931). La magnitud y el signo del coeficiente de endogamia reflejan la desviación de las proporciones de los genotipos bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, así cuando  $f$  es cero, los genotipos están en las proporciones del equilibrio; y cuando  $f$  es positivo, hay deficiencia de heterocigotos.

Debido a que  $f$  es una probabilidad, tiene un rango de 0 a 1. Si  $f$  es 1, significa máxima endogamia, por lo tanto solo habrá homocigotos y las frecuencias genotípicas serán las mismas alélicas.

### 3.7 ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

Cuando existen diferencias en la variación genética y más específicamente hay diferencia en las frecuencias alélicas se dice que dos poblaciones están estructuradas (Hartl y Clark, 1997).

Esta diferenciación genética puede deberse a que la selección natural favoreció a diferentes genotipos en diferentes poblaciones, y también puede deberse a procesos aleatorios en la transmisión de alelos de una generación a otra o por diferencias al azar en las frecuencias alélicas entre los fundadores de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

En relación a las poblaciones en cautiverio, cuando ésta se establece, la población silvestre estará representada únicamente por el acervo génico de los fundadores y en conjunto con la deriva genética que afecta en mayor proporción a las poblaciones de pequeño tamaño, rápidamente las dos poblaciones se diferenciarán (Cuervo, 2010), problemática crucial cuando se piensa en programas de repoblación.

Existen dos formas de medir estructura de la población. Una es mediante el estadístico  $F_{st}$ , el cual se basa en el modelo mutacional de alelos infinitos; y la otra es el estadístico  $R_{st}$ , que se basa en el modelo mutacional paso a paso y que se amolda más al modelo mutacional de los microsatélites (Hartl y Clark, 1997).

#### 3.7.1 Índices de fijación

La fragmentación poblacional, la cual ocasiona endogamia, puede usarse para medir el grado de diferenciación que ha ocurrido entre estos fragmentos. Esta diferenciación entre estas subpoblaciones está directamente relacionada al coeficiente de endogamia dentro y entre poblaciones.

Wright (1969) dividió la endogamia de los individuos en la población total  $F_{IT}$  debida a tres causas.

- ✓ La endogamia de los individuos respecto a su subpoblación o fragmento ( $F_{IS}$ ): es la probabilidad que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia; este es el coeficiente de endogamia mencionado anteriormente,  $f$ , promediado en todos los individuos para todos los fragmentos poblacionales (WRIGHT, 1951, 1965). Este estadístico describe

la intensidad y la señal de la desviación respecto al equilibrio. Es positivo cuando existe deficiencia de heterocigotos en la población, y adquiere valores negativos cuando existe un exceso de heterocigotos. La hipótesis nula en este tipo de análisis es que el locus analizado se encuentra en equilibrio. Para verificar si los valores  $FIS$  son significativos, observamos los valores de  $PL$ , para  $FIS$  positivos y de  $Ps$  para  $FIS$  negativos. Si los valores de  $p$  son inferiores a 0,05 significa que existe una probabilidad de equivocación inferior al 5% de rechazar la hipótesis nula.

- ✓ La endogamia debida a la diferenciación entre subpoblaciones respecto a la población total ( $FST$ ): es el índice de fijación, que es una medida de la diferenciación genética entre las poblaciones. Es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de un fragmento poblacional ya sea del mismo individuo o de diferentes individuos, sean idénticos por descendencia. Puede tener valores de 0 (no hay diferenciación entre las subpoblaciones) a 1 (fijación de diferentes alelos en las subpoblaciones) (Cuervo, 2010).

Cabe resaltar de los coeficientes  $FIS$  y  $FIT$  son medidas de la desviación con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y la población total, respectivamente, donde los valores positivos indican una deficiencia de heterocigotos y los valores negativos, un exceso de heterocigotos (Hedrick, 2005).

Estos tres coeficientes  $FST$ ,  $FIT$  y  $FIS$  se inter-relacionan de la siguiente manera (Hedrick, 2005):

$$1 - FIT = (1 - Fst)(1 - FIS)$$

Nei (1977) amplió este análisis para múltiples loci en el que los coeficientes  $F$  promedio se calculan de la siguiente manera:

$$FIS = \frac{\overline{Hs} - \overline{Ho}}{\overline{Hs}}$$

$$\overline{FIT} = \frac{\overline{HT} - \overline{Ho}}{\overline{HT}}$$

$$\overline{FST} = \frac{\overline{HT} - \overline{HS}}{\overline{HT}}$$

En donde  $\bar{H}_o$  es la heterocigosidad observada promedio dentro de una subpoblación en el total de *loci*,  $\bar{H}_s$  es la heterocigosidad esperada promedio  $\bar{H}_T$  es el promedio de la heterocigosidad esperada en la población total sobre todos los *loci* (Hedrick, 2005).

### 3.7.2 Rst

Este índice se basa en el modelo mutacional paso a paso. Es equivalente a la fracción del total de la varianza en el tamaño de los alelos (en términos de número de repeticiones) que hay entre las poblaciones (Slatkin, 1995) y está dado por:

$$RST = \frac{\bar{S} - SW}{\bar{S}}$$

En donde  $\bar{S}$  Es dos veces la varianza en el tamaño alélico en las *d* poblaciones y  $SW$  es dos veces el promedio de la varianza en el tamaño alélico dentro de la población.

## 3.8 PARENTESCO GENÉTICO

Estimativas del grado de parentesco genético, son realizadas entre individuos en estudios biológicos en poblaciones naturales y en cautiverio, cuando principal objetivo es responder cuestiones relativas al reconocimiento entre parientes, sistemas de apareamiento, patrones de dispersión de gametos e individuos, grado de vagilidad e de filopatría, dispersión sexo-diferencial y los procesos poblacionales histórico-demográficos (Awise, 2004).

En el caso de las poblaciones en cautiverio, el principal objetivo de un programa de reproducción es evitar la adaptación al cautiverio, la depresión por endogamia y sobretodo, lograr mantener una máxima variabilidad genética, puesto que es preferible poblaciones con una gran variabilidad genética para una futura reintroducción, una alta variabilidad permitirá a las poblaciones adaptarse fácilmente al medio ambiente. (Lacy, 1988; Landweber y Dobson, 1999;).

La mejor manera de lograr este objetivo es usar el método de minimización de parentesco, que envuelve la selección de individuos con el menor parentesco en la población para ser los parentales de la siguiente generación. El parentesco

promedio de un individuo son los valores promedio de parentesco de ese individuo con cada individuo de la población, incluido él mismo (Miño, 2010).

Este método requiere que se conozca el pedigrí de la población (Frankham *et al.*, 2003), pero para el presente estudio no se contó con toda esa información; por tal motivo, el uso de los microsatélites son una herramienta para inferir parentesco entre individuos de ancestro desconocido cuando hay ausencia de información en el pedigrí, ya que brindan resultados genotípicos que permiten una estimación razonablemente precisa del parentesco entre individuos (Russello y Amato, 2004).

En términos de conservación de especies y poblaciones, estimadores de parentesco genético han sido una aplicación práctica, puesto que auxilian programas de translocación de poblaciones naturales y de manejo en cautiverio, contribuyendo para la preservación de la variabilidad genética de esos grupos (Lacy, 1994; Russello; Amato, 2004; De Woody, 2005, tomado de Silos, 2011). Así mismo, los análisis de parentesco han sido usados por su relación con la elección de parejas aptas para reproducción y la fuga de la endogamia, así como también por su relación con la dinámica poblacional evolutiva, especiación y con cuestiones relativas en relación a como las poblaciones hacen frente a procesos como fragmentación del hábitat, susceptibilidad a enfermedades, tamaño poblacional efectivo y a la reproducción en cautiverio y hasta definir unidades de Manejo (UM) (Silos, 2011).

Existe una gran variedad de programas y métodos estadísticos que estiman el grado de parentesco entre individuos basándose la información genética brindada por microsatélites (Miño, 2010). Todos estos métodos se basan en las diferentes probabilidades con que dos individuos relacionados pueden compartir “alelos idénticos por descendencia” (IBD, del inglés, *identity-by-descent*). Dos alelos que descendieron recientemente (unas pocas generaciones atrás) de un mismo alelo ancestral son denominados idénticos por descendencia.

Los métodos de análisis de parentesco pueden dividirse en dos clases. La primera clase utiliza el estimador “momentum”, una cantidad continua, definida en términos de probabilidad de alelos idénticos por descendencia (Queller; Goodnight, 1989). Este método utiliza es estimador  $r$  para estimar la relación genética. Esta es muy utilizada en una población en cautiverio, ya que se puede minimizar la endogamia al escoger las parejas reproductivas basándose en el  $r$ . Sin embargo, hay que tener en cuenta que todos los estimadores de relación genética tienen grandes varianzas debido a las diferencias en una verdadera identidad por descendencia entre los *loci* y la opción de compartir alelos que sean idénticos por estado. Alrededor de 30 o 40 *loci* microsatélite se necesitan para obtener una confianza moderada en la estimación del  $r$  entre una pareja (Blouin, 2003).

La segunda clase se basa el método de verosimilitud, para determinar los probables relacionamientos (Goodnight; Queller, 1999). Ese método consiste en asignar pares de individuos a categorías de parentesco específicas como hermanos o primos, y tiene el poder para discriminar entre categorías de parentesco usando pruebas de verosimilitud, dependiendo del número y del polimorfismo de los *loci*.

Tres clases de relacionamiento pueden ser supuestas: hermanos completos (FS), medio hermanos (HS) y no relacionados (U). Los valores teóricos medios esperados de  $r$  son 0,5 para hermanos completos, 0,25 para medios hermanos y 0,0 para individuos no relacionados. (Russelo y Amato, 2004).

### 3.9 ANTECEDENTES

En las últimas décadas varios estudios se han dirigido a incrementar el conocimiento de primates, entre los que se encuentran:

Passos (1992), quien describe el hábito alimenticio del mico león negro en la estación Ecológica dos Caetetus encontrando que la mayor parte de la dieta es compuesta por frutos, exudados y presas, catalogando a esta especie como omnívora en vista de la variedad de recursos alimenticios utilizados en su dieta. El autor afirma que los frutos de *Syagrus romanzoffiana* y el exudado de *Pilocarpus pauciflorus* deben ser considerados como especies clave para la manutención de éstas especies durante la época de escases de recursos. Además encuentra que la dieta presenta una variación estacional, con los exudados representando una importante fuente alternativa de alimento durante el periodo de baja disponibilidad de los recursos.

Mamede (1997), analiza algunos aspectos ecológicos de un grupo de micos-leones-negros, considerando patrones de actividad, uso del espacio y dieta durante 12 meses. Este estudio demostró, que los micos leones pasan 53% de su tiempo inactivos, 18,4% desplazándose, 17, 2% corriendo y 11,4% forrajeando. Así mismo, calcula un área de vida igual a 40 hectáreas, y también aporta evidencias de una dieta compuesta por frutos maduros (53%), exudados (21,9%), frutos verdes (16,7%) y presas animales (8,4%).

Passos y Alho (2001), realizaron un estudio de la importancia de diferentes micro hábitat en el comportamiento de forrajeo por presas del mico león negro en la Estación Ecológica Caetetus, el sudeste de Brasil, encontrando que el más importante micro hábitat usado para el forrajeo es la búsqueda de presas en cavidades o huecos de los árboles, pero además palmas, bambú, corteza,

vainas de semillas y epifitas también constituyen micro hábitats importantes. Así mismo, ellos observan que las zonas de sotobosque, o zonas medias, son las zonas de alimentación más importante. Por último encuentran que de todos los integrantes del género *Leontopithecus*, *L. Chrysopygus* se ha adaptado a las zonas con fuerte estacionalidad del clima y los recursos.

Por otro lado, Saddy (2003) analizó el proceso de adaptación de individuos de mico león negro (*Leontopithecus chrysopygus*) respecto a procesos de movilidad, con el fin de evaluar parámetros de ecología y el comportamiento de la especie.

El primer tipo de movilidad incluyó la transferencia de un grupo salvaje de un hábitat natural a otro, tras dos años de estudio el autor observó la muerte de un individuo y el nacimiento de dos crías, sugiriendo que el grupo presentó un suceso de adaptación en la nueva área.

El segundo tipo de movilidad fue la reintroducción y liberación de animales nacidos en cautiverio en un área natural. Este grupo presentó alteraciones de comportamiento a lo largo del tiempo disminuyendo el descanso y aumentando el forrajeo. Estos grupos obtuvieron menos éxito, según Saddy, 2003 y que a pesar de la no supervivencia de los animales reintroducidos, hubo cambios en el comportamiento de los animales cautivos en dirección a los salvajes, indicando aprendizaje y adaptación en poco tiempo. El último tipo de movilidad que realizaron los investigadores consistió en capturar dos machos salvajes y la liberación de estos, en territorio diferente al original. Este último tipo de manejo resultó ser el menos exitoso, puesto que los animales murieron en un periodo de 3 a 8 meses concluyendo que este tipo de manejo no alcanzó las metas deseadas.

En 2005 Pérez y colaboradores, diseñaron cebadores de microsatélites para *Leontopithecus chrysopygus*, identificando nueve loci polimórficos, siete de los cuales fueron probados en titi león dorado (*Leontopithecus rosalia*). Los siete loci polimórficos y otros dos loci monomórficos de *L. chrysopygus* fueron polimórficos en *Leontopithecus rosalia*.

El estudio permitió concluir que los marcadores microsatélites que identificaron son directamente aplicables a la población actual del mico-león-negro y en estudios de genética de la conservación.

En otros estudios realizados para especies del mismo género se destacan:

Forman y colaboradores (1986), estimaron la variación genética de 67 individuos en cautiverio y 73 individuos de vida libre de micos-leones-dorados mediante el análisis 47 loci de aloenzimas. Encontraron que la cantidad de variación fue baja en comparación con otras especies de primates (4% de los loci polimórficos (P), y

una heterocigocidad promedio de 0.001). Así mismo análisis electroforéticos de individuos tanto en cautiverio como de vida libre pertenecientes a dos morfotipos alopátricos, *Leontopithecus rosalia chrysopygus* y *Leontopithecus rosalia chrysomelas* mostraron ser similares en términos de polimorfismo en comparación al morfotipo *Leontopithecus rosalia rosalia*. La distancia genética de Nei mostro que los tres morfotipos son genéticamente similares, concluyendo que esos datos concuerdan con el reciente aislamiento reproductivo entre esas subespecies.

Guidorizzi (2008), estudió la ecología y el comportamiento del mico león cara dorada (*Leontopithecus chrysomelas*), en un fragmento de bosque semicaducifolio en Itororó, Bahia, Brasil. Monitorearon dos grupos por 20 meses, con 169 horas de observación para grupo y 683 horas para el otro grupo. El autor encontró, que la dieta es muy semejante a las otras poblaciones de *Leontopithecus* en términos de productos consumidos, siendo compuesta por frutos, insectos, pequeños vertebrados (anfibios y lagartos) y exudados. Como los otros miembros del género el consumo de exudados solamente fue observado en la estación seca. Observó además que el uso del espacio y el desplazamiento diario estuvieron relacionados con los sitios donde duermen (huecos de los arboles), de los árboles de frutas utilizadas y de la presencia de grupos vecinos (defensa de territorio).

Concluye que existe una gran flexibilidad ecológica y comportamental de la especie aunque no garantice su supervivencia a largo plazo. Además recomienda esfuerzo para aumentar la conectividad entre los fragmentos y el flujo génico de la población.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1 Población *ex situ* de *Leontopithecus chrysopygus*.

Para llevar a cabo el estudio genético, se colectaron muestras de sangre, pelo y heces de 20 individuos, los cuales hacen parte de la población *ex situ* del mico león negro distribuida en el Parque Ecológico Dr. Antonio Texeira Vianna en la ciudad de São Carlos y en la Fundación Parque Zoológico de São Paulo. El tamaño de la muestra de la población, equivalente a 20 ejemplares corresponde al número actual de individuos que existe en las dos áreas de cautiverio.

### 4.2 ÁREA DE ESTUDIO.

Teniendo en cuenta el pequeño número de individuos de la población en cautiverio se obtuvo muestras de todos los individuos para el desarrollo de los enfoques genéticos y moleculares. Las muestras procedían de la Fundación parque ecológico de São Paulo (FPZSP) (Figura 3A) y del parque Ecológico de São Carlos (PESC) (Figuras 3B). La FPZSP es el mayor zoológico de Brasil y está localizado en un área de 824.529 m<sup>2</sup> de bosque Atlántico original y cuatro kilómetros de álamos. Así mismo alberga nacientes del río Itirapina cuyas aguas forman diversos lagos que albergan ejemplares de varias especies de aves exóticas, nativas y migratorias (FPZSP, 2012)

A su vez el PESC posee uno de los mayores recintos de Bioma Cerrado con un área de 720.000 m<sup>2</sup>. El cerrado es el segundo mayor Bioma Brasileiro, con una vegetación en su mayor parte semejante al de las Sabanas, con gramíneas, arbustos y árboles dispersos (PESC, 2012).



Figura 3. Sitios en donde fueron realizadas las colectas. A. Fundação Zoológica de São Paulo, B. Parque Ecológico de São Carlos. Fuente Google Maps.

#### 4.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Fueron colectadas un total 55 muestras las cuales corresponden a los 20 individuos en cautiverio distribuidos de la siguiente manera: 16 individuos de la FPZSP y 4 individuos del PESC, a través de colecta manual con ayuda de los funcionarios del parque. La tabla 2 muestra la distribución y la cantidad e individuos en los dos puntos de colecta.

Tabla 2. Cantidad de muestras colectadas en cada recinto de estudio.

Amostra	FPZSP	PESC
Sangre	32	3
Pelo	16	3
Heces	-	1

En el caso de las heces, estas fueron colectadas en tubos fálcon con alcohol al 96% y posteriormente almacenadas en *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El pelo fue arrancado del dorso de cada individuo teniendo en cuenta que estos tuvieran los folículos o bulbos los cuales tienen tejido vivo para la extracción de DNA. Estos fueron preservados en sobres plásticos. Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción femoral con ayuda de jeringas de 3ml e agujas de 13X4, 5mm. Fueron colectados 0.2 centímetros cúbicos (200  $\mu\text{L}$ ) por individuo. Una vez

colectada, la sangre fue transferida para tubos *ependorf* los cuales contenían una gota de EDTA (Figura 4).

Los tubos fueron rotulados y enseguida colocados en una caja isotérmica para su posterior preservación en *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todas las muestras se transportaron en estas mismas cajas al laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos para su análisis.



Figura 4. Muestras de sangre obtenidas por venopuncion femoral.

#### 4.4 FASE DE LABORATORIO

##### 4.4.1 Extracción y Cuantificación de DNA

La extracción de DNA de la muestras de heces fue realizada usando el *kit de extração* “PSP<sup>®</sup> Spin Stool DNA Kit” (Invitek), siguiendo las orientaciones contenidas en el protocolo que acompaña el propio producto. La elección de este *kit* se debe a su objetivo de extracción específica para muestras de heces además de a haber demostrado buenos resultados en el laboratorio.

Para la extracción de DNA de las muestras de sangre y pelo, fue utilizado el protocolo con fenol cloroformo basado en Sambrook *et al*, 1989. (Anexo 3)

El protocolo de extracción de sangre básicamente consistió en dos pasos: ruptura y digestión de membranas celulares con la adición de detergente el cual promueve la emulsión de lípidos presentes en las membranas y la adición de una solución salina que provoca lisis celular.

El segundo paso consistió en la adición de *proteinasas k* que promueven la digestión del DNA y la precipitación de este por la adición de sales y alcohol helado. Los pasos detallados del proceso se describen a continuación.

La figura 5 describe de manera gráfica el protocolo que fue usado en este trabajo

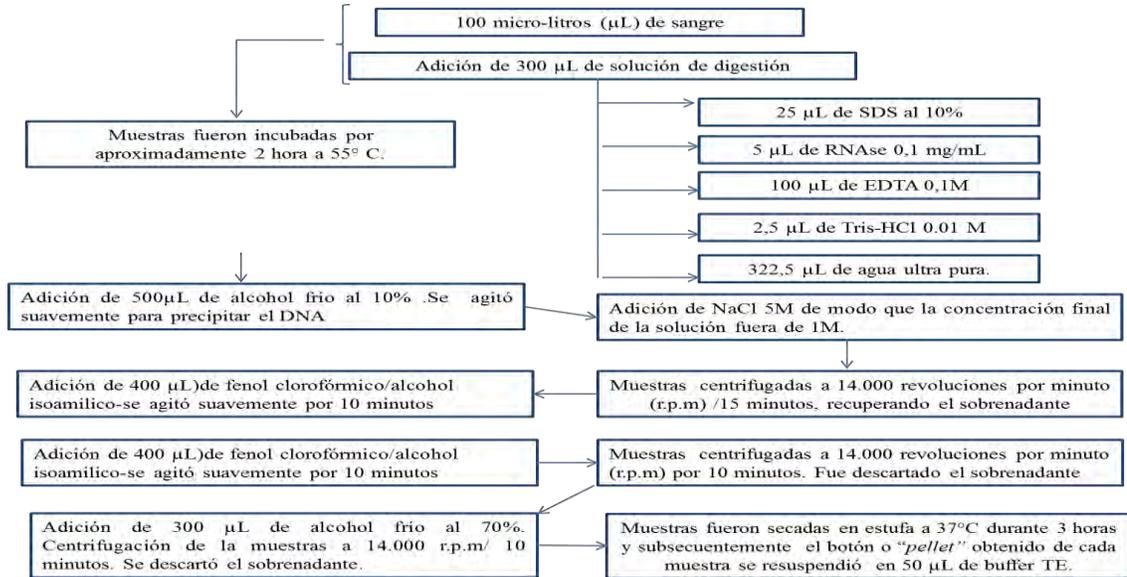


Figura 5. Protocolo de Extracción utilizado para la obtención DNA a partir de sangre y pelo.

Para la extracción de las muestras de pelo, fue utilizado el mismo protocolo con el aumento de la cantidad de *proteinasas k* adicionada (10 µL).

La cuantificación de la muestras se realizó con ayuda de un Biofotómetro (*BioPhotometer*, Eppendorf®), y alícuotas de DNA con concentración de 50ng/µl fueron realizadas y almacenadas a -20° C. La verificación de la calidad del DNA extraído se realizó en geles de agarosa 1%.

#### 4.4.2 Caracterización genética de las Muestras.

Para caracterizar genéticamente la población en estudio fueron utilizados diez cebadores específicos obtenidos por Pérez *et al.*, 2005 para amplificar regiones microssatélites. Estas secuencias están siendo usadas en la estimación del *estatus* genético de las poblaciones de mico león y en estudios de conservación (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias forward y reverse de los *cebadores* microsatélites específicos para *Leontopithecus chrysopygus* obtenidos por Pérez *et al*, 2005.

Secuencias		
<b>Primer (5´-3´)</b>		
<b>Leon27c13</b>	AAGCGCAGATTTATTGATAGG	TGCAGGTAATGATGGTAATG
<b>Leon35c42</b>	GTGGAAAGGTTTCAGAATATC	TGCAGTTGTCCACACTTTA
<b>Leon2</b>	CTGCTTCTTGTTCCACTTCTTCTC	GTTTGGGTGGTTGCCAAG
<b>Leon26c10</b>	TTCATCTCAATGACACGAAAC	CATCGAGTGTCTGCTGT
<b>Leon15c85</b>	CTGATCCTTGAAGCAGCATTG	GGTAAAGGGGTTTCGTTCTGTG
<b>Leon21c75</b>	CAGTTGAGGGAACAGGAATTA	CACTGCACTGACAGAGCAAG
<b>Leon11c72</b>	AGGATTACAGGTGCCAC	TTGCATATTGTGTTCAACTTC
<b>Leon31c97</b>	TGGTCCAGAGAAATGATGTC	GTAATTCCTTGGATTTATGCC
<b>Leon30c73</b>	GGACCTGATTGAAGCAGTC	TTCCCTGAGAATCTAATGGAG
<b>Leon3c20</b>	CTGTATGTGATCGCTTTTACCTG	AAGGCAATCTAACTAATCAACTC

Las reacciones de amplificación fueron realizadas con base en el protocolo de Schuelke (2000). Es importante mencionar, que este protocolo requiere de la adición de un tercer cebador universal a la reacción, conocido como cebador M13 formado por 18 bases y marcado con un fluoróforo.

Así, la reacción de amplificación necesita de dos cebadores específicos que flanquean la región microsatélite, y una cola del cebador universal M13. Para la marcación de los cebadores se ensayaron tres fluoróforos distintos, FAM, HEX, TET, con el objeto de optimizar el marcaje y posterior identificación de los alelos en el secuenciador (Figura 6).

La primera etapa de la reacción de PCR consta de una temperatura de anillamiento en la cual los cebadores específicos amplifican el fragmento de interés. En esta etapa es producida una región complementaria a la cola M13 (la cual es adicionada a uno de los dos cebadores específicos). La segunda etapa de la reacción, involucra una temperatura de anillamiento específica para que la cola M13 pueda anclarse al fragmento complementario, amplificando así, los alelos microsatélites de interés, además de la cola M13 marcada con el respectivo fluoróforo.

La estandarización de las reacciones fueron llevadas a cabo con el Kit *GoTaq®* PROMEGA (mix preparado que contiene cantidades específicas de cloruro de magnesio, *Taq* y DNTP's). El volumen final de la reacciones fue de 15 µL y contiene: 0.7 µL de cada *cebadores* específico y cola M13, 7.5 µL de *GoTaq®*, 0.3 µL BSA, 1 µL de DNA y finalmente 4 µL agua ultrapura (milli-Q).

Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: una etapa preliminar de desnaturalación a 94 ° C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 30s a 94 ° C, un gradiente de anillamiento específico para cada locus durante 45s a 72°C: mas 8 ciclos adicionales distribuidos así: 30s a 94 °C, 45s a 53°C (temperatura de anillamiento del cebador M13), 45s a 72°C y finalmente una etapa de extensión a 72 °C por 10 minutos.

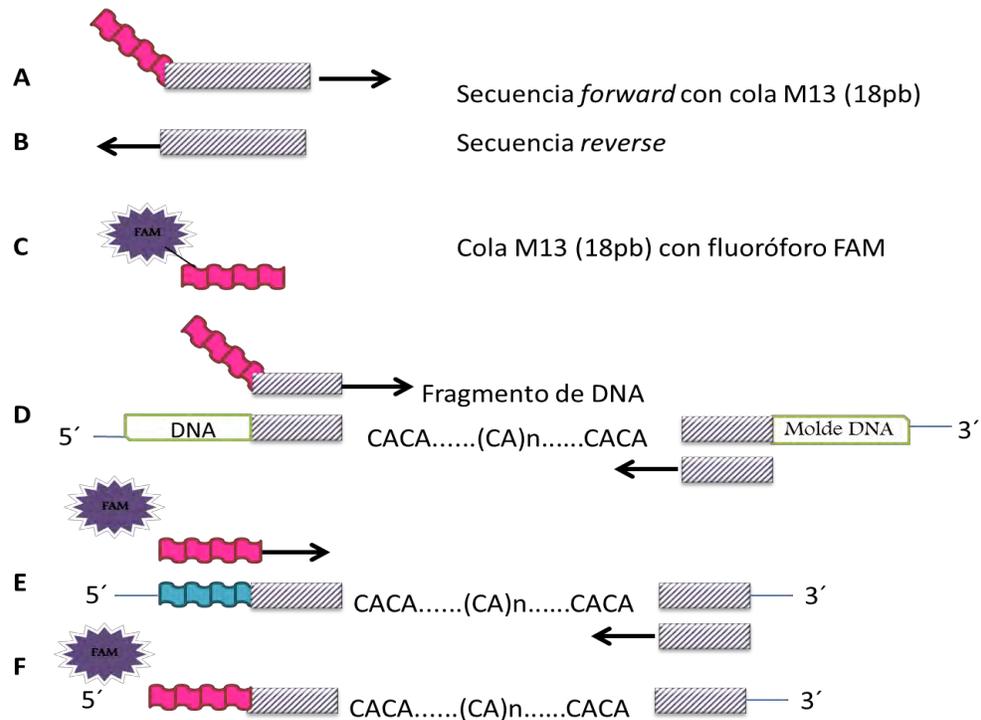


Figura 6. La figura representa la reacción de amplificación utilizando la cola universal M13 A. Primer forward el cual tiene adicionado la cola M13. B. Primer reverse. C. Cola M13 marcada con fluoróforo FAM. D. Anillamiento de los primers específicos a las regiones que flanquean los microsatélites, y amplificación del fragmento E. Anillamiento de la cola M13 a su secuencia complementaria. F. DNA microsatélite amplificado junto con la cola M13 marcada con fluoróforo. Fuente: Adaptado de Schuelke (2000).

Las reacciones de PCR fueron optimizadas para cada uno de los cebadores, con la adición de  $MgCl_2$  y variando la temperatura de anillamiento. El termociclador usado para todas las amplificaciones fue Eppendorf Mastercycler Gradient® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% adicionando a 2  $\mu$ L de cada muestra, 1  $\mu$ L de azul de bromofenol y 1  $\mu$ L de GelRed (Uniscience), la condición de corrida es de 100 voltios (V) durante 40 minutos.

Los fragmentos amplificados fueron enviados para genotipar en secuenciador automático Megabase en la empresa DNA Consult Genética y Biotecnología (São Carlos, SP). Finalmente, el tamaño de los alelos fue determinado por medio del programa Megabase™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science).

#### 4.4.3 ANÁLISIS DE DATOS

Con el fin de analizar la variabilidad intrapoblacional fue calculado el número de alelos ( $N_a$ ), los valores de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) utilizando el programa GenAlex6 (Peakall; Smouse, 2006) y la riqueza alélica ( $R_a$ ) con ayuda del programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

La desviación de los sistemas microsatélites con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) fue calculado mediante el programa GenePop (Schneider *et al.*, 2006). Las estimativas para el desvío de HWE y deficiencia de heterocigotos fueron obtenidas mediante el algoritmo de cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC) (Braga, 2010). Además la desviación de los sistemas microsatélites fueron analizados por el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ , en conjunto con los valores de  $p$  para el exceso (PL) e para el déficit de heterocigotos (PS).

Para verificar la presencia de alelos nulos, se utilizó el programa Micro-Checker (Oosterterhout *et al.*, 2004). Varios métodos permiten estimar la frecuencia de alelos nulos cuando aparentemente hay un déficit de heterocigotos, estos métodos depende de si hay errores en la amplificación de algunas muestras y también depende de si esas muestras no amplificadas representan homocigotos para alelos nulos (Silos, 2011). Dos métodos son los más usados para el cálculo de alelos nulos: el método de Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996), donde se asume que la deficiencia de heterocigotos es consecuencias de alelos nulos y no de errores de genotipificación o desvíos en la *panmixia*. El segundo método es el de Oosterhout *et al.* (2004), quien asume que no hay homocigotos nulos y considera todas las no amplificaciones como producto de un DNA de mala calidad (degradado) o de errores humanos. En este sentido la presencia de alelos nulos es estimada mediante el cálculo previo de las frecuencias alélicas de todos los alelos encontrados, suponiendo que el alelo nulo tiene un tamaño estándar (Silos, 2011).

Mediante el programa Gene pop 4.0.10 fue realizada una estimativa multilocus del número efectivo de migrantes. El contenido de información polimórfica (PIC) a partir de los genotipos y las frecuencias alélicas para cada uno de los *locus* fue estimado mediante el programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007, tomado de Silos, 2011).

Con el fin de verificar la diferenciación genética entre las subpoblaciones definidas *a priori*, se estimó el grado de diferencia poblacional mediante el índice de

fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) con el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). El índice  $F_{ST}$  fue calculado mediante el modelo de alelos infinitos el cual sugiere que la mayoría de nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existen en la población original, por lo tanto en este modelo la homoplasia es despreciable o no existe (Méndez *et al*, 2004).

Así mismo se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en el programa GenePop, con el fin de verificar la aparición de varianza entre y dentro de las subpoblaciones. Wright, 1951, 1965, definió el índice de fijación  $F_{ST}$  como la correlación entre gametos tomados al azar de la misma subpoblación en relación al total. Un alto valor de  $F_{ST}$  indica que hay baja variación genética en una población local en relación a la población total, valores pequeños indican mucha variación local en relación a la total (Templeton, 2006).

Las estimativas de parentesco genético ( $r$ ) inicialmente fueron calculadas mediante el estimados "momentum" en el programa Kingroup de acuerdo con Queller e Goodnight (1999). Entre más negativo es el valor de  $r$ , mayor probabilidad de que los individuos que están siendo evaluados no tienen ninguna relación. Lo anterior debido a que estos individuos presentan un menor número de alelos idénticos por descendencia que lo esperado. (Konovalov y Heg, 2008). Así mismo esos valores negativos pueden ayudar a detectar individuos que poseen nuevos alelos.

El programa ML Relate, el cual se fundamenta en estimativas de máxima verosimilitud fue usado para establecer las posibles relaciones de parentesco entre los individuos, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de alelos nulos (Miño, 2010).

La clasificación final de las relaciones de parentesco entre pares de individuos fue realizada de la siguiente manera: inicialmente fue estimado el valor de parentesco y enseguida fue comparado este valor con las categorías mostradas por el *studybook* y por las mostradas por el programa M-relate con el fin de dar un diagnóstico final de relacionamiento.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Población *ex situ* de *Leontopithecus chrysopygus*.

La población *ex situ* de *L. chrysopygus* que se encuentra en el Parque Ecológico de São Carlos se conformó gracias al establecimiento de tres parejas de ascendencia desconocida (Figura 6). Por la información recaudada, todos los individuos del parque fueron llevados al Centro de Primatología de Rio de Janeiro (CPRJ) desde el Parque Estadual *Morro do Diabo*, entre los años 2004 y 2008. Actualmente, la población tiene cuatro individuos adultos y un juvenil, el cual es descendiente de una de las parejas.

Respecto a la población *ex situ* encontrada en la Fundación Parque Zoológico de São Paulo, esta se conformó gracias al establecimiento de dos parejas que dieron origen a todos los individuos que fueron estudiados en este trabajo. Gracias a la información compilada en el *Studybook* de la especie, se logró realizar un heredograma mostrando las relaciones de parentesco entre estos individuos (Figura 7).

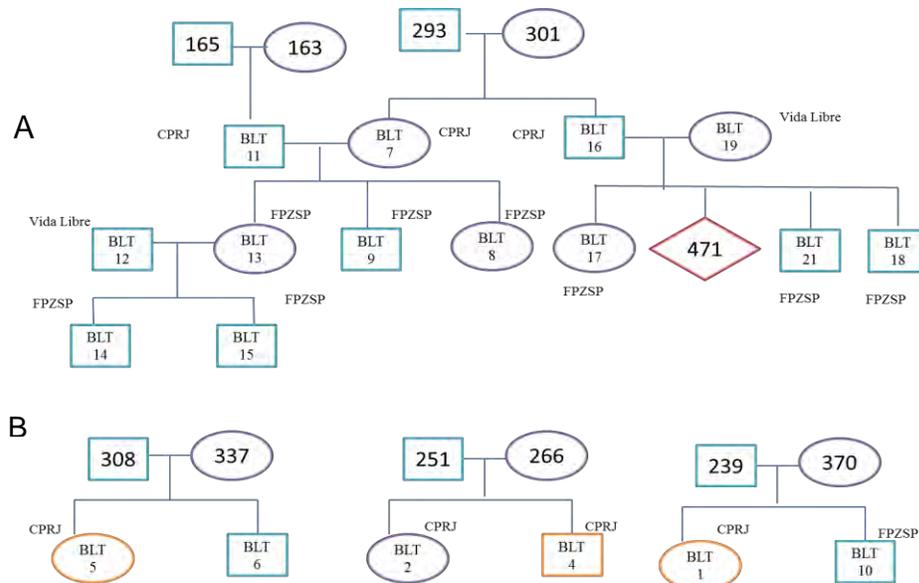


Figura 7. Heredograma que indica las relaciones de parentesco entre los individuos A. Fundación Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) B. Parque Ecológico de São Carlos (PESC). Los números indican el registro de cada uno de los individuos dentro del Registro Genealógico de la Especie (*Studybook*). Cada uno de los individuos estudiados en este trabajo se presenta marcado de acuerdo al local a donde fueron llevados después de su nacimiento así CPRJ: Centro de Primatología de Rio de Janeiro. FPZSP: Fundación Parque Zoológico de Sao Paulo.

### 3.2 Extracción de DNA genómico total.

En general, el protocolo de extracción fue exitoso puesto que el DNA obtenido en este trabajo resulto de buena calidad en todas las muestras. Además presento poca degradación lo que se evidenció en el gel de agarosa 1% en el cual no se observó ningún “rastros en el gel” (Figura 8), patrón que indicaría la fragmentación del DNA molde. Sin embargo las muestras de DNA obtenidas de heces y pelos presentaron baja calidad, hecho explicado posiblemente a que el material genético en este tipo de muestras, no invasivas, se encuentra muy degradado lo que a su vez dificulta el éxito de la amplificación (Taberlet *et al.*, 1999.)

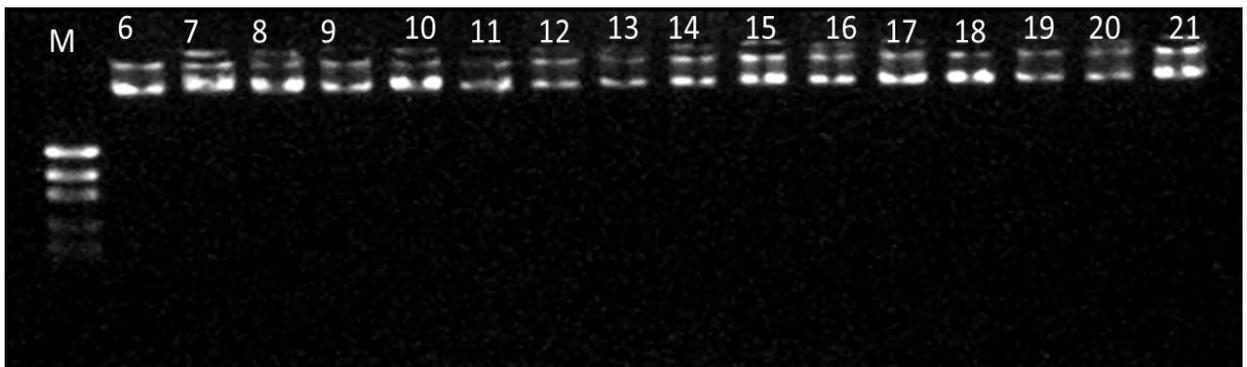


Figura 8. Verificación de la calidad de DNA genómico total extraído a partir de sangre, en gel de agarosa al 1% de las muestras de la FPZSP *Leontopithecus chrysopigus*. (M) 1KB plus Ladder.

Las muestras de DNA obtenidas a partir de tejido sanguíneo fueron mejores en relación a la calidad como a la cantidad de DNA en comparación con las muestras de heces fecales y pelos. La concentración de material genético de las extracciones de sangre mostro una variación de 36 a 488 ng/ $\mu$ l y una media de 257 ng/ $\mu$ l de DNA extraído. Las muestras de heces y pelos tuvieron una concentración de 21 y 3 ng/ $\mu$ l respectivamente. Las soluciones estoque de DNA fueron diluidas con el fin de alcanzar una concentración de 50 ng/ $\mu$ l y esas diluciones fueron utilizadas posteriormente en todas las PCRs. Las muestras en las cuales la concentración de DNA fue inferior a 50 ng/ $\mu$ l fueron usadas con dicha concentración sin ser diluidas.

## 5.2 Amplificación y proporción de *loci* polimórficos.

Para cada pareja de *cebadores* homólogos, se realizaron diferentes ensayos con el fin de establecer las condiciones de temperatura óptimas para su amplificación, en la especie *Leontopithecus chrysopygus*. Fueron utilizados diez *loci* microsatélites descritos por Pérez *et al.*, (2005) siendo todos homólogos. En la fase de optimización de las condiciones de amplificación en el termociclador, se experimentó un gradiente de temperatura de alineamiento de los *cebadores* específicos observando que la mejor temperatura oscila entre 58°C y 60°C (Figura 9).

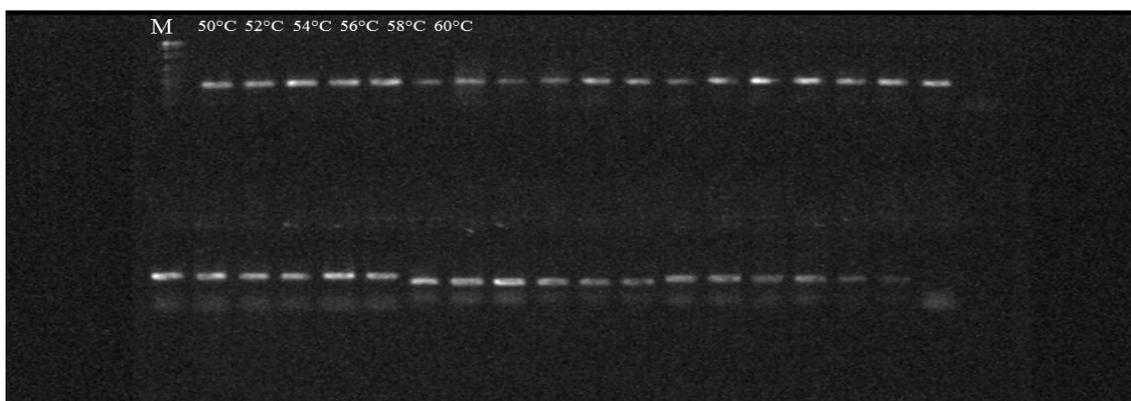


Figura 9. Amplificación de regiones microsatélites del genoma del mico león, muestra BLT5, utilizando un gradiente de temperatura (50-60°C). Los resultados evidencian la amplificación de múltiples fragmentos en todas las temperaturas ensayadas.

De los 10 *loci* microsatélites testados (Tabla 4) todos resultaron en la amplificación satisfactoria de un fragmento de tamaño esperado después de las reacciones de PCR. Para los *loci* en los cuales no se observó amplificación fueron realizadas algunas modificaciones en el protocolo, así, se probó un aumento o disminución en la temperatura de anillamiento, aumento en la concentración de MgCl<sub>2</sub> y por último se aumentó la cantidad de DNA en cada reacción. Sin embargo en algunas muestras no se obtuvo éxito en la amplificación

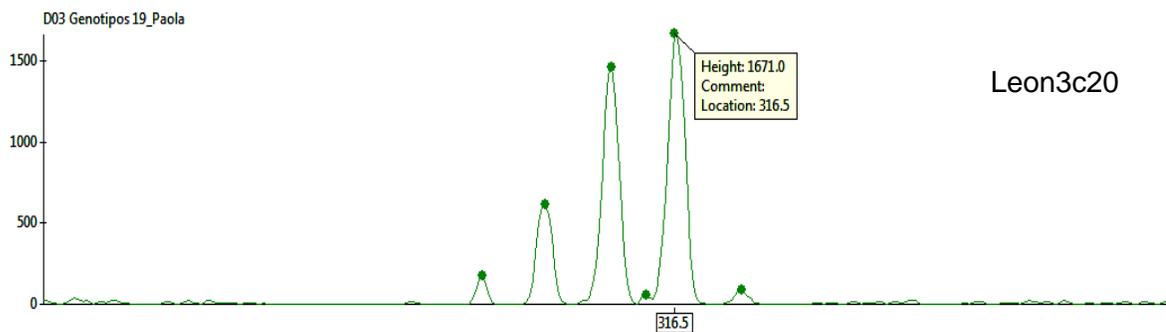
## 5.3 Variabilidad Genética

Una vez analizados los electroferogramas y el valor PIC en general, (contenido de información polimórfica) tres *locus* fueron considerados poco informativos (35c42, 26c10, 27c13).

Cuatro *locus* fueron considerados como razonablemente informativos (3c20, 15c85, 30c73, 31c87) y tres *locus* fueron considerados altamente informativos (Leon2, 21c75, 11c72) (Tabla 4) (Botstetein *et al*, 1980). La figura 10 muestra los electroferogramas en los cuales se muestra el polimorfismo en cada *locus* y el patrón característico de cada uno de sus alelos. El número de alelos y tamaño de los fragmentos obtenidos para los 6 *loci* fueron comparados con el trabajo de Pérez *et al*, 2005 (Tabla 4).

Tabla 4. La tabla muestra los *Loci* microsatélites que fueron polimórficos en la especie *L. chrysopygus*. Se comparan los datos obtenidos en este estudio con los propuestos por Pérez, *et al*, 2005. (Na) número de alelos. (PIC) Contenido de información polimórfica.

<i>Loci</i>	Na Pérez <i>et al</i> , 2005	Na Ayala, P. <i>et al</i> , 2012	Tamaño fragmentos Pérez <i>et al</i> , 2005	Tamaño Fragmento Ayala, P. <i>et al</i> , 2012	PIC
Leon2	2	4	206-208	213-225	0.584
Leon3c20	2	2	294-296	288-316	0.365
Leon15c85	2	4	270-274	268-298	0.291
Leon21c75	3	4	278-282	284-296	0.579
Leon30c73	6	4	255-269	210-286	0.499
Leon31c97	4	4	311-323	294-340	0.487
Leon35c42	3	3	201-205	219-221	0.177
Leon11c72	2	2	296-304	307-323	0.513
Leon26c10	1	1	250	268	0.000
Leon27c13	1	1	195	213	0.000



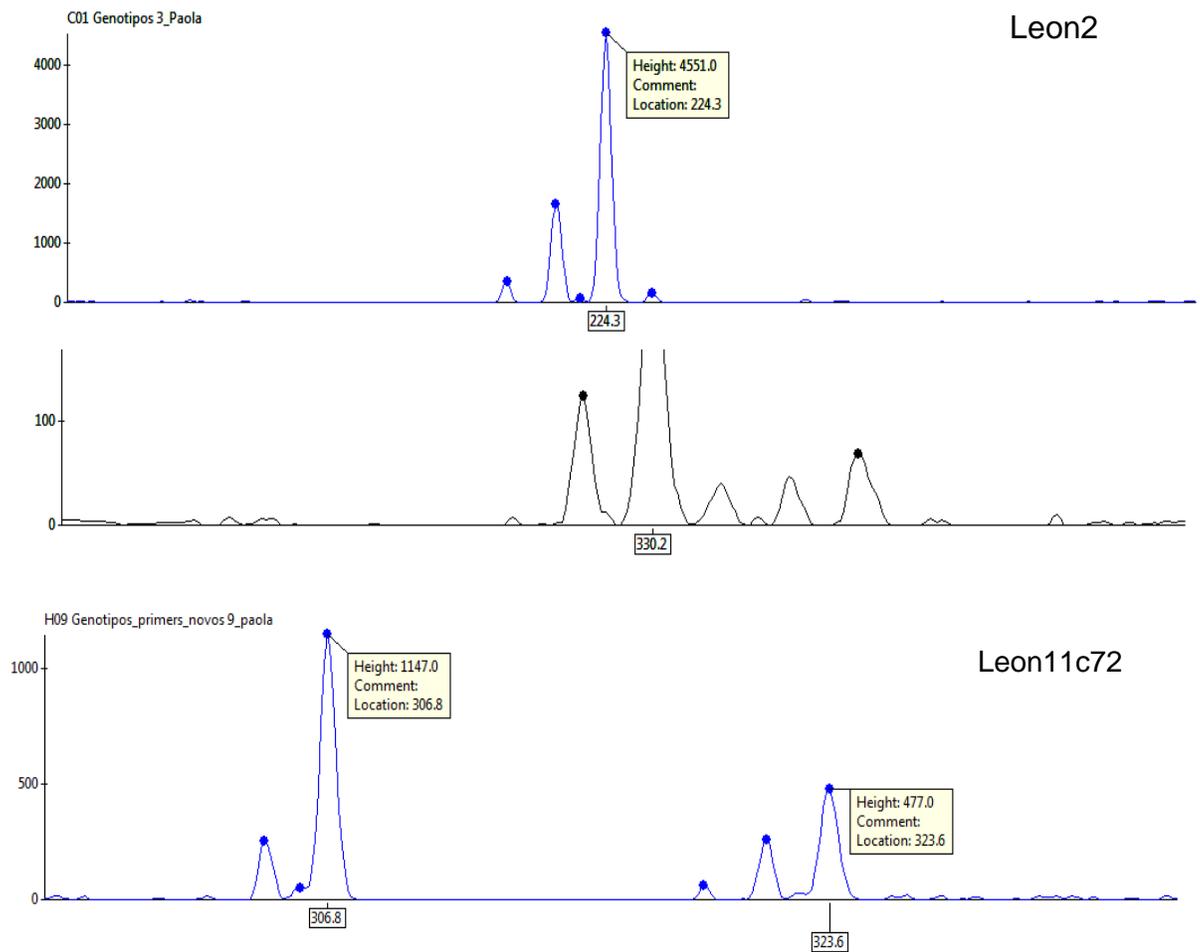


Figura 10. Electroferogramas mostrando el patrón de algunos alelos.

Con respecto a las frecuencias alélicas, se aprecia que en general estas fueron diferentes entre los dos grupos (Anexo 1). En los *loci* menos polimórficos 35c42, 26c10 y 27c13 las diferencias entre las frecuencias de los alelos fueron marcadas, apreciándose por ejemplo que en los sistemas 26c10 y 27c13 la frecuencia del único alelo toma valor de uno (Figura 11 A y B). En contraste, los *loci* Leon2, 21c75, 11c72, 3c20, 15c85, 30c73, 31c87 que son los más polimórficos, se aprecia una mayor diferencia en las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones (Figura 11 C, E)

Para el locus León 2 (Figura 11 C) que es el más polimórfico, el alelo más frecuente fue el 225, en las dos poblaciones aunque el la población del zoológico de São Paulo se presenta en mayor frecuencia. Se puede observar que algunos alelos que se encuentran con una frecuencia determinada en los individuos del

zoológico de São Paulo , tienen una mayor frecuencia en los individuos del parque ecológico de São Carlos (alelos 213, 223) e incluso algunos alelos como el 228 no se encuentran en los individuos de este recinto. (Figura 11 C). Con el sistema 30c73 ocurre algo similar: el alelo 210 se encuentra ausente en el zoológico de São Paulo, pero toma una frecuencia de 0,125 en el zoológico de São Carlos (Figura 11 F)

Con el sistema 31c97 ocurre algo análogo: el alelo 330 aumentó considerablemente su frecuencia en las dos poblaciones. Los alelos 294, 340 solamente se encontraron en los individuos de la FPZSP, mientras que el alelo 342 aumentó considerablemente su representación en la población del PESC y para la población del zoológico de São Paulo se observó su notoria disminución (Figura 10 H). Estos resultados obtenidos para algunos de los sistemas más polimórficos muestran que solo algunos de los individuos que se reprodujeron segregaron alelos a la siguiente generación, ocasionando una variación en las frecuencias alélicas de los dos recintos (Figura 10).

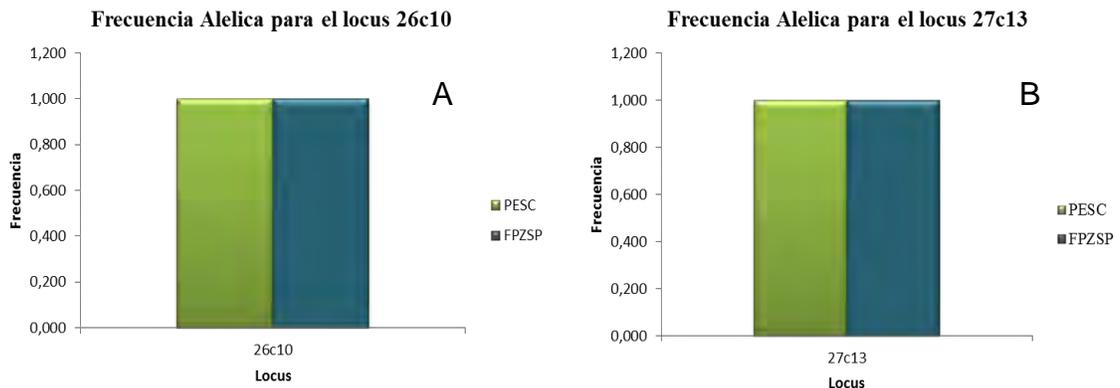


Figura 11. Distribución de las frecuencias alélicas para la población *ex situ* del mico-león-negro en la Fundación parque Zoológico de São Paulo y el en Parque Ecológico de São Carlos.

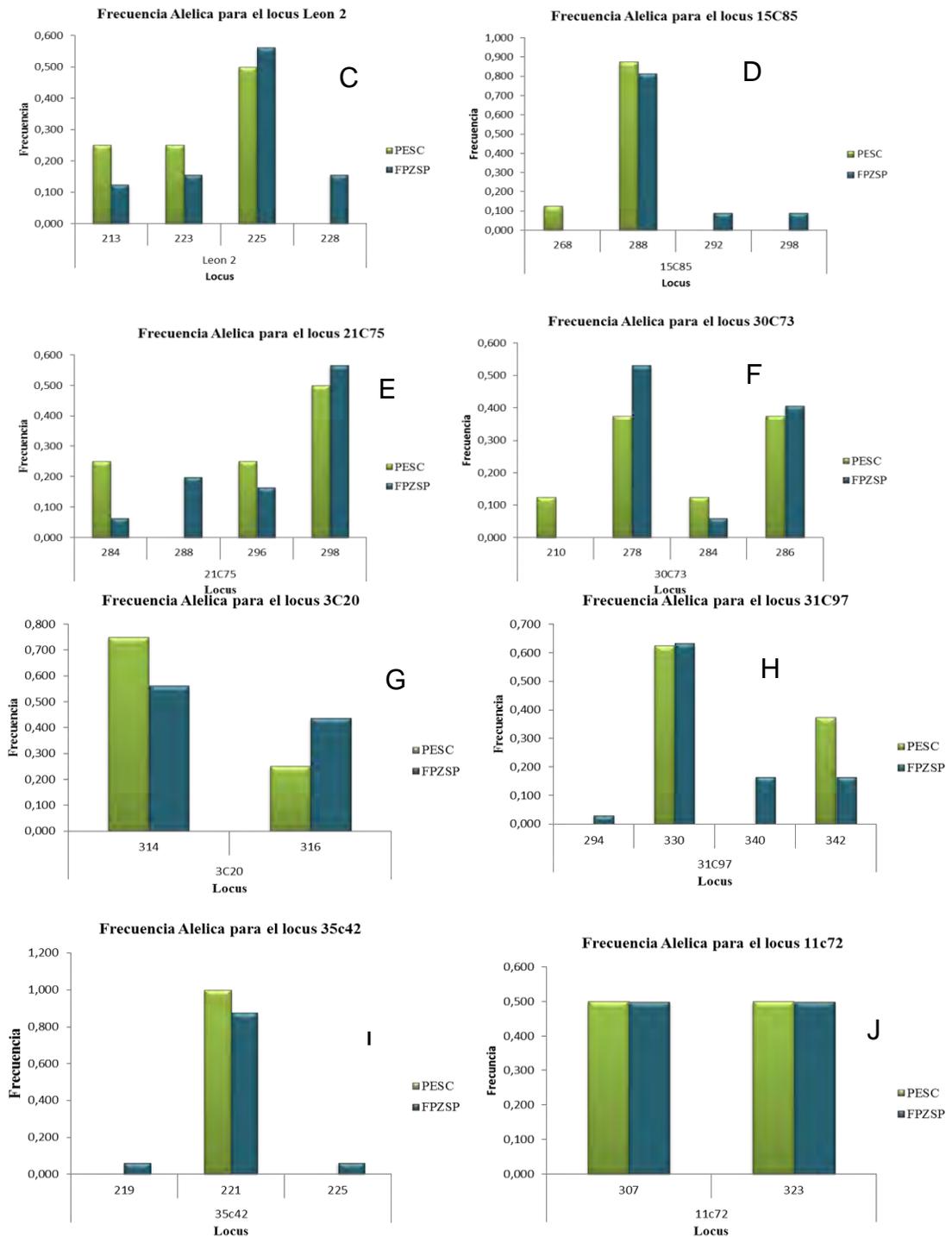


Figura 11. Distribución de las frecuencias alélicas para la población *ex situ* del mico-león-negro en la Fundación parque Zoológico de São Paulo y el en Parque Ecológico de São Carlos.

#### 5.4 Riqueza alélica y Heterocigocidad.

Las estimaciones de diversidad genética se basaron en el número de alelos, valores de heterocigocidad observada y esperada y riqueza alélica. En total se detectaron 33 alelos considerando los 10 locus microsátélites analizados. El número de alelos por locus en las dos poblaciones *ex situ* varió de uno en los locus Leon26c10 y Leon27c13, hasta 4 en el locus Leon 2, 15c85, 21c75 ,30c73, 31c97 con una media de 2.9 alelos por locus (Figura 11 y Anexo 1). En este sentido, los locus con únicamente un alelo fueron considerados monomórficos y por consiguiente descartados para el análisis.

La riqueza alélica fue relativamente baja detectando un número máximo de alelos por locus polimórfico de 4 y 3,2 respectivamente. La distribución de los alelos no siguió ningún patrón común entre los *loci* variables. Alelos comunes para la FPZSP no siempre están presentes en la población más pequeña PZSC, (por ejemplo, alelo 298 en locus León 15c85) y, no todos los alelos presentes en la población más pequeña están en la población del zoológico de São Paulo (Anexo 1).

La heterocigocidad observada ( $H_o$ ) vario de 0 (Locus 3c20) hasta 1 (Locus 11c72) en la población del PESC, y de 0(Locus 35c42) a 1(Locus 11c72) en la población proveniente de la FPZSP. Así mismo, la heterocigocidad esperada varió de 0,219 (Locus 15c85) hasta (0,688) en la población uno y de 0,227 (Locus 35c42) hasta 0,619 (Locus León 2) en la población dos. La tabla 5 recopila cada uno de esos valores. No hubo diferencias significativas cuando se compararon las dos poblaciones respecto a la Heterocigocidad observada ( $H_o$ ), lo que nos indica que la diversidad genética entre esas dos poblaciones es similar.

Tabla 5.  $N_a$ , número de alelos;  $H_o$ , heterocigocidad observada;  $H_e$ , heterocigocidad esperada;  $P_{EHW}$  desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg con  $0.005 < \alpha < 0.05$  (ajustado con la corrección secuencial de Bonferrini);  $F_{is}$ , coeficiente de endogamia;  $PL$ , valores de  $p$  para a deficiencia de heterocigotos;  $P_s$ , valores de  $p$  para el exceso de heterocigotos;  $R_a$ , riqueza alélica.\*Valores significantes.

Población	Locus	N	$N_a$	$H_o$	$H_e$	$P_{EHW}$	$F_{is}$	PL	$P_s$	$R_a$
PESC	León 2	4	3,000	0,500	0,625	0,257	0,333	0,338	0,969	3,000
	15C85	4	2,000	0,250	0,219	—	0,000*	1,000	1,000	2,000
	21C75	4	3,000	0,500	0,625	0,257	0,333	0,338	0,969	3,000
	3C20	4	2,000	0,000	0,375	0,143	1,000	0,131	1,000	2,000
	31C97	4	2,000	0,750	0,469	0,571	-0,500*	1,000	0,533	2,000
	30C73	4	4,000	1,000	0,688	0,400	-0,333*	1,000	0,403	4,000
	11c72	4	2,000	1,000	0,500	0,229	-1,000	1,000	0,231	2,000

FPESP	León 2	16	4,000	0,500	0,619	0,023	0,223	0,084	0,966	3,282
	15C85	16	3,000	0,375	0,322	0,566	-0,132*	1,000	0,528	2,184
	21C75	15	4,000	0,467	0,607	0,058	0,263	0,097	0,967	3,158
	3C20	16	2,000	0,000	0,492	0,000*	1,000	0,003	1,000	1,996
	31C97	15	4,000	0,533	0,542	0,436	0,051*	0,456	0,784	2,897
	30C73	16	3,000	0,563	0,529	0,981	0,007*	0,575	0,613	2,436
	35c42	16	3,000	0,125	0,227	0,063	0,474	0,078	1,000	1,887
	11c72	16	2,000	1,000	0,500	0,000*	-1,000	1,000	0,003	1,998

## 5.5 Equilibrio Hardy-Weinberg

Como se puede observar en la tabla 5 las proporciones genotípicas están de acuerdo con el Equilibrio de Hardy-Weinberg en la población del PESC, ya que ningún locus presento vapor de  $p$  significativo. Para la población de la FPZSP, los locus 3c20 y 11c72 presentaron desvíos significativos del Equilibrio Hardy-Weinberg ( $0,005 < \alpha < 0,05$  ajustado de acuerdo con la corrección secuencial de Bonferroni).

El locus 3c20, no se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg debido a una deficiencia de heterocigocidad observada lo que evidencia una mayor frecuencia de genotipos homocigotos.

El valor  $F_{is}$  de 1 en este loci, significa máxima endogamia, por lo tanto solo habrá homocigotos y las frecuencias genotípicas serán las mismas alélicas. En contraste el sistema 11c72 presenta desviación del equilibrio Hardy-Weinberg por exceso de heterocigotos.

En general, el índice  $F_{is}$  sugirió déficit de heterocigotos en 9 de las 20 comparaciones realizadas en las 2 poblaciones analizadas, sin embargo solamente los loci 15c85, 31c97 y 30c73 mostraron diferencias significativas en las dos poblaciones (Tabla 5).

Los análisis realizados con el programa Micro-checker, mostraron presencia de alelos nulos únicamente en el locus 3c20 para la población de la fundación zoológico de São Paulo. Una de las causas de la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg por deficiencia de heterocigotos es la presencia de alelos nulos (Braga, 2011; Cuervo, 2010). Al determinar si la presencia de alelos nulos era la responsable de la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg por exceso de homocigotos, se encontró que aunque la frecuencia de alelos nulos es alta en el locus 3c20 (Tabla 6), no es la principal responsable de las diferencias entre las heterocigocidad observadas y esperadas pues estas cambian muy poco al considerar el alelo nulo; si el alelo nulo fuera el responsable de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, las heterocigocidad observadas y esperadas

calculadas con el alelo nulo serían muy similares y ya no habría desviación del equilibrio (Cuervo, 2010).

Tabla 6. Estimativas de las frecuencias de alelos nulos para cada locus según el método descrito por *Brookfield 1* (1996), calculado con el programa Micro-Cheker.

<b>Locus</b>	<b>Presencia de alelos nulos</b>	<b><i>Brookfield 1</i></b>
<b>Leon2</b>	No	0,0736
<b>15c85</b>	No	-0,0399
<b>21c75</b>	No	0,0871
<b>3c20</b>	Si	0,3298
<b>31c97</b>	No	0,0058
<b>30c73</b>	No	-0,0088
<b>35c42</b>	No	0,0828
<b>11c72</b>	No	-0,3333

Una posible explicación para la aparición de alelos nulos en este locus, podría ser la baja eficiencia de hibridación del *cebador* utilizado debido a puntos de mutación en uno o más sitios de anillamiento (Dakin; Avise, 2004). Otra explicación según Wattier *et al.*, 1998, es la amplificación diferencial de alelos de distinto tamaño. Además, en este locus (3c20), específicamente, los picos de los diferentes alelos se observaron muy próximos unos de otros en los electroferogramas, imposibilitando su distinción. Según Silos, 2010, es probable, que aunque cada electroferograma fue visualizado cuidadosamente, haya ocurrido una clasificación errónea de individuos heterocigotos como homocigotos, explicando así la presencia de alelos nulos o el exceso de homocigotos en la mayoría de clases de los alelos. En los otros *locus* ese tipo de problema no fue detectado, así como también no fueron observados alelos nulos.

## 5.6 Estructura Poblacional

Los valores de  $F_{ST}$  estimados par a par no mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones y son exhibidos en Tabla 7, junto con los  $p$  valores.

Tabla 7.  $F_{ST}$  (debajo de la diagonal) y  $p$  (encima de la diagonal) entre las dos subpoblaciones de *L. chrysopygus*. Los  $p$  valores fueron obtenidos después de 20 permutaciones. El ajuste del intervalo de significancia para análisis múltiples fue de 0.050000.

Población	PESC	FPZSP
PESC	---	0.45000
FPZSP	-0.0387	---

Así mismo, el análisis de varianza Molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación genética está dentro de las subpoblaciones. De la variación total, 97% fue atribuida a las diferencias individuales dentro de las poblaciones y 3% a la divergencia entre poblaciones (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) presente en las poblaciones. En ella se muestra grados de libertad (df), suma de cuadrados (SS), media de la suma de cuadrados (MS), la estimativa de varianza y el porcentaje de varianza total (%).

Origen	Df	SS	MS	Estimativa de Varianza	%
Entre Poblaciones	1	5,545	5,545	0,154	3%
Dentro Poblaciones	18	82,027	4,557	4,557	97%
Total	19	89,571	10,102	4,711	100%

## 5.7 Análisis de Parentesco

El análisis de parentesco fue realizado con el fin de corroborar las relaciones mostradas por el heredograma, presentado en este trabajo, que fue realizado con base en el *studybook* de la especie (Figura 7).

El locus 3c20, aunque presenta alelos nulos fue incluido para el análisis de parentesco genético, puesto que esos análisis se tornan más robustos si *loci* con

alelos nulos son incluidos en ellos, principalmente cuando estos poseen mayor número de alelos (Wagner *et al.*, 2006).

La probabilidad media de identidad (*PI*) fue de 0,0004 en el Zoológico de São Paulo, y de 0,0002 en el Parque Ecológico de São Carlos. La probabilidad combinada de exclusión para todos los *loci* (*PE*) (simulando que no se conocen ninguno de los padres) fue de 0,967 en el Zoológico de São Paulo y de 0,973 en el Parque Ecológico de São Carlos (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de probabilidad de Identidad (*PI*) y probabilidad de Exclusión (*PE*) por locus en las dos poblaciones.

<b>Locus</b>	<b><i>PI</i> PESC</b>	<b><i>PI</i> FPZSP</b>	<b><i>PE</i> PESC</b>	<b><i>PE</i> FPZSP</b>
<b>Leon2</b>	0,193	0,488	0,510	0,277
<b>15c85</b>	0,634	0,691	0,167	0,063
<b>21c75</b>	0,211	0,444	0,493	0,294
<b>3c20</b>	0,461	0,379	0,239	0,279
<b>31c97</b>	0,392	0,275	0,263	0,457
<b>30c73</b>	0,132	0,139	0,668	0,650
<b>35c42</b>	1,000	0,610	0,000	0,101
<b>11c72</b>	0,375	0,375	0,281	0,281
<b>26c10</b>	1,000	1,000	0,000	0,000
<b>27c13</b>	1,000	1,000	0,000	0,000

Al establecer una aproximación global del parentesco entre los individuos de la población mediante la distribución de los coeficientes de relación genética Queller y Goodnight (1989) los resultados muestran que algunos pares de individuos de la población en general presentan altos valores de parentesco genético ( $r=0,738$ ), desviándose de lo esperado para poblaciones panmíticas.

El grado de parentesco genético entre dos individuos, estimado mediante el estadístico  $r$ , se basa en la probabilidad de que dos alelos presentes en ambos individuos, sean idénticos por descendencia (IBD, Lynch; Walsh, 1998, tomado de Silos, 2010). Según Russelo y Amato, 2004, existen tres clases de relación:

Hermanos completos (FS), medios hermanos (HS) y no relacionados (U). Teóricamente los valores medios esperados del estadístico  $r$  son 0,5 para hermanos completos, 0,25 para medios hermanos y 0.0 para individuos no relacionados.

Para poblaciones naturales se observa una variación en torno de los valores teóricos. Esto debido a varios factores como la naturaleza estocástica de la selección genética durante la reproducción sexual, al pequeño número de *loci* marcadores moleculares y a las proporciones reales de pares en las categorías de parentesco diferentes en las poblaciones (Russello; Amato, 2004).

Por ese motivo se hace necesario el uso del programa IRel 1.0, el cual se basa en las frecuencias alélicas observadas en la población y la simulación de pares, con el fin de determinar valores medios entre las tres clases relacionadas (FS, HS, UR) los cuales se aproximan más a las muestras poblacionales reales (Silos, 2010). Sin embargo, debido al tamaño poblacional de este estudio, no fue posible calcular los valores medios y, por lo tanto el análisis se basó en los valores teóricos.

En este sentido, la estimativa de parentesco genético ( $r$ ) entre los individuos pertenecientes a los dos zoológicos fueron realizadas mediante el estimador “momentum”, con ayuda del programa Kingruop (Konovalov *et al.*, 2004), de acuerdo a Queller Goodnight (1999). Así, entre más negativo es el valor de  $r$ , hay una mayor probabilidad que los individuos evaluados sean no relacionados, puesto que estos, presentan un menor número de alelos idénticos por descendencia que lo esperado (Konovalov y Heg, 2008). Así mismo, los valores negativos pueden ayudar a detectar individuos que cargan nuevos alelos (Konovalov y Heg, 2008). Mediante el programa ML-Relate se realizó los análisis con las frecuencias alélicas corregidas para la existencia de alelos nulos en el locus 3c20. La tabla 10 muestra las Categorías de relacionamiento ente los pares de individuos estudiados de cada uno de los recintos. Para cada par, se muestra el valor de parentesco genético según Queller y Goodnight (1989) (Q&Gr), la categoría de relacionamiento más probable identificada por máxima verosimilitud (ML-Relate) y la categoría de relacionamiento registrada dentro del studybook de la especie. Las líneas representan los pares de individuos que no tuvieron categoría de relacionamiento confirmada.

Tabla 10. Categorías de relacionamiento ente los pares de individuos estudiados de cada uno de los recintos.

Par de individuos		<i>Studybook</i> Categoría de Relacionamiento	ML-Relate categoría de relacionamiento	(rQ&GR) categoría de relacionamiento Kingroup	Diagnostico final de categoría de Relacionamiento
BLT3	BLT1	U	U	(-0,071) U	U
BLT4	BLT1	U	U	(-0,494) U	U
BLT4	BLT3	PO	U	(-0,06) U	—
BLT5	BLT1	U	U	(-0,159) U	U
BLT5	BLT3	PO	U	(0,286) HS	—
BLT5	BLT4	U	FS	(-0,159) U	—
BLT6	BLT1	U	U	(-0,111) U	U
BLT6	BLT3	U	FS	(-0,829) U	—
BLT6	BLT4	U	U	(0,211) U	U
BLT6	BLT5	FS	U	(0,258) HS	—
BLT7	BLT1	U	U	(-0,061) U	U
BLT7	BLT3	U	FS	(0,705)FS	—
BLT7	BLT4	U	FS	(0,251) HS	—
BLT7	BLT5	U	FS	(0,294) HS	—
BLT7	BLT6	U	FS	(0,832) FS	—
BLT8	BLT1	U	U	(-0,669) U	U
BLT8	BLT3	U	U	(-0,2) U	U
BLT8	BLT4	U	FS	(0,651) FS	—
BLT8	BLT5	U	U	(-0,306) U	U
BLT8	BLT6	U	U	(-0,259) U	U
BLT8	BLT7	PO	U	(-0,186) U	—
BLT9	BLT1	U	U	(-0,53)U	U
BLT9	BLT3	U	FS	(0,354) HS	—
BLT9	BLT4	U	FS	(0,738) FS	—
BLT9	BLT5	U	U	(-0,245) U	U
BLT9	BLT6	U	FS	(0,419) HS	—
BLT9	BLT7	PO	FS	(0,36) HS	PO
BLT9	BLT8	FS	HS	(0,417) HS	FS
BLT10	BLT1	FS	HS	(0,241) HS	FS
BLT10	BLT3	U	FS	0,646) FS	
BLT10	BLT4	U	U	(-0,197) U	U
BLT10	BLT5	U	U	(0,086) U	U
BLT10	BLT6	U	FS	(0,475) HS	—
BLT10	BLT7	U	U	(0,414) HS	—
BLT10	BLT8	U	U	(-0,319) U	U
BLT10	BLT9	U	U	(0,157) U	U

BLT11	BLT1	U	U	(-0,103) U	U
BLT11	BLT3	U	U	(0,054) U	U
BLT11	BLT4	U	U	(-0,097) U	U
BLT11	BLT5	U	U	(-0,04) U	U
BLT11	BLT6	U	FS	(0,299) HS	—
BLT11	BLT7	U	U	(0,331) HS	—
BLT11	BLT8	PO	HS	(-0,228) U	—
BLT11	BLT9	PO	U	(-0,187) U	—
BLT11	BLT10	U	U	(-0,093) U	U
BLT12	BLT1	U	U	(-0,608) U	U
BLT12	BLT3	U	U	(-0,466) U	U
BLT12	BLT4	U	U	(0,174) U	U
BLT12	BLT5	U	FS	(0,217) U	U
BLT12	BLT6	U	U	(-0,527) U	U
BLT12	BLT7	U	U	(-0,478) U	U
BLT12	BLT8	U	U	(0,076) U	U
BLT12	BLT9	U	U	(0,108) U	U
BLT12	BLT10	U	U	(-0,517) U	U
BLT12	BLT11	U	U	(-0,638) U	U
BLT13	BLT1	U	U	(-0,439) U	U
BLT13	BLT3	U	U	(-0,33)U	U
BLT13	BLT4	U	FS	(0,388) HS	—
BLT13	BLT5	U	U	(-0,284) U	U
BLT13	BLT6	U	U	(-0,249) U	U
BLT13	BLT7	PO	U	(-0,198) U	—
BLT13	BLT8	FS	U	(0,188) U	—
BLT13	BLT9	FS	U	(0,247)FS	FS
BLT13	BLT10	U	U	(-0,397) U	U
BLT13	BLT11	PO	FS	(0,219) U	—
BLT13	BLT12	U	FS	(0,473) HS	—
BLT14	BLT1	U	U	(-0,224) U	U
BLT14	BLT3	U	FS	(0,595) FS	—
BLT14	BLT4	U	U	(-0,232) U	U
BLT14	BLT5	U	U	(0,092) U	U
BLT14	BLT6	U	PO	(0,543) FS	—
BLT14	BLT7	U (Abuelo-Nieto)	PO	(-0,466) U	U
BLT14	BLT8	U (Sobrino-Nieto)	U	(-0,531) U	U
BLT14	BLT9	U (Sobrino-Nieto)	U	(0,17) U	U
BLT14	BLT10	U	U	(-0,345) U	U
BLT14	BLT11	U (Abuelo-nieto)	U	(-0,111) U	U

BLT14	BLT12	PO	U	(-0,064) U	U
BLT14	BLT13	PO	U	(-0,114) U	—
BLT15	BLT1	U	U	(-0,48) U	U
BLT15	BLT3	U	U	(-0,496) U	U
BLT15	BLT4	U	U	(0,242) U	U
BLT15	BLT5	U	U	(-0,443) U	U
BLT15	BLT6	U	U	(-0,419) U	U
BLT15	BLT7	U (Abuelo-nieto)	U	(-0,359) U	U
BLT15	BLT8	U (Sobrino-Tío)	U	(0,02) U	U
BLT15	BLT9	U (Sobrino-Tío)	U	(0,116) U	U
BLT15	BLT10	U	U	(-0,535) U	U
BLT15	BLT11	U (Abuelo-nieto)	HS	(0,081) U	U
BLT15	BLT12	PO	FS	(0,591) FS	PO
BLT15	BLT13	PO	FS	(0,896) FS	PO
BLT15	BLT14	FS	FS	(-0,032) U	—
BLT16	BLT1	U	U	(-0,129) U	U
BLT16	BLT3	U	FS	(0,674) FS	—
BLT16	BLT4	U	U	(-0,162) U	U
BLT16	BLT5	U	U	(-0,222)U	U
BLT16	BLT6	U	FS	(0,621) FS	—
BLT16	BLT7	U	FS	(0,678) FS	—
BLT16	BLT8	U (Sobrino-Tío)	U	(-0,524) U	U
BLT16	BLT9	U (Sobrino-Tío)	U	(0,162) U	U
BLT16	BLT10	U	U	(0,366) HS	—
BLT16	BLT11	U	U	(0,12) U	U
BLT16	BLT12	U	U	(-0,456) U	U
BLT16	BLT13	U (Sobrino-Tío)	U	(-0,17) U	U
BLT16	BLT14	U	FS	(0,561) FS	—
BLT16	BLT15	U	U	(-0,344) U	U
BLT17	BLT1	U	U	(-0,387) U	U
BLT17	BLT3	U	U	(-0,221) U	U
BLT17	BLT4	U	U	(0,289) HS	—
BLT17	BLT5	U	U	(-0,66) U	U
BLT17	BLT6	U	U	(-0,3) U	U
BLT17	BLT7	U (Sobrino-Tío)	U	(-0,378) U	U
BLT17	BLT8	U (primos)	U	(0,175) U	U
BLT17	BLT9	U (primos)	HS	(0,408) HS	HS
BLT17	BLT10	U	U	(-0,337) U	U
BLT17	BLT11	U	U	(-0,714) U	U
BLT17	BLT12	U	U	(0,073) U	U

BLT17	BLT13	U (primos)	U	(0,04) U	U
BLT17	BLT14	U	U	(-0,399) U	U
BLT17	BLT15	U	U	(0,006) U	U
BLT17	BLT16	PO	U	(-0,359) U	—
BLT18	BLT1	U	U	(0,012) U	U
BLT18	BLT3	U	U	(0,182) U	U
BLT18	BLT4	U	U	(-0,245) U	U
BLT18	BLT5	U	U	(0,083) U	U
BLT18	BLT6	U	PO	(0,53) U	—
BLT18	BLT7	U (Sobrino-Tio)	U	(0,19) U	U
BLT18	BLT8	U (primos)	U	(-0,549) U	U
BLT18	BLT9	U (primos)	U	(-0,196) U	U
BLT18	BLT10	U	U	(0,01) U	U
BLT18	BLT11	U	U	(0,003) U	U
BLT18	BLT12	U	U	(-0,734) U	U
BLT18	BLT13	U (primos)	U	(-0,461) U	U
BLT18	BLT14	U	U	(-0,12) U	U
BLT18	BLT15	U	U	(-0,619) U	U
BLT18	BLT16	PO	FS	(0,408) HS	—
BLT18	BLT17	FS	U	(-0,259) U	—
BLT19	BLT1	U	U	(-0,427) U	U
BLT19	BLT3	U	U	(-0,435) U	U
BLT19	BLT4	U	U	(-0,036) U	U
BLT19	BLT5	U	U	(-0,005) U	U
BLT19	BLT6	U	U	(-0,391) U	U
BLT19	BLT7	U	U	(-0,526) U	U
BLT19	BLT8	U	U	(-0,127) U	U
BLT19	BLT9	U	U	(-0,02) U	U
BLT19	BLT10	U	U	(-0,477) U	U
BLT19	BLT11	U	U	(-0,628) U	U
BLT19	BLT12	U	FS	(0,238) U	—
BLT19	BLT13	U	U	(-0,237) U	U
BLT19	BLT14	U	U	(-0,626) U	U
BLT19	BLT15	U	U	(-0,265) U	U
BLT19	BLT16	U	U	(-0,417) U	U
BLT19	BLT17	PO	FS	(0,43) HS	—
BLT19	BLT18	PO	HS	(0,133) U	—
BLT20	BLT1	U	U	(-0,091) U	U
BLT20	BLT3	U	U	(0,286) FS	—
BLT20	BLT4	U	U	(-0,205) U	U

BLT20	BLT5	U	U	(-0,149) U	U
BLT20	BLT6	U	FS	(0,338) HS	—
BLT20	BLT7	U	FS	(0,41) HS	—
BLT20	BLT8	U	U	(-0,329) U	U
BLT20	BLT9	U	U	(0,046) U	U
BLT20	BLT10	U	U	(0,114) U	U
BLT20	BLT11	U	U	(0,23) U	U
BLT20	BLT12	U	U	(-0,64)	U
BLT20	BLT13	U	U	(-0,405)	U
BLT20	BLT14	U	U	(0,122) U	U
BLT20	BLT15	U	U	(-0,544) U	U
BLT20	BLT16	U	FS	(0,361) HS	—
BLT20	BLT17	U	U	(-0,481) U	U
BLT20	BLT18	U	U	(0,003) U	U
BLT20	BLT19	U	U	(-0,572) U	U
BLT21	BLT1	U	U	(-0,112) U	U
BLT21	BLT3	U	PO	(0,591) FS	—
BLT21	BLT4	U	U	(-0,521) U	U
BLT21	BLT5	U	U	(0,083) U	U
BLT21	BLT6	U	U	(0,285) HS	—
BLT21	BLT7	U (Sobrino-Tio)	U	(0,055) U	U
BLT21	BLT8	U (primos)	U	(-0,394) U	U
BLT21	BLT9	U (primos)	U	(-0,196) U	U
BLT21	BLT10	U	HS	(0,34) HS	—
BLT21	BLT11	U	U	(-0,371) U	U
BLT21	BLT12	U	U	(-0,478) U	U
BLT21	BLT13	U (primos)	U	(-0,573) U	U
BLT21	BLT14	U	U	(0,254) HS	—
BLT21	BLT15	U	U	(-0,619) U	U
BLT21	BLT16	PO	U	(0,112) U	—
BLT21	BLT17	FS	FS	(0,056) U	—
BLT21	BLT18	FS	U	(0,121) U	—
BLT21	BLT19	PO	HS	(-0,06) U	—
BLT21	BLT20	U	U	(-0,218) U	U

En total fueron analizados 190 pares de individuos por lo que fue posible definir el parentesco de 133 pares (70%), de los cuales 127 fueron clasificados como no relacionados, 3 como padre e hijo y 3 como hermanos completos. Los pares de individuos restantes no tuvieron relación de parentesco definida, puesto que no hubo concordancia entre los métodos utilizados en este trabajo.

Dentro de las clases de métodos utilizados que no coinciden, el mayor porcentaje (38.6%) se explica por la coincidencia entre el valor  $r$  y la categoría mostrada por el programa ML- Relate (FS, HS), pero no concuerdan con lo reportado en el registro genealógico de la especie (*studybook*) (U). El 15.8% se explica por la coincidencia entre los datos reportados en la genealogía y el coeficiente  $r$ . El valor de parentesco genético medio observado dentro de los individuos (-0,065) fue considerado congruente con lo esperado para la categoría no relacionados.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Amplificación de *loci* homólogos

En este trabajo se encontró que la población del mico-león-negro es polimórfica (más de dos alelos) para 8 de los 10 cebadores específicos estudiados, resultando en un éxito de amplificación del 80%. Aunque los trabajos genéticos sobre el género y/o la especie son escasos, se observa que en primates del género *Leontopithecus*, las tasas de éxito de amplificación son proporcionales a las encontradas en este trabajo, por ejemplo, Pérez *et al.*, 2005, encontró un éxito del 60% en la amplificación de 15 *loci* microsatélites.

La amplificación homologa fue realizada partiendo de *loci* desarrollados específicamente para el mico león negro. El éxito de la amplificación fue favorecida disminuyendo la temperatura de anillamiento propuesta anteriormente por Perez *et al.*, 2005, para algunos de los *cebadores* utilizados (15C85, 3C20, 21C75, 30C73). Para estos *cebadores*, fue observada una mayor probabilidad de amplificación en las pruebas en donde se ensayó una menor temperatura de anillamiento. Según Primmer, *et al.*, 2005, como mutaciones en las regiones flaqueantes de microsatélites son frecuentes, la disminución de la temperatura de anillamiento favorece una ligación más inespecífica de los oligonucleótidos, tornado la amplificación exitosa.

Para los demás sistemas, las temperaturas de anillamiento fueron altas (58°C-60°C), lo que permite deducir que las regiones flanqueadoras de estos sistemas están bastante conservadas en *L. chrysopygus*.

Lo anterior es de suma importancia puesto estas regiones al ser conservadas permiten la amplificación cruzada, es decir ser usados en especies relacionadas, como en el trabajo de Martins *et al.*, 2010, quienes testaron seis de los diez sistemas usados en este trabajo, pero en la especie *Leontopithecus caissara*.

Existen algunas limitaciones cuando se utilizan microsatélites para estudios poblacionales, algunas de ellas están relacionadas con factores como por ejemplo errores en la genotipificación. Esos tipos de errores según Wandeler *et al.*, 2003, pueden ser causados debido a la baja concentración de DNA en las muestras. Así mismo pueden ser el resultado de la no amplificación de un alelo o de la amplificación preferencial de alelos menores (alelos *dropout*) (Wattier *et al.*, 1998; Miller y Waits, 2003).

Otro de los problemas encontrados en el uso de microsatélites es el surgimiento *stuttering*, que se refiere al deslizamiento de la DNA polimerasa durante la amplificación, generando un producto de tamaño diferente al esperado (productos secundarios), el cual tiene unidades repetidas menores a 14 pb con respecto a la longitud del alelo original. Según Shinde *et al.*, 2003, el deslizamiento puede ocurrir ya sea en el sitio activo de la enzima o antes de que el sustrato se una a la enzima, además de ser más común en *loci* dinucleótidos, en los cuales estas bandas a veces pueden ser igualmente intensas que las bandas primarias, haciendo difícil la precisión de la caracterización de los genotipos tanto homocigotos como heterocigotos.

El surgimiento de alelos nulos también es otro problema encontrado. Al utilizar este tipo de marcadores, la presencia de alelos nulos se debe generalmente a mutaciones en las secuencias que flanquean la región microsatélite, las cuales sirven como sitio de unión a los *cebadores* diseñados para producir la amplificación por PCR.

De esta forma, un genotipo heterocigoto puede ser registrado erróneamente como un individuo homocigoto al no amplificar uno de sus dos alelos (Shaw *et al.*, 1999; Dakin; Avise, 2004). Así mismo el surgimiento de alelos nulos, podría ser explicada por la amplificación diferencial de alelos de distinto tamaño (Wattier *et al.*, 2004). En conjunto, este tipo de errores causa observaciones falsas sobre deficiencias de heterocigotos en la población y por lo tanto desequilibrio Hardy-Weinberg.

Estudios con microsatélites en otras especie o con problemas de conservación biológica (Harper *et al.*, 2003; Keyghobadi *et al.*, 2005) han relacionado la deficiencia de heterocigotos con la presencia de alelos nulos más que con la posibilidad de altos niveles de endogamia, selección en contra de los heterocigotos, apareamiento selectivo o efectos asociados a la diferenciación entre poblaciones.

Por otra parte, la exclusión de este tipo de alelos puede ser impráctica cuando se analiza parentesco, puesto que cuando se tiene un gran número de padres, el número de *loci* necesario para excluirllos incrementa y bajo la exclusión estricta o la presencia de alelos nulos, un solo error al comparar los alelos puede conllevar a la eliminación errónea de animales como posibles progenitores, o errores en la asignación del grado de parentesco entre individuo (Tapia, 2010).

Cabe resaltar que el DNA obtenido de folículos pilosos o heces plantea una sospecha de errores de genotificación, pues como fue anteriormente dicho estas muestras contienen baja concentración y son degradadas. Sin embargo, muestras de sangre como las empleadas para este estudio, la cuales son derivadas de células precursoras hematopoyéticas podrían aumentar esta suposición, puesto

que en *Callitricidos* se puede observar *quimerismo* que potencialmente hace algunos homocigotos parecer tener genotipos heterocigotos (Signer *et al.*, 2000; Martins, *et al.*, 2011).

Quimerismo genético es la mezcla de dos o más linajes genómicos dentro de un individuo, es poco común en los mamíferos, pero es frecuente en los tejidos hematopoyéticos de los titíes y otros primates de la familia *Callitrichidae* (Ross, *et al.*, 2007) . En este estudio, sin embargo no se detectaron locus exhibiendo tres o más alelos para un solo individuo heterocigoto. Según Martins, *et al.*, 2011, si hubiera un pool quimérico de células incluido en el análisis, es de esperar un exceso de heterocigotos con respecto a los heterocigotos esperados, pero que no se observó para los *loci* analizados. Por consiguiente, se concluye que el *quimerismo* no afectó la evaluación y por lo tanto todos los *loci* fueron incluidos en el estudio.

Los *loci* Leon2, 21c75, y 3c20 en la población del Zoológico de São Carlos y los *loci* Leon2, 21c75, 3c20, 31c97 y 35c42 en la población del Zoológico de São Paulo, como se muestra en la tabla 5 presentan una deficiencia de heterocigotos. Algunos autores apuntan esa deficiencia a la aparición de alelos nulos, fallas en la genotificación, efecto *Wahlund*, endogamia o errores muestrales. En el caso de este estudio, la endogamia parece ser el uno de los principales problemas a corto plazo, puesto que en estas poblaciones el número efectivo es reducido lo que puede tornarlas más susceptibles a los efectos deletéreos de homocigosis de alelos raros (que tienen una mayor probabilidad de consanguinidad) y deriva genética (Frankhan, 2003, tomado de Daltoé Paula). El surgimiento de endogamia podrá tornarse una preocupación relevante para las dos poblaciones estudiadas en este trabajo, puesto que la mayoría de los individuos fueron capturados de la misma área y llevados a estos recintos en donde su reproducción fue direccionada.

Sin embargo la pérdida de variabilidad también puede ser el resultado de una subestructura genética críptica, conocida como efecto *Wahlund*; este fenómeno se produce cuando dentro de una población existen subpoblaciones aisladas genéticamente (individuos dentro de cada zoológico) que posiblemente tienen un origen común, pero cuyas frecuencias alélicas difieren debido a la deriva genética al azar (Robertson y Hill, 1984; Castric *et al.*, 2002, tomado de Santacruz *et al.*, 2013). Es posible que en este caso se estén presentando las dos situaciones, en el sentido que la relación de la subestructura con la endogamia puede interpretarse tomando cada subpoblación como una familia extendida o un conjunto de pedigríes interconectados (Hartl & Clark, 1997, tomado de Santracruz *et al.*, 2013).

## 6.2 Variabilidad Genética

Los resultados reportados en este estudio indican que la diversidad genética de las poblaciones en cautiverio del mico león negro ha sido reducida. Esa disminución en la diversidad genética ha venido siendo observada en algunos trabajos con aloenzimas (Forman et al., 1986) y el DNA mitocondrial (Seuáñez et al., 2002) en el género *Leontopithecus*. Según estos datos, una baja diversidad genética es un rasgo compartido por la familia *Callitrichidae*. Según Martins, et al., 2011, para los datos de microsatélites, las comparaciones entre poblaciones deben idealmente realizarse con la riqueza alélica y, no con respecto a la heterocigocidad esperada puesto que esta última es sensible al tamaño de la muestra. Sin embargo la riqueza alélica rara vez es reportada en la literatura para estudios genéticos.

En este sentido algunas investigaciones, se basan en el número medio de alelos por locus, así Gravitol et al., 2001 encuentra un número medio de alelos por locus de 2.0 y 3.8 en cuatro poblaciones de *Leontopithecus rosalia*; Martins y colaboradores (2010) encuentran un número medio de 2.56 y 2.67 en dos poblaciones de *Leontopithecus caissara*. Neivergelt y colaboradores (2000) observan un número medio de alelos igual a 3,09 para *Callithrix jacchus*, y este trabajo reporta un número medio de alelos por locus de 2,2 y 2.7 en dos poblaciones estudiadas.

El número medio de alelos por locus y la heterocigocidad media observada disminuyen a medida que disminuye el tamaño de la población, los alelos privados estuvieron presentes en las dos poblaciones (Figura 12) y tres alelos se fijaron en la población de Parque ecológico de São Carlos y dos en la población del Zoológico de São Paulo. El patrón alélico de las dos poblaciones como indicado en la figura 12, confirma que ambas son bastante similares.

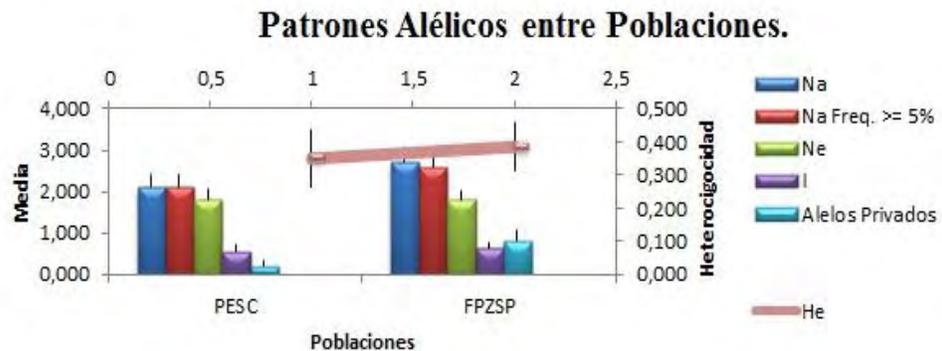


Figura 12. La figura muestra el patrón alélico de las dos poblaciones. Na: Número de alelos. Ne: Número efectivo de alelos. I: Índice de Shannon. Número de alelos privados.

Fueron observados de dos a cuatro alelos en los siete *loci* polimórficos de la Población del PESC, así como en los ocho *loci* polimórficos de la FPZSP. Además, una diversidad media de 0,5 y 0,482 respectivamente. Las poblaciones en cautiverio del mico león negro muestran una variación mucho mayor en relación a los datos observados en el trabajo usando aloenzimas desarrollado por Forman y colaboradores (1986), quienes estudiando 47 *loci* encontró una diversidad de 0,003. Perez y colaboradores (2005), encuentran un número de alelos de 2 a 6 en 9 *loci* polimórficos y una diversidad media de 0,295 para una población del mico león negro menor que la encontrada en este estudio. Lo anterior demuestra que con la cantidad de adultos empleados para el establecimiento de la población en cautiverio, se está representando una parte importante de variabilidad en términos de heterocigocidad que se encuentra presentes en las poblaciones naturales.

Aunque en este trabajo no se tiene conocimiento de los fundadores, Hedrick, 2005 afirma que con un número de fundadores entre 20 y 30 individuos se está capturando el 98% de la heterocigocidad. Sin embargo no sucede lo mismo con la riqueza alélica pues para capturar una gran parte de esta se requiere un número de fundadores mucho mayor.

Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho y, los valores de riqueza alélica y heterocigocidad esperada de la población en cautiverio del mico león negro en comparación con otras especies del género *Leontopithecus*, se podría decir que hay una baja representación en términos de alelos y heterocigocidad de la población silvestre. La baja diversidad genética mostrada por los *Callitricidos* ha llamado la atención de los investigadores. Pope, 1996 sugiere que esta baja diversidad tiene sus raíces en el sistema social, que incluye la supresión reproductiva de la hembra dominante. La reproducción se limita normalmente a una y, ocasionalmente, dos hembras por grupo (Goldizen, 1990; Dietz *et al.*, 1996). Además, los machos dominantes de la familia *Callitrichidae* engendran la mayoría de las crías nacidas en su grupo (Nievergelt *et al.*, 2000; Faulkes *et al.*, 2003; Huck *et al.*, 2005). Así mismo, algunos estudios *in situ* demuestran que el comportamiento agresivo por parte de los individuos dominantes limita el acceso de individuos del mismo sexo subordinados al sexo opuesto para el apareamiento (Abbott *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1993).

Para la población del Zoológico de São Paulo, se encontró una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para dos de los *locus* estudiados. El *locus* 3c20 presenta un déficit de heterocigotos, y el *locus* 11c72 presenta un exceso de heterocigotos. Uno de los factores que podría estar causando este desequilibrio es la presencia de alelos nulos. Sin embargo, al determinar si la presencia de alelos nulos era la responsable de la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg por exceso de homocigotos, se encontró que la frecuencia de alelos nulos es baja y no es la principal responsable de las diferencias entre las heterocigocidades observadas y esperadas pues estas cambian muy poco al considerar el alelo nulo

(Anexo 2). Si el alelo nulo fuera el responsable de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, las heterocigosidades observadas y esperadas calculadas con el alelo nulo serían muy similares y ya no habría desviación del equilibrio ( Cuervo, 2010).

Por lo tanto el exceso de homocigotos podría estar reflejando que en las poblaciones silvestres hay una condición de homocigosidad debido a la ausencia de un muestreo estructurado en el cual fueron escogidos individuos al azar con diversos orígenes para el establecimiento de las poblaciones en cautiverio (Cuervo, 2010). Es poco probable que al realizar un muestreo se colecten en su mayoría genotipos homocigotos a menos que estén con una frecuencia alta.

En este sentido lo más probable es que la deficiencia de heterocigotos se deba a un reflejo de endogamia en la población natural. Según Cuervo, 2010, para las poblaciones en cautiverio, si no hay una contribución de todos los individuos en la siguientes generaciones pueden darse pérdidas significativas en la diversidad genética entre las generaciones, siendo más común la forma de detectar esto en los cambios de la riqueza alélica que en la heterocigosidad, ya que la primera es más sensible a las diferencias en el éxito reproductivo.

Para poder afirmar lo anterior, sería útil la inclusión de más *loci* polimórficos junto con el estudio de poblaciones silvestres con el objetivo de determinar cuanta variabilidad se encuentra representada en la población en cautiverio, ya que como se aprecia con la presencia de algunos alelos en la población del zoológico de São Carlos que no se encuentran en la población del zoológico de São Paulo, en las poblaciones silvestres puede haber nuevas fuentes de riqueza alélica.

Aunque la variabilidad genética en términos de heterocigosidad esperada y riqueza alélica en las dos poblaciones, no presentó diferencias estadísticamente significativas, se debe tener en cuenta que sí se dio una pérdida de variabilidad detectada por la ausencia de los alelos 268, 292 y 298; 288; 294 y 340; 210; 219 en los sistemas 15c85, 21c75, 31c97, 30c73 y 35c42 respectivamente. Estos alelos se encuentran entre los que presentan frecuencias igual a cero, y son estos alelos los que por deriva se han perdido (Hedrick, 2005).

Si bien no se observó diferencias significativas con respecto a la riqueza alélica, se observó que hay pérdida y fijación de algunos alelos, por deriva genética. Lo anterior nos da una idea de que en las poblaciones en cautiverio la contribución de cada individuo a la siguiente generación es vital, lo que sugiere que al no existir un manejo genético adecuado de estas poblaciones en cautiverio, a medida aumenta el número de generaciones puede darse pérdida o fijación de alelos, ocasionando la diferenciación respecto a la población silvestre y por lo tanto se presentarán consecuencias perjudiciales para los individuos en el momento del repoblamiento pues su potencial evolutivo se verá afectado; además, en dado caso que se

presentaran cruces con individuos silvestres, se podría dar depresión por exogamia (Cuervo, 2010).

Así mismo aunque los resultados obtenidos nos dan un indicio que los individuos fundadores provinieron de la misma población silvestre, es vital realizar estudios de las éstas poblaciones con el fin de determinar el origen de las poblaciones en cautiverio y así evitar la reproducción de individuos de poblaciones estructuradas que puede llevar a una depresión exogámica o a un repoblamiento en el sitio incorrecto, lo que podría generar dificultades en la sobrevivencia de los individuos al realizar reintroducción al hábitat natural (Cuervo, 2010).

### 6.3 Estructura Poblacional

El patrón de distribución alélica y el resultado del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mostraron que la mayor proporción de la diversidad está distribuida dentro de las poblaciones y no entre ellas. Este resultado es confirmando por el valor del índice  $F_{ST}$  que indica baja diferenciación genética entre las poblaciones ( $-0.0387$ ,  $p < 0,05$ ). Ese bajo nivel de diferenciación entre las poblaciones estudiadas nos hace inferir que éstas no presentan estructuración genética. Sin embargo es posible haya subpoblaciones mezcladas que no han sido identificadas. En este caso existe una dificultad en conocer la estructura reproductiva de una población, que puede incluir varias unidades reproductivas o subpoblaciones. Así, aunque cada subpoblación este en EHW, las frecuencias genotípicas de la población total pueden desviarse de las proporciones esperadas. Lo anterior es conocido como efecto Wahlund (Rodrigues de Moraes y Vitral, 2002).

A partir de esos resultados se concluye que no existe estructuración espacial (recintos muestreados) entre las subpoblaciones de *L.chysopygus*, lo que sugiere la presencia de un único pool genético. Ese nivel bajo de diferenciación entre las poblaciones revela que no están fuertemente estructuradas genéticamente probablemente debido a un intenso flujo genético reciente o a un pasado común.

El número de migrantes (1.0879) en relación al número de alelos privados, apunta en la misma dirección, puesto que en teoría, la migración de un único individuo por generación es suficiente para proporcionar una homogenización entre poblaciones distintas geográficamente (Hartl y Clark, 1989). Ese patrón más homogéneo de los dos recintos estudiados está de acuerdo con lo esperado por la dinámica metapoblacional, que predice baja diferenciación genética entre las poblaciones de los dos recintos reproductivos. Estudios incluyendo un número mayor de poblaciones y un número mayor de *loci* podrán confirmar este patrón (Silos 2011)

Para autores como Martins, *et al.*, 2011 aunque el porcentaje de varianza molecular es relativamente pequeño (3%), se podría sugerir que hay una estructuración a escala fina probablemente producto del sistema de apareamiento. La mayor diferencia significativa evidenciada por la AMOVA (97% de la varianza total) se registró dentro del grupo. Obtener pruebas de una diferencia en este nivel jerárquico es difícil de obtener. Quizás dispersores procedentes de diferentes grupos como fundadores de nuevos grupos o cópulas adicionales de grupo durante los encuentros con otro grupo son la causa de tal estructura fina dentro de los grupos, a pesar del efecto de homogenización impuesto por los métodos reproductivos de algunos criadores (Martins, *et al.*, 2011).

Sería de gran interés disponer de resultados de los métodos de *agrupación* los cuales mejorarían y explicarían de manera adecuada la estructuración a escala fina revelado por AMOVA. El hecho que los métodos de agrupación han sido ampliamente utilizados como complemento del enfoque clásico de Wright no debe interpretarse como una garantía de exactitud. Puesto que Martins *et al.*, 2011 a pesar de utilizar dos métodos de agrupación, no determinaron con exactitud que grupos de micos leones eran más similares genéticamente.

#### 8.4 Parentesco Genético

El uso de herramientas moleculares para estudios de parentesco, ha sido importante para desarrollar investigaciones sobre evolución y ecología comportamental de organismos, evidenciando aspectos aún sin resolver de la biología reproductiva y la historia natural de las especies (Avise, 2004).

La determinación de parentesco por medio de microsatélites en los últimos años ha sido muy utilizado en especies silvestres y en cautiverio, puesto que los elevados índices de confiabilidad permiten el uso de estos marcadores en estudios de paternidad en primates no humanos con un 99% de confiabilidad (Rodríguez, 2004).

La probabilidad mínima que dos individuos sean iguales en relación a sus genotipos multilocus ( $P$ ) fue de 40.000 individuos en la población de la Fundación Zoológico de São Paulo y de 20.000 en el Parque Ecológico de São Carlos. La probabilidad de excluir un falso padre, con el grupo de *loci* utilizados en este trabajo fue del 97%. En conjunto, esos valores muestran que los marcadores microsatélites utilizados en este estudio poseen poder para alcanzar los objetivos de este análisis y dar soporte y confianza en relación a los resultados de análisis de parentesco genético.

El valor de parentesco medio dentro del grupo mostro lo esperado para una muestra de individuos sin parentesco común, lo que podría llevar a descartar que

el sistema de reproducción es extra-par, pues los valores medios dentro del grupo se alejan de los valores esperados para medio hermanos (Silos, 2011).

Si bien el número total de pares de individuos para los cuales se estableció una clasificación final de relacionamiento genético correspondió al 70% del total de pares analizados, se puede concluir que para esos pares el diagnóstico fue confiable, puesto que el procedimiento utilizado con los diferentes métodos fue realizado con criterio. La dificultad se centró básicamente en el bajo tamaño poblacional que imposibilitó la clasificación basada en las frecuencias alélicas observadas en la población y la simulación de pares que permite determinar valores medios entre las tres clases relacionadas (FS, HS, UR) los cuales se aproximan más a las muestras poblacionales reales (Silos, 2010).

Del 70% de individuos para las cuales se estableció una clasificación final, el 95% de éstos, fueron diagnosticados como no relacionados, lo cual llevaría a pensar que la mayoría de estos individuos son potenciales para el diseño de cruces con el fin de reducir la endogamia y la pérdida de variabilidad genética, lo cual es probablemente la contribución más importante de la genética al manejo de poblaciones en cautiverio (Frankham *et al.*, 2002). Lo anterior debido a que para realizar este manejo, el procedimiento más usado es cruzar individuos con la menor relación de parentesco en la población con lo que se evita la endogamia y se mantiene una variabilidad genética representativa (Frankham *et al.*, 2002). Por tanto según Haig 1998, en poblaciones pequeñas o en cautiverio donde la contribución de cada individuo a la diversidad futura es crítica, es esencial el conocimiento del parentesco.

Uno de los principales resultados del presente trabajo fue el de que las poblaciones de los dos recintos estudiadas no se encuentran estructuradas. Los bajos valores de parentesco genético identificados entre los individuos son indicativos que la mayoría de los individuos no son genéticamente relacionados. El parentesco medio entre los individuos no fue alto en la mayoría de pares analizados, como sería esperado en caso de grupos con algún nivel de estructuración genética (Miño, 2006).

La Habilidad de estimar relaciones genéticas entre pares de individuos de linaje desconocido en poblaciones naturales debe ser usada en dos áreas de conocimiento: el estudio de la evolución del comportamiento social que depende críticamente del conocimiento de la relación genética entre individuos (Qualler y Goodnight) y el control de programas de reintroducción en cautiverio para especies amenazadas a través de la reducción de los cruzamientos, que son frecuentes cuando datos sobre linajes son existentes (Haig *et al.* 1990; Hedrick y Miller, 1992).

## CONCLUSIONES.

- ✓ De los diez *loci* microsatélites homólogos empleados, 8 resultaron polimórficos (más de dos alelos), los cuales fueron eficaces para la evaluación de variabilidad genética y el análisis de parentesco de la población en cautiverio.
- ✓ La riqueza alélica y la heterocigocidad esperada son similares a las encontradas en otras especies del género *Leontopithecus*, lo que sugiere que la población *ex situ* de *L. chrysopygus* posee una variabilidad valiosa que le brinda un gran potencial genético, aunque el exceso de homocigotos encontrado en algunos individuos de la fundación zoológico de São Paulo podría estar reflejando un exceso de homocigotos en el medio silvestre y por lo tanto una posible endogamia.
- ✓ Aunque los resultados obtenidos indican que todos los individuos proceden de una misma población silvestre, sin embargo sería importante llevar a cabo el estudio de las poblaciones silvestres distribuidas actualmente en el bosque Atlántico Brasileño, para determinar el origen de la población en cautiverio y evitar el cruce de individuos de poblaciones estructuradas que pueda llevar a una depresión por exogamia o a un repoblamiento en el sitio incorrecto, lo que podría generar grandes dificultades en la sobrevivencia de los individuos al realizar la reintroducción al hábitat natural.
- ✓ Los datos proporcionados por marcadores nucleares neutros, como es el caso de microsatélite, no mostraron estructuración poblacional, así como tampoco diferenciación genética entre los dos recintos estudiados. La posible subestructuración encontrada en este estudio puede ser explicada por la existencia actual de intercambio de individuos entre los grupos reproductivos, o por la existencia de flujo genético pasado, los cuales contribuyeron a la homogenización genética de las poblaciones, no habiendo transcurrido desde entonces el tiempo suficiente para tornarlas dos poblaciones genéticamente diferentes.
- ✓ Fueron identificadas las categorías de relacionamiento de 70% de los pares de individuos analizados en este estudio. Se podría llegar a concluir que el sistema genético de apareamiento no es únicamente monógamo, pues el 2 % de los pares fueron diagnosticados como medio hermanos y 95% de ese 70% fueron clasificados como no teniendo ninguna relación de parentesco, llevando a inferir que hay copulas extra-par.

- ✓ Para determinar cuanta variabilidad genética de la población silvestre se encuentra representada en la población en cautiverio tanto en el momento de su establecimiento como en la última generación obtenida, sería muy útil realizar un estudio genético de la población silvestre inicialmente con el fin de verificar , qué proporción de variabilidad genética se encuentra representada en la población *ex situ* y así, determinar la posible estructura poblacional que pueda existir entre las poblaciones silvestres, ya que esta debe ser tenida en cuenta en la reproducción en cautiverio para evitar reproducir individuos provenientes de poblaciones muy estructuradas cuya progenie puede presentar reducción en el *fitness* debido a la depresión por exogamia.

Por último cabe resaltar que este trabajo es el primer estudio de genética de poblaciones y parentesco genético en poblaciones en cautiverio de *Leontoptihecus chrysopygus* y proporciona una base importante para ampliar y nortear futuras propuestas para su conservación y manejo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott D, Barrett J, George L. (1993). Comparative aspects of the social suppression of reproduction in female marmosets and tamarins. In *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology* (Rylands AB, ed.), pp 152–163. Oxford, Oxford University Press.
- Aliaga, P. (2004). Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachipomus* en la región del alto maderá (Amazonia Boliviana) para el análisis de polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (Epic-PCR). Tesis de grado para optar el título de Licenciatura en Biología.
- Allendorf, F. (1993.) Delay of Adaptation to Captive breeding by Equalizing Family Size. *Conserv. Biol.* 7(2):416-419
- Astorga, P. (2008). Estado Actual del uso de Marcadores Moleculares en moluscos Bivalvos de Importancia para la Acuicultura. Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile pp, 277-287.
- Avise, J. C. . (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd ed. Sunderland. 511p
- Baker A, Dietz J, Kleiman D (1993). Behavioral evidence of monopolization of paternity in multi-male groups of golden lion tamarins. *Animal Behaviour* 46: 1091–1103.
- Beaumont, M.A., Bruford, M.W. (1999) Microsatellites in Conservation Genetics. En: Goldstein DB, Schlotterer C, editors. *Microsatellites Evolution and Applications*. USA: Oxford University Press. p.165-182
- Blouin MS. (2003), DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18:503-511
- Botstein, D., White ,R.L., Skolnick, M. y DAVIS. O.W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. . *Am JHum Genet.*, 314-331.
- Braga, A. (2011). Estructura genética populacional de *Prochilodus costatus* Valenciennes 1850 (Characiformes, Prochilodontidae) no Alto São

- Francisco. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos , São Paulo, Brasil.
- Brasil. (20 de marzo de 2012). *Ministério do Meio Ambiente. Convenção sobre a Diversidade Biológica: Panorama da Biodiversidade Global. 3 ed. Brasília, MMA/SBF, 2010. 94 p.* Obtenido de <<http://www.cbd.int/doc/publications/gbo/gbo3-final-pt.pdf>>.: <<http://www.cbd.int/doc/publications/gbo/gbo3-final-pt.pdf>>.
- Brito, D. ( 2009). Análise De Viabilidade De Populações: Uma Ferramenta Para A Conservação Da Biodiversidade No Brasil. *Oecologia Brasiliensis* 13(3), 452-469
- Brookfield, J. F. Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. . *Molecular Ecology*, v. 5., 453-455.
- Brown LM, Ramey II RR, Tamburini B, Gavin TA. (2004.). Population structure and mitochondrial DNA variation in sedentary Neotropical birds isolated by forest fragmentation. *Conservation Genetics* , 5:743-757.
- Burgman, M. A., Ferson, S. and Akçakaya, H. R. (1993). Risk assessment in conservation biology. Chapman and Hall, London. 314p.
- Bustamante, D. y .Grez, A. (1995). Consecuencias ecológicas de la fragmentación de los bosques nativos. *Ambiente y Desarrollo Vol. XI N°2*, pp 58 -63 .
- Cabrero, J. y Camacho M. (2002). *Fundamentos de Genética de Poblaciones, en Evolución , La Base de la Biología. Manuel Soler.*
- Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP, Budowle B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. . *Annals of Human Genetics*, v. 56, 45-47.
- Chambers, GK., Macavoy, ES. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 126:455-476
- Chapin III, F.S.; Zavaleta, E.S.; Eviner, V.T.; Naylor, R.L.; Vitousek, P.M.; Reynolds,. (2000). Consequences of changing biodiversity. . *Nature.*, 405: 234-242.

- Chistiakov, DA., Hellemans, B., Volckaert FAM. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255,1-29
- Clegg, M. T., Kobayashi, M. y Lin J.-Z. . (1999). The use of molecular markers in the management and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.). *Chapingo Serie Horticultura* 5, 227-231.
- Coimbra-Filho, A. D. . (1978). Natural Shelter of *Leontopithecus rosalia* and Some Ecological Implications. In *Biology and Conservation of the Callitrichidae*. . *Smithsonian Institution* , 79-89.
- Coimbra-Filho, A. M. . (1973). Distribution and Ecology of the Genus *Leontopithecus* in Brazil. . *Primates*. Vol. 14 (1), 47-66.
- Cuervo, A. (2010). Caracterización genética de la población ex situ de *Crocodylus intermedius* (Graves, 1819) en Colombia mediante microsatélites. *Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Bogotá D.C., Colombia. Universidad Nacional de Colombia*,.
- Daltoé, I. (2006). Caracterização genética de *Alouatta caraya* (Primate, Atelidae) utilizando marcadores heterólogos do tipo microsatélites. Brasília: Disertação de Mestrado .Universidade de Brasília.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, v. 93, p. 504–509, 2004
- Dietz J, Souza S, Billerbeck R. (1996). Population dynamics of golden-headed lion tamarins *Leontopithecus chrysomelas* in UNA reserve, Brazil. *Dodo Journal of Wildlife Preservation Trusts* 32: 115–122.
- Eguiarte, L. Souza, V. y Aguirre, X. (2007). *Ecologia Molecular*. Mexico. 592 p.
- Eizirik, E. (1996). Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics* , 23-29.
- Escobar, P. . (2002). Análisis genético poblacional y sistemática molecular en cuatro especies de *Alouatta*. Bogotá, Colombia. . *Tesis Bach. Pontificia Universidad Javeriana*, 154 .

- Excoffier L., Smouse P.E. y Quattro J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. . *Genetics*, 131: 479-491.
- Faulkes CG, Arruda MF, Monteiro da Cruz MAO (2003). Matrilineal genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus* . *Molecular Ecology* 12: 1101–1108.
- Ferre, D.; Steinberg, E.R.; Albarracín, L.; Pedrosa, A.; Hynes, V.; Duarte, A.; Mudry, M.D.; Gorla, N. (2010). Utilización de Variables Citogenéticas y antropométricas para un eficiente manejo de primates neo tropicales en cautiverio. ISSN (on line) 1668.
- Ferreira, M. G. . (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia : 1ed. Brasilia:Embrapa-Cenargen pp220. Citado por Yañez, A. 2002.
- Fleagle, L. (1999). Primate Adaptation and Evolution. 2ª ed. San Diego Academic Press. pg. 11, 12. 581 p.
- Forman, L., Kleiman, D., Bush, M., Dietz, J., Bllou, J., Phillips, L., Coimbra-Filho, A. y Obrien, S. . (1986). Genetic Within and Among Lion Tamarins . *American Journal of Physical Anthropology* 71, 1-11.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press. 617 p.
- Frankham, R. (2003). Genetics and Conservation Biology. *Biologies* 326, S22-S29.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2008). *Fundamentos da Genética da Conservação*. 290 p. Ribeirão Preto, SP:: SBG. 412 p.
- Freeman S. y Herron C. (2002). *Análisis evolutivo*. Prentice Hall, 2ª edición. 720 p.
- Galetti, P. (2010-2013). Genética da Conservação em Espécies Chaves e Espécies Ameaçadas de Diferentes Grupos Animais. Brasil.
- Garcia, F., Marini, M.Â. (2006). Estudo comparativo entre as listas global, nacional e estadual de aves ameaçadas no Brasil. *Natureza e Conservação* v4, n.2, .24-49.
- Godoy, J. (2009). La genética, Los Marcadores Moleculares. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, pg.23 -28.

- Goldizen A (1990). A comparative perspective on the evolution of tamarin and marmoset social systems. *International Journal of Primatology* 11: 63–83.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal Heredity*. v, 86, 485-486.
- Goudet, J. (2008.). FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Grativol A, Ballou J, Fleischer R . (2001). Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetics.*, 2:1-4.
- Guidorizzi, C. (2008). Ecologia e comportamento do mico-leão-da-caradourada, *leontopithecus chrysomelas* (kuhl, 1820) (primates, callitrichidae), em um fragmento de floresta semidecidual em Itororó, Bahia, Brasil. *Dissertação de Mestrado.*, Universidad Estadual se Santa Cruz.
- Haig SM, Ballou JD, Derrickson SR. (1990). Management options for preserving genetic diversity: reintroduction on Guam rails to the wild. *Conserv Genet* 4, 290-300.
- Haig, S. M. . (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*. , 79(2):413-425.
- Harper, G.L., N. MacLean y D. Goulson (2003). Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Mol. Ecol.* 12:3349-3357.
- Hartl DL. y Clark AG. (1997). *Principles of Population Genetics*. Canada: Sinauer Associates, Inc. 3 ed. 652 p.
- Hedrick P, Miller PS. (1992). Conservation genetics:Techniques and fundamentals. *Ecol Appl* 2, 30-46.
- Hedrick P. (2005). *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc United States of America: 3 ed. 663 p.
- Hillis, D. M.; Moritz, C.; Mable, B.K. (eds). *Molecular Systematics*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 655 pp.

- Huck M, Löttker P, Böhle U-R, Heymann E. (2005). Paternity and kinship patterns in polyandrous moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *American Journal of Physical Anthropology* 127: 449–464.
- IUCN. (2011). IUCN Red List of Threatened Species. *IUCN Red List of Threatened Species*. . Obtenido de <www.iucnredlist.org>.
- Janzen, D. H. (1996). The eternal external threat. En: M.E Soulé (ed.). *Conservation Biology. The science of scarcity and diversity* ., 286-303.
- Jimenez, P. y Collada, C.( 2000). *Técnicas Para La Evaluacion de la Diversidad*.
- Joly, C.A. . (2007). Biodiversidade e Mudanças Climáticas: Contexto Evolutivo, Histórico e Político. . *Ambiente y Sociedad*, v. 10. n. 1., 169-172.
- Jordano, B. (2004). Utilidad y Aplicaciones de Técnicas Moleculares en Ecología y Conservación. Estación Biológica de Doñana, CSIC. Pabellón del Perú.
- Keyghobadi, N., J. Roland, and C. Strobeck (2005). Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Mol. Ecol.* 14:1897-1909.
- Kierulff, M.C.M., Rylands, A.B., Mendes. S.L. & de Oliveira, M.M. . (2008). *Primate Adaptation and Evolution*. San Diego Academic Press.pg. 11, 12. 2ª ed. 435p.
- Konovalov, D. A.; Heg, D. (2008). A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. . *Molecular Ecology Resources*, v. 8., 256-263. .
- Konovalov, D.A., Manning, C., Henshaw, M. T. . (2004). KINGROUP: a program for pedigree assignments using genetic markers. . *Molecular Ecology*, 779–782.
- Konstantin, V., Krutovskii y Neale, David. . (2001). *Forest Genomics for Conserving Adaptive Genetic Diversity*. pg. 1, 2 ,3. 27 p.
- Lacy, RC. (1988). A Report of Population Genetics in Conservation .*Conservation Biol.* 2(3):145-247.
- Landweber LF y Dobson AP. (1999). Genetics and the Extinction of species: DNA and the conservation of biodiversity. USA: Princeton University Press. 652p.

- Lawton, J.H.; May, R.M. . (1995). *Extinction rates*. Oxford, Reino Unido. Oxford University Press. 233 p.
- Loreau, M., Alfred Oteng-Yeboah, M. T. K. Arroyo, D. Babin, R. Barbault, M. Donoghue, M. Gadgil, C. Häuser, C. Heip, A. Larigauderie, K. Ma, G. Mace, H. A. Mooney, C. Perrings, P. Raven, J. Sarukhan, P. Schei, R. J. Scholes & R. T. Watson. (2006). Diversity without representation. *Nature*, v. 442, 245-246.
- Matioli, S.R. (2001) *Biologia Molecular e Evolução*. 12 ed., Ribeirão Preto: Holos Editora. 202 p.
- Markovchick-Nicholls, L.; Regan, H.M.; Deutschman, D.H., Widyanata, A.; Martin, B.;. (2008). Relationships between human disturbance and wildlife land use in urban habitat fragments. *Conservation Biology*, 22(1): 99-109.
- Martins M.M., Nascimento, A.T.A., Nali, C., Velastin, G.O. . (2011). Genetic Analysis Reveals Population Structuring and a Bottleneck in the Black-Faced Lion Tamarin (*Leontopithecus caissara*). *Folia Primatol* , 82:197–211.
- Martins, M., and Galetti P. (2010). Informative microsatellites for genetic population studies of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*). *Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print*.
- Méndez, J. A. Aranguren, Bravo, R. Román, Isea, W., Villasmil, Y. y Jordana, J. (2004). Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs. A review. .
- Miller, C. R.; Waits, L. P. . (2003). The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 4334–4339.
- Miño, C. I.; Del Lama, S. N. (2009). Sistemas de acasalamento e biologia reprodutiva em aves aquáticas neotropicais. . *Oecologia Brasiliensis* v.13, 141-152.
- Monteiro, P. K. (2006). Estimativas Populacionais Para Espécies Raras: O Mico-Leão-Preto *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) COMO MODELO. *Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná*

*comorequisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Conservação. Paraná , Curitiba, Brasil.*

- Morales, A. (2004). *Variabilidad genética del mono tití (Saimiri oerstedii) en Costa Rica: Implicaciones para su Conservación*. Costa Rica: Informe de Práctica de Especialidad para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.
- Moura, M. y Galetti, P. (2010). Informative Microsatellites for Genetic Population Studies of Black-Faced Lion. *Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print*.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., da Fonseca, G. y Kent, J. . (2000). Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature*, 853-858.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., da Fonseca, G. y Kent, J. (2000). Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature*,, 853-858.
- Nageswara R., Soneji J.R., Chen C., Choi Y.A.,Huang S. y Gmitter F.G. . (2007). Identification of Zygotic and Nuclear Seedlings from Citrus Rootstock Candidates Using RAPD. *Acta Hort* , 738:255-260.
- Nievergelt C, Digby L, Ramakrishnan U, Woodruff D. (2000). Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. . *International Journal of Primatology* , 21:1-20.
- Oosterterhout, C. V.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M.; Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3., 535-538, 2004.
- Passos, D. (1992). Hábito Alimentar do Mico Leão Preto *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) (Chalithicidae, Primates) na Estação Ecologia dos Caetetus, Município de Gália, SP. Dissertação Apresentada a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), para ), para obtenção do grau de Mestre em Ecologia.
- Passos, F. de C. y C. J. R. Alho. (2001). Importância de diferentes microhabitats no comportamento de forrageio por *Leontopithecus chrysopygus*,(Mikan) (Mammalia, Callitrichidae). *Revta. Brasil. Zoo*, 18(supl. 1): 335-342.

- Peakall, R.; Smouse, P. E. . (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population Genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. v,6. n,1., 288-295.
- Perez, S., Valladares, P., Burrell S., Di Flore, A., Satkoski, J., Van Coeverden de Groot P., Boag. P. y Melnick ,J. (2005). Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). *Molecular Ecology Notes*.
- Philip W. Hedrick . (2005). *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc.3 ed. United States of America. 663 p.
- Pissinatti, L. P. (2008). *Ocorrência de Acanthocephala em Leontopithecus (Lesson, 1840), cativos: Aspectos Clínicopatológicos. Callitrichidae-Primates*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.6, p.1473-1477.
- Pope T. (1996). Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. In *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (Awise J, Hamrick J, eds.), p .119–159. London, Chapman & Hall.
- Precópio, O., Daudt, G., Ruiz, M. . (2008). *Conservação do mico-leão-dourado .Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada*. ISBN : 978-85-89479-11-0.
- Primack, R., Rozzi, R., Feinsinger, P., Dirzo, R. y Massardo, F. (2001). *Fundamentos de Conservacion Biológica, Perspectivas Latinoamericanas*. Mexico.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E. (2001). *Biologia da Conservação. Londrina: Ed. Efracim*. 328 p.
- Primmer,C.R., Jodie N. Painter, Mikko T. Koskinen, Jukka U. Palo and Juha Merila. . (2005). Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, v. 36., 348-360. .
- Queller, D.C.; Goodnight, K. F. . (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 49. , 1280-1283.
- Ribeiro, M.C.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F. J.; Hirota, M.M. . (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. . *Biological Conservation*., 142(6): 1141–1153.

- Rich A, Nordheim A, Wang AH. . ((s.f.)). The Chemistry and Biology of Left-Handed Z-DNA. *Biochem* 1984;53:791-846, 1984;53:791-846.
- Rocha, M. y Gasca, J. En Eguiarte, L., Souza,V. y Aguirre X. . (2007). Ecología molecular de la conservación. 251-278. 573 p.
- Rodríguez, J B., Jane C. Wheeler, Ciara S. Dodd, Michael W. Bruford y Raúl Rosadio A. (2004). Determinación de parentesco en alpacas (vicugna pacos) por medio del análisis de adn microsatélite. *Rev Inv Vet Perú* , 15 (2) 113-119.
- Rodrigues de Moraes, P. y Vitral, M. (2002) Estrutura genética de Populações Naturais de *Cryptocarya aschersoniana* mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos *Biota Neotropica* v2 (n2).
- Ross,C.N., Jeffrey E. Fite, Heather Jensen,and Jeffrey A. French. (2007). Demographic Review of a Captive Colony of Callitrichids (*Callitrix kuhlii*). . *Amer J Primatol* 69, 234-240.
- Ruokonen M, Andersson AC, Tegelström H. (2007). Using historical captive stocks in conservation. The case of the Lesser white-fronted goose. *Conserv. Genet.* 8:197-207
- Russello, Ma. y Amato, G. (2004). Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13:2829-2840.
- Saddy, M. (2003). *Conservação do Mico Leão Preto (Leontopithecus chrysopygus): Três tipos de Manejo Avaliados Através da Ecologia e Comportamento*. Brasil: Dissertação de Doutorado. Universidad Estadual de Campinas.
- Sambrook, J.,Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* .Segunda Edicion . New York: Cold Spring Harbor Press.
- Santos, F.S. (2 de marzo de 2012). *A Importância da Biodiversidade*. *Revista Paidéi@, Unimes Virtual*, v. 2, n. 4, dez. 2010. . Obtenido de <<http://revistapaideia.unimesvirtual.com.br>>.
- Santos, R., Lacerda, R., Redondo, R., Nascimento, A., Chartone-Souza, E, Borda, E., Ribeiro,R., Lovato, M. (2009). *Diversidade Genética*, em Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais Subsídio ao Programa BIOTA MINAS. pp 390-410.

- Santacruz, D. Burbano, M., Usaquen, W. (2013.) Marcadores Moleculares en la Acuicultura: Presentación de un caso *Prochilodus magdalenae* en la cuenca del río Sinú. Universidad Nacional de Colombia.
- Schneider, H. . (2000). The Current Status of the Newworld Monkey Phylogeny. . *Rio de Janeiro, Brasil: Anais da Academia Brasileira de Ciências jun; año/vol.72, número 002.*
- Schuelke, M. ( feb. 2000.). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech*, v. 18, p. 233-234.
- Selkoe, A. y Toonen, R.J. . (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629.
- Seuáñez H, Di Fiore A, Moreira M, Almeida C, Canavez F . (2002). Genetics and evolution of lion tamarins. . *In Lion Tamarins: Biology and Conservation (Kleiman D, Rylands AB, eds.)*, 117-132.
- Shaw, P. W., Pierce E, G. J.; Boyle, P. R. (1999.). Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, v. 8., 407–417. .
- Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasilielihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Research*, v. 31., 974–980.
- Signer EN, Anzenberger G, Jeffreys AJ . (2000). Chimaeric and constitutive DNA fingerprints in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Primates* , 41: 49–61.
- Silos, M. (2011). Caracterização Genética Ppopulacional e Parentesco en Tapicuro, Plegadis Chichi (VIEILLOT, 1817) (Threskionithidae), do rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de de Pós-Graduação em Genética e Evolução.*
- Slatkin M. (1995). A measure of Population Subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139:457-162.
- Sunnucks P. (2000). Efficient Genetic Markers for Population Biology. *Tree* 15(5):199-203.

- Tapia, A. (2010). Determinación de paternidad y relaciones genéticas en camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) usando microsatélites. Universidad Autónoma de México.
- Taberlet, P. Waits, L.P. y Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 323–327.
- Templenton, A.R. . (2011). *Genética de populações e teoria microevolutiva*. 705 p. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética-SBG.
- Torres, P. (2010.). Caracterização da Diversidade Genética, sa Estrutura Populacional e do Parestenco De Arara Azul-Grande (*Anodorhynchus Hyacinthinus*) Por Medio De Análise De Regiões Dos Genomas Nuclear e Metocondrial. Sao Paulo, Brasil: Tese Apresentada Tese Apresentada para a obtenção do Título de Doutora en Ciencia, na área de Biologia/Genetica. Universidad de Sao Paulo.
- Valadez, E. y Kahl, G. . (2000). Huellas de ADN en Genomas de Plantas. *Mundi-Prensa*.
- Valdes, I. y Rodríguez N. (2008). Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales.
- Velasco, R. (2005). Molecular markers and the DNA extraction. *Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol 3 No.1*.
- Vié, J.c.; Hilton-Taylor, C.; Stuart, SN. (2009). Wildlife in a Changing World – An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened. IUCN, Gland, Switzerland. 184.
- Villamón, F. . (2000). *Caracterización de microsatelites de Solanum tuberosum Subsp tuberosun y en las otras de especies de papa cultivada*. . Lima-Perú: Tesis para optar el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.
- Wagner, A. P., Creel, S.; Kalinowski, S. T. (2006). Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, v. 97, n. 5., 336-345. .
- Wandeler P, Smith S, Morin PA, Pettifor RA, Funk SM. (2003). Patterns of nuclear DNA degeneration over time - a case study in historic teeth. *Molecular Ecology*, v. 12., 1087–1093.

- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P. y Valero, M. . (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* v,7., 1569-1573.
- Wright, S. T. (1965). The Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. . *Evolution*. v, 9. n, 3., 395-420.
- Wright. (1931). *Evolution in Mendelian Populations*.
- Wright, S. . (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, 323-354.
- Yañez, A. (2002). *Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsatélites a partir de la Construcción de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (Ipomoea batatas)* . Tesis para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Genética.

## ANEXOS

### Anexo A. Frecuencias Álicas por Población.

<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>PESC</b>	<b>FPZSP</b>
León 2	213	0,250	0,125
	223	0,250	0,156
	225	0,500	0,563
	228	0,000	0,156
15C85	268	0,125	0,000
	288	0,875	0,813
	292	0,000	0,094
	298	0,000	0,094
21C75	284	0,250	0,067
	288	0,000	0,200
	296	0,250	0,167
	298	0,500	0,567
3C20	314	0,750	0,563
31C97	316	0,250	0,438
	294	0,000	0,033
	330	0,625	0,633
30C73	340	0,000	0,167
	342	0,375	0,167
	210	0,125	0,000
	278	0,375	0,531
35c42	284	0,125	0,063
	286	0,375	0,406
	219	0,000	0,063
	221	1,000	0,875
11c72	225	0,000	0,063
	307	0,500	0,500
	323	0,500	0,500
26c10	268	1,000	1,000
27c13	213	1,000	1,000

Anexo B. Comparación entre las Heterocigosidades observadas ( $H_o$ ) y esperadas ( $H_e$ ) sin considerar el alelo nulo y considerando el alelo nulo ( $H_o(n)$ ) y ( $H_e(n)$ ).

<b>Locus</b>	<b>FPZSP</b>				<b>PESC</b>			
	$H_o$	$H_o(n)$	$H_e$	$H_e(n)$	$H_o$	$H_o(n)$	$H_e$	$H_e(n)$
<b>Leon 2</b>	0,500	0,5000	0,619	0,6191	0,500	0,5000	0,625	0,6250
<b>15C85</b>	0,375	0,3750	0,322	0,3223	0,250	0,2500	0,219	0,2188
<b>21C75</b>	0,467	0,4667	0,607	0,6067	0,500	0,5000	0,625	0,6250
<b>31C97</b>	0,533	0,5333	0,542	0,5422	0,750	0,7500	0,469	0,4688
<b>30C73</b>	0,563	0,5625	0,549	0,5488	1,000	1,0000	0,688	0,6875
<b>35c42</b>	0,125	0,1250	0,227	0,2266	0,000	0,0000	0,000	0,0000

Anexo C. Descripción detallada del protocolo de extracción usado en este trabajo.

Inicialmente se tomaron 100 micro-litros ( $\mu\text{L}$ ) de sangre, a los cuales se adicionaron 300 $\mu\text{L}$  de una solución de digestión que contiene: 25  $\mu\text{L}$  de SDS al 10%, 5  $\mu\text{L}$  de RNase 0,1 mg/mL, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1M, 2,5  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0.01 M y finalmente 322,5  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura (mili-Q). Las muestras fueron incubadas por aproximadamente 2 hora a 55° C. Una vez culminado este periodo de tiempo fueron adicionados 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (0,1mg/mL) y las muestras nuevamente se incubaron por 24 horas a 56° C.

Se adicionó aproximadamente 400 micro-litros ( $\mu\text{L}$ ) de fenol clorofórmico/alcohol isoamílico y se agitó suavemente por 10 minutos. Seguido de la agitación, las muestras fueron centrifugadas a 14.000 revoluciones por minuto (r.p.m) por 15 minutos, recuperando después de este paso, el sobrenadante.

A continuación fue adicionado NaCl 5M de modo que la concentración final de la solución fuera de 1M. Así mismo, se adicionaron 500 $\mu\text{L}$  de alcohol frío al 10% y se agitó suavemente con el fin de precipitar el DNA. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 14.000 r.p.m durante 10 minutos y posteriormente fue descartado el sobrenadante. Posterior a esto se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de alcohol frío al 70% y las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m por 10 minutos y nuevamente se descartó el sobrenadante. Por último las muestras fueron secadas en estufa a 37°C durante 3 horas y subsecuentemente el botón o "*pellet*" obtenido de cada muestra se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de buffer TE, el cual es una solución tampón específica para mantener la integridad del DNA.