Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE *Saguinus leucopus* (Primates: Callitrichidae) A LO LARGO DE SU RANGO DE DISTRIBUCIÓN.

Juan Sebastián Arciniegas Vacares

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá D.C.
Diciembre 2015

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE *Saguinus leucopus* (Primates: Callitrichidae) A LO LARGO DE SU RANGO DE DISTRIBUCIÓN.

Juan Sebastián Arciniegas Vacares

Tesis de Maestría para optar al titulo en
Maestria en Ciencias - Biología

Director
Paul Bloor, MSc., Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá D.C.
Diciembre 2015

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada a Dios.

Quiero agradecer a mis padres y a mis hermanos por estar presentes durante cada momento brindándome su compañía, apoyo y paciencia. A Leda por brindarme su apoyo y colaboración en todo el proceso, el cual fue de vital importancia para salir adelante en los momentos más difíciles y en los que más necesitaba contar con alguien, creyendo en mi aun cuando yo no podía, proporcionando una mirada científica, objetiva y sincera del trabajo realizado. A mis amigos que han estado acompañadome antes y durante la maestría. A todas las personas que creyeron en mí y no me dejaron dar un paso atras en este camino.

De forma especial quiero agradecer al Dr. Paul Bloor por su apoyo, esfuerzo, paciencia y experiencia que permitieron no solo la elaboración de esta tesis sino conocer otro campo de la genética y biología molecular. A mis compañeros de laboratorio Manuel Hoyos, Tomas Viloria y Carolina Ibáñez por la colaboración que me brindaron durante el proceso de investigación.

Finalmente quiero agradecer WCS Colombia (especialmente a Luz Dary Acevedo) por todo el trabajo en campo y el muestreo realizado. A ACOPAZOA (especialmente a Carolina Falla) por las muestras proporcionadas. Al Ministerio de medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Este trabajo no hubiera sido posible son el trabajo en conjunto de estas instituciones

RESUMEN

El titi gris (*Saguinus leucopus*) es una especie de primate endémica de Colombia, la cual se encuentra en Peligro de extinción (EN, según UICN) debido principalmente a la pérdida del hábitat y al tráfico ilegal. Para definir planes de conservación que incluyan la elaboración de protocolos de manejo y liberación de especímenes decomisados se requiere conocer la estructura genética de *S. leucopus*, dentro de su rango de distribución. A pesar que se han realizado algunos estudios sobre los niveles de diversidad y distribución de la composición genética de la especie, éstos se han restringido a algunos departamentos dentro de su distribución o a estudios que no permiten acceder a los datos obtenidos en su investigación. En la actualidad, no se cuenta con una base de datos para identificar la estructura genética de esta especie a largo de su rango natural de distribución.

Para estudiar la estructura genética-geográfica y la dinámica poblacional de *S. leucopus* a lo largo de su área de distribución, se usaron tres marcadores mitocondriales: el gen completo Citocromo Oxidasa II (COXII) (n=55), la región hipervariable I de Región Control (HPVI-RC) (n=80) y el gen completo Citocromo-B (CytB) (n=80). Adicionalmente, se obtuvieron genotipos para un set de nueve marcadores nucleares (tipo microsatélites) (n=56).

Los datos mitocondriales y nucleares revelaron altos niveles de variación genética al interior de *S. leucopus*. Los datos mitocondriales permitieron identificar una reducción en el tamaño efectivo de *S. leucopus*. La correspondencia entre los resultados obtenidos con marcadores mitocondriales y marcadores microsatélites soportan la presencia de una estructura filogeográfica al interior de *S. leucopus*, la cual está compuesta por tres grupos genéticos principales (sur-centro-norte) a lo largo de su distribución.

La presente investigación es la primera en reportar una estructura filogeográfica en *S. leucopus* a lo largo de su rango distribucional, lo que permitió reconocer la necesidad de designar unidades prioritarias para la conservación de la integridad genética de esta especie. La estructura genética encontrada permite realizar planes de conservación que incluyan la elaboración de protocolos de manejo y liberación de especímenes, aplicando el uso de herramientas moleculares para inferir el origen de los animales decomisados.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 9
3. OBJETIVOS 13
3.1. Objetivo general 13
3.2. Objetivos específicos 13
4. ANTECEDENTES 14
4.1. Descripción de la especie 14
4.1.1. Generalidades de Saguinus. 14
4.1.2. Generalidades de la especie. 16
4.2 Diversidad y Estructura Genética 18
4.2.1. Modificaciones de la estructura genética en primates 21
4.3 Marcadores Moleculares 22
4.3.1 ADN Mitocondrial. 22
4.3.2 Marcadores Moleculares tipo Microsatélites. 23
4.4 Quimerismo 26
4.5 Identificación de Unidades para la Conservación. 28
5. METODOLOGÍA 31
5.1 Área de Estudio. 31
5.2 Toma y Procesamiento de Muestras. 31
5.3 Fase de Laboratorio. 30
5.3.1 Extracción de ADN. 30
5.3.2 Obtención de Datos de Marcadores Mitocondriales. 30
5.3.3 Amplificación y Genotipificación de loci microsatélite. 34
5.3.4 Análisis de Datos 38
6. RESULTADOS 41
6.1 Marcadores Mitocondriales. 41
6.1.1 Citocromo Oxidasa C Subunidad II (COXII). 41
6.1.2 Región Hipervariable I de Región Control (HpvI-RC) y Gen Citocromo B (CytB). 49
6.1.3 Datos de Marcadores Microsatélites. 67
7. DISCUSIÓN 68
7.1 Efecto de los procesos históricos sobre la estructura genética y demografía. 68

7.2 Efecto de los procesos contemporáneos sobre la estructura genética 74
7.3 Implicaciones para la conservación.....84
8. BIBLIOGRAFÍA.....86

1. INTRODUCCIÓN

Colombia tiene el privilegio de poseer una de las faunas más variadas del mundo, debido a su ubicación ecuatorial y su compleja topografía, resultando en la conformación de diferentes hábitats y condiciones climáticas (Emmons, 1997; Alberico *et al.*, 2000). A su vez, es reconocido como uno de los paises con mayor diversidad de primates del Nuevo Mundo junto con Brasil, Zaire, Camerún, Indonesia, Madagascar y Perú (Cuervo *et al.*, 1986; Alberico *et al.*, 2000). A pesar que no es posible saber con absoluta certeza el número de primates que habitan en Colombia, Defler (2010) afirma que en Colombia se encuentran reportadas 29 especies de primates que comprenden 45 taxones (especies y subespecies), de los cuales 12 son endémicos distribuidos desde el nivel del mar hasta los 3.200 msnm.

A nivel nacional, dentro de los mamíferos, el orden Primates es el grupo taxonómico que contiene más especies amenazadas, con 22 taxones dentro de las categorías de amenaza de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN): seis en estado crítico (CR), cinco amenazadas (EN) y once vulnerables (VU) (Defler, 2010). Una de las principales causas del estado de amenaza de las poblaciones de primates son los procesos de pérdida y fragmentación del hábitat, lo que restringe la distribución de poblaciones de primates a segmentos de hábitat relictos de la fragmentación, llevando a un trastorno de los procesos evolutivos (dinámica entre migración, flujo génico y deriva genética) que puede resultar en la reducción de la diversidad genética como consecuencia a la disminución de la capacidad de supervivencia y/o extinción de las poblaciones (Fahrig, 2003; Henle *et al.*, 2004; Harcourt & Doherty, 2005) por la reducción en “fitness” o adecuación biológica.

La pérdida y fragmentación del hábitat se consideran los principales procesos de modificación ambiental que afectan la diversidad biológica. Habitualmente, la pérdida del hábitat tiene efectos negativos sobre la persistencia de las especies, mientras que la fragmentación del hábitat puede causar efectos positivos, negativos o no causar ningún efecto sobre las poblaciones. Sin embargo, la fragmentación del hábitat a menudo se produce al mismo tiempo con la pérdida del mismo. El efecto de ambos fenómenos

actuando juntos, causa la división de un hábitat contiguo en múltiples parches discontinuos, los cuales abarcan menos área y pueden verse afectados en mayor medida por el efecto de borde (Fahrig, 2003; Lindenmayer & Fischer, 2007). Estos procesos pueden resultar en un decremento en el tamaño de las poblaciones y en aislamiento de los remanentes de la población (Chapman & Peres, 2001; Arroyo-Rodríguez & Mandujano, 2009). La sensibilidad que presentan los mamíferos a la fragmentación está relacionada con su tamaño corporal y la adaptabilidad que posee a los diferentes tipos de hábitats (Ewers & Didham, 2006).

En el caso de los primates la sensibilidad a la fragmentación depende de la especie. Por ejemplo, los tamarinos (género *Saguinus*) son primates pequeños, reconocidos por adaptarse con bastante éxito hábitats que han sufrido algun proceso de modificación, lo cual permite que sean comunes en zonas de vegetación secundaria, áreas de selva selva intervenida y en proceso de regenración (Defler, 2010). Este género constituye el más grande y diverso de los primates del Nuevo Mundo, habitando desde el sur de centro América hasta el norte de Bolivia, incluyendo Colombia, Ecuador, Perú, Guyana, Surinam y Brasil (Defler, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006; Defler, 2010; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013). Defler (2010) reconoce la existencia de seis especies del género *Saguinus* en Colombia, de las cuales dos son endémicas (*Saguinus leucopus* y *Saguinus oedipus*). El tití gris (*Saguinus leucopus*) es la especie del género *Saguinus* que presenta la distribución más restringida; se encuentra distribuida en un área pequeña que presenta una alta actividad antropogénica, la cual tiende a reducirse y fragmentarse cada vez más con el transcurso del tiempo. Todo esto sumado a la caza ilegal para su comercio, ha hecho que esta especie sea categorizada en Peligro (EN) de acuerdo a los criterios de la UICN (2013). Por esta razón, *S. leucopus* representa una prioridad fundamental de conservación en Colombia, puesto que cuenta con varias poblaciones pequeñas que habitan áreas restringidas, como consecuencia de los procesos de modificación ambiental, principalmente la pérdida y la fragmentación de su hábitat (Defler, 2004; Defler, 2010; Stevenson *et al.*, 2010; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tití gris (*Saguinus leucopus* - Callitrichidae) es un primate endémico de Colombia, y presenta una de las distribuciones más restringidas del territorio nacional. De hecho, presenta el menor rango de distribución de todas las especies del género *Saguinus* (Stevenson *et al.*, 2010; Alba-Mejía, 2013). Además de esto, *S. leucopus* es una especie sometida a la caza, ya que el tamaño pequeño que tiene promueve su comercio ilegal como mascota, por lo que en la actualidad se tiene un elevado número de individuos en cautiverio, provenientes de incautaciones y entregas voluntarias, lo cual ha generado modificaciones en las densidades de sus poblaciones (Rodríguez *et al.*, 2006; Alba-Mejía, 2013; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013). Por esta razón, esta especie ha sido categorizada en Peligro (EN) de acuerdo a los criterios de la UICN (Rodríguez *et al.*, 2006; Castañeda *et al.*, 2010).

Las poblaciones de *S. leucopus* se encuentran asociadas a fragmentos muy pequeños de bosque (Defler, 2010), y pueden presentar una pérdida importante en su diversidad genética como consecuencia de la reducción y fragmentación de su hábitat, el cual se localiza en zonas que tienden a achicarse rápidamente por efectos antropogénicos. Sin embargo, aún se desconoce el efecto de procesos demográficos, ecológicos y sociales sobre los procesos de dispersión, migración y flujo génico en esta especie, lo que dificulta la evaluación de su capacidad de persistencia en estos fragmentos y de dispersión a otros fragmentos de bosques cercanos (Defler, 2010; Stevenson *et al.*, 2010; Alba-Mejía, 2013).

En ese sentido, *S. leucopus* debe ser considerada una prioridad de conservación, que requiere de atención especial y de esta manera lograr crear e implementar un plan de conservación que garantice la estabilidad de las poblaciones en los ecosistemas. Por tanto, teniendo en cuenta el grado de vulnerabilidad de esta especie, es fundamental priorizar investigaciones que permitan identificar el grado de amenaza y diseñar dichos planes de conservación (Rodríguez *et al.*, 2006; Defler, 2010; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013).

La pérdida y la fragmentación del hábitat son procesos de modificación ambiental que se viene presentando por un largo periodo de tiempo, sin que se conozcan sus efectos sobre la composición genética actual de las poblaciones de *S. leucopus*. Se requiere generar conocimientos básicos de aspectos sobre la composición genética histórica, que permita reconstruir la historia demográfica de la especie. De igual forma, es indispensable detectar y describir los efectos de estas modificaciones en escalas geográficas e intervalos de tiempo más pequeños, proporcionando información importante, como: las tasas de migración, el éxito reproductivo, relaciones genéticas inter e intrapoblacionales, tamaños poblacionales, parentesco entre individuos y dinámica poblacional a lo largo de su rango de distribución; y de esta manera lograr comprender los procesos evolutivos que ocurren dentro de las poblaciones naturales de *S. leucopus* (Frankham *et al.*, 2002; Castañeda *et al.*, 2010; Defler, 2010; Yang & Jiang, 2011; Alba-Mejía, 2013).

Pese a la importancia de la especie, se han realizado pocos estudios que permitan conocer los niveles de diversidad y distribución de la composición genética histórica y contemporánea de ésta. Dichos estudios, se limitan a pocos departamentos a lo largo de su rango de distribución o utilizan marcadores moleculares que no son los adecuados para evaluar la estructura genética de las poblaciones de *S. leucopus* (Defler, 2004; Defler, 2010, Stevenson *et al.*, 2010; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013). En la actualidad existe un desconocimiento de la diversidad genética de *S. leucopus* a lo largo de todo su rango de distribución, lo que se convierte en el principal obstáculo para el desarrollo de iniciativas para su conservación, puesto que las formulaciones de planes de manejo efectivos necesitan identificar las unidades de manejo y conservación, para lo que se necesita conocer la dinámica, estructura y flujo génico de las poblaciones (Moritz, 1994; Crandall. *et al.*, 2000; Poveda & Sánchez, 2004; Pires-Costa *et al.*, 2005; Palsbøll *et al.*, 2007).

Se estima que con el paso del tiempo se acentuarán las amenazas que hoy afrontan las poblaciones de *S. leucopus*, por lo cual es urgente poner en marcha un plan de conservación enfocado a mitigar las presiones que afectan a la especie, así como la fauna y flora asociadas a su área de distribución. Además, es necesario priorizar las investigaciones para ampliar los conocimientos sobre flujo génico, la dinámica y estructura poblacional de esta

especie, con el fin definir las pautas para la identificación de zonas estratégicas para su manejo y conservación, que puedan asegurar la supervivencia y viabilidad de sus poblaciones a largo plazo, y de esta manera proteger su hábitat e incrementar el número de individuos dentro de las poblaciones. Este aspecto es de gran importancia, sí tenemos en cuenta que actualmente existe únicamente una figura del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Parque Nacional Natural Selva de Florencia, departamento de Caldas) en toda la distribución de *S. leucopus* (Poveda & Sánchez, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013; Alba-Mejía, 2013).

En consecuencia y para afrontar este problema, en el 2005 surgió *El Programa Internacional de Conservación del Saguinus leucopus (PICSL)*. Este programa trabaja en diferentes frentes de conservación, *in situ* y *ex situ*, educación e investigación. Pese a que en la parte *in situ* se realizó un convenio entre *PICSL* y Wildlife Conservation Society (WCS) con el objetivo de estudiar la distribución, densidad, genética y salud de las poblaciones silvestres, en la actualidad no se cuenta con una caracterización de los linajes genéticos y relaciones genealógicas de las poblaciones silvestres de *S. leucopus*. Esta información es de vital importancia, si tenemos en cuenta que conocer la composición genética histórica y la dinámica poblacional contemporánea, orientaría los programas de reproducción en cautiverio y la reintroducción de individuos incautados, evitando la pérdida de la viabilidad a largo plazo y garantizando la conservación de los distintos linajes dentro de la especie (Rodríguez *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2010).

En la última década se ha mostrado que la forma habitual, sencilla y menos costosa de examinar la variabilidad genética de las poblaciones es mediante el uso de marcadores moleculares (You-Chun *et al.*, 2002; Kimberly *et al.*, 2006). Los marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) tienen una tasa de mutación relativamente elevada, por lo que son una herramienta que proporciona un acercamiento al efecto de los procesos históricos sobre la variación y evolución de la estructura histórica poblacional. De igual forma, estos marcadores son útiles para identificar grupos poblacionales genéticamente divergentes, permitiendo identificar las prioridades de los programas de conservación o Unidades de Manejo y Conservación (Poveda & Sánchez, 2004; Castañeda *et al.*, 2010). A

pesar de esto, la identificación de la estructura genética contemporánea y los procesos evolutivos que ocurren en las poblaciones naturales de *S. leucopus* requieren de un marcador molecular que se caracterice por altas tasas de mutación y fijación de alelos (Ellegren, 2004; Chistiakov *et al.*, 2005). Los microsatélites se destacan por tener una alta capacidad para detectar y describir diferencias genéticas a escalas geográficas y en intervalos de tiempo más pequeños, que tradicionalmente no se alcanzan a evaluar utilizando ADN mitocondrial. La alta variabilidad de los marcadores tipo microsatélites los convierte en una herramienta idónea para describir la estructura genética contemporánea, las tasas de migración, el éxito reproductivo, relaciones genéticas, tamaños poblacionales, parentesco entre individuos y dinámica poblacional, entre otros.

En base a esto, la presente investigación aportará información necesaria para la caracterización de la composición genética histórica y contemporánea de poblaciones naturales de *S. leucopus* (Primates: Callitrichidae) en los departamentos de Tolima, Bolívar, Caldas y Antioquia, atendiendo la consecuente necesidad de ampliar los conocimientos acerca de la dinámica, estructura y flujo génico de esta especie, lo que permitirá obtener las bases para la determinación de unidades de manejo y conservación *in situ* de *S. leucopus*, contribuyendo al *PICSL* y a los programas de reproducción en cautiverio y reintroducción de individuos incautados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar la estructura y dinámica poblacional de *Saguinus leucopus* (Primates: Callitrichidae) mediante el uso de marcadores moleculares.

3.2. Objetivos específicos

1. Describir la estructura genética histórica y la historia demográfica de las poblaciones naturales de *S. leucopus*, a partir de secuencias de ADN mitocondrial.

2. Analizar la estructura genética contemporánea de las poblaciones naturales de *S. leucopus*, a partir de marcadores tipo microsatélites.

3. Realizar recomendaciones para la conservación de las poblaciones naturales de *S. leucopus* en base a los resultados obtenidos en la presente investigación.

4. ANTECEDENTES

4.1. Descripción de la especie

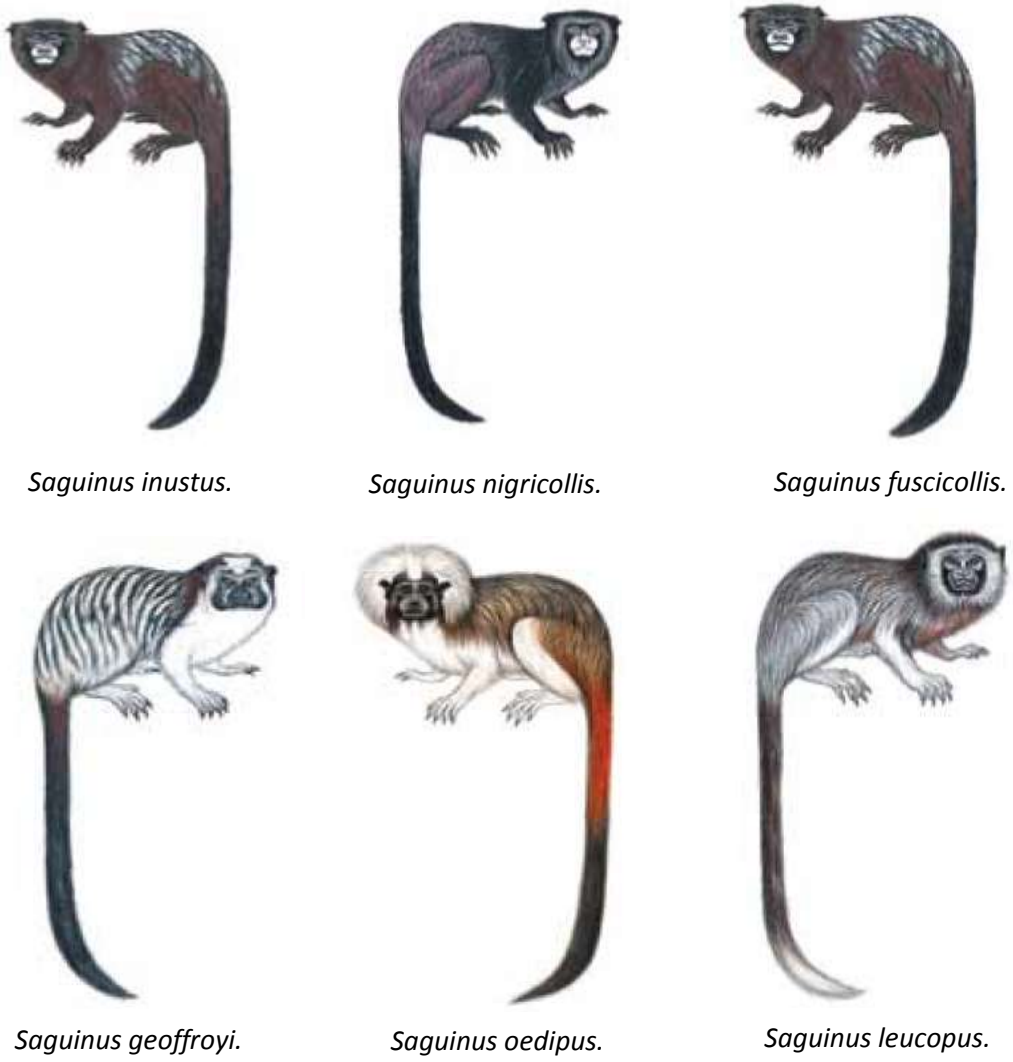
4.1.1. Generalidades de Saguinus.

En Colombia, la familia Callitrichidae tiene los géneros *Callimico*, *Saguinus* y *Cebuella* (Defler, 2010). Solo existen tres especies trasandinas pertenecientes al género *Saguinus*: *S. oedipus*, *S. leucopus* y *S. geoffroyi*. De estas, las dos primeras son consideradas endémicas (Castañeda *et al.*, 2010; Defler, 2003; Poveda & Sánchez, 2004; Ruivo *et al.*, 2005) (Figura 1). Estudios citogenéticos y moleculares, han concluido que *Saguinus* es el género basal de la familia Callitrichidae (Nagamachi *et al.*, 1999; Schneider, 2000).

Las especies del género *Saguinus* (Thomas, 1903) son de tamaño mediano y pesan entre 800 y 2.000 g dependiendo de la especie (Defler, 2003). Se encuentran distribuidas en bosques tropicales y subtropicales desde el norte de Panamá hasta el sur de Brasil, distribuyéndose desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 1.500 metros de sobre el nivel del mar, alcanzando su concentración máxima en la baja Amazonía (Defler, 2003).

Estos primates son esencialmente de hábitos diurnos y algunos son completamente arborícolas, aunque habitualmente prefieren los bosques densos a las orillas de cuerpos aguas, y se desplazan fácilmente entre las ramas de los árboles (Castañeda *et al.*, 2010). Regularmente viven en grupos sociales que comprenden una pareja monógama y sus crías con indiviuos satélite de menor jerarquía. Rara vez se pueden observar individuos solitarios o grupos con más de 14 individuos (Defler, 2003). La comunicación es un factor importante para la cooperación en el grupo. Los conjuntos sociales son territoriales, defienden su territorio con gritos y persiguiendo a los intrusos, pero rara vez participan en una verdadera lucha. Su dieta se compone principalmente de frutas, sin embargo, también comen hojas, flores insectos y pequeños vertebrados (Defler, 2010; Poveda & Sánchez, 2004; Ruivo *et al.*, 2005).

Figura 1. Especies del género *Saguinus* presentes en territorio colombiano.



(Modificado de Defler, 2010)

Se ha discutido bastante con respecto al origen del género *Saguinus* y sobre el proceso que dio lugar a las tres especies trasandinas pertenecientes al género *Saguinus* (*S. oedipus*, *S. leucopus* y *S. geoffroyi*) (Hershkovitz, 1977). Una posibilidad es que las especies se originaran de un grupo ancestral emparentado con la subespecie *S. nigricollis graellsi*, a partir de la cual se desplazó un grupo que migró hasta el norte de Colombia, diversificándose en los tres grupos previamente mencionados. La segunda posibilidad, es que el grupo de primates se originará a partir de un ancestro amazónico que habría dado

origen en primera medida a *S. leucopus* en el valle del Magdalena y y luego a *S. geoffroyi* y *S. oedipus* aproximadamente en el Plioceno superior. Luego *S. geoffroyi* se habría expandido desde Colombia hasta Panamá y Costa Rica (Defler, 2010).

4.1.2. Generalidades de la especie.

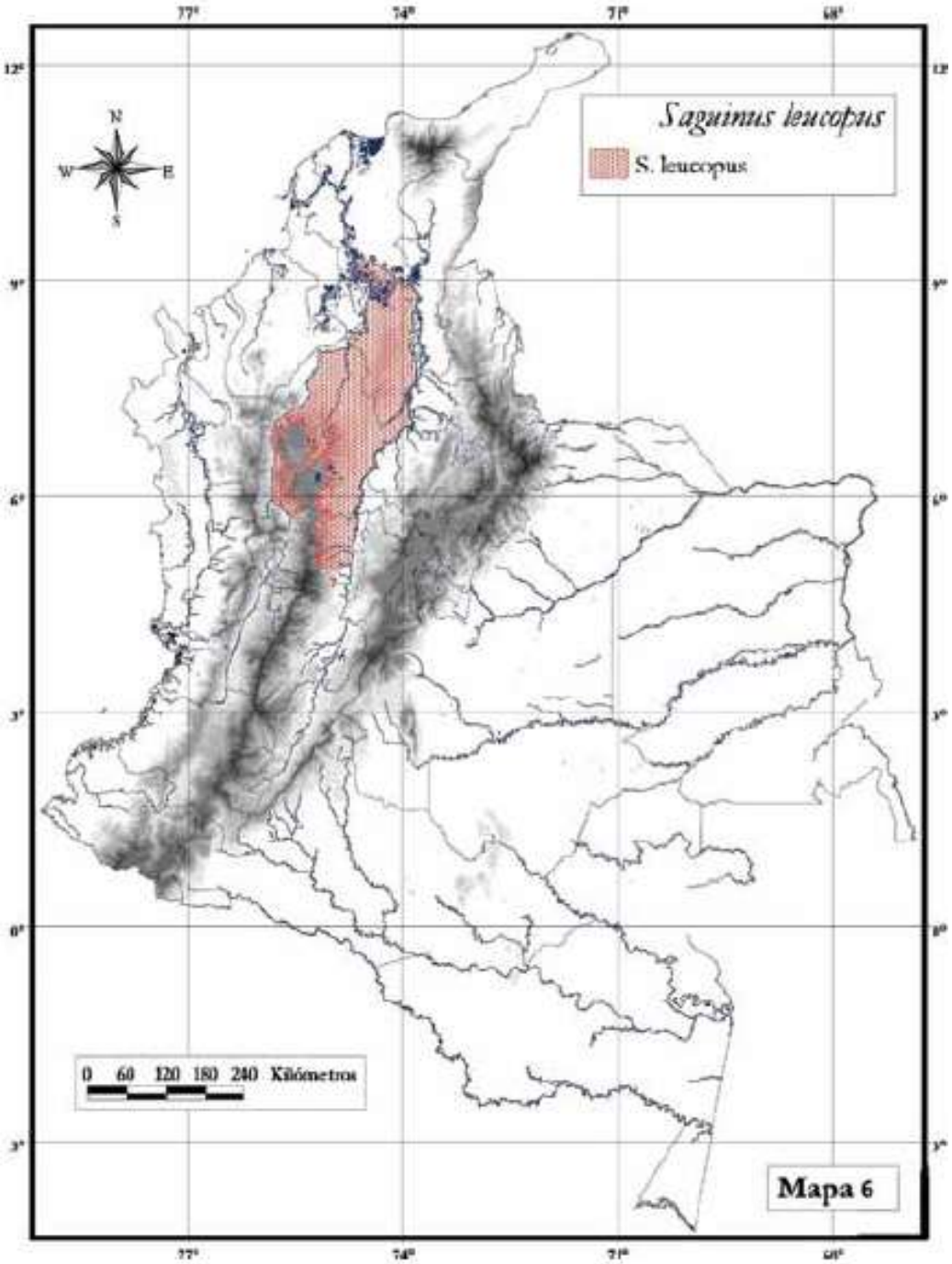
Saguinus leucopus es una especie endémica de Colombia distribuida en la región norte y en el piedemonte de la cordillera central. Sus límites de distribución se encuentran desde la orilla oriental del bajo río Cauca, la orilla occidental del río Magdalena y el piedemonte de la Cordillera Central en donde se distribuye hasta los 1500 metros de altura. Se encuentra en el nordeste de Antioquia, el sur de Bolívar, en el departamento de Caldas y en el norte del Tolima (Figura 2) (Defler, 2003; Defler, 2010). Esta especie fue descrita por Hershkovitz (1977) como monotípica, aunque es posible la existencia de dos subespecies (Defler, 2010).

En su área de distribución es conocido como tití o tití gris. Esta especie habita en bosque seco tropical, húmedo tropical, muy húmedo tropical y húmedo premontano. Su rango altitudinal va desde los 0 hasta los 1.500 metros sobre el nivel del mar. Habita bosques primarios y secundarios, aunque también existen registros en zonas urbanas (Defler, 2010). La mayor proporción de las áreas donde habita soportan fuertes presiones antropogénicas como la deforestación y la fragmentación producto de actividades agropecuarias y ganaderas, relegando las poblaciones a pequeñas zonas con cobertura vegetal (Defler, 2003), por lo que se le termina encontrando en residuos de bosques aislados, lo que ha causado que se le considere como una especie pionera en tolerar fragmentación de hábitat (Gordo *et al.*, 2013).

El peso promedio para la especie es de 500 gramos aproximadamente (Massicot, 2006). El pelaje del dorso es de color café en su base y se aclara casi completamente hacia la punta. Los flancos son blanquecinos y las extremidades son casi blancas. El abdomen es oscuro y la cola peluda; esta presenta un color café con el extremo blanco y no es prensil. La cara no presenta pelaje y se encuentra delineada por una franja delgada de pelo blanco. Entre las

orejas y el cuello, tiene el pelaje de color café. Las manos, y los pies son blancos y tienen garras en vez de uñas (Defler, 2003).

Figura 2. Rango de distribución de *Saguinus leucopus* en Colombia.



(Modificado de Defler, 2010)

Como resultado de la distribución geográfica restringida y el hábitat altamente fragmentado, se ha considerado como una de las especies de primate de Colombia con distribución más limitada (Defler, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006). Las poblaciones se han reducido en un 86% debido al tráfico ilegal y a la destrucción de su hábitat, lo que sigue aumentando de manera alarmante por lo que pueden sufrir procesos de extinción en corto tiempo (Defler, 2003).

4.2 Diversidad y Estructura Genética

Los factores evolutivos que cambian las frecuencias alélicas de las poblaciones son: la mutación, la deriva genética, la migración y la selección natural; sin embargo, estos factores actúan de diferentes formas. La variabilidad genética es generada principalmente por dos procesos: la mutación que genera nuevos alelos en la población, y la recombinación, que crea nuevas combinaciones alélicas en la población. Estos procesos se encargan de generar y mantener la diversidad genética al interior de las poblaciones (Amos & Harwood, 1998; Yang & Jiang, 2011). La diversidad se reduce principalmente por la acción de la deriva genética y la selección natural, debido a que estas fuerzas evolutivas eliminan o fijan alelos por eventos estocásticos o de adaptación, respectivamente (Aspi *et al.*, 2006; Bergl *et al.*, 2008). Es así que la distribución de la diversidad genética (tanto frecuencia genotípica como alélica) dentro y entre las poblaciones puede cambiar a través del espacio y el tiempo, como resultado de la historia de vida de la especie (sistema de dispersión y apareamiento) y fuerzas evolutivas (mutación, migración, deriva genética y selección natural), por lo que la estructura genética en las poblaciones depende del balance existente entre los procesos que aumentan la diversidad genética y las fuerzas que la reducen (Hacker *et al.*, 1998; Fahrig, 2003; Brouat *et al.*, 2004).

Las fuerzas evolutivas que actúan sobre la estructura genética de una especie determinada, puede ocasionar que las frecuencias alélicas sean compartidas por toda la población, a lo largo de su rango de distribución (Muller *et al.*, 2009; Yang & Jiang, 2011). Sin embargo, en otras especies se puede encontrar que la población presenta una estructura genética diferente, debido a que sus frecuencias alélicas varían entre los fragmentos aislados (Brouat

et al., 2004; Aspi *et al.*, 2006; Bergl *et al.*, 2008). La diferenciación genética entre poblaciones puede ser el resultado de la baja tasa de interacción entre los organismos de los diferentes grupos o porque su sistema de reproducción se da entre individuos que presentan algún grado de parentesco, esto puede conducir a que las fuerzas evolutivas actúen de forma diferente en dichas poblaciones, conduciendo a la diferenciación de su estructura genética (Hanski & Gaggiotti, 2004). En el caso específico del grupo de los primates, se han encontrado especies que presentan un tipo de estructura genética y otras que presentar el otro, para entender la dinámica de cada población es necesario comprender la estructuración genética que presenta la especie que se desea estudiar.

La dinámica de las poblaciones fragmentadas depende de los patrones de dispersión (Hanski & Gaggiotti, 2004). Este aspecto es particularmente importante al estudiar poblaciones pequeñas, debido a que la estocasticidad demográfica al combinarse con la deriva genética puede conducir fácilmente a las poblaciones a la extinción (Frankham, 2002). Por esta razón, se deben conocer los patrones de dispersión de las poblaciones mediado por la matriz del paisaje y la capacidad de dispersión de los organismos que la constituyen (Ricketts, 2001). La matriz del paisaje es un factor importante al trabajar con poblaciones pequeñas; sin embargo, se debe hacer una distinción entre los diferentes grados de intervención de los paisajes. Frankham (2007) muestra que la pérdida de hábitat y la fragmentación son procesos básicamente diferentes. Aunque la pérdida de hábitat tiene siempre efectos negativos sobre las especies, la fragmentación del hábitat puede cambiar las frecuencias alélicas generando efectos positivos, negativos o no tener efectos dentro de la población en estudio. Cuando la fragmentación del hábitat cambia las frecuencias alélicas de forma positiva, regularmente es debido a que, a pesar del cambio ocurrido, los individuos se encuentran en un hábitat adecuado (Hilty *et al.*, 2006), mientras que cuando se tienen efectos negativos, es debido a que las condiciones bióticas y abióticas cambian de forma abrupta, lo que afecta negativamente a varios grupos de organismos (Gehring & Swihart, 2003).

Los patrones de organización de la diversidad genética dentro de las especies y las matrices de paisaje, permiten conocer la historia evolutiva de las poblaciones y evaluar su potencial

evolutivo (Amos & Harwood, 1998; Hanski *et al.,* 2000), permitiendo examinar problemas como la baja variabilidad genética, que limita la respuesta a cambios en el ambiente (Crandall *et al.,* 2000; Brouat *et al.,* 2004; Aspi *et al.,* 2006; Manel *et al.,* 2003; Williams *et al.,* 2003; Yang & Jiang, 2011). En general, un hábitat altamente fragmentado conduce a que la mayoría de las especies presenten una organización jerárquica en grupos poblacionales locales con alto grado de aislamiento (Gaggiotti & Hanski, 2004), llevando muchas veces a la pérdida de variación genética en la población y diferenciando las poblaciones aisladas por las variables en la matriz de paisaje a las que se ven sometidas (Berg *et al.,* 2008; Ewers & Didham, 2006; Fahrig, 2003). De esta forma, el conocimiento de la distribución jerárquica de la diversidad genética es de vital importancia para orientar planes de manejo y conservacion, ya que permite conocer el grado de aislamiento o conectividad de las poblaciones de una especie (González-Solís *et al.,* 2001; Jensen *et al.,* 2005; Gillespie & Chapman, 2008).

El conocimiento de los parámetros genéticos de una población brinda elementos útiles para el planteamiento de estrategias de manejo de especies objeto de conservación, uso y aprovechamiento, y permite elegir los procedimientos adecuados para el mantenimiento de las poblaciones en peligro (Hacker *et al.,* 1998; Schwartz *et al.,* 2007; Broquet & Petit, 2009). Los estudios de flujo génico y dinámica poblacional son una alternativa para obtener datos que posibiliten el manejo exitoso de especies amenazadas que habitan ambientes muy fragmentados (Bergl *et al.,* 2008; Mapelli, 2010). Sin embargo, en especies como *S. leucopus,* se desconocen los patrones de dispersión y conectividad que existe entre las diferentes poblaciones, factor esencial para la aplicación de políticas eficaces de conservación.

De este modo, la comprensión de parámetros genéticos como la estructura genética permite identificar Unidades Evolutivas Significativas (ESU por sus siglas en inglés) y Unidades de Manejo (MU por sus siglas en inglés) (Moritz, 1994), entendiendo por ESU y MU unidades poblacionales que merecen manejo propio y que tienen una alta prioridad de conservación en el manejo de especies amenazadas (Zhang & Hewitt, 2003; Palsbøll *et al.,* 2007). Así, a partir de criterios genéticos poblacionales, se pueden definir unidades de conservación

prioritarias por debajo del nivel de especie para llevar a cabo estrategias que garanticen el manejo *in situ* adecuado de especies amenazadas (Hedrick *et al.,* 2001; Maudet *et al.,* 2002; Hey *et al.,* 2003; Palsbøll *et al.,* 2007).

Es por esto, que la aplicación de políticas eficaces de conservación requiere un conocimiento detallado de la estructura genética de las poblaciones y los patrones de dispersión de los individuos, principalmente en especies que se encuentran altamente amenazadas. Existen diferentes métodos para estimar las tasas de dispersión y conectividad entre poblaciones (monitoreo directo, captura y recaptura, etc.) (Rouquette & Thompson, 2007). Sin embargo, los métodos genéticos han sido ampliamente utilizados gracias a su eficacia, ya que han permitido evaluar aspectos genético-estructurales, calcular tasas de dispersión y correlacionarlos con elementos del paisaje, lo que ha permitido identificar aquellos elementos que impiden o favorecen la dispersión. Además, los métodos genéticos permiten identificar el origen de los migrantes e incluso los eventos de dispersión raros. Es por esto que el desarrollo de marcadores moleculares, como los microsatélites, permiten estimar patrones genéticos poblaciones de una manera detallada y con mayor resolución (Coates *et al.,* 2009; Flagstad *et al.,* 2012). Estos análisis se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones, y permiten hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones (Muller *et al.,* 2009).

4.2.1. Modificaciones de la estructura genética en primates

Investigaciones en diversos grupos de primates han evaluado los procesos que afectan la estructura genética de sus poblaciones, concluyendo que los factores más importantes para los cambios en las frecuencias alelicas son: variación en el tamaño del grupo, la densidad, la composición de las unidades sociales, y la dispersión de machos y hembras (Bergl *et al.*, 2008; Guschanski *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Quemere *et al.*, 2010). En numerosas especies de antropoides, se han observado diferencias moleculares que revelan patrones de dispersión que han dado lugar a patrones de comportamiento afiliativo disímiles dentro de los grupos sociales relacionados. Esto, sumado a aislamiento poblacional causado por la fragmentación del hábitat, limita las oportunidades de dispersión favoreciendo tendencias

en las especies de permanecer en su propia localidad (Robbins *et al.*, 2007; Teichroeb *et al.*, 2009); aumentando la probabilidad de endogamia (Vigilant *et al.*, 2015). En algunas especies de primates, ambos sexos suelen dejar sus grupos familiares cuando llegan a la madurez sexual, mientras que otras veces se dispersa solo alguno de los sexos. La dispersión diferencial de sexos funciona como un mecanismo para mantener la variabilidad genética y evitar la endogamia (Field & Guatelli-Steinberg, 2003; Pusey & Wolf, 1996).

Estudios que evalúan los cambios en la estructura genética de poblaciones de haplorrinos (suborden de primates, donde separa los grupos que presentan el labio superior continuo), enfrentan gran variedad de retos. Las metodologías de estudio y los modelos deben considerar los complejos patrones del comportamiento social de los primates, al igual que el comportamiento cooperativo y las relaciones de afiliación, así como los patrones de filopatria femenina. Por esta razón, se necesitan modelos solidos que se adapten a las condiciones del grupo estudiado para realizar un análisis completo (Booksmythe *et al.*, 2015). En general, los modelos predicen que las hembras deben ser filopátricas cuando los recursos alimenticios son de alta calidad y se encuentran distribuidos en parches donde están los grupos establecidos. Mientras que cuando los recursos alimenticios son de baja calidad y se encuentran dispersos, aumenta la competencia y las hembras se ven obligadas a dispersarse (Sterck *et al.*, 1997). Sin embargo, los patrones de dispersión de los taxones son muy variables, especialmente en monos del Nuevo Mundo (Di Fiore *et al.*, 2009).

4.3 Marcadores Moleculares

4.3.1 ADN Mitocondrial.

La identificación de marcadores moleculares adecuados es crítica para la descripción de diversidad intra-especifica relevante para la orientación de programas de manejo y conservación. La relativamente alta tasa de sustitución de ADN mitocondrial permite examinar la estructura genética histórica relevante por debajo del nivel de especie. En el presente estudio se emplean dos regiones mitocondriales, incluyendo un fragmento de la región no codificante o *Región Control* y el gen codificante completo *citocromo b*. El *citocromo b* ha demostrado ser preciso en la reconstrucción filogenética de especies de

mamíferos, en la asignación de taxones, y en brindar buena resolución al separar especies (Tobe *et al.,* 2010).

La secuencia no codificante *Región Control* se ha empleado para establecer relaciones evolutivas entre especies cercanas y subespecies (Tagliaro *et al.,* 1997), ya que se ha visto que presenta la tasa evolutiva más alta de todo el genoma mitocondrial (Sigurgardottir *et al.,* 2000). La secuencia de *Región Control* tiene una estructura compleja con regiones conservadas separadas por regiones altamente variables. En mamíferos, la secuencia de *Región Control* puede ser dividida en tres dominios (Figura 1): El dominio izquierdo (región hipervariable I) adyacente al gen Pro-tRNA, que contiene las secuencias de terminación donde se detiene la síntesis de la cadena pesada (*H-strand*) del asa de desplazamiento (*D-loop*) de triple cadena; la región central conservada, consistente en una secuencia rica en G-C que ha estado implicada en la regulación de la replicación de *H-strand* y formación de *D-loop* y; el dominio derecho (región hipervariable II) adyacente al gen Phe-tRNA, que contiene el sitio de inicio de la replicación de *H-strand*, los promotores para la transcripción de *H-strand* y *L-strand* (cadena liviana) y los bloques de secuencias conservadas (CBS) (Fumagalli *et al.,* 1996). Para el estudio se utilizó la región hipervariable I (HVRI) o dominio izquierdo, debido a que es una región codificante y tiene una tasa de mutación mayor que *citocromo b*.

4.3.2 Marcadores Moleculares tipo Microsatélites.

El elevado grado de variabilidad generalmente asociados a secuencias nucleares implican que a menudo contienen información que permite conocer la variabilidad y diversidad genética a nivel poblacional. Los marcadores microsatélites tienen la capacidad de detectar polimorfismos genéticos en escalas temporales las que los marcadores de ADN mitocondrial no son capaces de hacerlo, por lo que permiten revelar el efecto de procesos contemporáneos en los patrones genéticos (Miles *et al.,* 2009; Guichoux *et al.,* 2011).

Los microsatélites son secuencias de 2-6 nucleótidos repetidas en tándem (*p. ej.* ACACACACACACAC). También se conocen como repeticiones cortas en tándem (STRs

por sus siglas en inglés) o repeticiones de secuencia simple (SSRs por sus siglas en inglés). Estas secuencias repetidas en tándem cuentan con regiones flanqueantes conservadas que permiten su amplificación y posterior genotipificación (Ellegren, 2004; Chistiakov *et al.*, 2005). Este tipo de marcador se puede clasificar a partir del número bases o al tipo de estructura repetitiva que lo componen. De acuerdo al número de bases que posee el motivo de repetición se pueden clasificar como mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido (*p. ej.* TATATA, GATAGATAGATA). Respecto a la estructura repetitiva estos se clasifican en: **1)** simples, cuando tienen un solo motivo repetido varias veces en serie (repeticiones perfectas) (*p. ej.* $(AC)_{10}$); **2)** compuestos, con dos o más motivos de diferente composición repetidos en serie (repeticiones imperfectas) (*p. ej.* $(GT)_2(AC)_{10}$); **3)** simples o compuestos interrumpidos, cuando presentan secuencia no repetitiva entre las distintas repeticiones (*p. ej.* $(AC)_5(CT)_4GTCA(GC)_{11}$); **4)** complejos, cuando existen combinaciones entre cualesquiera de las clases anteriores sin ningún patrón de orden definido (Urquhart *et al.*, 1994). Dependiendo de la secuencia o de la estructura repetitiva que componen un microsatélite, su abundancia y distribución en el genoma pueden ser diferentes, ya que repeticiones trinucleótidicas y hexanucleótidicas son más frecuentes en los exones. Además, dependiendo de las características del motivo de repetición, algunos microsatélites poseen un mayor número de alelos (teniendo un mayor poder discriminatorio) y son menos susceptibles a errores en la genotipificación (Nikitina & Nazarenko, 2004; Broquet *et al.*, 2007).

Debido a la posibilidad de detectar la variabilidad genética mediante la amplificación y secuenciación, los marcadores microsatélites se han convertido en el más utilizado en estudios de ecología y evolución debido a que se caracterizan por ser neutrales, se heredan de forma codominante, poseen un elevado grado de variabilidad y fijación de alelos en las poblaciones, además de que son abundantes y ampliamente distribuidos en el genoma (Frankham *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Chistiakov *et al.*, 2005; Yang & Jiang, 2011). Aunque su distribución dentro de los cromosomas no es uniforme, ya que se encuentran en menos abundancia en las regiones subteloméricas (Koreth *et al.*, 1996), pueden encontrarse tanto en las regiones codificantes como en las que no lo son (Toth *et al.*, 2000), sin embargo, en eucariotas se encuentran con mayor frecuencia en las regiones no codificantes

(Metzgar *et al.,* 2000). Por estas características, este tipo de marcador molecular ha adquirido una importancia creciente en los últimos años en estudios sobre análisis de variabilidad y diversidad genética, relaciones entre especies, niveles de consanguinidad, controles de paternidad, éxito reproductivo y comportamiento en poblaciones silvestres (Miles *et al.,* 2009; Guichoux *et al.,* 2011).

La eficiencia de amplificación de los marcadores tipo microsatélites, depende en gran medida de la región flanqueante, ya que debe ser altamente conservada y el polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo. Esto se debe principalmente a que un locus microsatélite puede contener más de un alelo, y la detección de estos alelos va a depender de las diferencias y variaciones en la longitud o número de veces que se encuentra una secuencia repetitiva en los diferentes individuos, lo cual se produce por inserciones o deleciones de las unidades de repetición (Frankham *et al.,* 2002; Ellegren, 2004; Chistiakov *et al.,* 2005). De esta forma, en microsatélites el polimorfismo va a estar dado por las variaciones en el número de repeticiones en cierto locus, lo cual estará reflejado en los cambios de tamaño o longitud de los fragmentos amplificados (Metzgar *et al.,* 2000; Toth *et al.,* 2000).

Las secuencias de las regiones flanqueantes de los loci microsatélites están generalmente conservadas entre los individuos de la misma especies y especies muy cercanas, de tal forma que se pueden diseñar primers que se unan a esta región flanqueante y de esta forma llevar a cabo la amplificación del locus en taxones muy cercanos (amplificación cruzada) (Selkoe & Toonen, 2006). Sin embargo, se ha reportado que la amplificación cruzada presenta una reducción en el éxito de amplificación y en el número de alelos, asociando el aumento en los problemas y errores en la genotipificación (*p. ej.* alelos nulos y amplificación predominante de alelos pequeños) con cambios y mutaciones en las regiones flanqueantes (principalmente en los sitios de unión de los primers usados) (Soulsbury *et al.*, 2009). De hecho, en algunas especies se ha reportado la tendencia en la disminución en el polimorfismo y número de alelos conforme se aleja del clado en donde se describieron los microsatélites. Esta regla se conoce como “tendencia de ascertividad”. Esta tendencia ha sido descrita en diferentes especies de ovejas, zorros, aves, cetáceos, tortugas y rumiantes;

y específicamente para primates se encontró que al usar 42 microsatélites desarrollados en humanos se presenta una disminución del tamaño de alelos y el número de bases en 33 (cerca del 78%) de estos microsatélites (Crawford *et al.,* 1998; Ortega & Maldonado, 2007).

Además de esto, existen problemas potenciales asociados al uso de microsatélites como herramientas de estudio en poblaciones silvestres (Hoffman & Amos, 2005; Dewoody *et al.,* 2006). Por ejemplo, la aparición de alelos nulos como producto de mutaciones en la secuencia flanqueante, el cual corresponde al sitio de unión de alguno de los primers, dificulta la amplificación de alelos largos o cortos (*p. ej.* allele dropout). Otro problema, es la creación de "artefactos" o amplificaciones inespecíficas, producto del deslizamiento de la polimerasa (*p. ej.* stutter peaks), lo cual produce un aumento en la longitud de la unidad repetitiva (este tipo de error es más frecuente en loci dinucleótidos). Estos errores generan una dificultad para discriminar entre individuos homocigotos y heterocigotos, causando errores en el análisis e interpretación de las estimaciones de equilibrio Hardy-Weinberg, tamaño poblacional, flujo génico y evaluación de la estructura poblacional (Gonzalez, 2003; Hoffman & Amos, 2005; Pompanon *et al.,* 2005; Dewoody *et al.,* 2006).

4.4 Quimerismo

Existe un problema metodológico particular en el análisis molecular mediante marcadores microsatélites en primates que presentan quimerismo genético (Hsu & Benirschke, 2013), en los cuales la comunicación entre mellizos durante el desarrollo temprano, permite la mezcla de dos o más linajes genómicos dentro de un mismo individuo, producto del intercambio de líneas celulares a través de la fusión coriónica. En dichos casos, la fusión de dos blastocistos originan un único corión con anastomosis que comunica a los dos embriones, les permite a las células madre embrionarias migrar a través de la sangre, posibilitando que los tejidos se conformen con los linajes de los individuos y de sus hermanos, es decir, heredados tanto por línea vertical como horizontal (Ross *et al.,* 2007).

A pesar de ser un fenómeno raro en los mamíferos, el quimerismo genético ocurre con frecuencia en tejidos hematopoyéticos de primates de la familia Callitrichidae (Wislocki, 1939). Estudios adicionales, permitieron establecer la existencia del quimerismo a través de especies dentro de esta familia a diversos niveles. Se observó, por primera vez, gracias a la detección de cromosomas sexuales discordantes en los cariotipos de gemelos de sexo opuesto (Benirschke *et al.*, 1962). Sin embargo, el alto costo de los cariotipados limitó el análisis de un gran número de animales y tejidos, por lo que se empezó a implementar el uso de marcadores de microsatélites como un método de detección (Ross *et al.*, 2007). Ambos métodos, cariotipado y microsatelites, tuvieron éxito en la detección de tejido quimérico, y gracias a éstas herramientas se concluyó que los tejidos derivados de origen hematopoyético son quiméricos en esta familia (Ross *et al.*, 2007). Los investigadores han preferido el uso de microsatélites al trabajar con poblaciones quiméricas, pero se debe tener en cuenta el tipo de tejido con el que se está trabajando.

Estudios previos han utilizado marcadores moleculares de tipo microsatelites en primates Callitrichidos, los cuales se han concentrado en examinar la extensión y distribución de quimerismo que se produce en los diferentes tejidos de los derivados del sistema hematopoyético, utilizando microsatélites específicos de cada especie analizada (Ross *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2012; Tachibana *et al.* 2012). Dichas investigaciones, muestran evidencia que sugiere que las células de la línea germinal podrían incluir células quimericas (Benirschke & Brownhill, 1963). Sin embargo, no existen resultados concluyentes con respecto a estas aseveraciones.

El potencial de los marcadores microsatélites en este grupo de primates, no se limita únicamente al estudio del quimerismo en el marco de su biología del desarrollo. Este tipo de marcadores moleculares permite medir las frecuencias alélicas, evaluar los alelos presentes, estudiar las diferencias en la frecuencia alélica entre poblaciones de una zona específica e identificar posibles alelos anómalos con estructuras complejas (Jin *et al.*, 1997). Factores importantes, si se quiere evaluar los fenómenos en los que se fundamenta en la impronta genómica. El estimar la expresión de un alelo, dependiendo de su matriz de origen, puede contribuir a la identificación de un posible mecanismo evolutivo en

individuos quiméricos. Permitiendo realizar asociaciones entre rasgos de comportamiento y desarrollo, implicaciones importantes en las características del cuidado parental en las poblaciones y la relación entre los miembros de un grupo familiar y otros grupos (Cheney, 1987; Buchan *et al.*, 2003).

El estudio mediante el uso de marcadores microsatélites en grupos de primates Callitricidos permite identificar individuos y determinar la relación genética que tienen unos con otros, ayudando a dilucidar como se encuentran sus relaciones intragrupales y por ende entender cómo se encuentra el estado de sus poblaciones. Sin embargo, la genotipificación de individuos quiméricos normalmente presenta errores principalmente asociados con la presencia de tres o más alelos en los loci utilizados. Por esta razón, es necesario tener en cuenta el porcentaje de quimerismo que presentan los tejidos somáticos con los que se puede abordar la investigación, ya que se debe asegurar que el porcentaje quimérico sea adecuado, para no llegar a conclusiones erróneas.

4.5 Identificación de Unidades para la Conservación.

Los resultados obtenidos a partir de estudios que utilizan diferentes marcadores moleculares pueden ser muy útiles para seleccionar las poblaciones de primates candidatos para realizar planes de conservación, contribuyendo al manejo de las especies que puedan encontrarse en peligro de extinción y desarrollar programas de conservación consistentes. Este proceso se realiza mediante la identificación de ESUs, las cuales son las unidades operativas de la conservación. Su objetivo es conservar el potencial evolutivo de especies enteras mediante la conservación de los linajes intra-específicos con historias evolutivas independientes dentro de las poblaciones que se encuentran aisladas y por ende evolucionan independientemente de otras poblaciones (DeSalle & Amato, 2004). La identificación de ESUs, permite evaluar el impacto antropológico que puede afectar a una población, factor importante al trabajar con especies que han sufrido decrementos poblacionales y/o disminuciones sustanciales en su hábitat natural. Al igual, que al evaluar el número de extinciones históricas a los que se ha visto afrontada determinada especie. Esta herramienta

permite hacer un acercamiento a las poblaciones que son la fuente más apropiadas para realizar reintroducciones (Meusnier *et al.*, 2008).

La subdivisión demográfica puede proporcionar la oportunidad para que poblaciones puedan adaptarse a las presiones ambientales locales que no se comparten a través de todo el rango de distribución de la especie. El implementar el uso de ESUs, puede incrementar el potencial evolutivo de linajes únicos, ya que poseen diferencias en las frecuencias alélicas. Por medio de evaluación con marcadores neutros, se puede pronosticar si existe alguna diferencia que se relacionen con rasgos de importancia ecológica (Pinto *et al.*, 2014). Además, la identificación de ESUs puede ser importante al realizar estudios que pretendan evaluar los factores que influyen en los patrones de diversidad genética, como: el flujo de genes, la deriva genética, el proceso de selección, por ejemplo, se podría identificar que se ha producido deriva en forma aislada en otras poblaciones. Para el establecimiento de unidades de gestión en la biología de la conservación, es importante conocer el estado de los ESUs. Esta perspectiva no se restringe únicamente al campo de la conservación, diversidad de campos pueden beneficiarse con este enfoque, como por ejemplo el control biológico (Allendorf *et al.*, 2010).

Existen diferentes formas de relacionar la información genética con los datos georreferenciados que permiten establecer las Unidades de Conservaciónes con ESUs. El método criterio de monofilia recíproca de Moritz (1994), fue el primer método descrito en este tipo de investigaciones, el cual requiere árboles filogenéticos para las inferencias *a posteriori*. Actualmente, el método de evaluación más utilizado fue el descrito por DeSalle & Amato (2004), en donde el criterio de evaluación está basado en distancias genéticas. La presencia de ciertos polimorfismos permite agrupar individuos como unidades, que luego se acoplan con los datos geográficos, permitiendo identificar patrones genéticos congruentes con la ubicación de las poblaciones estudiadas.

La identificación de las unidades de conservación en poblaciones naturales es necesaria para evaluar el estado de amenazas y definir los objetivos de conservación. Para que las acciones de conservación pueden ser implementadas se deben identificar las MUs dentro de las ESUs (Moritz, 1994). La evaluación de la variación genética se ha convertido en una

práctica estándar para la identificación de las unidades de conservación, las cuales típicamente incluyen una consideración de la presencia de linajes evolutivos o ESUs (Hedrick *et al.*, 2001). La identificación de MUs es fundamental para el trabajo en biología de conservación con poblaciones naturales y es crucial para evaluar los efectos de la actividad humana sobre la abundancia de determinada especie (Palsbøll *et al.*, 2007). La identificación de las MUs debe hacerse mediante la evaluación de datos genéticos de poblaciones distribuidas lo largo de un rango geográfico, en donde se debe estimar la cantidad de divergencia genética en la que las poblaciones se hacen demográficamente independientes (Palsbøll *et al.*, 2007).

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de Estudio.

La fase de campo se llevó a cabo por la organización Wildlife Conservation Society (WCS)-Colombia entre el 2012 y 2015. Durante este tiempo los veterinarios de WCS-Colombia colectaron muestras de individuos silvestres de *S. leucopus* obtenidos en cinco localidades: 1) Mariquita en el departamento de Tolima, 2) Norcasia en el departamento de Caldas, 3) Puerto Berrío en el departamento de Antioquia, 4) Remedios en el departamento de Antioquia y 5) Puerto Rico en el departamento de Bolívar (Figura 3). Estas localidades se definieron por WCS procurando abarcar todo el rango de distribución de la especie. Además, estos sitios se caracterizan por no ser utilizados para realizar liberaciones de individuos provenientes de incautaciones y entregas voluntarias, lo que permite estudiar poblaciones que no han presentado incersion de individuos realizadas por el ser humano. El trabajo de campo requirió un esfuerzo (proceso de posteo) para habituar y cebar las trampas. El tiempo de posteo acumulado en cada una de las localidades fue el siguiente: 1) Mariquita (La Parroquia: 509,3 horas durante 75 días; San Juan: 148,63 horas durante 20 días), 2) Norcasia (174 horas), 3) Puerto Berrío (1530 horas), 4) Remedios (139,41 horas en 12 días) y 5) Puerto Rico (1020 horas).

Dada la dificultad de definir *a priori* lo que representa una población de primates, en la mayoría de las localidades se muestrearon grupos sociales para los cuales se desconoce el tipo de interacción que existe entre ellos. Por esta razón, la unidad más básica en este trabajo fueron los grupos sociales y no las poblaciones, por lo cual los análisis se realizaron tanto para los grupos sociales muestreados y los sitios en los cuales fueron muestreados.

5.2 Toma y Procesamiento de Muestras.

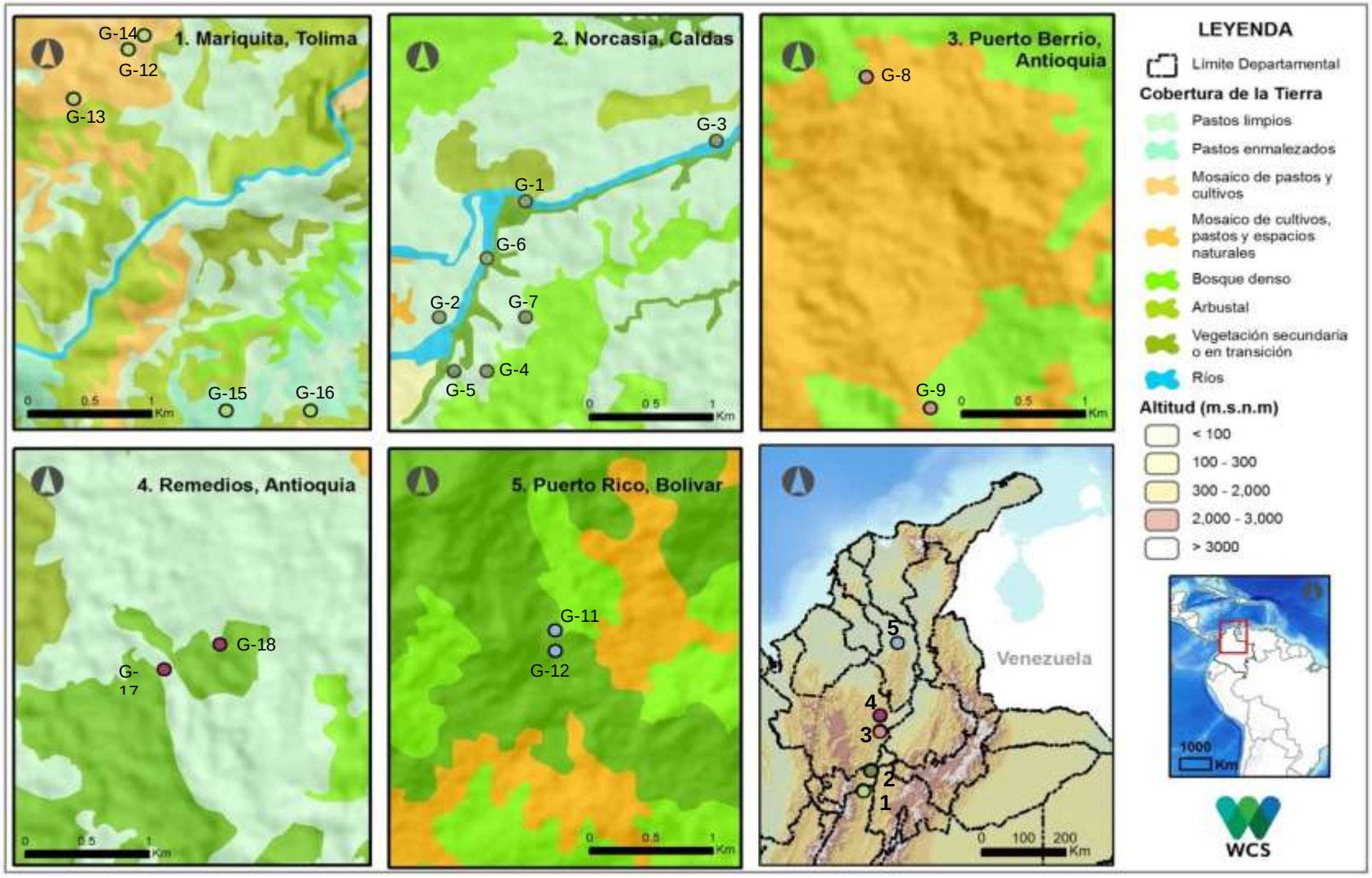
En cada una de las cinco localidades de muestreo se utilizaron tres métodos para la captura de individuos de *S. leucopus*: 1) Trampas Tomahawk, 2) Captura Directa (a mano) y 3) Jaulas Colectivas de Activación Manual (WCS 2013). De estos tres métodos, el uso de

jaulas colectivas de activación manual es un método que permite la captura de manadas completas. Este método consiste en instalar las trampas de varios compartimentos a una altura aproximada de dos metros del suelo y por un periodo de cuatro a diez semanas, habituar un grupo realizando ceba diaria con guayaba o banano, y finalmente una captura. Esto permite la captura de todos o la mayoría de los individuos de un grupo en un mismo momento. En el método de Captura Directa inicialmente se reconocen y ubican grupos y luego se procura capturar la mayor cantidad de individuos por el personal de campo. Los individuos capturados con estos dos métodos pueden designarse como miembros de una misma manada, grupo familiar o grupo social. Para los individuos capturados con las trampas Tomahawk no hay certeza de que hagan parte de un mismo grupo.

Una vez capturados los individuos los veterinarios de WCS-Colombia tomaron muestras sanguíneas y muestras de pelo de los individuos juveniles o adultos de *S. leucopus* siguiendo los protocolos de captura, manipulación, anestesia y toma de muestra estandarizados por WCS-Colombia. Se tomaron entre 0.1 y 0.2 mililitros (ml) de sangre periférica en tubos de 2 ml con etanol al 100%. Adicionalmente se obtuvieron muestras de sangre de *Saguinus oedipus* en cautiverio proporcionados por la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS).

Para evitar el problema de quimerismo que representa el uso de tejidos hematopoyéticos en la familia Callitrichidae para la genotipificación de marcadores microsatélites, fue necesario tomar muestras de pelo y heces de cada uno de los individuos juveniles o adultos y así realizar la genotipificación a partir de dichos marcadores. De igual forma, se contó con muestras de pelo de los infantes encontrados a lo largo del muestreo, que fueron tomadas para evitar las complicaciones en el proceso de anestesia y punción para la toma de muestras de sangre. Las muestras de pelo se almacenaron en sílica gel, dentro de sobres de papel mantequilla, mientras que las muestras de heces se almacenaron en tubos con etanol al 100% manteniendo el mismo código asignado para cada individuo.

Figura 3. Mapa del área de estudio. Se encuentran señalados los grupos sociales muestreados (G-**XX**) (1-18) en las cinco localidades (1-5): 1) Mariquita, Tolima, 2) Norcasia, Caldas, 3) Puerto Berrío, Antioquia, 4) Remedios, Antioquia y 5) Puerto Rico, Bolívar.



Finalmente, para cada muestra se registraron los siguientes datos: fecha de toma de muestra, sexo, edad y coordenadas geográficas. De igual forma, se tomaron algunas fotografías que permitieron registrar algunos de los aspectos morfológicos más importante de cada individuo. Finalizada la toma de datos físicos y muestras biológicas, se esperó a que los individuos se recuperaran completamente del anestésico y se liberaron en el mismo sitio de captura. Todas las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su llegada Laboratorio de Biología y Ecología Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en donde fueron procesadas.

5.3 Fase de Laboratorio.

El acceso a los recursos genéticos se realizó bajo el Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con fines de investigación científica no comercial de la Universidad Nacional de Colombia, otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambiental (ANLA) mediante resolución No. 0255 del 12 de marzo de 2014.

5.3.1 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN genómico de las muestras de sangre, se utilizó el método de Fenol-Cloformo descrito por Sambrook *et al.* (1989). De igual forma, para la extracción de ADN genómico de las muestras de heces y pelo se utilizó el protocolo de Tiocianato de Guanidina (GuSCN) y Dióxido de Silicio (Boom *et al.*, 1990; Hoyos *et al.*, en preparación). Para verificar la concentración y calidad del ADN extraído se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con SYBR ® SAFE.

5.3.2 Obtención de Datos de Marcadores Mitocondriales.

5.3.2.1. Amplificación de Marcadores Mitocondriales.

Para describir la estructura genética histórica y evaluar la historia demográfica de las poblaciones naturales de *S. leucopus* se usaron tres genes mitocondriales: 1) Inicialmente se amplificó el gen *Citocromo Oxidasa C Subunidad II* (COXII), por ser un gen que ha sido

utilizado previamente en otros estudios poblacionales y a partir del cual se han reportado altos niveles de diversidad genética en Hominoidea, Cercopithecoidea, Strepsirrhini, y dentro de varios géneros de primates neotropicales incluyendo *S. leucopus* (Ruiz-García *et al.*, 2014). Sin embargo, pruebas realizadas con este gen revelaron incongruencias con estudios previos y la presencia de un pseudogén lo cual podría explicar el elevado número de haplotipos y de sitios segregantes (ver Resultados), razones por las cuales se decidió amplificar otros dos genes mitocondriales que tuvieran diferentes tasas de mutación y que permitieran tener diferentes niveles de resolución de la estructura genética histórica de las poblaciones de *S. leucopus*: 2) Región Hipervariable I de Región Control (HpvI-RC) y 3) el gen Citocromo B (CytB).

A continuación, se describe el proceso de evaluación y amplificación de cada gen.

***Citocromo Oxidasa C Subunidad II* (COXII):** Para obtener el fragmento de aproximadamente 800pb que contiene el gen COXII (688pb), se diseñaron primers de regiones conservadas identificadas mediante el alineamiento de secuencias disponibles en GenBank (Prim_COXIIL1 y Prim_COXIIH1), a estos primers diseñados se le agregaron colas M13REV y M13(-21) para realizar la secuenciación (Tabla 1). Sin embargo, los resultados obtenidos con estos primers diseñados eran contradictorios con los obtenidos por Ruiz-Garcia *et al.* (2010; 2014). Por esta razón, se decidió realizar la amplificación del gen COXII en algunos individuos usando los primers usados previamente en *S. leucopus* por dichos autores (L6955 y H7766) (Ruiz-Garcia *et al.*, 2010; Ruiz-Garcia *et al.*, 2014) (Tabla 1). La PCR con ambos pares de primers se realizó en un volumen final de 35µL que contiene Buffer NH4 1X (Fermentas), 2µL de ADN extraído de sangre, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP y 0.25 U DNA *Taq* Polymerase (Fermentas) con 0.5 µM de cada primer. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Eppendorf comenzando con una temperatura inicial de 94°C durante 2 min, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30seg, 30 seg a 49°C y 45seg a 72°C, y un paso de extensión final de 1min a 72°C.

Tabla 1. Primers diseñados e implementados en la amplificación y secuenciación de tres regiones mitocondriales para el estudio de poblaciones naturales de *S. leucopus*.

Primer	Secuencia (5´-3´)	Función
Prim_CRL1	YTYYACCAYCARYACCCAAA	Amplificación RC
Prim_CRH1	ATGGCCBTGARGTARGAACCA	Amplificación RC
Seq_M13REV	CAGGAAACAGCTATGACC	Secuenciación RC
ProH1	TAGAATTTCAGCTTTGGGTGTT	Amplificación y secuenciación CytB
ND6L1	CAACCCACAGCACCACTA	Amplificación y secuenciación CytB
Prim_COXIIL1	TTTGTCAAAGTCAAATCATAGA	Amplificación y secuenciación COXII
Prim_COXIIH1	AGGAAGTCCTCTCAGTCTTTAAC	Amplificación y secuenciación COXII

Región Hipervariable I de *Región Control* (HpvI-RC): Para la obtención de un fragmento de aproximadamente 500pb que contiene la Región Hipervariable I de la *Región Control* mitocondrial (HpvI-RC) (419pb) se diseñaron primers de regiones conservadas identificadas mediante el alineamiento de secuencias disponibles en GenBank (Prim_CRL1 y Prim_CRH1) (Tabla 1). Debido a que estos primers tienen algunas posiciones degeneradas fue necesario agregar colas M13REV y M13(-21) para realizar la secuenciación. La PCR se realizó en un volumen final de 35µL que contiene Buffer NH4 1X (Fermentas), 2µL de ADN extraído de sangre, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP y 0.25 U DNA *Taq* Polymerase (Fermentas) con 0.5 µM de cada primer. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Eppendorf comenzando con una temperatura inicial de 94°C durante 2 min, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30seg, 30seg a 53°C y 45seg a 72°C, y un paso de extensión final de 1min a 72°C.

Gen Citocromo B (CytB): Para conseguir la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1882 pb, que contiene el gen Citocromo B (CytB) (1140pb), se diseñaron primers de regiones conservadas, la cuales fueron identificadas mediante el alineamiento de secuencias disponibles en GenBank (ND6L1 y ProH1) (Tabla 1). La PCR se realizó en un volumen final de 35µL que contiene Buffer NH4 1X (Fermentas), 2µL de ADN extraído de sangre, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP y 0.25 U DNA *Taq* Polymerase (Fermentas) con 0.5 µM de cada primer. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un

Termociclador Eppendorf comenzando con una temperatura inicial de 94°C durante 2 min, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30seg, 30seg a 53°C y 45seg a 72°C, y un paso de extensión final de 1min a 72°C.

5.3.2.2. Purificación y Secuenciación de productos amplificados:

Los productos amplificados se verificaron en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con SYBR® safe. Para eliminar los dNTPs y *primers* no incorporados (incluyendo dímero de primer) en la PCR, se utilizaron diferentes métodos de purificación para los fragmentos amplificados. Para COXII y HpvI-RC se utilizó el protocolo de purificación de precipitación con etanol y para el fragmento de CytB los productos se purificaron usando el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research). Los fragmentos para COXII y HpvI-RC se secuenciaron en un sentido utilizando el primer de amplificación (Prim_COXIIH1-H7766) y Seq_M13REV respectivamente (Tabla 1), el fragmento de CytB se secuencio en los dos sentidos utilizando uno de los primers de amplificación (ND6L1) y un primer de secuenciación (Sle2) (Tabla 1). Todas las reacciones de secuenciación se realizaron en un analizador ABI 3500 (Applied Biosystem) del Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

5.3.2.3. Revisión y Depuración de Secuencias Obtenidas.

La designación de los nucleótidos en las secuencias obtenidas se realizó utilizando el programa PeakTrace™ Basecaller (http://www.nucleics.com/peaktrace/). Las secuencias en las que se encontraron algunas posiciones mezcladas o correspondientes a haplotipos únicos o poco frecuentes se repitieron hasta tres veces para descartar un posible error de secuenciación como origen del polimorfismo. Los cromatogramas fueron revisados individualmente y las secuencias para cada individuo se ensamblaron y editaron usando el programa CodonCode Aligner 5.0.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA). Todas las secuencias correspondientes a cada región mitocondrial se alinearon usando el algoritmo de ClustalW implementado en Bioedit (Hall, 1999). Finalmente, para descartar la aparente presencia de codones de terminación prematuros, inserciones o deleciones, y por la tanto la

amplificación de pseudogenes, las secuencias se tradujeron a proteínas usando el programa MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

5.3.3 Amplificación y Genotipificación de loci microsatélite.

Debido a que en la actualidad no se cuenta con marcadores microsatélites propios para *S. leucopus*, fue necesario utilizar marcadores microsatélites aislados en especies cercanas. Dada que está implementación puede conllevar a problemas en los estudios moleculares que impiden la elaboración de estudios genéticos, se probaron previamente los marcadores para asegurarnos de su adecuado funcionamiento. Por esta razón, inicialmente se realizó una evaluación preliminar en individuos de *S. leucopus* de nueve loci microsatélite reportados inicialmente por Böhle & Zischler (2002), los cuales fueron aislados y desarrollados específicamente para *Saguinus bicolor* y probados en *S. mystax* y *S. oedipus*, especies muy cercanas a *S. leucopus*.

Inicialmente, se probaron los niveles de polimorfismo y los tamaños alélicos de estos nueve marcadores en muestras de sangre de las poblaciones naturales de *S. leucopus* (Primates: Callitrichidae) de los departamentos de Tolima, Bolívar, Caldas y Antioquia y se estandarizó un protocolo de PCR Múltiplex usando el programa Múltiplex Manager 1.2 (Holleley & Geerts, 2009). Los primers forward utilizados para la amplificación de cada locus se marcaron con el fluorocromo asignado en la PCR Múltiplex (Figura 4).

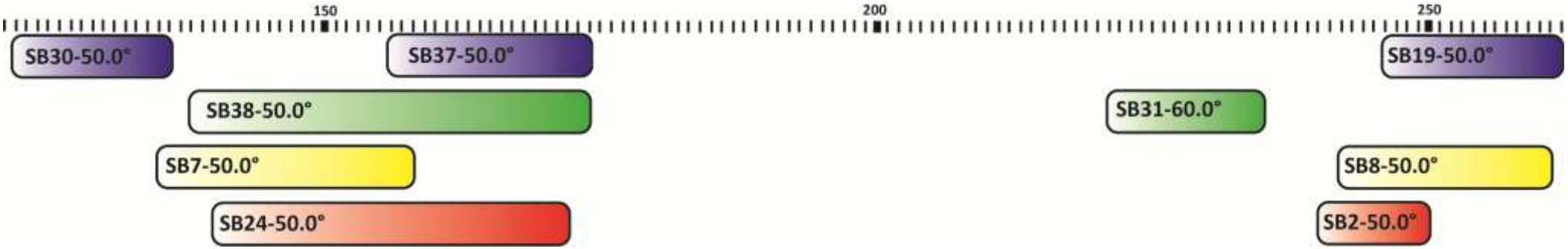
Una vez probados los niveles de polimorfismo, se amplificaron individualmente cada uno de los de nueve loci microsatélites marcados con el fluorocromo asignado para la PCR Múltiplex. Estas amplificaciones se realizaron en un volumen final de 10µL con Hot Start PCR Buffer 1X (Fermentas), 2µL de ADN extraido de bulbo de pelo, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP y 0.06U de Máxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific) con 0.5 µM de cada primer. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf comenzando con una temperatura inicial de 95°C durante 4 min, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30seg, 30 seg a 50°C y 30seg a 72°C, y un paso de extensión final de 10min a 72°C.

Con el fin de estandarizar una metodología que permitiera la amplificación de un mayor número de marcadores en una PCR Múltiplex, se realizaron diferentes amplificaciones probando todos las posibles combinaciones entre nueve loci microsatélites usando el Kit Múltiplex PCR (Qiagen) y Máxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific) en ocho muestras de sangre de las poblaciones naturales de *Saguinus leucopus* (Primates: Callitrichidae) de los departamentos más distantes en su distribución (Tolima y Bolívar). Estas reacciones de amplificación se realizaron siguiendo el protocolo descrito para el Kit Múltiplex PCR (Qiagen) en un volumen final de 12 µL con 1x QIAGEN Múltiplex PCR Master Mix (Qiagen), 2µL de ADN y 0.2 µM de cada primer. Estas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador comenzando con una temperatura inicial de 95°C durante 15 min, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30seg, 90 seg a 57°C y 1min a 72°C, y un paso de extensión final de 30min a 60°C. Las amplificaciones con Máxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific), se realizaron siguiendo las condiciones descritas para las amplificaciones individuales.

Durante la estandarización de la amplificación se ajustó la concentración de primer de cada marcador para obtener una amplificación que permitiera obtener las intensidades necesarias para correr los fragmentos en el en el analizador ABI 3500 (Applied Biosystem).

La amplificación de productos se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5% teñidos con SYBR® safe. A parir de los resultados visualizados en los geles se realizaron diluciones y se enviaron 10µl para ser corridos en el analizador ABI 3500 (Applied Biosystem), usando como marcador de peso molecular LIZ 600 en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Los datos obtenidos se editaron y analizaron usando el programa GeneMapper® (Applied Biosystems®), mediante el cual se realizó la asignación alélica.

Figura 4. PCR Multiplex diseñada para *S. leucopus* a partir de nueve marcadores microsatélites descritos por Böhle & Zischler (2002).



Para cada recuadro: el tamaño corresponde al rango de tamaño alelico de cada marcador, el color corresponde al fluorocromo asignado a cada marcador (Azul=6-FAM; Verde=VIC; Amarillo=NED y Rojo=PET) y los códigos al interior corresponde al nombre de cada marcador y la temperatura de anillamiento. Los números en la escala superior corresponden a pares de bases (bp).

Estas amplificaciones permitieron evaluar no sólo el efecto de todas las posibles combinaciones entre los nueve loci microsatélites sobre el genotipo obtenido para cada individuo, sino también la replicabilidad de los genotipos obtenidos a partir de ADN extraído de muestras de sangre. En esta evaluación se encontraron inconsistencias en los genotipos de algunos individuos, asociado principalmente a la presencia de más de dos alelos producto del quimerismo reportado en los Callitrichidae (Ross *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2012). Debido a que se ha reportado que las muestras de pelo exhiben menores niveles de quimerismo (Ross *et al.*, 2007; Tachibana *et al.*, 2012), fue necesario volver a estandarizar una metodología de PCR Múltiplex usando ADN obtenido de muestras de pelo de los mismos ocho individuos genotipificados previamente con muestras de sangre. De igual forma con estas muestras de pelo también se realizaron diferentes amplificaciones probando todos las posibles combinaciones entre nueve loci microsatélites usando el Kit Múltiplex PCR (Qiagen) y Máxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific). Al final se eligió la combinación de marcadores, la concentración de primer y los protocolos de amplificación que permitieran la asignación del genotipo de todos los individuos usando muestras de pelos para disminuir la posibilidad de errores del genotipado producto del quimerismo.

Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5% teñidos con SYBR® safe. A partir de estos geles se realizaron diluciones dependiendo de la intensidad de los productos amplificados para cada individuo, obteniendo un volumen final de 10µl para ser corridos en el analizador ABI 3500 (Applied Biosystem) usando como marcador de peso molecular LIZ 600 en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Los datos obtenidos se editaron y analizaron usando el programa GeneMapper® (Applied Biosystems®), mediante el cual se realizó la asignación alélica.

5.3.4 Análisis de Datos

Marcadores Mitocondriales (Análisis filogenéticos y filogeográficos).

Para establecer las inferencias de las relaciones filogenéticas y evolutivas de los individuos muestreados se realizaron análisis para cada uno de las regiones mitocondriales y también se realizaron análisis concatenando las regiones CytB y HpvI-RC. Inicialmente se determinó el mejor modelo mutacional para cada uno de estos individualmente y luego concatenados usando el programa JModeltest (Darriba *et al.*, 2012). Para determinar las relaciones filogenéticas se usaron cuatro métodos de inferencia: Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining, Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano.

Las relaciones filogenéticas con el método de Neighbour-Joining se realizaron implementado el programa MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013) con bootstrap de 10000 réplicas. Para realizar el análisis de Máxima Parsimonia se usó el software PAUP v4.0 (Swofford, 2002) con bootstrap de 20000 réplicas. Para realizar la reconstrucción filogenética con Máxima Verosimilitud (ML) se usó el software GARLI v2.0 (Zwickl, 2006) con bootstrap de 20000 réplicas. La reconstrucción filogenética Bayesiana se realizó usando el software MrBayes 3.2.5 (Ronquist *et al.*, 2012), corriendo 4 Cadenas de Markov Monte Carlo para 100000 generaciones, con muestreo cada 100 generaciones, descartando un 10% de *burn in*. Para verificar la consistencia de las topologías obtenidas para cada método de inferencia se realizaron varias corridas independientes.

De igual forma, se estimaron las relaciones filogenéticas entre los individuos realizando una red de haplotipos basado en un procedimiento de parsimonia (Templeton *et al.*, 1998), utilizando el criterio de 95% probabilidad para conectar secuencias utilizando el programa de TCS ver. 1.21 (Clemente *et al.*, 2000). Usando las redes de haplotipos se determinó si existe alguna relación entre estructura genética histórica y la estructura geográfica de los individuos muestreados.

Utilizando los programas DNAsp (Librado & Rozas, 2009) y MEGAS6 (Tamura *et al.*, 2013) se estimó la diversidad haplotípica y nucleotídica en los individuos muestreados. Finalmente, se usaron las secuencias de ADN mitocondrial para examinar la historia demográfica de las poblaciones de *S. leucopus* usando un método coalescente *Bayesian Skyline Plot* en el programa BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Este método permite inferir variaciones en el tamaño efectivo de las poblaciones a través del tiempo. Los análisis se corrieron utilizando el criterio de selección (AIC) bajo el modelo mutacional (HKI+I). Se corrieron 25 millones de generaciones muestreando cada 1000 generaciones con un *burn in* equivalente al 10%.

Microsatélites.

Los genotipos de los individuos de las poblaciones naturales de los departamentos de Tolima, Bolívar, Caldas y Antioquia fueron obtenidos mediante el programa GenMapper v4.1 (Applied Biosystems). Para evitar sesgo en la asignación de los genotipos producto de la presencia de alelos nulos, *allele dropout* (dominancia de alelo corto), corrimientos (*stutter peaks*) o errores tipográficos, los genotipos obtenidos fueron revisados usando el software MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Posteriormente se estimaron frecuencias alélicas, equilibrio Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento, número de alelos, número efectivo de alelos por locus y heterocigocidad con los programas Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) y Fstat v2.9.3.2 (Goudet, 1995). Adicionalmente se calcularon distancias genéticas aplicando correcciones de Bonferroni para determinar los valores significativos.

Para examinar los niveles de diferenciación genética se calcularon los estadísticos de Fst y Rst. Estos estadísticos reflejan el nivel de flujo génico para todos los pares de poblaciones, Se calculó su nivel de significancia (1000 permutaciones) mediante el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Los valores de significancia se ajustaron aplicando correcciones de Bonferroni. Para establecer la presencia de estructura genética teniendo en cuenta diferentes niveles jerárquicos preestablecidos se realizó un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) a partir de los valores de Fst entre las diferentes localidades usando el

programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Los niveles jerárquicos definidos fueron grupos sociales, localidades de muestreo y regiones muestreadas.

Para determinar la existencia de una estructura genética entre los individuos muestreados se empleó el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa está basado en inferencia Bayesiana, y a partir de los datos introducidos calcula el número de grupos genéticos distintos o acervos genéticos que deberían existir para que cada una de ellos estuviera en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los análisis con el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) se realizaron para modelos ancestrales (mezclado y no mezclado) y modelos de frecuencias alélicas (correlacionadas y no correlacionadas) usando una Cadena de Markov Monte-Carlo (MCMC) de 500000 repeticiones y un *burn-in* equivalente al 10%. Además, se asignó un rango para el valor de K (número de grupos genéticos distintitos) desde 1 hasta 19 (número de grupos sociales muestreados) con 10 iteraciones para cada uno de los modelos evaluados. A partir de los resultados obtenidos se estimó el número de grupos (K) que mejor se ajusta a los datos. Para esto se usó el software en línea Structure Harvester v0.6.94 (Earl & vonHoldt, 2012) usando el método descrito por Evanno *et al.* (2005).

6. RESULTADOS

6.1 Marcadores Mitocondriales.

6.1.1 Citocromo Oxidasa C Subunidad II (COXII).

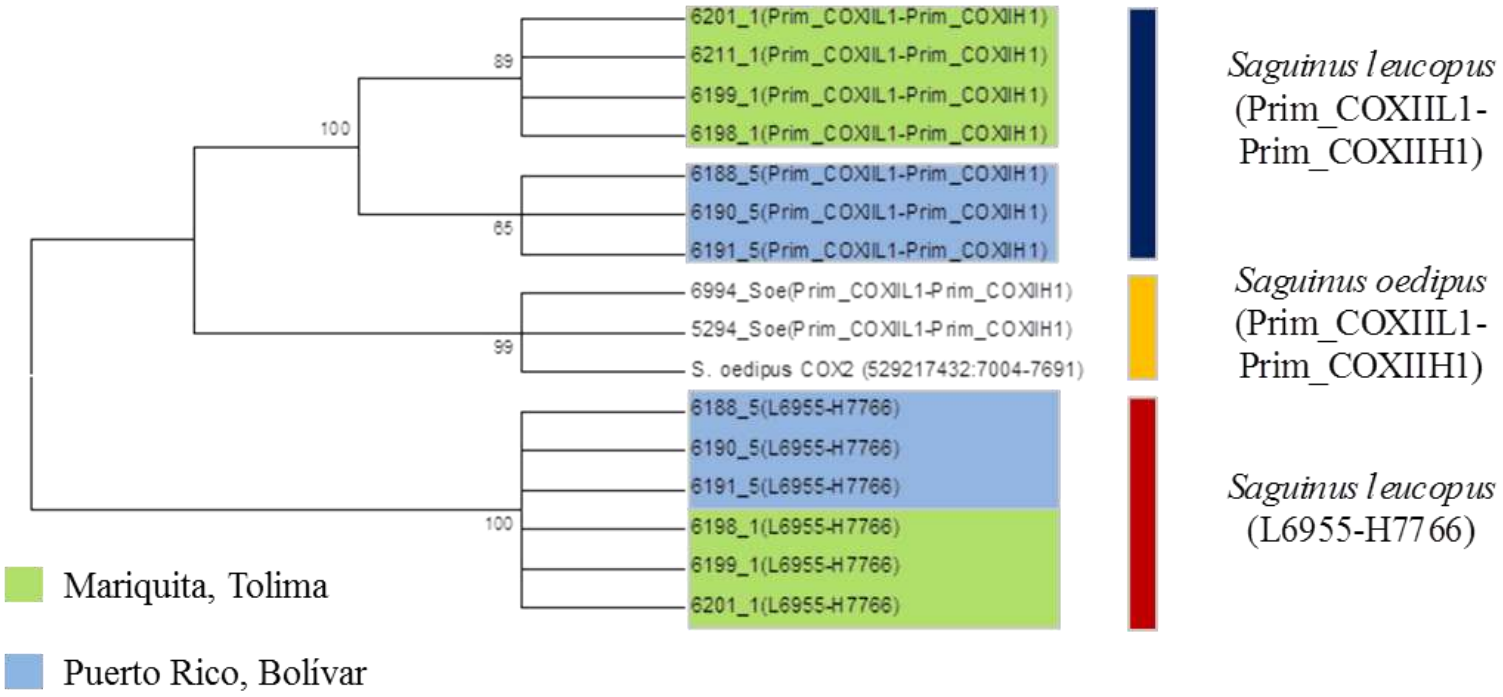
En las pruebas iniciales realizadas con este gen mitocondrial, se analizaron seis individuos de los dos puntos de muestreo más distantes (Mariquita-Tolima y Puerto Rico-Bolívar), usando dos parejas de primers: Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 (Tabla 1) y L6955-H7766 (Ruiz-Garcia *et al.*, 2010; Ruiz-Garcia *et al.*, 2014). El fragmento obtenido con los primers incluia los tRNA al inicio (Ser-Asp) y al final (Lys) del gen COXII, obteniendo secuencias con un tamaño de 749pb con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 y 748pb con los primers de L6955-H7766. Para identificar el inicio del gen COXII, se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia completa de COXII del genoma mitocondrial de *S. oedipus* (gi|529217432:7004-7691), se delimitó el inicio y el final del gen basado en la homología con los tRNA. Después de hacer dicho proceso se encontraron diferencias en el tamaño de las secuencias del gen COXII obtenida con los primers L6955-H7766 (690pb) y las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 (688pb), estas diferencias encontradas están asociadas a inserciones y deleciones encontradas la secuencia obtenida con los primers L6955-H7766 en comparación con la secuencia completa de COXII del genoma mitocondrial de *S. oedipus* (gi|529217432:7004-7691) y la secuencia las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1.

Luego de alinear las secuencias éstas se tradujeron, para identificar la presencia de codones de parada en los tres marcos de lectura. Identificando codones de parada en dos marcos de lectura para las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 (1: 0, 2: 18, 3:21), mientras que para las secuencias obtenidas con los primers L6955-H7766 se identificaron codones de parada en los tres marcos de lectura (1: 11, 2: 26, 3:8).

Los resultados de los análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas para las dos parejas de primers, revelaron la presencia de tres grupos monofiléticos: 1) Grupo conformado por

las secuencias de los individuos de *S. leucopus* obtenidas con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1, 2) Grupo conformado por las secuencias de individuos de *S. oedipus* obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 y la secuencia de *S. oedipus* obtenida del genoma mitocondrial gi|529217432:7004-7691 y 3) Grupo conformado por las secuencias de los individuos de *S. leucopus* obtenidas con los primers L6955-H7766 (Figura 5). A pesar de ser un número muy reducido de individuos, en el grupo de las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 se lograron recuperar dos linajes correspondientes al origen geográfico de los individuos muestreados (Mariquita-Tolima y Puerto Rico-Bolívar) con una distancia genética no corregida de 0.2% (S.E.=0.001).

Figura 5. Árbol filogenético basado en Neighbour-Joining (Kimura-2p) de secuencias de *S. leucopus* y *S. oedipus* obtenidas con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 y L6955-H7766.



Se incluye la secuencia de COXII de *S. oedipus* obtenida del genoma mitocondrial reportado en Genbank (gi|529217432:7004-7691). El soporte de las ramas corresponde a valores de bootstrap para 1000 repeticiones. Los colores de los clados indican la procedencia geográfica

Las distancias genéticas entre los dos grupos obtenidos de secuencias para los mismos individuos de *S. leucopus* fue mayor con los pares de primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 y L6955-H7766 (Distancia Genética no corregida=20.5%, S.E.=0.015), que entre las secuencias de *S. leucopus* y *S. œdipus* obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 (Distancia Genética no corregida=6.1%, S.E.=0.009) y obtenidas con los primers L6955-H7766 (Distancia Genética no corregida=19%, S.E.=0.015) (Tabla 2).

Tabla 2. Distancias genéticas no corregidas obtenidas con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 y L6955-H7766.

	1	**2**	**3**
Sle_(Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1)		0,009	0,015
Soe_(Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1-GenBanK)	6.1%		0,015
Sle_(L6955-H7766)	20.5%	19.1%	

Las distancias fueron calculadas entre las secuencias de *S. leucopus* (Sle) y *S. oedipus* (Soe). En azul se muestra las desviaciones estándar para cada comparación.

La magnitud de la distancia genética estimada entre secuencias para *S. leucopus* generadas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 y L6955-H7766, así como las inserciones y los codones de parada identificados al interior de las secuencias obtenidas con L6955-H7766, indica que las secuencias generados con estos primers (L6955-H7766) corresponden a un pseudogén: es decir una secuencia nucleotidíca similar a un gen normal pero que no da como resultado un producto funcional, es decir, que no se expresa (Woischnik & Moraes, 2002; Zhang *et al.*, 2010). Por ende, las secuencias generadas con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 corresponden al gen mitocondrial funcional.

Partiendo del hecho que las secuencias generadas con los primers L6955-H7766 corresponden a un pseudogén, el paso a seguir es identificar la ubicación de este pseudogen: es decir si es una copia del gen insertado en el genoma mitocondrial o en el genoma nuclear. Una posibilidad para identificar esto seria comparar el pseudogén con el genoma nuclear o el genoma mitocondrial; la ausencia del pseudogén en el genoma mtDNA indicaría que es una copia insertada en el genoma nuclear (NUMTs), y viceversa.

Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con el genoma nuclear ni mitocondrial de *S. leucopus*. Una estrategia alternativa seria aislar el genoma mitocondrial (mediante el uso de gradientes de CsCl o Kits comerciales, amplificación de amplio rango, diluciones seriales de extracciones de ADN, entre otros) y repetir las amplificaciones como se ha hecho en muchos estudios (Ibarguchi *et al.*, 2006; Soto-Calderón *et al.*, 2013): la ausencia de la amplificación con los primers L6955-H7766 indicaria que el pseudogén se encuentra en el genoma nuclear, y viceversa.

A pesar de que no se cuenta con el genoma mitocondrial ni nuclear de *S. leucopus*, se encuentra disponible el genoma mitocondrial para *S. oedipus*, taxón hermano de *S. leucopus*. Comparaciones realizadas con BLAST revelaron bajos porcentajes de identidad (80%) entre las secuencias obtenidas para COXII en *S. leucopus* con los primers L6955-H7766 y el genoma mitocondrial de referencia para *S. oedipus* (gi|529217432:7004-7691), en comparación con los porcentajes de identidad de las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 (94.04%). Este concuerda con la descripción original del genoma mitocondrial de referencia de *S. oedipus* (gi|529217432:7004-7691), en el cual no se reportaron copias adicionales del gen COXII. Estos resultados sugieren dos posibilidades: 1) que el pseudogén se encuentre restringido al genoma mitocondrial de *S. leucopus* teniendo un origen después de la separación de las dos especies (siendo la perdidad del pseudogén en *S. oedipus* muy impropable), o 2) que el pseudogén se ubique en el genoma nuclear. Para dilucidar entre estas dos posibilidades se requiere aislar el genoma mitocondrial de *S. leucopus* o el genoma nuclear de *S. oedipus* y repetir la amplificacion, un procedimiento fuera del alcance del presente estudio. Sin embargo, el porcentaje de identidad (94.04%) encontrado entre las secuencias obtenidas para COXII en *S. leucopus* y el genoma mitocondrial de referencia para *S. oedipus* (gi|529217432:7004-7691) reveló que las secuencias obtenidas con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 son ortólogas con la secuencia de COXII reportada en el genoma mitocondrial para *S. oedipus*.

Dadas estas evidencias que indican la amplificación de un pseudogén con los primers L6955-H7766, se decidió utilizar los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 para la amplificación del gen COXII en *S. leucopus*.

Tabla 3. A. Sitios variables para cinco haplotipos mitocondriales encontrados en individuos de *S. leucopus* (Sle) y *S. oedipus* (Soe) utilizando el gen COXII (682pb), obtenidos con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1.(N) el núero total de individuos para cada haplotipo. **B.** Distribución de los cuatro haplotipos mitocondriales encontrados en individuos de *S. leucopus* (Sle) utilizando el gen COXII (682pb)(Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1) en los cinco localidades muestreadas.

A.

Haplotipo	Secuencia Referencia	N	9	21	30	39	84	96	11	114	126	153	159	192	198	207	222	258	273	276	306	327	333	340	348	354	357	372	375	376	381	387	390	411	423	426	447	495	496	544	552	561	576	597	603	621	636
Sle1	2-6147	43	T	G	C	T	C	C	G	C	T	T	C	T	A	C	T	C	C	T	G	T	T	T	C	C	C	T	C	T	G	A	G	T	C	A	C	A	C	T	T	C	C	G	C	C	C
Sle2	3-6171	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
Sle3	3-6174	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sle4	5-6187	4	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Soe1	So-5294	2	C	A	T	C	T	T	A	T	A	A	.	C	G	T	C	T	T	C	A	C	C	C	T	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	G	T	G	T	C	C	A	T	A	.	T	T

B.

Haplotipo	Secuencia Referencia	N	SUR		CENTRAL		NORTE
			Tolima	Caldas	Antioquia		Bolivar
			1	2	3	4	5
Sle1	2-6147	43	18	14	5	6	
Sle2	3-6171	2			2		
Sle3	3-6174	4			3	1	
Sle4	5-6187	4					4

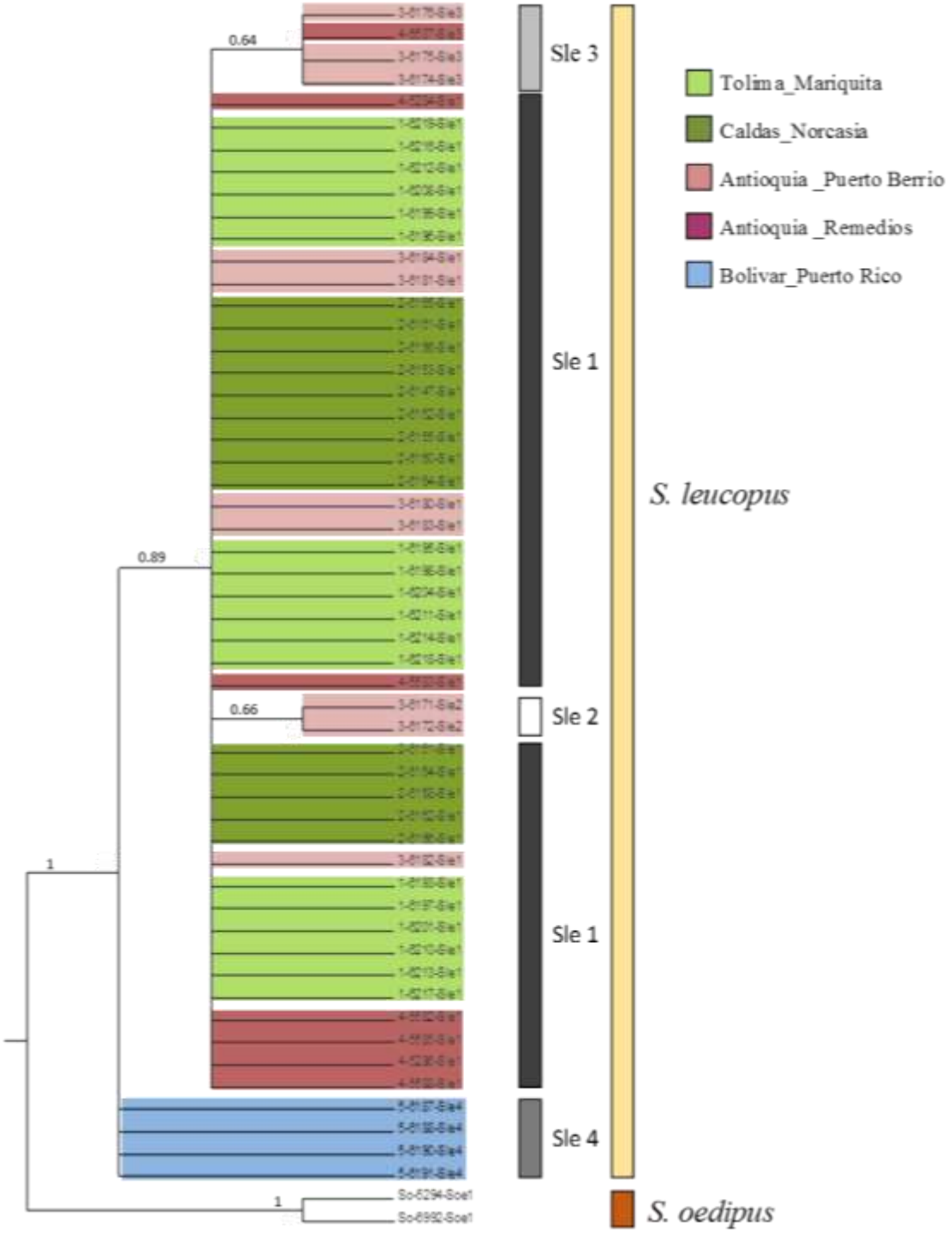
1) Tolima, Mariquita; 2) Caldas, Norcasia; 3) Antioquia, Puerto Berrío; 4) Antioquia, Remedios y 5) Bolívar, Puerto Rico.

Usando los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1, en total se obtuvieron secuencias del gen COXII para 55 individuos (adultos y juveniles), 53 individuos corresponden a *S. leucopus* silvestres distribuido a lo largo de todo su rango de distribución, en los departamentos de Tolima (Mariquita=18), Caldas (Norcasia=14), Antioquia (Puerto Berrío=10 y Remedios=7) y Bolívar (Puerto Rico=4). Los dos individuos restantes corresponden a *S. oedipus* en cautiverio descritos anteriormente.

Con los primers Prim_COXIIL1- Prim_COXIIH1 se obtuvo un fragmento de 682pb del gen Citocromo Oxidasa C Subunidad II (COXII). En las 55 secuencias analizadas se encontraron un total de 45 sitios polimórficos correspondientes a cinco haplotipos (Hd=0.382 +/- 0.081, π=0.00518 +/- 0.00292, k=3.531 +/- 0.121). En las muestras exclusivas de *S. leucopus* se reportan cuatro sitios polimórficos que corresponden al mismo número de haplotipos distribuidos en las cincos sitios de muestreo (Hd=0.335 +/- 0.080, π=0.00073 +/- 0,00020, k=0.501 +/- 0.007). Entre las muestras de *S. oedipus* no se encontraron sitios polimórficos conformando un único haplotipo (Tabla 3). Entre *S. leucopus* y *S. oedipus* se encontraron 41 diferencias fijas con 4 sustituciones polimórficas en *S. leucopus* pero monomórficas en *S. oedipus*.

Todos los análisis filogenéticos (Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining, Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano) permitieron recuperar la misma topología para los 55 individuos analizados para un fragmento de 682pb del gen COXII. Estas topologías revelaron la presencia de dos Haplogrupos bien diferenciados, el primer haplogrupo incluye a los 53 individuos silvestres de *S. leucopus* que se encuentran a lo largo de todo su rango de distribución y el segundo haplogrupo corresponde a los dos individuos de *S. oedipus* con un alto soporte (Probabilidad Posterior=1.0) (Figura 6). De esta forma, podemos afirmar que el fragmento de 682pb del gen COXII obtenido con los primers Prim_COXIIL1-Prim_COXIIH1 recupera dos grupos monofileticamente distintos con las secuencias de *S. leucopus* y *S. oedipus*.

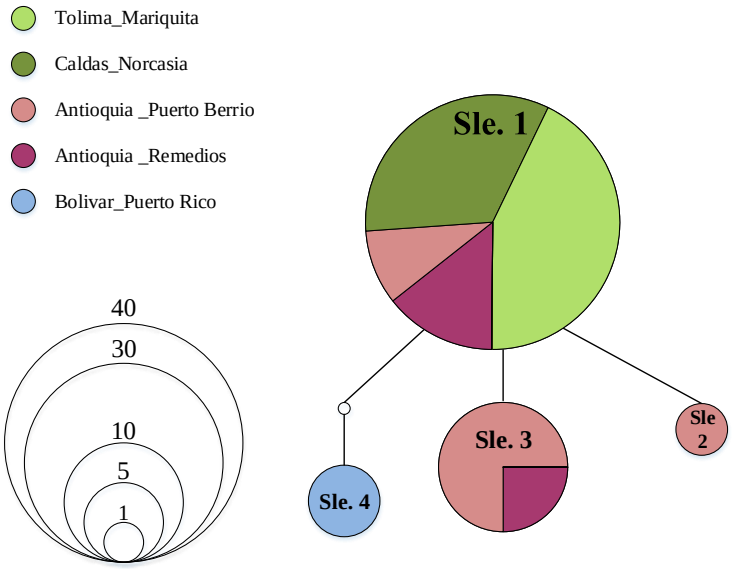
Figura 6. Árbol filogenético Bayesiano de haplotipos del gen COXII (682pb) para 55 individuos de *S. leucopus* (Sle) y 2 individuos de *S. oedipus* (Soe).



Los valores en los nodos corresponden a las pobabilidades posteriores, los analisis se realizaron usando un modelo de sustitucion HKY, 4 MCMC para 100000 generaciones, con un 10% de *burn in*. Los colores de los clados indican la procedencia geográfica. Las barras laterales indican el haplotipo y la especie a la cual corresponde cada grupo encontrado.

Al interior de *S. leucopus* (Haplogrupo 1) se lograron recuperar cuatro linajes correspondientes a los haplotipos reportados en la red de haplotipos (Figura 7). Debido a que dentro de los linajes de *S. leucopus* recuperados en las topologías obtenidas con los diferentes métodos de inferencia filogenética no se logro resolver las relaciones entre los los linajes Sle1 con respecto a Sle2 y Sle3, fue necesario utilizar la red de haplotipos para resolver esta politomia y esclarecer las relaciones filogenéticas entre los individuos que componen los linajes Sle1, Sle2 y Sle3.

Figura 7: Red de parsimonia estadística de haplotipos en 55 individuos de *S. leucopus* (Sle) utilizando el gen COXII (682pb).



Los círculos con colores representan haplotipos encontrados en los individuos analizados; los colores en cada círculo representan cada localidad de muestreo. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Todas las líneas representan un paso mutacional y el círculo sin color representa un haplotipo que no se encuentra entre los individuos analizados.

Los resultados obtenidos tanto con los análisis filogenéticos (Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining, Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano) como con la red de haplotipos realizados con el gen COXII (682pb) para *S. leucopus*, revelaron: 1)el haplotipo Sle 1 se caracteriza por no presentar una estructura geográfica clara, debido a que es un linaje que se encuentra conformado por individuos provenientes de la región Sur (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia) y la región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-

Remedios), 2) a pesar de que los linajes correspondientes a los haplotipos Sle2 y Sle3 obtuvieron soportes bajos en las topologías obtenidas, presentaron algún nivel de estructura geográfica encontrándose restringidos a la región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios) y 3) únicamente el linaje correspondiente al haplotipo Sle 4 presento altos soportes en las topologías obtenidas, y una estructura geográfica clara, estando restringido únicamente a la región Norte (Puerto Rico-Bolívar) (Figura 7).

6.1.2 Región Hipervariable I de Región Control (HpvI-RC) y Gen Citocromo B (CytB).

En total se obtuvieron secuencias de 80 individuos (59 adultos, 18 juveniles, 3 Infantes) para los dos genes (HpvI-RC y CytB), incluyendo 78 individuos silvestres de *S. leucopus*, correspondientes a todo su rango geográfico, en los departamentos de Tolima (Mariquita=26), Caldas (Norcasia=21), Antioquia (Puerto Berrío=15 y Remedios=9) y Bolívar (Puerto Rico=7). Los dos individuos restantes corresponden a *S. oedipus* en cautiverio descritos anteriormente.

Para la HpvI-RC se obtuvo un fragmento de 419pb. En las 80 secuencias se encontraron un total de 61 sitios polimórficos, con niveles de identidad entre 88.54% y 90.93%. Entre las dos especies se encontraron 30 diferencias fijas y 2 sustituciones compartidas, 22 sustituciones polimórficas en *S. leucopus* pero monomórficas en *S. oedipus*, al igual que 9 sustituciones polimórficas en *S. oedipus* pero monomórficas en *S. leucopus.* En las muestras exclusivas de *S. leucopus* se reportaron 23 sitios polimórficos, de los cuales 22 sitios fueron informativos, que corresponden a 11 haplotipos distribuidos en los cinco sitios de muestreo (Hd=0.785 +/- 0.032, π=0.01216 +/- 0,00072, k=5.094 +/- 1.742). Para las muestras de *S. oedipus* se reportaron 11 sitios polimórficos correspondientes a dos haplotipos (Tabla 4).

El tamaño de la secuencia del gen completo CytB que se obtuvo fue de 1140pb. En las 80 secuencias obtenidas se encontraron un total de de 134 sitios polimórficos, con niveles de identidad entre 89.12% y 89.56%. Entre las dos especies se encontraron 114 diferencias fijas, con 20 sustituciones polimórficas en *S. leucopus* pero monomórficas en *S. oedipus*. Para las muestras exclusivas de *S. leucopus* se reportaron 20 sitios polimórficos, que corresponden a 11 haplotipos distribuidos en las cincos sitios de muestreo (Hd=0.796 +/- 0.033, π=0.0311 +/- 0,00036, k=3.547 +/- 1.213). En las dos muestras de *S. oedipus* no se encontraron sitios polimórficos, reportando así un único haplotipo para esta especie (Tabla 4).

Tabla 4. A. Sitios variables para 14 haplotipos encontrados en un alineamiento de 1559pb para 78 individuos de *S. leucopus* (Sle). **B.** Distribución de los 14 haplotipos encontrados en individuos de *S. leucopus* (Sle) en las cinco localidades muestreadas.

A.

			Posiciones Variables																																															
			Citocromo B																						Region Control HVI																									
																							1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
				1	2	2	2	2	3	4	5	5	6	7	7	7	7	8	8	9	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	5	5
Haplotipo	Secuencia Referencia		8	1	4	5	7	9	9	7	1	8	3	1	1	5	6	1	4	9	8	4	6	7	7	0	2	3	4	6	8	1	1	2	2	2	3	4	6	7	7	4	4	3	5
		N	4	7	0	5	3	1	9	1	9	1	3	2	4	0	8	3	9	6	8	0	8	0	8	8	4	8	1	6	6	6	9	0	1	6	8	4	1	0	1	0	3	4	1
Sle1	6145_2	29	T	C	C	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	A	T	G	C	A	C	G	G	T	G	T	T	T	C	T	A	T	A	A	C	T	A	A	A	C	A	A	G	A	T
Sle2	6165_2	1	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sle3	6153_2	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sle4	6155_2	13	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Sle5	6148_2	4	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.
Sle6	6171_3	2	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.
Sle7	5582_4	5	C	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	A	.	C
Sle8	6177_3	7	C	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	G	T	.	.	A	.	C
Sle9	5588_4	3	C	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	G	T	.	.	A	.	C
Sle10	5587_4	1	C	.	.	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	A	G	.
Sle11	6167_3	5	C	.	.	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	C	.	G	.	.	G	.	.	.	.	.	A	G	.
Sle12	6187_5	1	C	T	.	.	T	C	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	G	A	.	.
Sle13	6190_5	1	C	T	.	.	T	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	G	A	.	.
Sle14	6185_5	5	C	T	T	.	T	C	.	G	.	.	.	.	A	.	C	.	T	.	T	A	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	.	A	.	.

El alineamiento de 1559pb corresponde a las secuencias concatenadas del gen Citocromo B completo (1140pb) y a la región Hipervariable I de Region Control (419pb)

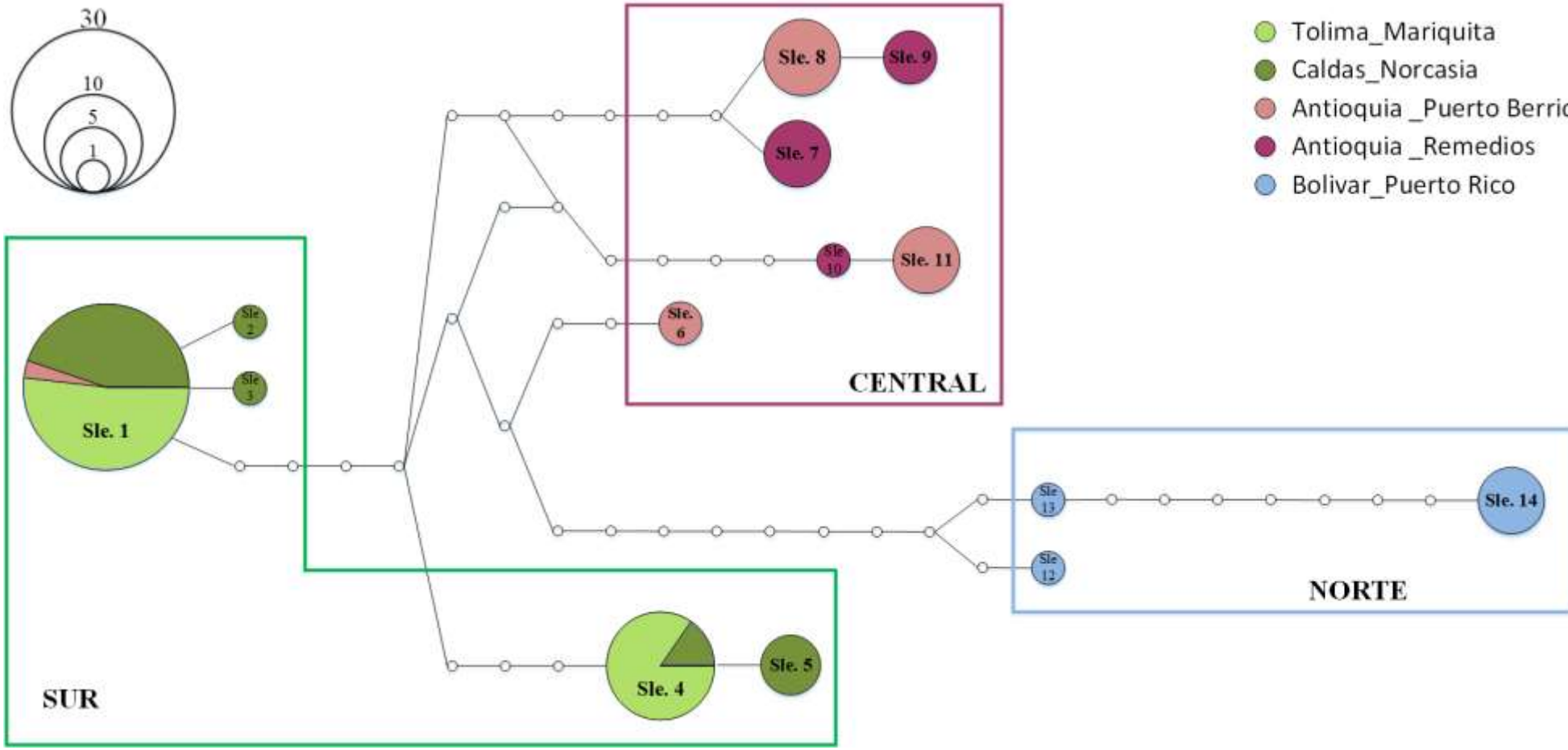
B.

Haplotipo	Secuencia Referencia	N	Región				
			Sur		Centro		Norte
			1	2	3	4	5
Sle1	6145_2	29	15	13	1		
Sle2	6165_2	1		1			
Sle3	6153_2	1		1			
Sle4	6155_2	13	11	2			
Sle5	6148_2	4		4			
Sle6	6171_3	2			2		
Sle7	5582_4	5				5	
Sle8	6177_3	7			7		
Sle9	5588_4	3				3	
Sle10	5587_4	1				1	
Sle11	6167_3	5			5		
Sle12	6187_5	1					1
Sle13	6190_5	1					1
Sle14	6185_5	5					5

1) Tolima, Mariquita; 2) Caldas, Norcasia; 3) Antioquia, Puerto Berrío; 4) Antioquia, Remedios y 5) Bolívar, Puerto Rico.

Al concatenar los dos genes HpvI-RC y CytB, se obtuvo un fragmento de 1559pb. En las 80 secuencias obtenidas se encontraron un total de 195 sitios polimórficos, con niveles de identidad entre 89.03% y 89.86% (Tabla 4 y Figura 8). Entre las dos especies se encontraron 144 diferencias fijas y 2 mutaciones compartidas, 42 sustituciones polimórficas en *S. leucopus* pero monomórficas en *S. oedipus*, al igual que 9 sustituciones polimórficas en *S. oedipus* pero monomórficas en *S. leucopus.* Para las muestras exclusivas de *S. leucopus* se reportaron 43 sitios polimórficos, de los cuales 40 sitios fueron informativos, que corresponden a 14 haplotipos distribuidos en los cinco sitios de muestreo (Hd=0.819 +/- 0.033, π=0.0554 +/- 0,00038, k=8.641 +/- 2.955). En las dos muestras de *S. oedipus* se encontraron 11 sitios polimórficos, reportando dos haplotipos para esta especie (Tabla 4).

Figura 8. Red de parsimonia estadística que muestra las relaciones entre 14 haplotipos encontrados en un alineamiento de 1559pb para 78 individuos de *S. leucopus* (Sle).



El alineamiento de 1559pb corresponde a las secuencias concatenadas del gen Citocromo B completo (1140pb) y a la región Hipervariable I de Region Control (419pb). Todas las líneas representan un paso mutacional, los colores representan las localidades de muestreo y los círculos sin color representan haplotipos que no se encuentraron entre los individuos analizados. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los haplotipos encontrados se agruparon de acuerdo a las tres regiones (Sur, Centro y Norte), correspondientes a la ubicación geográfica de los individuos analizados.

Los resultados de las redes de haplotipos realizadas para *S. leucopus*, con las dos regiones mitocondriales concatenadas (HPVI-RC + CytB), revelaron un total de 14 haplotipos, entre los cuales los dos haplotipos de mayor frecuencia son Sle1 (N=29) y Sle4 (N=13), compuestos principalmente por individuos provenientes de los puntos de muestreo que se encuentran más al sur de la distribución de la especie (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia) (Tabla 4 y Figura 8). La composición de los haplotipos encontrados está directamente asociada con la procedencia de los individuos y los grupos sociales de cada individuo. De esta forma, encontramos un grupo genético (haplotipos Sle1, Sle2, Sle3, Sle4 y Sle5), que en su mayoría contiene individuos procedentes de los puntos de muestreo que se encuentran más al sur de la distribución de la especie (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia), puntos que conforman como tal la región Sur. Igualmente, se encontró otro grupo genético (haplotipos Sle6, Sle7, Sle8, Sle9, Sle10 y Sle11), conformado exclusivamente por individuos procedentes de los puntos de muestreo que se encuentran en el centro de la distribución (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios), los cuales conforman la región Central. Finalmente, hallamos un grupo genético (haplotipos Sle12, Sle13 y Sle14) conformado por los individuos procedentes del punto de muestreo que se encuentran más al norte (Puerto Rico-Bolívar), el cual conforma la región Norte (Figura 8). La estructura geográfica fue bastante consistente con la distribución geográfica de los haplotipos encontrados, a excepción del haplotipo Sle6 que contiene dos individuos procedentes de Antioquia-Puerto Berrío (Centro), mostrando una relación más cercana al grupo genético de la región Sur. Por otro lado, encontramos haplotipos conformados exclusivamente por individuos pertenecientes a un grupo social especifico (Sle5, Sle6, Sle7, Sle8, Sle9, Sle11 y Sle14) (Tabla 4 y Tabla 5).

Las relaciones entre los haplotipos reportados y los grupos genéticos recuperados para *S. leucopus* se caracterizan por presentar una gran cantidad de pasos mutacionales o haplotipos ausentes, para lograr conectar los haplotipos o grupos pertenecientes a las diferentes regiones de origen (Figura 8). La estructura genética y geográfica encontrada en la red de haplotipos realizada con los dos marcadores mitocondriales concatenados se mantuvo en las redes de haplotipos realizadas en los análisis con los dos marcadores separados (HPVI-RC y CytB) (Figura 10).

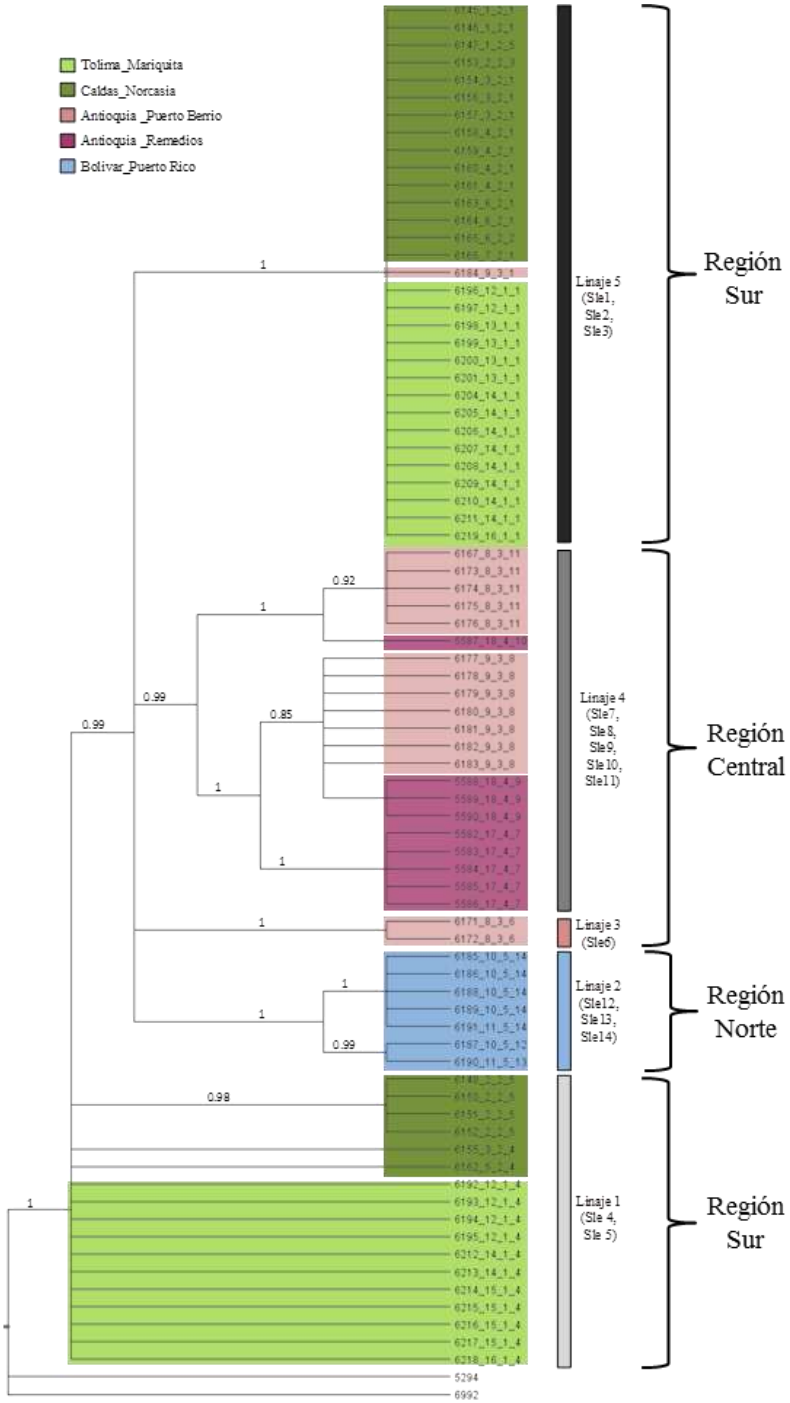
Tabla 5. Distribución de los 14 haplotipos encontrados para *S. leucopus* (Sle), en las cinco localidades de muestreo (1-5) y en los grupos sociales muestreados (GS 1-16).

		SUR												CENTRO				NORTE	
		Tolima (N=26)					Caldas (N=21)							Antioquia (N=24)				Bolívar (N=7)	
		1					2							3		4		5	
	N	**GS 12**	**GS 13**	**GS 14**	**GS 15**	**GS 16**	**GS 1**	**GS 2**	**GS 3**	**GS 4**	**GS 5**	**GS 6**	**GS 7**	**GS 8**	**GS 9**	**GS 17**	**GS 18**	**GS 10**	**GS 11**
Sle1	29	2	4	8		1	3		3	4		2	1		1				
Sle2	1											1							
Sle3	1							1											
Sle4	13	4		2	4	1			1		1								
Sle5	4							4											
Sle6	2													2					
Sle7	5															5			
Sle8	7														7				
Sle9	3																3		
Sle10	1																1		
Sle11	5													5					
Sle12	1																	1	
Sle13	1																		1
Sle14	5																	4	1
Total	**78**	**6**	**4**	**10**	**4**	**2**	**3**	**5**	**4**	**4**	**1**	**3**	**1**	**7**	**8**	**5**	**4**	**5**	**2**

1) Tolima, Mariquita; 2) Caldas, Norcasia; 3) Antioquia, Puerto Berrío; 4) Antioquia, Remedios y 5) Bolívar, Puerto Rico.

Se realizaron análisis filogenéticos y filogeográficos para los genes HPVI-RC y CytB por separado y concatenados. Los análisis filogenéticos obtenidos con los cuatro métodos de inferencia usados (Máxima Parsimonia, *Neighbour-joining*, Máxima Verosimilitud y análisis Bayesiano) recuperaron la misma topología para los 80 individuos analizados (Figura 9 y 10). Estos análisis filogenéticos revelaron la presencia de dos haplogrupos bien diferenciados, con altos soportes con todos los métodos de inferencia usados. Un primer Haplogrupo corresponde a los 78 individuos silvestres de *S. leucopus* distribuidos a lo largo de su rango geográfico; el segundo Haplogrupo corresponde a los dos individuos de *S. oedipus*. Podemos afirmar que tanto los dos marcadores mitocondriales, ya sea concatenados o por separado, soportan los dos grupos monofiléticos distintos para las secuencias de *S. leucopus* y *S. oedipus*.

Figura 9. Arbol filogenético basado en recontruccion Bayesiana para 78 individuos de *S. leucopus* (Sle) y 2 individuos de *S. oedipus* (Soe).

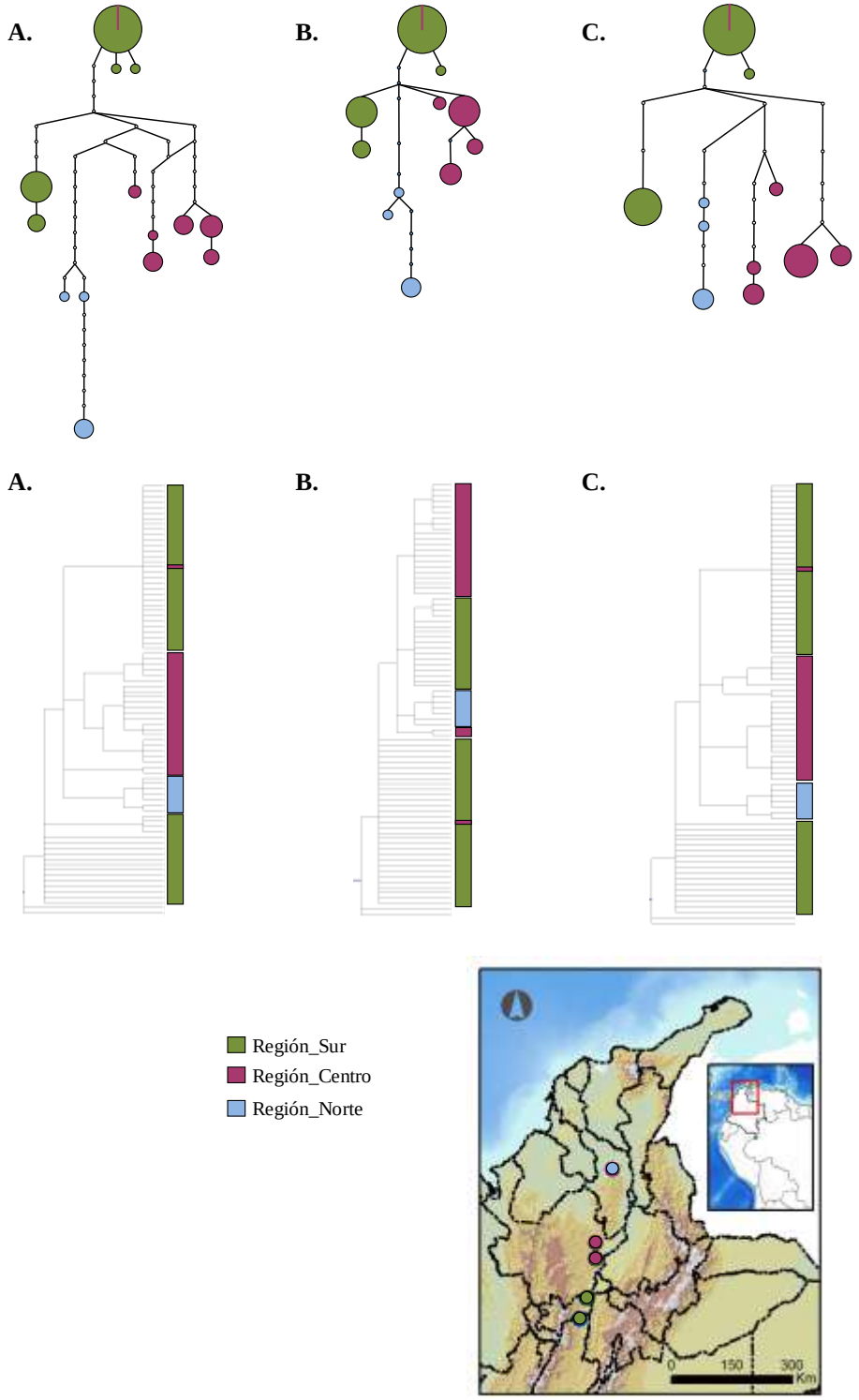


Los valores en los nodos corresponden a las probabilidades posteriores obtenidas para un alineamiento total de 1559pb correspondiente al gen CytB completo (1140pb) y a la región HPVI-RC (419pb). Modelo sustitucion HKY, 4 MCMC para 100000 generaciones, con un 10% de *burn in*. Los colores sobre los clados indican a la procedencia geográfica. Las barras laterales corresponde al linaje de cada haplotipo. Las llaves corresponden a las regiones de geográficas en la cuales se encuentran estos linajes.

Al interior del haplogrupo correspondiente a los individuos de *S. leucopus* se recuperó una estructura genética intraespecífica asociada con la procedencia de las muestras analizadas, soportando la monofilia de cinco linajes intraespecíficos, correspondientes a los grupos genéticos encontrados en las tres regiones (Sur, Centro y Norte) en la red de haplotipos realizada con los individuos de *S. leucopus* (Figura 9). La topología global de los cinco linajes intraespecíficos identificados presenta altos soportes, e inlcuso al interior de estos linajes se encuentran grupos bien delimitados y con alto soporte asociados principalmente a la conformación de los grupos sociales muestreados (Figura 9). Encontrando no solo una estructura genética al interior de *S. leucopus*, sino también una estructura geográfica (asociada con la procedencia de las muestras analizadas) y social (asociada con los grupos sociales muestreados). La estructura genética y geográfica encontrada en las topologías concuerda con la estructura encontrada en la red de haplotipos, relacionando los grupos genéticos encontrados y las regiones geográficas (Sur, Centro y Norte) de los puntos de muestreo a lo largo de la distribución de *S. leucopus.*

La topología obtenida muestra que los cinco linajes monofiléticos intraespecíficos para *S. leucopus* están separados en dos grupos. Un primer grupo está conformado por los haplotipos Sle4 y Sle5, los cuales contienen exclusivamente individuos provenientes de la región Sur (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia) y la región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios). El segundo grupo está conformado por los otros cuatro linajes restantes que parecen estar más relacionados entre sí, y que presentan una relación directa con la procedencia de los individuos analizados. De esta forma, encontramos un linaje intraespecífico monofilético conformado por los haplotipos identificados como Sle1, Sle2, Sle3 y Sle5 que se encuentran restringidos a individuos provenientes de la región Sur (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia) y a un individuo (6184_9_3_1) procedente de la zona Central (Antioquia-Puerto Berrío). Finalmente, los tres grupos restantes corresponden a haplotipos restringidos a la región Norte (Puerto Rico-Bolívar) (Sle12, 13 y 14) y la región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios) (Sle6, Sle7, Sle8, Sle9, Sle10 y Sle11).

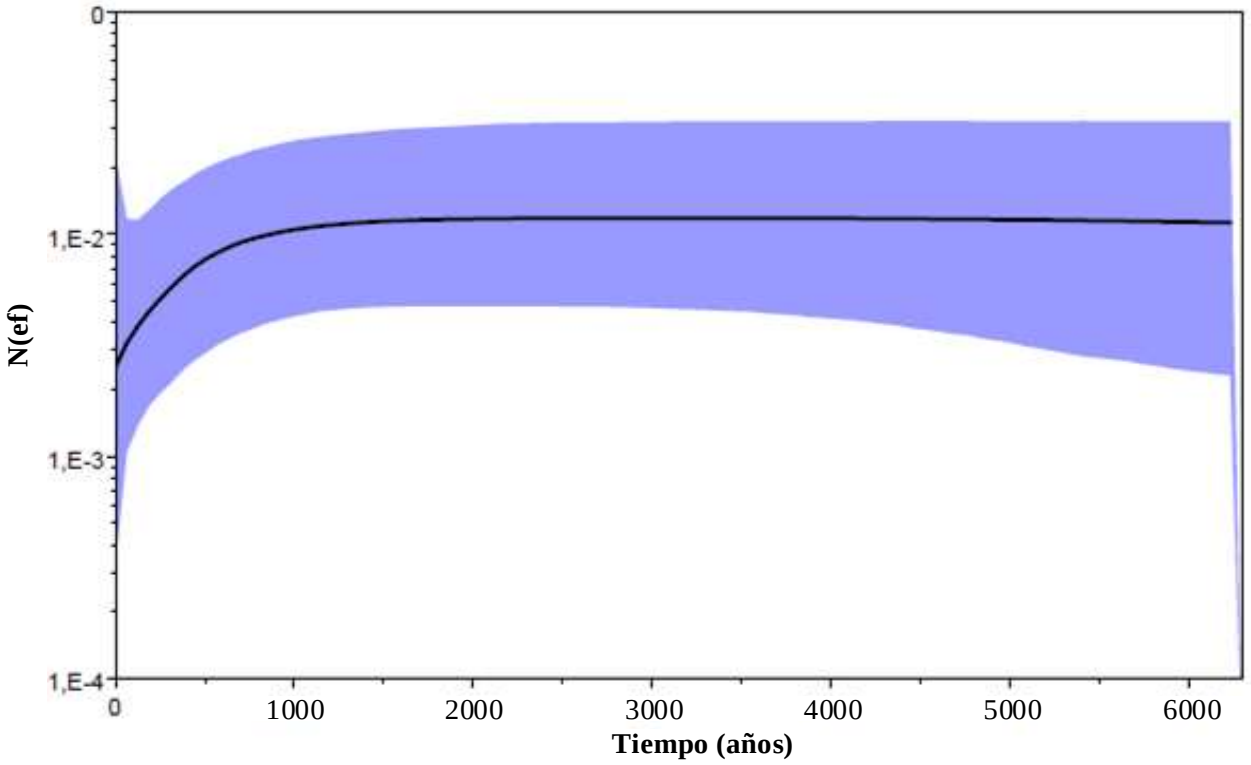
Figura 10. Comparación de Redes de haplotipos y topologías de árboles filogenéticos de recontruccion Bayesiana. **A**. Matriz con los dos genes concatenados (CytB+ HpvI-RC) **B.** CytB y **C.** HpvI-RC.



El color muestra la procedencia geográfica de los grupos encontrados, y su ubicación en el mapa.

Los resultados obtenidos para el análisis del *Skyline Plot* indican que por un largo periodo de cerca de 4000 años aproximadamente (desde hace 6000 años hasta hace 1400 años) el tamaño efectivo histórico de la población de *S. leucopus* se mantuvo estable sin presentar ningún cambio. Aproximadamente hace 1350 años el tamaño de la población comenzó a presentar una reducción, la cual comenzó a ser mayor desde hace 500 años, siendo más pronunciada desde hace 200 años. De esta forma los análisis realizados indican que la población de *S. leucopus* está sufriendo una reducción en su tamaño efectivo, la cual ha aumentado en los últimos años (Figura 11).

Figura 11. *Skyline Plot* de los cambios en el tamaño efectivo de la población femenina (Nef) de *S. leucopus* a través del tiempo en miles de años antes del presente.



En el eje X (0) representa el tiempo presente. Los calculos fueron generados usando un alineamiento de ADN mitocondrial total de 1559pb (CytB (1140pb) y HPVI-RC (419pb)) en 78 de *S. leucopus*. Se corrieron 25 millones de generaciones muestreando cada 1000 generaciones con un *burn in* equivalente al 10%. Se muestra la mediana (línea negra) y los intervalos de confianza superiores al 95% HPD (sombreado azul).

6.1.3 Datos de Marcadores Microsatélites.

6.1.3.1. Variabilidad Genética.

En total se obtuvieron los genotipos de nueve marcadores microsatélites para 56 individuos (44 adultos, 11 juveniles y 1 infante), correspondientes a *S. leucopus* silvestres distribuidos a lo largo de su rango geográfico en los departamentos de Tolima (Mariquita=12), Caldas (Norcasia=14), Antioquia (Puerto Berrío=17 y Remedios=6) y Bolívar (Puerto Rico=7). Los 56 individuos analizados corresponden a 14 grupos sociales distribuidos a lo largo de distribución de *S. leucopus* (Tabla 8). En las repeticiones realizadas para cada uno de los marcadores no se encontraron errores de genotipificación en ninguno de los loci utilizados para realizar el estudio (Tabla 6). En general, los loci fueron altamente polimórficos, con 8.77 alelos (Na) en promedio en toda la población; el locus SB38 presentó el mayor número de alelos (Na=13) y el locus SB31 el menor (Na=6). La heterogocidad observada en todo la población fue alta (Ho promedio=0.71). El locus con mayor heterogocidad observada fue el SB38 (Ho=0.85) y el locus SB24 con la menor (Ho=0.59) (Tabla 6). El número de alelos fue variable en todas las localidades (Tabla 6).

El análisis con marcadores microsatélites evidenció que la localidad de Tolima-Mariquita (Na=3.44, Ho=0.61) presentó la menor diversidad genética, mientras que la localidad de Antioquia-Puerto Berrío (Na=5.00; Ho=0.75) presento la mayor diversidad. En general las localidades ubicadas en el Centro (Antioquia-Puerto Berrío; Antioquia-Remedios, Na=4.56, Ho=0,76) y Norte (Puerto Rico-Bolívar, Na=4.67, Ho=0.76) son las que presentan mayor diversidad genética, mientras que las localidades en el Sur (Tolima-Mariquita Na=3.44, Ho=0.61; Caldas-Norcasia Na=4.78, Ho=0.66) fueron las que presentaron menor diversidad genética.

El menor número efectivo de alelos (Ne) se reportó en la localidad de Tolima-Mariquita (Promedio Ne=3.16), mientras que Antioquia-Remedios presentó el mayor (Promedio Ne=5.00) (Tabla 6). Se encontraron desviaciones del Equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) para tres localidades: 1) Tolima-Mariquita (SB30), 2) Caldas-Norcasia (SB7) y 3) Antioquia-Remedios (SB30). De acuerdo al coeficiente de endogamia (Fis) reportado para

cada localidad, estos desequilibrios están asociados con la existencia de un exceso de homocigotos en estas localidades (Tolima-Mariquita Fis=0.23; Caldas-Norcasia Fis=0.33; Antioquia-Remedios Fis=0.57) (Tabla 6).

6.1.3.2. Estructura Genética.

Todos los valores de Fst obtenidos para las comparaciones entre las localidades de muestreo fueron significativos ($p<0.01$) y presentaron niveles de diferenciación genética entre 0.058 y 0.305 (para el presente estudio consideramos valores de Fst $\leq$ 0.14 como bajos, valores de Fst>0.14 y $\leq$ 0.222 moderados y Fst $\geq$ 0.304 altos). Los valores de Fst entre las localidades de muestreo evidenciaron que los niveles de diferenciación genética más bajos se encontraron en las localidades geográficamente más cercanas y ubicadas en la misma región Sur (Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia, Fst=0.058) y región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios, Fst=0.091). El grado de diferenciación entre estas dos regiones (Sur y Central) fue moderado (en promedio Fst=0.252). Los valores de diferenciación genética (Fst) más altos fueron los obtenidos entre las localidades geográficamente más alejadas, es decir entre la localidad más al Sur de la distribución (Tolima-Mariquita) y la localidad más al Norte (Puerto Rico-Bolívar) (Fst=0.305). En contraste con esto el índice de diferenciación encontrado entre la región Norte (Puerto Rico-Bolívar) y las localidades de la región Central (Antioquia-Puerto Berrío y Antioquia-Remedios) (Fst=0.18) fue menor al con las localidades de la región Sur (Puerto Rico-Bolívar y Tolima-Mariquita Fst=0.305; Puerto Rico-Bolívar y Caldas-Norcasia Fst=0.217) y entre las localidades de la región Sur y Central (en promedio Fst=0.252), evidenciando los bajos niveles de diferenciación genética (Fst) entre la región Norte y Central.

Tabla 6. Diversidad genética y equilibrio Hardy-Weinberg para nueve marcadores microsatélite en cinco localidades. Na: número de alelos, Ne: Numero de alelos efectivos, Ho: Heterocigocidad observada, He: Heterocigocidad esperada, Fis: Coeficiente de endogamia y EHW: Valor p para la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg. En azul se resaltan los loci fuera de equilibrio ($p<0.05$). Los valores negativos para el coeficiente de endogamia (Fis) indican un exceso de heterocigotos en las localidades muestreadas (rojo) y los positivos indican un exceso de homocigotos.

		Total	Tolima_Mariquita	Caldas_Norcasia	Antioquia_Puerto Berrio	Antioquia_Remedios	Bolivar_Puerto Rico	Mean
		56	12	14	17	6	7	
SB2	Rango de tamaño alélico	11	8	9	7	2	9	7
	Diversidad		0,62	0,77	0,52	0,47	0,58	0,59
	Na	7	3	5	4	2	4	3,60
	Ne	4,57	2,89	4,29	3,34	2	3,84	3,27
	Ho	0,65	0,75	0,71	0,53	0,67	0,57	0,65
	He	0,76	0,63	0,76	0,52	0,48	0,58	0,60
	Fis		-0,21	0,07	-0,02	-0,43	0,02	
	EHW		0,34	0,51	0,79	1	0,44	
SB7	Rango de tamaño alélico	30	21	22	18	10	23	18,8
	Diversidad		0,75	0,74	0,76	0,72	0,67	0,73
	Na	10	5	6	5	4	4	4,80
	Ne	5,86	4,63	4,68	4,43	4	3,85	4,32
	Ho	0,82	0,67	0,50	0,94	1	1	0,82
	He	0,83	0,75	0,73	0,77	0,74	0,69	0,74
	Fis		0,11	0,33	-0,24	-0,40	-0,50	
	EHW		0,28	0,001	0,31	0,35	0,27	

		Total	Tolima_Mariquita	Caldas_Norcasia	Antioquia_Puerto Berrio	Antioquia_Remedios	Bolivar_Puerto Rico	Mean
		56	12	14	17	6	7	
SB8	Rango de tamaño alélico	17	14	12	12	15	12	13
	Diversidad		0,75	0,74	0,68	0,85	0,67	0,74
	Na	9	5	6	5	6	4	5,20
	Ne	6,15	4,41	4,87	4,33	6	3,85	4,69
	Ho	0,73	0,58	0,93	0,71	1	0,43	0,73
	He	0,86	0,74	0,74	0,68	0,86	0,65	0,74
	Fis		0,22	-0,26	-0,04	-0,18	0,36	
	EHW		0,16	0,56	0,34	0,84	0,26	
SB19	Rango de tamaño alélico	14	8	8	12	14	12	10,8
	Diversidad		0,51	0,66	0,72	0,77	0,77	0,68
	Na	8	3	4	6	6	5	4,80
	Ne	4,66	2,50	3,62	4,37	6	4,70	4,24
	Ho	0,68	0,75	0,57	0,71	0,67	0,71	0,68
	He	0,78	0,52	0,65	0,71	0,76	0,77	0,6826
	Fis		-0,48	0,13	0,01	0,13	0,08	
	EHW		0,29	0,43	0,10	0,41	0,71	
SB24	Rango de tamaño alélico	19	2	4	8	12	17	8,6
	Diversidad		0,16	0,47	0,74	0,72	0,86	0,59
	Na	8	2	3	4	5	6	4
	Ne	4,46	1,76	2,42	3,73	5	5,70	3,72
	Ho	0,59	0,17	0,64	0,47	0,83	0,86	0,59
	He	0,70	0,16	0,47	0,73	0,73	0,86	0,59
	Fis		-0,05	-0,38	0,37	-0,16	0	
	EHW		1	0,47	0,13	1	0,60	
SB30	Rango de tamaño alélico	22	15	15	18	20	7	15
	Diversidad		0,76	0,76	0,79	0,78	0,66	0,75
	Na	10	5	5	7	5	4	5,20
	Ne	6,07	4,41	4,23	5,18	5	3,71	4,51
	Ho	0,67	0,58	0,71	0,88	0,33	0,86	0,67
	He	0,85	0,75	0,76	0,79	0,74	0,67	0,74
	Fis		0,23	0,07	-0,12	0,57	-0,31	
	EHW		0,05	0,56	0,99	0,01	0,44	

		Total	Tolima_Mariquita	Caldas_Norcasia	Antioquia_Puerto Berrio	Antioquia_Remedios	Bolivar_Puerto Rico	Mean
		56	12	14	17	6	7	
SB31	Rango de tamaño alélico	15	11	13	6	6	12	9,6
	Diversidad		0,48	0,68	0,64	0,78	0,71	0,66
	Na	6	2	4	3	4	5	3,60
	Ne	5	2	3,76	2,94	4	4,70	3
	Ho	0,82	0,75	0,71	0,76	1	0,86	0,82
	He	0,80	0,49	0,69	0,64	0,80	0,73	0,67
	Fis		-0,57	-0,04	-0,20	-0,28	-0,20	
	EHW		0,09	0,41	0,23	1	0,89	
SB37	Rango de tamaño alélico	16	14	8	8	10	16	11,2
	Diversidad		0,34	0,31	0,58	0,75	0,66	0,53
	Na	8	2	2	5	4	4	3,40
	Ne	4,99	1,98	1,96	3,73	4	3,85	3,1
	Ho	0,55	0,42	0,21	0,71	0,83	0,57	0,55
	He	0,77	0,34	0,30	0,59	0,76	0,65	0,53
	Fis		-0,22	0,30	-0,21	-0,11	0,13	
	EHW		1	0,35	1	1	0,25	
SB38	Rango de tamaño alélico	35	29	35	31	15	17	25,4
	Diversidad		0,69	0,88	0,84	0,58	0,82	0,76
	Na	13	4	8	6	5	6	5,80
	Ne	6,87	3,83	6,56	5,40	5	5,69	5,30
	Ho	0,85	0,83	0,93	1	0,50	1	0,85
	He	0,88	0,69	0,88	0,84	0,58	0,84	0,76
	Fis		-0,22	-0,06	-0,20	0,14	-0,22	
	EHW		1	0,19	0,38	0,51	0,30	
Mean	Rango de tamaño alélico	19,89	13,56	14	13,33	11,56	13,89	
	Na	8,78	3,44	4,78	5	4,56	4,67	
	Ne	5,39	3,16	4,04	4,16	5	4,43	
	Ho	0,71	0,61	0,66	0,75	0,76	0,76	
	He	0,80	0,56	0,67	0,70	0,72	0,71	
	Fis(total)		-0,09	0,01	-0,07	-0,07	-0,07	
	EHW							

Tabla 7. Valores de Fst (diagonal hacia abajo) y Rst (diagonal hacia arriba) para los 9 loci microsatélites entre las cinco localidades muestreadas. En azul se muestran los valores significativos (después de realizar una corrección de Bonferroni).

	Tolima-Mariquita	Caldas-Norcasia	Antioquia-P. Berrío	Antioquia-Remedios	Bolívar-P. Rico
Tolima-Mariquita		0,019	0,208	0,216	0,157
Caldas-Norcasia	0,058		0,276	0,266	0,162
Antioquia-P. Berrío	0,283	0,234		0,029	0,137
Antioquia-Remedios	0,270	0,222	0,091		0,168
Bolívar-Puerto Rico	0,305	0,217	0,180	0,180	

En azul se muestran los valores significativos después de realizar una corrección de Bonferroni ($p<0.01$).

Algunos valores de Rst obtenidos para todas las comparaciones entre localidades de muestreo no fueron significativos, a pesar de esto los valores que fueron significativos ($p<0.01$) presentaron niveles de diferenciación entre las localidades de muestreo con valores de Rst entre 0.137 y 0.276 (Tabla 7). A pesar de que los valores de Rst obtenidos entre las localidades ubicadas en la misma región (Central-Sur) no fueron significativos, estas localidades siguen teniendo los niveles de diferenciación genética más bajos lo cual concuerda con lo obtenido con los valores de Fst. De acuerdo a los valores significativos de Rst, el grado de diferenciación es similar al obtenido con Fst entre las regiones Central-Norte (promedio de Rst= 0.153) y Sur-Central (promedio de Rst=0.233). Sin embargo, con los valores de Rst se obtuvo un menor grado de diferenciación en comparación a los valores de Fst encontrados entre las regiones Sur-Norte (Rst= 0.157).

Tabla 8. Valores de Fst (diagonal hacia abajo) y Rst (diagonal hacia arriba) para los 9 loci microsatélites en los 14 grupos sociales analizados. En azul se muestran los valores significativos estadísticamente significativos (después de realizar una corrección de Bonferroni).

	Norc1 (N=3)	Norc2 (N=4)	Norc3 (N=2)	Norc4 (N=4)	Norc5 (N=1)	Mariq12 (N=4)	Mariq13 (N=3)	Mariq14 (N=5)	Remed17 (N=5)	Remed18 (N=1)	PBerrio8 (N=9)	PBerrio9 (N=8)	Bol10 (N=5)	Bol11 (N=2)
Norc1		0,557	0,418	0,169	0,455	0,357	0,294	0,236	0,693	0,462	**0,543**	0,350	0,425	0,442
Norc2	0,235		0,317	0,558	-0,156	0,011	0,255	0,251	0,361	0,241	**0,357**	0,422	0,296	0,452
Norc3	0,178	0,220		0,547	0,024	0,179	0,054	0,198	0,575	0,345	0,452	**0,419**	0,226	0,225
Norc4	0,188	0,363	0,331		0,516	0,335	0,278	0,179	0,723	0,528	**0,538**	0,397	0,525	0,597
Norc5	0,002	0,135	0,200	0,168		-0,114	0,057	0,076	0,463	0,077	0,343	0,352	0,217	0,267
Mariq12	0,131	0,169	0,198	0,185	0,016		0,014	-0,006	0,197	0,059	**0,204**	0,196	0,120	0,273
Mariq13	0,253	0,239	0,237	0,284	0,113	0,107		0,022	0,303	0,138	**0,217**	**0,162**	0,120	0,173
Mariq14	0,209	0,297	0,304	**0,146**	0,221	**0,104**	**0,251**		0,466	0,228	**0,362**	**0,240**	0,199	0,371
Remed17	0,291	0,368	0,361	**0,344**	0,242	0,294	0,347	0,362		0,132	0,050	0,214	0,349	0,399
Remed18	0,223	0,342	0,290	0,350	0,230	0,291	0,259	0,385	0,105		0,071	0,011	0,036	0,165
PBerrio8	**0,294**	**0,335**	0,330	**0,363**	0,283	**0,323**	0,343	**0,379**	0,160	0,142		0,124	**0,221**	0,302
PBerrio9	0,261	**0,329**	0,320	**0,343**	0,255	**0,280**	0,321	**0,346**	**0,156**	0,146	**0,125**		0,095	0,213
Bol10	0,256	0,296	0,338	**0,373**	0,237	0,329	0,349	**0,388**	0,265	0,209	0,259	**0,213**		0,188
Bol11	0,211	0,253	0,235	0,313	0,111	0,263	0,276	0,343	0,158	0,126	0,181	0,161	0,033	

Los valores de Fst y Rst no fueron significativos en todas las comparaciones entre grupos sociales de las localidades muestreadas, evidenciando un grado de diferenciación genética menor entre los grupos sociales, en comparación con la diferenciación genética encontrada entre las localidades de muestreo (Tabla 8). Los valores significativos permiten diferenciar algunos grupos sociales: 1) los valores de Fst evidenciaron que en la localidad (Tolima-Mariquita) el grupo social Mariq14 presenta diferencias significativas con los otros grupos sociales de esta misma localidad (Mariq12 y Mariq13) y con un grupo social de la localidad Caldas_Norcasia (Norc4), 2). Los valores de Fst y Rst evidencian una diferencia significativa entre los grupos sociales de la localidad Antioquia_Puerto Berrío (PBerrio8 y PBerrío 9) con la mayoría de grupos sociales de las localidades de Tolima-Mariquita y Caldas-Norcasia, y 3) los valores de Fst y Rst presentaron valores de diferenciación genética significativos entre el grupo social Bol10 (Puerto Rico-Bolívar) y los grupos sociales de las localidades de Tolima-Mariquita (Mariq14), Caldas-Norcasia (Norc14) y Antioquia-Puerto Berrío (PBerrio8 y PBerrio9) (Tabla 8).

Para los Análisis de Varianza Molecular se probaron tres diferentes hipótesis de agrupación de la población de *S. leucopus*: 1) Un único grupo que incluye todos los grupos sociales, 2) Cinco grupos correspondientes a las cinco localidades de muestreo, 3) Tres grupos correspondientes a las regiones en las que se encuentran las localidades de muestreadas. En las hipótesis de agrupaciones dos y tres se observaron valores significativamente similares para la varianza dentro de los grupos sociales (entre el 79,51 % al 86.97%) (Tabla 9). El mayor porcentaje de varianza explicada se da para la hipótesis de tres regiones (Sur-Central y Norte), en la cual el 22.06% de la varianza molecular es consecuencia de las diferencias entre las tres regiones. Los valores significativos mostraron, que para la hipótesis dos el 21.18% de la varianza molecular es producto de las diferencias encontradas entre las localidades de muestreo (Tabla 9). Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante la prueba de tres hipótesis de agrupación revelaron diferencias significativas entre las cinco localidades de muestreo y entre las tres regiones (Región Sur, Región Central y Región Norte), sin embargo el mayor porcentaje de varianza obtenido para la agrupación de las tres regiones indicaría una mayor variabilidad genética en las regiones en las que se encuentran las localidades de muestreadas.

Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado con los nueve loci microsatélites en las localidades: Tolima, Mariquita; Caldas, Norcasia; Antioquia, Puerto Berrío; Antioquia, Remedios y Bolívar, Puerto Rico.

Estructura Analizada Grupos Sociales	Fuente de Variacion	d.f.	Suma de Cuadrados	Componente de Variacion	Porcentaje de variacion (%)	F
1. Un grupo						
Nivel Jerarquico Menor: Grupos Sociales						
	Entre grupos sociales	55	224,643	0,47078	13,03	0,13
	Dentro de los grupos sociales	56	176	3,14286	86,97	
2 Cinco grupos (Tolima_Mariquita)-(Caldas_Norcasia)-(Antioquia_Puerto Berrio)-(Antioquia_Remedios)-(Bolivar_Puerto Rico)						
Nivel Jerarquico Menor: Grupos Sociales						
	Entre Localidades de Muestreo	4	80,6310	0,8016	21,18	0,21
	Entre grupos dentro de las localidades de muestreo	51	144,0120	-0,1595	-4,22	-0,05
	Dentro de grupos sociales	56	176,0000	3,1429	83,04	0,16
3. Tres grupos (Region Sur)(Region Central) (Region Norte)						
Nivel Jerarquico Menor: Grupos Sociales						
	Entre Regiones	2	64,656	0,872	22,06	0,22
	Entre grupos sociales dentro de Regiones	53	159,986	-0,062	-1,57	-0,06
	Dentro de grupos sociales	56	176,000	3,142	79,51	0,2

Se evaluaron diferentes estructuras utilizando como unidad jerárquica menor los grupos sociales: **1)** Un único grupo que incluye las cinco localidades muestreadas; **2)** Cinco grupos correspondientes a las cinco localidades muestreadas; **3)** Tres grupos correspondientes a las regiones en las que se encuentran las localidades muestreadas. En azul se muestran los valores significativos ($p<0.05$). F corresponde a valores de FST

En todos los modelos evaluados resultados con Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) el K más probable fue tres (K=3), indicando que este es el número teorico de grupos que mejor se ajusta a los individuos analizados. De esta forma, los resultados obtenidos con Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) sugieren la existencia de tres acervos genéticos principales en los 56 individuos de *S. leucopus* (Figura 12).

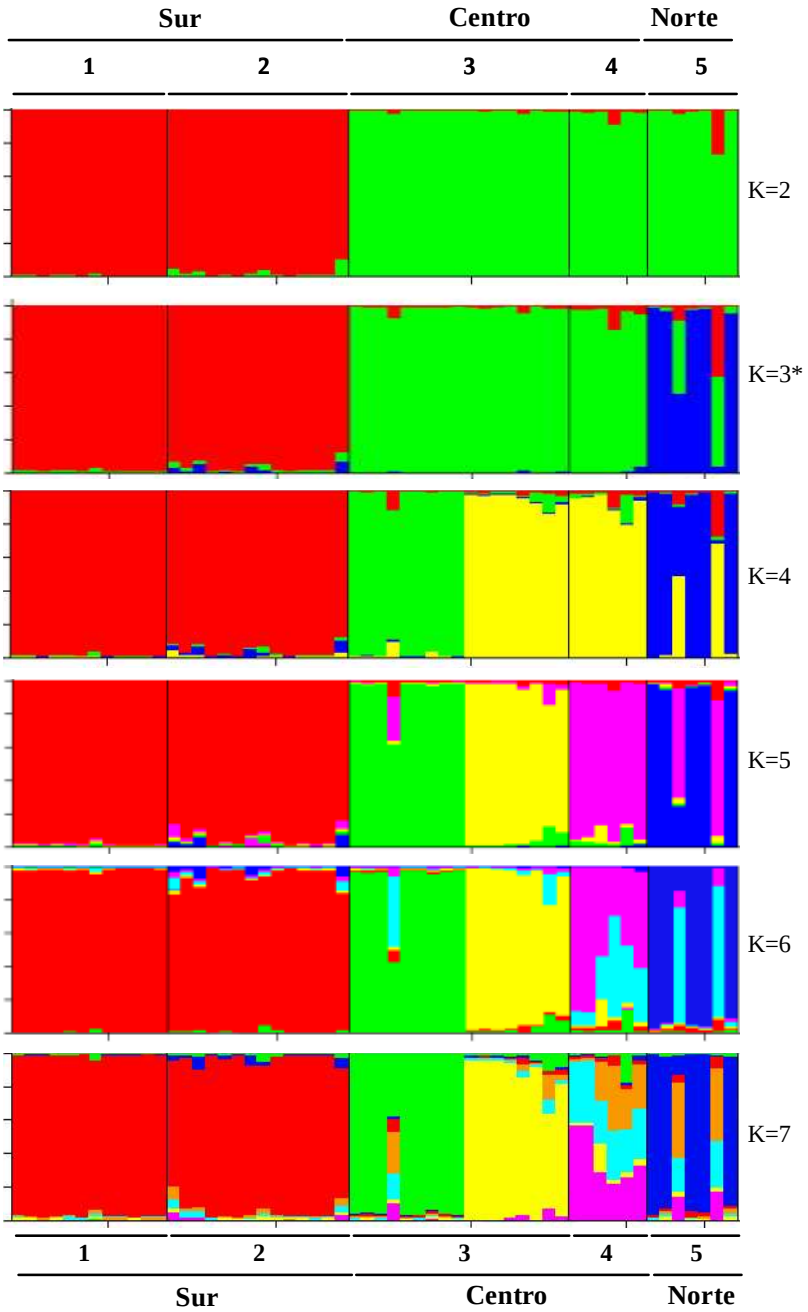
En un primer acervo genético principal se encuentran las localidades de Tolima_Mariquita y Caldas_Norcasia (Región Sur), las cuales forman un acervo genético independiente, que se mantiene a medida que aumentamos el K. Un segundo acervo genético principal se encuentra conformado por individuos de la localidad de Antioquia, dentro del cual se evidenció la presencia de subestructura a medida que se aumentaba el K. Esta subestructura encontrada al interior del segundo acervo principal está formada por dos grupos: un primer grupo conformado exclusivamente por individuos de la localidad de Antioquia_Puerto Berrío correspondientes al mismo grupo social (GS 8) el cual se mantiene independiente a medida que se aumenta el número de K, y un segundo grupo formado por algunos individuos de la localidad de Antioquia_Puerto Berrío (correspondientes a dos grupo sociales GS 8 y GS 9) y por todos los individuos de la localidad de Antioquia _Remedios. A medida que se aumenta el K este subgrupo se divide en dos acervos genéticos independientes correspondientes a los individuos de la localidad de Antioquia_Puerto Berrío y Antioquia _Remedios, lo cual evidencia que estos individuos pertenecen al mismo acervo principal pero existe una diferenciación genética entre ellos que los separa en dos grupos independientes que se mantienen a medida que se aumenta el K (desde K=4 hasta K=7).

Finalmente, se encontró un tercer acervo genético principal formado en su mayoría por individuos de la localidad Bolivar_Puerto Rico (Región Norte), excepto por dos individuos (6187 y 6190) que tiene una composición genética nuclear que corresponde a acervos diferentes. La composición genética nuclear únicamente encontrada en estos dos individuos, y las diferencias encontradas no solo con los demás idividuos que hacen parte su mismo grupo social sino también con los individuos de las demás acervos genéticos encontrados, podrían ser resultado de procesos traslocación. La composición genética nuclear encontrada en estos dos individuos corresponde en su mayoría a la región Central

(localidad Antioquia, Remedios) y en una menor proporción a la región Sur (localidad Tolima, Mariquita y Caldas, Norcasia) (Figura 12).

Estos tres acervos genéticos principales encontrados en los análisis con Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) se mantuvieron constantes e independientes a medida que aumentó el número de K (2-19) y se encontró una correspondencia con la región de procedencia de los individuos (Región Sur, Región Central y Región Norte) (Figura 12). De estas tres regiones, la región Central fue la única que presentó una subestructura en su interior, subdividiéndose en dos y tres acervos genéticos, asociados con la procedencia de los individuos de las localidades de muestreo (Puerto Berrío y Remedios) y a los grupos sociales a los que pertenecen los individuos (GS 8 y GS 9) (Figura 12).

Figura 12. Distribución de los grupos genéticos encontrados (K) con nueve loci microsatélite autosómicos, utilizando un modelo ancestral (mezclado) y un modelo de frecuencias alélicas (correlacionadas) en 56 individuos de *S. leucopus.* Se muestra desde un K=2 hasta un K=7.



K corresponde al número teórico de grupos genéticos encontrados. Las líneas horizontales representan los individuos analizados y sus colores muestran la proporción de cada individuo asignado a cada K., Con * se resalta el número de grupos (K) que mejor se ajusta a los datos. Los números (1-5) corresponden a los sitios de muestreo de los individuos analizados: **1)** Tolima, Mariquita; **2)** Caldas, Norcasia; **3)** Antioquia, Puerto Berrío; **4)** Antioquia, Remedios y **5)** Bolívar, Puerto Rico. Los grupos geneticos encontrados concuerdan con las tres regiones correspondientes a la ubicación geografica de lo sitios de muestreos Sur, Centro y Norte.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de los procesos históricos sobre la estructura genética y demografía.

El análisis de los genes mitocondriales (RC-CytB) permitió encontrar una estructura genética-geográfica al interior de *S. leucopus*. Las muestras procesadas abarcan el rango de distribución de esta espacie, en los departamentos de Tolima, Caldas, Antioquia y Bolívar. Los análisis filogenéticos concuerdan con los resultados de la red de haplotipos, en donde se encontró una fuerte estructura, caracterizada por la presencia de haplotipos compartidos entre localidades, pero únicos por cada región (Sur-Centro-Norte).

La estructura genética fuerte encontrada en *S. leucopus* concuerda con la historia demográfica estable por un periodo prolongado (desde hace 6000 años hasta hace 1400 años) reportada en el *Skyline Plot* (Figura 11). Bajo un escenario de estabilidad demográfica, generalmente se favorecen procesos que generan un aislamiento por distancia, lo cual permite la generación de una estructura genética caracterizada por la presencia de grupos monofiléticos que exhiben una estructura geográfica (Kolleck 2013). De esta forma, la obtención de grupos monofiléticos en los análisis realizados con *S. leucopus* se puede deber, a la colonización o expansión de una especie en una zona generando estabilidad y homogeneidad por un largo periodo, seguido ya sea de: 1) un proceso de aislamiento por fragmentación y restricción de flujo génico, favoreciendo un proceso de vicarianza por la formación de nuevos haplotipos en cada región o, 2) la pérdida de haplotipos intermedios a lo largo de la distribución de la especie, la cual puede ser producto de cambios demográficos recientes (ver resultado *Skyline Plot*, Figura 11), generando un aislamiento de los haplotipos de cada región.

No es claro si el patrón observado en la red de haplotipos mitocondriales es resultado de fragmentación y vicarianza (hipótesis 1) o resultado de la pérdida de haplotipos por cambios demográficos recientes (hipótesis 2). Sin embargo, la red obtenida muestra una historia genética con una cantidad de haplotipos faltantes, que no se encuentran entre los individuos muestreados, pero que son necesarios para recuperar la historia de los acervos encontrados al interior de *S. leucopus*. Teniendo en cuenta que el muestreo abarca todo el rango de distribución de *S. leucopus*, podemos afirmar que evidentemente hay un

componente histórico conformado por un patrón global que nos muestra grupos genéticos con fuertes asociaciones geográficas cuyas divergencias han sido generadas por procesos de fragmentación y vicarianza, pero principalmente por la eliminación de polimorfismos intermedios, lo que es consistente con la hipótesis 2.

La hipótesis de eliminación de polimorfismos como fuente de la divergencia entre las regiones encontradas cobra credibilidad, si tenemos en cuenta que el *Skyline Plot* para *S. leucopus* (ver resultado *Skyline Plot*, Figura 11) muestra una estabilidad demográfica histórica con una reducción en el tamaño efectivo desde hace 1350 años, la cual se ha acentuado en los últimos 500 años. Este efecto en la reducción del tamaño poblacional puede explicar el patrón observado en la red de haplotipos, favoreciendo la pérdida de haplotipos intermedios a lo largo de la distribución de *S. leucopus.*

Los efectos de los procesos demográficos históricos en el modelamiento de la estructura genética han sido descritos en muchas especies, encontrando una relación directa entre los procesos, los cambios demográficos y la estructura genética (Amos *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 1999; Peter *et al.*, 2010). Algunos estudios han reportado cómo la sobre-explotación y destrucción del hábitat genera fuertes reducciones demográficas afectando en mayor magnitud a especies con rangos distribucionales pequeños (Amos *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 2011; Peery *et al.*, 2012). Sin embargo, la detección y medición de los impactos de estos cambios demográficos requiere conocer los patrones de abundancia histórica (Palstra & Ruzzante, 2008; Hoffman *et al.*, 2011; Peery *et al.*, 2012), los cuales rara vez son conocidos en poblaciones de primates como *S. leucopus*. De esta forma, para entender los procesos que han modelado la estructura genética y el patrón obtenido en la red de haplotipos de *S. leucopus* es necesario utilizar otras especies de mamíferos en los que se haya reportado una estructura genética y una historia demográfica similar, pero que adicionalmente cuenten con patrones de abundancia históricas que nos permita acercarnos a los procesos que han ocurrido en *S. leucopus*.

El lobo marino antártico (*Arctocephalus gazella)* es una especie sometida a una historia de explotación descontrolada reduciendo sus poblaciones al borde de la extinción por su caza durante los siglos XVIII y XIX. Esta especie se considera un modelo demográfico importante debido a que los procesos de reducción y posterior recuperación de sus

poblaciones se encuentran bien documentadas y se cuenta con patrones de abundancia históricos (Hoffman *et al.*, 2011). Al igual que *S. leucopus*, los resultados de *Skyline Plot* y la red de haplotipos realizado con ADNmt (HVI) muestran una historia demográfica que se caracteriza por ser un población históricamente grande que se mantuvo estable por mucho tiempo y se ha sometido recientemente a una reducción drástica de su tamaño efectivo lo que ha producido una pérdida de haplotipos en la población, generando una red con una cantidad de haplotipos faltantes que no se encuentran en los individuos muestreados pero que son necesarios para recuperar la historia genética de *A. gazella* (Hoffman *et al.*, 2011). Esta historia genética concuerda con los censos realizados y los patrones de abundancia históricos obtenidos antes y después del auge de la caza de esta especie, revelando un cuello de botella producto de un evento histórico y antropogénico (Hoffman *et al.*, 2011).

Si bien en el caso de *A. gazella* se cuenta con una estructura genética soportada por censos, patrones de abundancia y muestreos a lo largo del tiempo, en el caso de *S. leucopus* no se cuenta con registros que permitan asegurar con certeza que la estructura encontrada es producto de la eliminación de polimorfismos como fuente de la divergencia. Dejando abierta la posibilidad de que la estructura genética encontrada en *S. leucopus* sea producto del muestreo realizado. Sin embargo, en un estudio en *S. leucopus* realizado en una escala micro-geográfica en cinco municipios del departamento de Antioquia (64 individuos en 12 grupos sociales), Acevedo (2015) reporta una red de haplotipos con ADNmt (HVI-RC) que sigue presentando pasos mutacionales o haplotipos ausentes (en una proporción menor a la reportada en el presente estudio) entre los haplogrupos encontrados en los individuos analizados. Al igual que en a la estructura genética reportada en este estudio, Acevedo (2015) encontró un patrón global (usando ADNmt (HVI) y microsatelites) el cual se caracteriza por agrupar individuos de acuerdo a su origen geográfico dentro del departamento de Antioquia. La concordancia encontrada entre datos mitocondriales y datos nucleares, asi como relación entre el patrón de la estructura geográfica encontrada en *S. leucopus* en una escala macro-geográfica (5 localidades a lo largo de su rango de distribucion) y micro-geográfica (5 municipios al interior de Antioquia), permiten descartar la posibilidad de que la estructura genética encontrada en *S. leucopus* sea producto del muestreo realizado.

No es raro encontrar en otras especies de primates redes de haplotipos mostrando una estructura geográfica similar a la reportada aquí para *S. leucopus*. Se han descrito patrones similares en especies como *Macaca radiata* (Evans, 2003), *Rhinopithecus roxellana* (Li *et al.*, 2007), *Lepilemur edwardsi* (Craul *et al.*, 2009), *Brachyteles hypoxanthus* (Chaves *et al.*, 2011), *Saimiri oerstedii citrinellus* (Blair & Melnick, 2012), entre otras. En estos estudios, se llegó a la conclusión que la conformación de la estructura genética de las poblaciones en estas especies se ha atribuido principalmente a los procesos antropogénicos (como la fragmentación y pérdida de hábitat) que han causado pérdida de haplotipos y de diversidad genética.

La historia demográfica no sólo se ve afectada por procesos antropogénicos. Es bien conocido que las fluctuaciones climáticas asociadas a los periodos geológicos generan expansiones y reducciones en el tamaño efectivo de las poblaciones de muchas especies (Davis *et al.*, 2005; Koblmuller *et al.*, 2012; Salmona *et al.*, 2012). Uno de los periodos con mayor impacto en los cambios demográficos poblacionales fue el Último Máximo Glacial, ocurrido aproximadamente hace 20.000 al final del Pleistoceno, el cual se caracterizó por ser un periodo particularmente dramático de avance glacial y enfriamiento global que resultó en cuellos de botellas demográficos en muchas especies (Beaumont *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2009). Después del Último Máximo Glacial siguió un periodo de clima cálido y húmedo que se prolongó hasta el Holoceno Temprano, con un clima que fue propicio no sólo para la expansión demográfica de muchas especies animales sino que también brindó una oportunidad para la colonización de nuevas regiones por parte de los humanos modernos provocando profundas alteraciones en los ecosistemas y a su vez cambios demográficos en algunas especies (Davis *et al.*, 2005; Koblmuller *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2012). A pesar que los cambios climáticos ocurridos en los periodos del Pleistoceno y Holoceno, han sido descritos como fuerzas que han modelado procesos demográficos en especies que no habitan los trópicos, pocos estudios han evaluado su efecto en la historia demográfica de las especies que los habitan, como es el caso de los primates que se encuentran en áreas tropicales y sub tropicales (Chakraborty *et al.*, 2014).

En *S. leucopus* se infirió un tamaño efectivo constante durante parte del Holoceno, aun cuando en dicho periodo se presentaron fluctuaciones climáticas durante la transición entre Holoceno Medio y Tardío, periodo en el cual se presentaron fases húmedas-frías, cálidos-

secos, seguido de fuertes sequias intermitentes durante los últimos cuatro milenios (Williams *et al.*, 2004; Philander, 2012; Chakraborty *et al.*, 2014). De las fluctuaciones ambientales ocurridas durante el Holoceno Medio, podemos considerar como una de las más importante el periodo conocido como el óptimo climático del Holoceno (entre 9000-5000 años antes del presente) el cual se caracterizó por tener la temperatura más alta del Holoceno, permitiendo el crecimiento de la vegetación como la que existe en la actualidad (Philander, 2012; Chakraborty *et al.*, 2014). Este óptimo climático del Holoceno fue seguido por un incremento en las precipitaciones, el cual produjo un clima caracterizado por una alta humedad y fuertes fluctuaciones en los niveles de los cuerpos de agua (Velásquez, 2004).

Sí bien el impacto de los procesos antropogénicos en la vegetación ha sido reportado desde hace aproximadamente 5000 años, este impacto ha sido particularmente importante desde 2000 años atrás (Philander, 2012; Salmona *et al.*, 2012; Kolleck, 2013; Chakraborty *et al.*, 2014). El resultado del *Skyline Plot* sugiere que la población de *S. leucopus* comenzó a experimentar una reducción aproximadamente hace 1350 años, época se caracterizó por pulsos fríos con un ciclo cálido con características de humedad variable (Velásquez, 2004; Vélez *et al.*, 2006). A pesar de que se podría considerar que las condiciones climáticas primordialmente cálidas que se presentaron en el Holoceno Medio y Tardío son propicias para la expansión y crecimiento de los tamaños efectivos de una población, en poblaciones de primates se ha reportado una reducción en estos periodos (Chaves *et al.*, 2011; Kolleck, 2013; Chakraborty *et al.*, 2014). Los pocos estudios realizados han encontrado que estas reducciones poblacionales en especies de primates (*Brachyteles hypoxanthus*, *Rhinopithecus brelichi*, *Macaca munzala*, *Pongo abelii* y *Gorilla gorilla diehli*) ocurridas en el Holoceno Medio y Tardío no corresponden a las fluctuaciones climáticas de este periodo. Por el contrario, han encontrado que esta reducción ha sido acelerada y reforzada por el rápido desarrollo de civilizaciones antiguas (aproximadamente hace 1500 años), el rápido desarrollo de la agricultura y los cambios en el paisaje en los últimos tiempos (Goossens *et al.*, 2006; Bergl *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2011; Philander 2012; Kolleck, 2013; Chakraborty *et al.*, 2014). Los procesos antropogénicos serían el principal factor que altera la historia demográfica en los primates, generando cambios relativamente recientes en las poblaciones de primates, salvo algunas excepciones en las que se han reportado

reducciones demográficas más fuertes en el periodo del Pleistoceno que las generadas por los procesos antropogénicos recientes.

De esta forma, se podría asociar la reducción poblacional que encontramos en *S. leucopus* (que inició aproximadamente hace 1350 años) con el periodo en el cual se ha reportado una mayor actividad y aumento del impacto de los procesos antropogénicos como la agricultura, la ganadería en Colombia y crecimiento reciente de las áreas urbanas en el rango de distribución de esta especie variable (Velásquez, 2004; Vélez *et al.*, 2006), acentuándose esta reducción poblacional de *S. leucopus* en los últimos años (500 años). Soportando la hipótesis de un mayor efecto en los cambios demográficos de *S. leucopus* producto de los procesos antropogénicos que las fluctuaciones climáticas en los periodos geológicos.

En base a esto, podríamos afirmar que la estructura genética de *S. leucopus* y la diferenciación entre los tres acervos genéticos principales encontrados es el resultado de alteraciones en los procesos demográficos históricos que han generado pérdida de diversidad genética a causa de modificaciones en el hábitat, lo que ha sido causado principalmente por procesos antropogénicos en su área de distribución.

Los resultados obtenidos en este estudio contrastan con lo encontrado por Ruiz-García (2010; 2014), quienes reportaron a partir de secuencias de ADNmt (COXII) una estructura genética en geográfica en su distribución, mostrando una notable expasión en esta especie desde hace 0.3 millones de años. A pesar que en algunas especies de primates ha sido reportado igualmente una expansión *S. leucopus* que se caracteriza por presentar haplotipos de baja frecuencia sin ninguna estructura demográfica reciente (Ascunce *et al.*, 2007; Oliveira 2014), los resultados obtenidos en este estudio con ADNmt (RC y CytB) no soportan una expansión demográfica en las poblaciones de *S. leucopus*. La razón que explicaría la falta de concordancia entre los resultados obtenidos con secuencias mitocondriales usadas en el presente estudio (CytB-HPI-RC) y las usadas por Ruiz-García *et al.* (2010; 2014) (COXII), es amplificación de pseudogenes (Numts) del gen mitocondrial COXII en las secuencias generadas con los primers (L6955-H7766) usados en los trabajos de Ruiz-García *et al.* (2010; 2014) (ver resultados Figura 5).

En una población que ha sufrido una expansión reciente se esperaría encontrar una red de haplotipos en forma de estrella con abundancia de haplotipos de muy baja frecuencia estrechamente relacionados con haplotipos modales, que no exhiben ningún tipo de estructura geográfica. Éste fenómeno ha sido reportado en algunas especies de primates, como por ejemplo en *Gorilla gorilla diehli* (Bergl & Vigilant, 2007), la cual a pesar de encontrarse en una zona altamente fragmentada y estar considerada en peligro alto de extinción, aún exhibe contacto reproductivo entre muchas de las localidades, resultados alentadores para la conservación de la población de gorilas del río Cross.

7.2 Efecto de los procesos contemporáneos sobre la estructura genética

La correspondencia entre los resultados obtenidos con marcadores mitocondriales y microsatélites soporta las inferencias a las que se ha llegado en la presente investigación. Las diferentes pruebas evaluando la estructura genética muestran la distinción de tres grupos genéticos principales a lo largo de la distribución de *S. leucopus*.

La estructura social, el sistema de apareamiento, los patrones variables de dispersión entre sexos y la filopatría hacen parte del comportamiento y estrategias reproductivas presente en especies de Callitricidos. Al interior de los Callitricidos se han reportado sistemas de apareamiento, patrones de dispersión y migración variables, sin embargo la mayoría de Callitricidos tiene un sistema de apareamiento poliándrico cooperativo, pero también se pueden encontrar algunas especies con un sistema de apareamiento basado en poligenia, poliginandria y monogamia (Huck *et al.*, 2007). Estas características propias de cada especie pueden modificar el flujo génico y contribuir a la diferenciación y la formación de estructura genética dentro y entre poblaciones de primates (Blair & Melnick 2012; Liu *et al.*, 2009; Díaz-Muñoz 2011).

Como consecuencia de los patrones de dispersión diferentes entre los sexos y la herencia uniparental de los marcadores de ADNmt, podría esperarse una diferenciación entre la estructura encontrada con el ADNmt y la encontrada para los marcadores microsatélites como ha sido reportada en otras especies de primates (Di Fiore, 2003). A pesar de no haber realizado ninguna prueba estadística para encontrar alguna evidencia de una dispersión sesgada hacia alguno de los sexos en *S. leucopus*, la concordancia entre la estructura

encontrada de ADNmt y los marcadores nucleares (tipo microsatélites) podría soportar la hipótesis según la cual no existe una diferencia significativa en la dispersión de machos y hembras en *S. leucopus*, en una escala macrogeográfica. Sin embargo, analizando con mayor detalle la estructura encontrada con ADNmt podemos observar que la región sur se compone por dos agrupamientos en la red de haplotipos, mientras que en la estructura encontrada con los microsatélites las dos localidades (Tolima, Mariquita y Caldas, Norcasia) correspondientes a la región Sur se agrupan en un único acervo genético independiente y constante (Figura 8, Figura 10 y Figura 12). De igual forma, en la región Central se puede encontrar una mayor estructura con ADNmt (presencia de dos agrupamientos) que con los marcadores nucleares (Figura 8, Figura 10 y Figura 12). Estos resultados indicarían una mayor restricción en la dispersión de las hembras; sin embargo, esta reducción en la dispersión de las hembras no es clara y este patrón puede ser el resultado del comportamiento social y el sistema de apareamiento de la especie.

Sin embargo, Goldizen *et al.* (1996) y Huck *et al.* (2007) han reportado que no existe una diferencia significativa entre la dispersión de machos y hembras en *Saguinus mystax* y *Saguinus fuscicollis*, lo que concuerda con lo encontrado en este estudio para *S. leucopus*. A pesar que Huck *et al.* (2007) reportaron que en una población de *S. mystax* machos y hembras tienen la misma posibilidad de migrar, habitualmente las hembras migran mayores distancias debido a las limitaciones para reproducirse en una población que se caracteriza por tener un sistema de apareamiento poliándrico. No obstante, por la concordancia entre la estructura encontrada de ADNmt y los marcadores nucleares y la falta de pruebas que revelen una diferencia significativa entre la dispersión de machos y hembras en *S. leucopus*, podemos inferir que la estructura genética encontrada y la distinción de tres grupos genéticos a lo largo de la distribución de *S. leucopus* no es consecuencia del sistema de apareamiento o los patrones variables de dispersión en esta especie, pero es necesario realizar análisis apropiados que nos permitan descartar el sistema de apareamiento o patrones variables de dispersión.

El primer acervo genético principal identificado (región Sur), corresponde a las localidades Tolima (Mariquita) y Caldas (Norcasia). Los resultados con ADNmt muestran dos grupos monofiléticos compuestos indistintamente por individuos de las dos localidades, es decir que la composición genética histórica de estas dos localidades se parece entre sí, pero es

diferente con las de las otras localidades. Esto concuerda con los resultados encontrados con los marcadores microsatélites, ya que nos muestran estas dos localidades (Tolima y Caldas) como un acervo único, evidenciado un contacto contemporáneo entre las localidades de la región sur.

El segundo acervo genético principal (región Central) identificado corresponde a las localidades de Antioquia (Puerto Berrío y Remedios). Los resultados con ADNmt muestran dos grupos monofiléticos compuestos indistintamente por individuos de las dos localidades, evidenciando que la composición genética histórica de estas localidades se parece entre sí, pero es diferente con las otras localidades. Los resultados obtenidos con marcadores microsatélites concuerdan con los resultados obtenidos con el ADNmt debido a que las dos localidades fueron asignadas como un acervo genético diferente (Figura 12, K=3). Sin embargo, a medida que aumentamos el K, este acervo genético principal muestra una subestructura (tanto con ADNmt como con microsatelites) dividiéndose en dos (K=4) y hasta tres grupos (K=5) que muestran una asociación con los grupos sociales muestreados, lo cual es evidencia discutible de que la estructura genética de la región Central tiene un componente histórico aún más complejo que el encontrado en las otras regiones. Este resultado es concordante con lo encontrado en un estudio genético realizado en esta zona, en donde utilizaron seis de los nueve marcadores usados en la presente investigación (Acevedo, 2015). Reportaron una estructura genética a una escala micro-geográfica e incluso entre algunos municipios en el centro y occidente de Antioquia, así como también en el área urbana de Medellín. Según los resultados obtenidos por Acevedo (2015) con ADNmt (HPVI-RC) y microsatélites, evidencian que la estructura genética encontrada en los municipios Antioquia y en el área urbana de Medellín es el resultado de las diferencias notables no solo entre regiones sino también entre los grupos sociales muestreados en cada localidad, lo cual se ve reflejado en el agrupamiento de individuos de acuerdo a su grupo social y origen geográfico.

En el tercer acervo genético principal correspondiente a Bolívar (Puerto Rico, región Norte), la presencia de dos individuos (6187: macho adulto colectado en grupo social de cinco individuos y 6190: hembra colectada en un grupo social de dos individuos) que corresponden a un acervo genético diferente al reportado para esta localidad, fue concordante con lo encontrado con con ADNmt, en donde los dos individuos corresponden

a dos haplotipos únicos y diferentes de los encontrados en los demás miembros de sus grupos sociales (Sle12 y Sle13, respectivamente). A pesar de haber realizado los muestreos en zonas donde la ocurrencia de liberaciones es baja, y si tenemos en cuenta que la estructura genética encontrada con ADNmt y microsatelites no concuerda con procesos de migración a larga distancia, las características de estos dos individuos y las diferencias genéticas nos hacen pensar que la presencia de estos individuos en dicha localidad puede ser producto de liberaciones realizadas. No obstante para descartar completamente la posibilidad de que la presencia de estos dos individuos en el tercer acervo genético correspondiente a Bolívar sea producto de eventos de migración, es necesario aumentar el número de individuos y los puntos de muestreo de cada región.

Ruiz-García *et al.* (2007; 2010; 2014) evaluaron la estructura poblacional de *S. leucopus* mediante el uso de un marcador mitocondrial (COXII) y un set de 10 marcadores microsatélites, abarcando todo su rango de distribución, con un mayor número de muestras. El set de de 10 marcadores microsatélites reportaron la presencia de una estructura genética, en la que reportaron dos acervos genéticos: 1) Antioquia y 2) Tolima, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio. A pesar de los dos acervos genéticos encontrados con un set de 10 marcadores microsatélites, los datos mitocondriales del gen mitocondrial COXII obtenidos por Ruiz-García *et al.* (2014) (usando los primers L6955 y H7766) no reportaron ninguna estructura geográfica en la distribución de sus haplotipos.
La amplificación inadvertida de un pseudogén del marcador COXII por Ruiz-García *et al.* (2014) (ver Resultados Figura 5), puede explicar la no concordancia entre la estructura encontrada con los marcadores microsatélites y los datos mitocondriales.

Algunos autores como Hernández-Camacho & Cooper (1976) y Defler (2003) han propuesto la existencia de sub-especies al interior de *S. leucopus* a partir de algunos cambios en los patrones de coloración del pelaje en algunas poblaciones de esta especie. Estos cambios en los patrones de coloración han sido descritos dos individuos en el extremo sur de la distribución de la especie (Tolima, Mariquita), lo cual concuerda con la estructura genética encontrada al interior de *S. leucopus*. Sin embargo, la estructura genética-geográfica y los niveles de diferenciación al interior de *S. leucopus* no sugieren la existencia de sub-especies lo cual concuerda con lo propuesto por Ruiz-García *et al.* (2014).

Pese a una historia compleja de tráfico y movimiento ilegal de individuos de *S. leucopus*, vale la pena resaltar el alto nivel de conservación que exhibe la estructura genética encontrada compuesta por los tres acervos genéticos principales identificados, para las regiones previamente establecidas (Sur-Central-Norte). Los resultados encontrados no muestran ninguna evidencia significativa, de que se hayan realizado procesos de liberaciones en acervos genéticos que no corresponden directamente a las localidades muestreadas. A pesar de la cantidad de incautaciones y liberaciones que se realizan con individuos de *S. leucopus*, en este estudio sólo se identificaron dos individuos (6187 y 6190) fuera de su acervo genético ancestral en la región Norte (Bolivar_Puerto Rico). Por el contrario, el acervo genético principal encontrado en la región Sur (Tolima_Mariquita y Caldas _Norcasia) siempre se mantuvo como un acervo robusto. Este resultado es importante si se tiene en cuenta que dicho acervo tiene el mayor número de muestras y de grupos sociales (12 grupos sociales), y aun así mantiene su estructura, sin presentar ningún tipo de mezcla. Es indispensable evaluar el tiempo y las áreas que abarcan los programas de conservación que se han llevado a cabo en estas localidades, ya que dichos resultados podrían soportar la efectividad e importancia de las acciones que están llevando a cabo para la conservación y mantenimiento de la integridad genética de la región Sur. Es necesario tener en cuenta que este patrón que muestra un alto nivel de conservación en la estructura genética encontrada y la ausencia individuos fuera de su acervo genético ancestral, salvo algunas excepciones previamente mencionadas, puede ser el resultado de dirigir el muestreo a localidades que no han sido intervenidas o en las que no se han realizado procesos de liberación. Tal vez al realizar un muestreo que incluya sitios en los que sí se han realizado procesos de liberación puede revelar una estructura más compleja y consecuente con la historia de tráfico y movimiento ilegal de individuos de *S. leucopus*.

Por otro lado, el acervo genético principal encontrado en la región Central (Antioquia_Puerto Berrío y Antioquia _Remedios), a pesar de tener un bajo número de grupos sociales (4 grupos sociales), permite identificar una subestructura genética al interior, encontrando dos y hasta 12 subgrupos en dicha región. Esta diferencia entre el número de grupos sociales y la estructura encontrada entre y al interior de los tres acervos genéticos principales identificados en *S. leucopus* nos indica la presencia de factores

diferentes al comportamiento social propio de la especie, que se encuentran actuando sobre la variación genética y los procesos de divergencia en *S. leucopus*.

Recientes estudios en genética y ecología del paisaje, han evaluado el efecto de la composición del hábitat sobre el comportamiento y ecología en poblaciones de primates (*Alouatta belzebul*, *Alouatta caraya*, *Saimiri oerstedii* y *Rhinopithecus biet*) y han rechazando el modelo simplista en el que se creía que un hábitat fragmentado impide la conectividad de las poblaciones de éstas especies (Liu *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2010; Oklander *et al.*, 2010, Blair & Melnick, 2012). En su lugar es necesario entender el paisaje como una matriz dinámica y heterogénea que puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre la dispersión y persistencia a largo plazo de una especie (Pearson, 2013).

Los efectos de la estructura y heterogeneidad del paisaje sobre la distribución de la variabilidad genética a menudo están correlacionados con factores bióticos y abióticos, incluyendo características propias de cada especie (tamaño corporal, comportamiento social, modo de reproducción, filopatría, dieta, hábitat, entre otros) (Vigilant & Guschanski, 2009; Blair & Melnick, 2012). Debido a esto, es necesario comparar y evaluar la estructura genética en diferentes escalas espaciales en una especie para comprender los efectos sobre la variación genética y poder predecir los procesos de divergencia al interior de poblaciones que habitan paisajes modificados (Díaz-Muñoz, 2012).

En este estudio los marcadores microsatélites en *S. leucopus* revelaron una estructura compuesta por tres acervos genéticos principales (Sur-Centro-Norte), en los cuales algunas localidades aisladas no presentan ningún flujo génico reciente generado por un hábitat heterogéneo que haya modificado la dispersión a larga distancia, favoreciendo el flujo génico entre individuos de localidades cercanas. Esta estructura genética ha sido descrita en algunas especies de primates que habitan áreas con una intervención antropogénica alta. Por ejemplo, en *Saimiri oerstedii citrinellus* en la región Pacifica de Costa Rica, apartir de un set de 16 marcadores microsatélites se reportaron al menos dos grupos genéticos distintos, geográficamente separados al interior de la población (Oriente-Occidente). Los análisis realizados con STRUCTURE y GENECLASS permitieron identificar flujo génico entre los dos grupos genéticos identificados. Estos dos grupos están asociados a fragmentos de bosque secundario separados por pastos, plantaciones de palma africana y zonas

residenciales. Al medir los efectos de estos patrones espaciales sobre la variación genética encontraron que únicamente las plantaciones de palma representan barreras moderadas al flujo génico, donde la influencia sobre la variación genética depende de la escala y se manifiesta durante los procesos de dispersión entre poblaciones (Blair, 2011; Blair & Melnick, 2012).

De igual manera, Liu *et al.* (2009) mediante el uso ADNmt (HVI) y marcadores microsatélites, encontraron cinco grupos genéticos geográficamente separados en *Rhinopithecus biet* en la meseta tibetana (Nor-occidente, Nor-oriente, Centro, Sur-oriente, Sur-occidente). Estos grupos presentaban niveles de flujo génico bajo, principalmente por las características del hábitat, y su efecto en la estructura genética de la especie coincide con las características y patrones espaciales de la zona. La estructura de *R. biet* está asociada a parches de bosques rodeados por hábitat inadecuado (cultivos, pastizales, carreteras, zonas residenciales, entre otras), los cuales afectan el flujo génico entre grupos (por la larga distancia que los separa), actuando como barreras poco permeables. Sin embargo, la presencia de algunos corredores y la capacidad de algunos individuos de moverse entre los diferentes parches ha favorecido el flujo génico al interior de los grupos premiando el flujo génico entre localidades cercanas.

Dentro del género *Saguinus* (Tamarinos) también se ha reportado la formación de estructura genética en diferentes escalas espaciales, logrando mostrar que en comparación con otros primates las especies del género *Saguinus* son más propensas a cambios en la estructura alélica, producto de los cambios en los patrones espaciales en escalas pequeñas (Díaz-Muñoz, 2010; Díaz-Muñoz, 2012; Farias *et al.*, 2015). Los Tamarinos presentan un grado de parentesco al interior de los grupos y una baja tasa de dispersión, características que aumentan las probabilidades de presentar estructura genética en respuesta a cambios en la estructura del paisaje (Díaz-Muñoz, 2010; Díaz-Muñoz, 2012).

Díaz-Muñoz (2012) usando un set de siete microsatélites (cuatro de los cuales usamos en este estudio) y un marcador de ADNmt, encontró que las barreras riverinas (Rio Chagres) y las modificaciones antropogénicas (Canal de Panamá) están contribuyendo en diferentes escalas temporales y generacionales a la formación de estructura genética encontrada en la población *Saguinus geoffroyi* en las cuencas de las provincias de Panamá y Colón. Los

marcadores mitocondriales permitieron establecer una diferenciación genética asociada a procesos históricos como lo son las barreras riverinas (Rio Chagres). Sin embargo, los marcadores microsatélites detectaron un nivel de diferenciación, que no fue detectado por los marcadores mitocondriales, en las poblaciones a lo largo del canal de Panamá. De esta forma, Díaz-Muñoz (2012) no solo ratificó el efecto de los procesos históricos (como la formación de barreras riverinas) en la divergencia y estructura genética de las poblaciones, sino que también permitió establecer el efecto de los procesos contemporáneos (como los cambios en la estructura del paisaje a diferentes escalas) empiezan a tener efecto en la divergencia y estructura genética al interior de una población a partir de tiempos relativamente cortos (la construcción del canal de Panamá finalizo en 1914) y pocos números de generaciones (20-40 generaciones).

Es necesario tener en cuenta que algunos cambios en la estructura del paisaje pueden afectar los patrones de flujo génico más que otros, y dependiendo de las características de cada especie algunos cambios en la estructura del paisaje pueden no tener ningún efecto en sobre los patrones de flujo génico (Díaz-Muñoz, 2012). Para el caso particular de *Saguinus bicolor*, Oliveira (2014) y Farias *et al.* (2015) reportaron mediante el uso microsatélites (el mismo set de nueve marcadores usados en este estudio) y tres marcadores de ADNmt (CytB, Región Control y Citocromo Oxidasa I), que la fragmentación en el hábitat y las actividades antropogénicas no han generado una estructura genética en ninguna escala geográfica en esta especie. Sin embargo, la reducción del hábitat y las modificaciones en la estructura del paisaje han generado cuellos de botella al interior de las poblaciones de *S. bicolor*, causando una reducción en la diversidad génica de esta especie.

Pese a que se sabe que su el área de distribución de *S. leucopus* corresponde a una de las regiones más afectadas por pérdida y transformación del hábitat en Colombia (Perez-Pinzon *et al.*, 2013), no se cuenta con una caracterización detallada que permita conocer toda la estructura del paisaje donde habita *S. leucopus* y entender el efecto de esas modificaciones sobre la estructura genética que reportamos en este trabajo. La Región Norte (Departamento de Bolívar) de la distribución de *S. leucopus* se caracteriza por ser una zona transformada en la que la mayor parte del bosque ha sido destruido en gran escala para su uso en la agricultura, ganadería y minería. Esta región se compone de tres ecosistemas estratégicos: 1) la Serranía de San Lucas, 2) la planicie inundable de la Mojana

y 3) la Depresión Momposina (De la Hoz, 2009), con características geográficas que han sido de vital importancia para mantener aislada esta región por mucho tiempo, ya que se dificulta la construcción de vías de comunicación entre el margen izquierdo del río Magdalena, la Serranía de San Lucas y el río Cauca; adicionalmente, esta zona se ha caracterizado por el asentamiento de grupos armados al margen de la ley (De la Hoz, 2009). La mayor parte del sur del Bolívar está incluido en la Zona de Reserva Forestal del río Magdalena (73% de su territorio se encuentra en zona de reserva). Municipios como Tiquisio tienen más del 90% de su jurisdicción en zona de reserva forestal (De la Hoz, 2009).

Parte del hábitat de Región Central de la distribución de *S. leucopus* (Departamento de Antioquia) corresponde a pequeñas montañas en la parte norte o este de la cordillera Occidental y Central, y esta región podría considerarse la zona con mayor cantidad de modificaciones del hábitat en el rango de distribución de *S. leucopus* (Acevedo, 2015). El paisaje de esta zona está compuesto por seis estructuras principales: 1) Valle medio Magdalena, 2) Cordillera Central, 3) Cañón del río Cauca, 4) Llanura aluvial del río Cauca, 5) Cordillera Occidental (Arbaux, 2003). Los fragmentos de bosque están inmersos en una matriz de pastos y de regeneraciones secundarias en distintos estados que se han desarrollado después de varias etapas de explotación (Cuartas, 2001). Algunos cambios en la estructura del paisaje están asociados a la agricultura a pequeña escala; sin embargo, la mayor parte de las modificaciones del hábitat de *S. leucopus* están asociadas con la construcción de varios proyectos hidroeléctricos en la zona (Guatapé, Niquia, Porce II y Porce III, entre otras), la cual ha tenido un crecimiento demográfico significativo desde la década de los años 80, presentado un mayor crecimiento en la década de los 90 como respuesta al mercado de energía mayorista en Colombia y la construcción de estas hidroeléctricas (Cuartas, 2001; Arbaux, 2003).

Tal vez la zona en la que se cuenta con más información acerca de la estructura del hábitat de *S. leucopus* es en los departamentos de Tolima y Caldas (región Sur), en donde se cuenta con un plan de conservación y manejo del tití gris (*Saguinus leucopus*) y un Sistema Regional de Áreas Protegidas del Eje Cafetero Colombiano (SIRAP-EC). En este plan de conservación se determinó que la distribución de tití gris al interior de la región del SIRAP-EC (nor-occidente del Tolima y Caldas) es de un área aproximada de 3800 km^2, la cual

representa cerca de un 13% de la distribución total original de la especie, y se estimó el área de distribución potencial de la especie entre 544 y 1767 km^2, de los cuales menos del 4% se encuentra en áreas protegidas. En estas localidades se han realizado varios estudios para estimar la densidad población y se ha encontrado que la cobertura original de bosque húmedo tropical se ha perdido en cerca de un 85% y del bosque nativo remanente el 80% es bosque en diferentes estados de sucesión. Al oriente del departamento de Caldas, zona que corresponde al valle del Magdalena, casi todo el paisaje original ha sido transformado en potreros. En el piedemonte, entre los 200 y los 500 m, se conservan algunos bosques de galería y unos pocos fragmentos de bosque con intervención, inmersos en una matriz de potreros. Entre los 500 y los 1500 m, la zona está compuesta por un mosaico de paisajes, entre los cuales se destacan potreros, cultivos de subsistencia, bosques de galería y algunos bosques secundarios en diferentes estados de sucesión. Hacia el oriente de Caldas y al Norte del Tolima, existen algunas áreas bajo figuras de protección en donde se ha registrado la presencia de *S. leucopus* (Poveda & Sánchez-Palomino, 2004; Sánchez-Londoño, 2007; Santamaría *et al.*, 2007; Roncancio *et al.*, 2009; Roncancio *et al.*, 2011; Roncancio *et al.*, 2012; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013; Alba-Mejia *et al.*, 2013).

Es evidente que la composición geográfica y del paisaje en la distribución de *S. leucopus* ha sufrido cambios significativos, caracterizándose por tener un incremento en el número de parches de bosque y una mayor complejidad paisajística asociada a procesos de sucesión vegetal. Estos cambios han modificado el hábitat de la *S. leucopus* y en este momento la dinámica de esta especie incluye paisajes heterogéneos como una mezcla de hábitats naturales e intervenidos con variaciones en forma, tamaño, conectividad y distribución en el espacio (Roncancio *et al.*, 2012; Pérez-Pinzón *et al.*, 2013). Por esta razón es necesario identificar los efectos en los procesos y la dispersión que tienen las características geográficas y la matriz del paisaje compleja de cada una de las regiones en las que se identificaron los acervos genéticos principales en *S. leucopus*, caracterizando las barreras y la escala en la cual afectan el flujo génico y la dispersión a lo largo de la distribución de *S. leucopus*.

A pesar de los grandes avances que este estudio aporta y la evidencia encontrada, tanto para marcadores microsatélites como para ADNmt, la cual soporta la diferenciación de *S. leucopus* en tres grupos genéticos principales a lo largo de su rango distribucional, es

necesario incrementar el muestreo y obtener un mayor número de muestras principalmente al norte de la distribución de la especie para delimitar estos grupos genéticos encontrados. De igual forma, para entender los efectos de las modificaciones del hábitat sobre la estructura genética de *S. leucpus* se requiere de un muestreo particular que se encuentra fuera de los alcances de este estudio.

7.3 Implicaciones para la conservación

Desde la perspectiva de la conservación, el criterio para seleccionar las poblaciones prioritarias es considerar el nivel de singularidad y variación genética que se encuentra dentro de cada especie (McKay & Latta, 2002). Las Unidades Evolutivamente Significativas (ESU, por sus siglas en ingles) se designan en base a lo monofilia recíproca de marcadores moleculares y la divergencia significativa en loci nucleares y mitocondriales (Moritz, 1994). Evaluamos estos criterios en diferentes poblaciones de *S. leucopus*, realizando un análisis con marcadores moleculares mitocondriales. Los resultados revelaron la existencia de tres acervos genéticos principales al interior al interior de *S. leucopus*. Es importante tener en cuenta que tanto la red de haplotipos como las topologías obtenidas con los análisis filogenéticos, evidenciaron la presencia de varios haplotipos con una tendencia global de agruparse en tres grupos principales monofileticos (Sur-Centro-Norte), con exclusión de un par de individuos.

Vogle & DeSalle (1994) y Palsboll & Allendorf (2007) afirman que las unidades de manejo (MU, por sus siglas en ingles) y conservación están delimitadas por caracteres que diagnostican los grupos de individuos o poblaciones únicas que se excluyen de otros grupos, es decir corresponde a grupos demográficamente independientes y con dinámicas poblacionales diferentes. En base a esta afirmación y teniendo en cuanta la diferencias encontradas en las frecuencia y distribución de los haplotipos encontradas en este estudio, podría postularse (en una escala macro- geográfica) que los tres acervos genéticos identificados al interior de *S. leucopus* (Sur, Centro y Norte) deben ser designados como UM (Moritz, 1994). Sin dejar de lado la necesidad de identificar si la estructura genética encontrada en una escala micro-geográfica (al interior de los tres acervos genéticos) requiere de la designación de ESU y MU.

Hudson y Coyne (2002) manifiestan su preocupación al designar ESU y MU utilizando sólo el ADNmt, ya que debido a su tasa de evolución, la fijación de polimorfismos y la formación de grupos monofileticos requiere de más tiempo que los genes nucleares, por lo que no es una buena estrategia para la evaluación de monofilia recíproca, a menos que la divergencia de las poblaciones sea muy antigua. En el caso de *S. leucopus* no se tenía conocimiento previo sobre la divergencia al interior de esta especie. Por esta razón, la presente investigación además de utilizar ADNmt implementó el uso de marcadores de tipo microsatélite. Se evaluó la correspondencia de los datos mitocondriales y nucleares obtenidos, teniendo en cuenta los principales acervos genéticos encontrados para las cinco localidades de muestreo a lo largo del rango de distribución de la espcie. Las localidades ubicadas en el Sur y Centro del rango de distribución de la especie, tienden a formar grupos moderadamente bien apoyados. Estas localidades no solo están separadas por grandes distancias, sino que también cuentan con una composición geográfica y una estructura del paisaje que se carateriza por la fragmentación y deforestación del hábitat de *S. leucopus*.

En base a la estructura encontrada con los marcadores de ADNmt y los marcadores microsatélites, junto con la composición genética única que exhiben los tres grupos principales identificados en *S. leucopus*, se debe considerar la implementación de unidades de gestión, para las tres unidades de conservación. Por esta razón, es igualmente razonable sugerir que las tres Unidades de Manejo deban ser designadas como ESUs (Unidades Evolutivas Significativas Moritz, 1994). Esto se encuentra soportado en las diferencias significativas que encontramos en la frecuencia y distibucion de haplotipos, frecuencias y distribución de los alelos y las dinámicas poblacionales al interior de los tres grupos genéticos principales encontrados en *S. leucopus*. Estas diferencias indican que las poblaciones que se encuentran al interior de los tres grupos genéticos principales encontrados pueden tener un potencial diferente a evolucionar, por lo que se deberían tratarse no solo como ESUs sino tambien como unidades de conservación separadas. Esto es importante, si se tiene en cuenta que el taxón evaluado está catalogado como en peligro por la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN, y se le debe considerar en un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre, dados los reportes de deforestación de su hábitat. Los planes de manejo y conservación de *S. leucopus* deben considerar el número y alcance espacial de las ESUs y MU propuesta en este trabajo, procurando mantener la diversidad genética de las poblaciones de éste primate en el país.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alba-Mejia L. 2013. Spatiotemporal Interactions Among Three Neighboring Groups of Free-Ranging White-Footed Tamarins (*Saguinus leucopus*) in Colombia. International Journal of Primatology.

Alberico M, Cadena A, Hernández-Camacho J, Muñoz-Saba. 2000. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. Biota Colombiana, 1:43-75.

Allen, J, Miyamoto M, Wu C, Carter T, Ungvari-Martin J, Magrini K. & Chapman CA. 2012. Primate DNA suggests long-term stability of an African rainforest. Ecology and Evolution 2(11): 2829-2842.

Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. Nature reviews genetics, 11(10), 697-709.

Amos W. & Harwood J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. Philosophical Transactions-Royal Society of London, Biological Sciences, 353 (1366), 177-186.

Arbaux M. 2003. El Paisaje Antioqueno: Otra perspectiva. Revista Universidad EAFIT No.130.

Arroyo-Rodríguez V & Mandujano S. 2009. Conceptualization and measurement of rainforest fragmentation from the primate´s perspective. Int. J. Primatol, 30: 497-514.

Ascunce, M. S., Hasson, E., Mulligan, C. J., & Mudry, M. D. 2007. Mitochondrial sequence diversity of the southernmost extant New World monkey, Alouatta caraya. Molecular phylogenetics and evolution, 43(1), 202-215.

Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojola C, Vilà C. 2006. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. Molecular Ecology, 15: 1561–1576.

Baden, A. L., Holmes, S. M., Johnson, S. E., Engberg, S. E., Louis, E. E., & Bradley, B. J. 2014. Species-level view of population structure and gene flow for a critically endangered primate (*Varecia variegata*). Ecology and evolution, 4(13), 2675-2692.

Bastos, H. B., Gonçalves, E. C., Ferrari, S. F., Silva, A., & Schneider, M. P. C. 2010. Genetic structure of red-handed howler monkey populations in the fragmented landscape of Eastern Brazilian Amazonia. Genetics and molecular biology, 33(4), 774-780.

Beaumont LJ, Pitman A, Perkins S, Zimmermann NE, Yoccoz NG, *et al*. 2011. Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. Proc Natl Acad Sci USA 108: 2306–2311.

Benirschke K, Anderson JM, Brownhill LE:1962. Marrow Chimerism in Marmosets. Science, 138(3539):513-515.

Benirschke, K., & Brownhill, L. E. 1963. Heterosexual cells in testes of chimeric marmoset monkeys. Cytogenetic and Genome Research, 2(6), 331-341.

Bergl, R. A., Bradley, B. J., Nsubuga, A., & Vigilant, L. 2008. Effects of habitat fragmentation, population size and demographic history on genetic diversity: The Cross River gorilla in a comparative context. American Journal of Primatology, 70(9), 848-859.

Blair, M. E. 2011. Habitat modification and gene flow in Saimiri oerstedii: Landscape genetics, intraspecific molecular systematics, and conservation (Doctoral dissertation, Columbia University).

Blair, M. E., & Melnick, D. J. 2012. Scale-dependent effects of a heterogeneous landscape on genetic differentiation in the Central American squirrel monkey (Saimiri oerstedii). PloS one, 7(8), e43027.

Bloor P, De Laguna HB, Kemp SJ. 2006. Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary Island lizard, *Gallotia atlantica*. Molecular Ecology Notes, 6:737–739.

Böhle, U. R., & Zischler, H. 2002. Polymorphic microsatellite loci for the mustached tamarin (Saguinus mystax) and their cross-species amplification in other New World monkeys. Molecular Ecology Notes, 2(1), 1-3.

Booksmythe, I., Mautz, B., Davis, J., Nakagawa, S., & Jennions, M. D. 2015. Facultative adjustment of the offspring sex ratio and male attractiveness: a systematic review and meta-analysis. Biological Reviews.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology, 28(3), pp.495–503.

Broquet T, Menard N & Petit E. 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetics, 8: 249-260.

Broquet T & Petit EJ. 2009. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 40: 193-216.

Brouat C, Chevallier H, Meusnier T, Noblecourt T & Rasplus JY. 2004. Specialization and habitat: spatial and environmental effects on abundance and genetic diversity of forest generalist and specialist Carabus species. Molecular Ecology, 13(7): 1815–1826.

Bruford MW, Wayne RK. 1993. Microsatellites and their application to population-genetic studies. Current Opinion in Genetics and Development, 3: 939-943.

Buchan, J. C., Alberts, S. C., Silk, J. B., & Altmann, J. 2003. True paternal care in a multi-male primate society. Nature, 425(6954), 179-181.

Castañeda, F.E., Buritica, E.F. & Barbosa, I.X., 2010. Tití gris (*Saguinus leucopus* GUNTHER 1876): algunos aspectos biológicos y de interés veterinario sobre la especie. Revista Colombiana de Ciencia Animal, 3(1), pp.81–89.

Chakraborty, D., Sinha, A., & Ramakrishnan, U. 2014. Mixed Fortunes: Ancient Expansion and Recent Decline in Population Size of a Subtropical Montane Primate, the Arunachal Macaque Macaca munzala. PloS one, 9(7), e97061.

Chapman CA & Peres CA. 2001. Primate conservation in the new millennium: The role of scientists. Evol. Anthropol, 10: 16–33.

Chaves, P. B., Alvarenga, C. S., Possamai, C. D. B., Dias, L. G., Boubli, J. P., Strier, K. B., & Fagundes, V. 2011. Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the northern muriqui (Brachyteles hypoxanthus). PloS one, 6(6), e20722.

Cheney, D. L. 1987. Interactions and relationships between groups. Primate societies.

Chistiakov D, 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.

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 9(10), 1657-1659.

Coates BS, Sumerford DV, Miller NJ, Kim KS, Sappington TW, Siegfried BD, Lewis LC. 2009**.** Comparative Performance of Single Nucleotide Polymorphism and Microsatellite Markers for Population Genetic Analysis. Journal Hered, 100: 556-564.

Cuervo A, Hernández-Camacho J, Cadena A. 1986. Lista actualizada de los mamíferos de Colombia: Anotaciones sobre su distribución. Caldasia, 15 (75): 471-501.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in Ecology and Evolution, 15: 290-295.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace MG & Wayne RK. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. TREE, 15(7): 46-52.

Crawford AM, Kappes SM, Paterson KA, deGotari MJ, Dodds KG, Freking BA, Stone RT, & Beattie CW. 1998. Microsatellite evolution: testing the ascertainment bias hypothesis. Journal of Molecular Evolution, 46: 256-260.

Cuartas CA. 2001. Distribución parcial del Tití gris (Saguinus leucopus, Callitrichidae) en el Departamento de Antioquia, Colombia. Neotropical Primates 9 (3): 107-110.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, 9(8), 772-772.

Davis, M. B., Shaw, R. G., & Etterson, J. R. 2005. Evolutionary responses to changing climate. Ecology, 86(7), 1704-1714.

Defler, TR. 1992. Un análisis del estado de la cobertura de bosque en la Amazonia colombiana. Sin publicar.

Defler TR. 2003. Primates de Colombia. Conservacion Internacional, Colombia.

Defler, T. R. 2004. Primates de Colombia. Conservación Internacional, Serie de Guías Tropicales de Campo, Conservación Internacional Colombia, Bogotá, Colombia, 550 pp.

Defler TR. 2010. Historia Natural de los Primates Colombianos. Conservación Internacional Colombia & Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 614 pp.

De la Hoz J. 2009. Economía y conflicto en el Cono Sur del Departamento de Bolívar. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional. Banco de la República - Sucursal Cartagena.

De Oliveira, J. B. 2014. Cacajao ouakary in Brazil and Colombia: patterns, puzzles and predictions. Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uacaris, 65, 179.

DeSalle, R., & Amato, G. 2004. The expansion of conservation genetics. Nature Reviews Genetics, 5(9), 702-712.

Dewoody J, Nason J & Hipkins VD. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. Molecular Ecology Notes, 6: 951–957.

Díaz-Muñoz S. L. 2010. Behavior, Ecology and Genetics of Geoffroy's Tamarin (*Saguinus geoffroyi*). Berkeley University Thesis Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Integrative Biology Berkeley University Thesis Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Integrative Biology.

Acevedo Y. A. 2015. Composición genética y valoración clínica de grupos sociales e individuos en cautiverio de Tití gris (Callitrichidae: *Saguinus leucopus*) en el área de distribución en el departamento de Antioquia. Trabajo de investigación para optar al título de Maestría en Biología.

Díaz-Muñoz S. L. 2011. Paternity and relatedness in a polyandrous nonhuman primate: testing adaptive hypottheses of male reproductive cooperation. Animal Behaviour. 82: 563-571.

Díaz-Muñoz, S. L. 2012. Role of recent and old riverine barriers in fine-scale population genetic structure of Geoffroy's tamarin (Saguinus geoffroyi) in the Panama Canal watershed. Ecology and evolution, 2(2), 298-309.

Di Fiore, A., Link, A., Schmitt, C. A., & Spehar, S. N. 2009. Dispersal patterns in sympatric woolly and spider monkeys: integrating molecular and observational data. Behaviour, 146(4), 437-470.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A. 2012 Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 Molecular Biology and Evolution 29: 1969-1973.

Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetics resources, 4(2), 359-361.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat. Rev. Genet, 5: 435-445.

Emmons LH. 1997. Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide. The University of Chicago Press, Chicago, USA, 732 pp.

Etter A, McAlpine C, Pullar D, Possingham H. 2006a. Modeling the conversion of Colombian lowland ecosystems since 1940: drivers, patterns and rates. Journal of Environmental Management, 79: 74–87.

Etter A, McAlpine C, Wilson K, Phinn S, Possingham H. 2006b. Regional patterns of agricultural land use and deforestation in Colombia. Agriculture, Ecosystems and Environment, 114: 369–386.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611–2620.

Ewers RM & Didham RK. 2006. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. Biol. Rev, 81: 117-142.

Excoffier, L. & H.E. L. Lische. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst, 34: 487-515.

Farias, I. P., Santos, W. G., Gordo, M., & Hrbek, T. 2015. Effects of Forest Fragmentation on Genetic Diversity of the Critically Endangered Primate, the Pied Tamarin (*Saguinus bicolor*): Implications for Conservation. Journal of Heredity, 106(S1), 512-521.

Field, M. & Guatelli-Steinberg, D. 2003. Dispersal and the Inbreeding Avoidance Hypothesis Primate Report, 67: 7-60

Flagstad O, Narendra MB, Kvernstuen LG, Wegge P. 2012. Conserving small and fragmented populations of large mammals: Non-invasive genetic sampling in an isolated population of Asian elephants in Nepal, Journal for Nature Conservation, 20 (3): 12-18.

Frankham, R., Lees, K., Montgomery, M. E., England, P. R., Lowe, E. H., & Briscoe, D. A. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?. Animal Conservation, 2(4), 255-260.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, UK, 573 pp.

Frankham R. 2005. Genetics and extinction. Biological Conservation. 126(2): 131–140.

Frankham R. 2006. Genetics and landscape connectivity. Connectivity conservation. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 72-96.

Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L., & Hausser, J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. Molecular Biology and Evolution, 13(1), 31-46.

Garber, P. A., & Kowalewski, M. M. 2015. New challenges in the study of howler monkey behavioral ecology and conservation: where we are and where we need to go. In Howler Monkeys (pp. 413-428). Springer New York.

Gehring T & Swihart R. 2003. Body size, niche breadth, and ecologically scaled responses to habitat fragmentation: mammalian predators in an agricultural landscape. Biological Conservation, 109: 283-295.

Gillespie TR & Chapman CA. 2008. Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. Am. J. Primatol, 70: 222-230.

Goldizen AW. 1988. Tamarin and marmoset mating systems: unusual flexibility. Trends Ecol Evol 3:36–40.

Gómez-Posada, C., & Londoño, J. M. 2012. *Alouatta seniculus*: density, home range and group structure in a bamboo forest fragment in the Colombian Andes. Folia Primatológica, 83(1), 56-65.

González-Solís J, Guix JC, Mateos E, Llorens L. 2001. Population density of primates in large fragment of the Brazilian Atlantic Forest. Biodivers. Conserv, 10: 1267-1282.

González E. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia, 59(2-3): 377-388.

Goossens B, Chikhi L, Ancrenaz M, Lackman-Ancrenaz I, Andau P, *et al.* 2006. Genetic signature of anthropogenic population collapse in orangutans. PLoS Biol 4: e25.

Goudet J. 1995. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). J Hered 86 (6): 485-486

Gordo M, Calleia FO, Vasconcelos SA, Leite JJ & Ferrari SF. 2013. The Challenges of Survival in a Concrete Jungle: Conservation of the Pied Tamarin (*Saguinus bicolor*) in the Urban Landscape of Manaus, Brazil. In Primates in Fragments (pp. 357-370). Springer New York.

Groves C. 2001. Primate Taxonomy. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. & London, 908 pp.

Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Leger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. Mol. Ecol. Resour, 11: 591-611.

Guschanski, K., Vigilant, L., McNeilage, A., Gray, M., Kagoda, E., & Robbins, M. M. 2009. Counting elusive animals: comparing field and genetic census of the entire mountain gorilla population of Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. Biological Conservation, 142(2), 290-300.

Hacker JE, Cowlishaw PH & Williams GT. 1998. Patterns of African primate diversity and their evaluation for the selection of conservation areas. Biological Conservation, (84)3: 251–262.

Hall TA. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.

Hanski I, Alho J & Moilanen A. 2000. Estimating the parameters of migration and survival for individuals in metapopulations. Ecology, 81: 239–251.

Hanski I & Gaggiotti OE. 2004. Metapopulation biology: Past, present, and future. Ecology, 5: 3-22.

Harcourt AH & Doherty DA. 2005. Species-area relationships of primates in tropical forest fragments: a global analysis. J. Appl. Ecol, 42: 630-637.

Hedrick PW, Parker KM & Lee RN. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. Molecular Ecology, 10: 1399–1412.

Henle K, Davies KF, Kleyer M, Margules C, Settele J. 2004. Predictors of species sensitivity to fragmentation. Biodivers. Conserv, 13: 207-251.

Hernandez-Camacho J, Cooper RW. 1976. The nonhuman primates of Colombia. In: Thorington RWJr, Heltne PG (eds) Neotropical primates: field studies and conservation. National Academy of Sciences, Washington, DC, pp 35–69.

Hershkovitz P. 1977. Living new world monkeys (Platyrrhini) with introductionto primates. Vol 1. University of Chicago press. Chicago.

Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK. & Harrison RG. 2003. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. TRENDS in Ecology and Evolution, 18 (11): 67-74.

Hoffman J & Amos W. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. Molecular Ecology,14: 599–612.

Hoffman, J, S Grant, J Forcada and C Phillips 2011. Bayesian inference of a historical bottleneck in a heavily exploited marine mammal. Molecular Ecology, 20, 3989-4008.

Holleley, C.E. & Geerts, P.G. 2009 Multiplex Manager 1.0: a crossplatform computer program that plans and optimizes multiplex PCR BioTechniques, Vol 46, No 7, pp 511-517

Hoyos, M., Tusso, S. & Bloor, P. En preparación. Cost-effective and simple animal DNA extraction protocol from wildlife and forensic samples using Guanidinium-thiocyanate (GuSCN) and Silicon Dioxideitle, Bogotá, Colombia.

Hsu, T. C., & Benirschke, K. 2013. An atlas of mammalian chromosomes (Vol. 10). Springer Science & Business Media.

Huck M, Ross C, Heymann EW. 2007. Spatio-genetic population structure in mustached tamarins. Saguinus Mystax. America Journal of Physical Antropology 132: 576-583.

Hudson, R.R. & Coyne, J.A. 2002. Mathematical consequences of the biological concept of species. Evolution 56:1557-1565.

Ibarguchi G, Friesen VL, Lougheed SC. 2006. Defeating numts: Semi-pure mitochondrial DNA from eggs and simple purification methods for field-collected wildlife tissues. Genome. 49: 1438-1450.

Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST. 2005. Isolation by distance, web service. BMC Genetics, 6: 13-19.

Jin L, Underhill PA, Buoncristiani M, Robertson JM. 1997. Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non–human primates. J Forensic Sciences; 42:496.

Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2009. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes, Genomes and Genomics, 3(1): 1-14.

Kimberly A, Selkoe & Robert JT. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9: 615–629.

Koblmuller S, Wayne RK, Leonard JA. 2012. Impact of Quaternary climatic changes and interspecific competition on the demographic history of a highly mobile generalist carnivore, the coyote. Biol Lett 8: 644–647.

Koichiro T, Glen S, Daniel P, Alan F, and Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution: 30 2725-2729.

Kolleck J, Yang M, Zinner D, Roos C. 2013. Genetic Diversity in Endangered Guizhou Snub-Nosed Monkeys (Rhinopithecus brelichi): Contrasting Results from Microsatellite and Mitochondrial DNA Data. PLoS ONE 8(8): e73647.

Koreth J, O´Leary J & Mcgee J. 1996. Microsatellites and PCR Genomic Analysis. J. Pathol, 178: 239-248.

Kress WJ, Heyer WR, Acevedo P, Coddington J, Cole D, Erwin TL, Meggers BJ, Pogue M, Thorington Jr RW, Vari RP, Weitzman MJ, Weitzman SH. 1998. Amazonian biodiversity: assessing conservation priorities with taxonomic data. Biodiv. Conserv. 7: 1577–1587.

Librado, P., & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25, 1451-1452.

Linacre A. 2009. Nature of Wildlife, Their Investigations and Scientific Processes. En: Linacre, A., Forensic Science in Wildlife Investigations. 2009: Taylor and Francis. 19: 1-8.

Lindenmayer DB & Fischer J. 2007. Tackling the habitat fragmentation panchreston. Trends in Ecology & Evolution, 22: 127-132.

Liu, Z., Ren, B., Wu, R., Zhao, L., Hao, Y., Wang, B., *et al.* & Li, M. 2009. The effect of landscape features on population genetic structure in Yunnan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) implies an anthropogenic genetic discontinuity. Molecular Ecology, 18(18), 3831-3846.

McKay, J. K. & Latta, R. G. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. Trends in Ecology & Evolution, 17(6), 285-291.

Massicot P. 2006. Animal info-white-footed tamarin. Primate Info Net. University of Wisconsin Madison. Disponible en:
http://www.animalinfo.org/species/primate/saguleuc.htm Consultado el 10 de octubre de 2015.

Maudet C, Miller C, Bassano B, Breitenmoserwürsten C, Gauthier D, Obexer-Ruff G, Michallet J, Taberlet P & Luikart G. 2002. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [Capra ibex (ibex)]. Molecular Ecology, 11: 421-436.

Metzgar D, Bytof J, Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits Microsatellite expansion in coding DNA. Genome Res, 10: 72-80.

Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC genomics, 9(1), 214.

Miles G, Lance S, Isberg S, Moran C, Glenn T. 2009. Cross-species amplification of microsatellites in crocodilians: Assessment and applications for the future. Conservation Genetic, 10: 935–954.

Mills, L. S. 2012. Conservation of wildlife populations: demography, genetics, and management. John Wiley & Sons.

Moilanen A & Nieminen M. 2002. Simple Connectivity Measures in Spatial Ecology. Ecology 83(4): 1131–1145.

Moritz C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. Trends in Ecology and Evolution, 9: 373–375.

Moynihan M. 1976. The New World primates: Adaptive radiation and the evolution of social behavior, languages, and intelligence. Princeton University Press, Princeton, N. J. 262 pp.

Muller F, Voccia M, Ba A & Bouvet JM. 2009. Genetic diversity and gene flow in a Caribbean tree *Pterocarpus officinalis*: a study based on chloroplast and nuclear microsatellites. Genet. Vol, 135 (2): 185-198.

Nagamachi CY, Pieczarka JC, Muniz JA, Barros RM, Mattevi MS. 1999. Proposed chromosomal phylogeny for the South American primates of the Callitrichidae family (Platyrrhini). Am J Primatol. 1999; 49:133-152.

Nikitina TV & Nazarenko SA. 2004. Human Microsatélites: Mutation and Evolution. Russ. J. Genet, 4(10): 1065-1079.

Oklander, L. I., Kowalewski, M. M., & Corach, D. 2010. Genetic consequences of habitat fragmentation in black-and-gold howler (*Alouatta caraya*) populations from northern Argentina. International journal of primatology, 31(5), 813-832.

Ortega J & Maldonado J. 2007. Caracterización y Evolución de Microsátelites en Murciélagos (Orden Chriroptera). Tópicos en Sistemática, Biogeografía, Ecología y Conservación de Mamíferos. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 1: 71-79.

Palsbøll, P. J., Berube, M., & Allendorf, F. 2007. Identification of management units using population genetic data. Trends in Ecology and Evolution, 22: 11-16.

Palstra, F. P. And Ruzzante, D. E. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence?. Molecular Ecology, 17: 3428–3447.

Pearson, S. M. 2013. Landscape Ecology and Population Dynamics. Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition). S. A. Levin. Waltham, Academic Press: 488-502.

Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet-Bëer, E., Robinson, S., Vásquez-Carrillo, C., Pauli, J. N. And Palsbøll, P. J. 2012. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. Molecular Ecology, 21: 3403–3418.

Peter BM, Wegmann D, Excoffier L. 2010. Distinguishing between population bottleneck and population subdivisión by a bayesian model choice procedure. Molecular Ecology, 19, 4648–4660.

Petit RJ & Excoffier L. 2009. Gene flow and species delimitation. Trends in Ecology and Evolution, 24(7): 32-45.

Pérez-Pinzón V, Cabrera-Amaya DM, Montenegro OL, Palomino PS. 2011. Caracterización del hábitat de tres grupos de tití gris (*Saguinus leucopus*) en un paisaje transformado por actividades agropecuarias en Victoria, Caldas. Asociación Primatológica Colombiana. Bogotá D.C., Colombia. P 155-163.

Philander GS. 2012. Encyclopedia of Global Warming and Climate Change. Princeton University. Second Edition. SAGE Publication, Inc.

Pinto, M. P., de Lima, A. A., & Grelle, C. E. V. (2014). Multi-Scales Analysis of Primate Diversity and Protected Areas at a Megadiverse Region.

Pires-Costa L, Leite YLR, Mendes SL, Ditchfield AD. 2005. Mammal Conservation in Brazil, Conservation Biology, 19: 672-679.

Pompanon F, Bonin A, Bellemain E & Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature Reviews Genetics, 6:847-846.

Poveda K & Sanchez P. 2004. Habitat use by the white-footed tamarin, *Saguinus leucopus*: A comparison between a forest-dwelling group and an urban group in Mariquita, Colombia. Neotropical Primates. 2004; 12(1):6-9.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.

Pusey, A., & Wolf, M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. Trends in Ecology and Evolution, 11(5), 201-206.

Quemere E, Crouau-roy B, Rabarivola, C., Louis E. & Chikhi, L. 2010. Landscape genetics of an endangered lemur (*Propithecus tattersalli*) within its entire fragmented range. Molecular Ecology,19(8), 1606-1621.

Ricketts TH. 2001. The matrix matters: effective isolation in fragmented landscapes. American Naturalist, 158: 87-99.

Robbins, M. M., Robbins, A. M., Gerald-Steklis, N., & Steklis, H. D. 2007. Socioecological influences on the reproductive success of female mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 61(6), 919-931.

Rodríguez JM, Alberico M, Trujillo F, Jorgenson J. Editores. 2006. Libro rojo de los mamíferos de Colombia. Serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Conservación internacional Colombia & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial: Bogotá, Colombia.

Roncancio N, Rojas W, Esteves J. 2009. Densidad poblacional y tamaño de grupo de *Saguinus leucopus* en parches de bosque en el departamento de Caldas, Colombia. Neotropical Primates 15 (2): 63-67.

Roncancio N, Rojas W, Defler T. 2011. Densidad poblacional de *Saguinus leucopus* en remanentes de bosque con diferentes características físicas y biológicas. Mastozool. neotrop. [online]. vol.18, n.1, pp. 105-117. ISSN 0327-9383.

Roncancio N, Díaz V, Ríos C, Posada C, Chacon C, Giraldo P, Velasco J, Franco P. 2012. Plan De Conservación y Manejo Del Tití Gris (*Saguinus leucopus*) Sistema Regional de Áreas Protegidas del Eje Cafetero Colombiano (SIRAP-EC).

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic biology, 61(3), pp.539–42.

Ross CN, French JA, Orti G: 2007. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). Proc Natl Acad Sci, 104(15):6278-6282.

Rouquette J & Thompson D. 2007. Patterns of movement and dispersal in an endangered damselfly and the consequences for its management. Journal of Applied Ecology, 44: 692–701.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz S (eds) Bioinformatics methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, 365–386 pp.

Ruivo E & Carroll JB. 2002. Guías de manejo de la EAZA para Callitricidos. Biología y estado en libertad. Carroll JB editor Bristol Zoogardens. 97-107 pp.

Ruiz-García, M., Castillo, M. I., Álvarez, D., Gardeazabal, J., Borrero, L. M., Ramírez, D. M. & Gálvez, H. 2007. Estudio de 14 especies de primates platirrinos (*Cebus, Saimiri, Aotus, Saguinus, Lagothrix, Alouatta y Ateles*), utilizando 10 loci microsatélites: análisis de la diversidad génica y de la detección de cuellos de botella con propósitos conservacionistas. Orinoquia, 11(2), 19-37.

Ruiz-García M, Leguizamon N, Vásquez C, Rodriguez K y Castillo MI. 2010. Metoddos genéticos para la reintroducción de monos de los géneros *Saguinus*, *Aotus* y *Cebus* (Primates: Cebidae) decomisados en Bogotá, Colombia. Revista de Biologia Tropical 58: 1049-1067.

Ruiz-García M, Escobar-Armel P, Leguizamon N, Manzur P, Pinedo-Castro M, Shostell J. 2014. Genetic characterization and structure of the endemic of the endemic Colombian silvery Brown bare-face tamarin, *Saguinus leucopus* (Callitrichinae, Cebidae, Primates). Primates, 55: 415-435.

Rutz C , Ryder TB & Fleischer RC. 2012. Restricted gene flow and fine-scale population structuring in tool using New Caledonian crows. Naturwissenschaften, 99(4): 313-320.

Ryder OA. Conservation genomics: Applying whole genome studies to species conservation efforts. Cytogenet Genome Res, 108: 6-15.

Sánchez-Londoño J. 2007. Censo de Tití gris Saguinus leucopus (Cebidae-Primates) en el bosque de Bella Vista, municipio de Victoria, Caldas. Informe final. Programa de Conservación de Saguinus leucopus. Fundación Biodiversa Colombia-Corpocaldas. Medellín, Colombia.

Santamaría M., C. Devenís, AM. Franco, JD. Sánchez, H. Mendoza, C. Pedraza, F. Forero & S. Medina. 2007. Densidad y ecología básica del Tití gris Saguinus leucopus en el área de influencia del Embalse Amaní, Norcasia, Caldas. Informe final. Instituto Alexander Von Humboldt – ISAGEN. Bogotá DC., Colombia.

Sambrook J & Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol-chloroform. CSH protocols, 2006(1), 4455.

Salmona J, Salamolard M, Fouillot D, Ghestemme T, Larose J, *et al.* 2012. Signature of a pre-human population decline in the critically endangered Reunion Island endemic forest bird Coracina newtoni. PloS one 7: e43524.

Scheneider H. 2000. The Current Status of the New World Monkey Phylogeny. An Acad Bras Cienc. 2000; 72:165-172.

Schwartz MK, Luikart G, Waples RS. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management, Trends in Ecology Evolution, 22(1): 25-33.

Selkoe KA & Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol. Lett, 9: 615-629.

Sigurgardottir, S. *et al.*, 2000. The mutation rate in the human mtDNA control region. Am J Hum Genet, 66(5), pp.1599–1609.

SINCHI. 2007. Balance Anual sobre el Estado de los Ecosistemas y el Ambiente de la Amazonia Colombiana 2006. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI), Bogotá,127 pp.

Soto-Calderón IS, Clark NJ , Wildschutte JV, DiMattio K, Jensen-Seaman MI, Anthony NM. 2013. Identification of species-specific nuclear insertions of mitochondrial DNA (numts) in gorillas and their potential as population genetic markers. Molecular Phylogenetics and Evolution 81 (2014) 61–70

Soulsbury C, Iossa G, Edwards K. Carl D. 2009. The influence of evolutionary distance between cross-species microsatellites and primer base-pair composition on allelic dropout rates." Conservation Genetics 10(3): 797-802.

Stéphanie M, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics, Trends in Ecology Evolution, 18(4): 189-197.

Sterck, E. H., Watts, D. P., & van Schaik, C. P. 1997. The evolution of female social relationships in nonhuman primates. Behavioral Ecology and Sociobiology, 41(5), 291-309.

Stevenson, P. R., Guzmán, D. C., & Defler, T. R. 2010. Conservation of Colombian primates: an analysis of published research. Trop Conserv Sci, 3(1), 45-62.

Sweeney, C. G., Curran, E., Westmoreland, S. V., Mansfield, K. G., & Vallender, E. J. 2012. Quantitative molecular assessment of chimerism across tissues in marmosets and tamarins. BMC genomics, 13(1), 98.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tachibana, M., Sparman, M., Ramsey, C., Ma, H., Lee, H. S., Penedo, M. C. T., & Mitalipov, S. 2012. Generation of chimeric rhesus monkeys. Cell, 148(1), 285-295.

Tagliaro CH *et al.*, 1997. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. Mol Biol Evol, 14(6), pp.674–684.

Teichroeb, J. A., Wikberg, E. C., & Sicotte, P. 2009. Female dispersal patterns in six groups of ursine colobus (*Colobus vellerosus*): infanticide avoidance is important. Behaviour, 146(4), 551-582.

Templeton NL. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. Molecular Ecology, 7: 381–397.

Tobe SS, Kitchener AC & Linacre AMT. 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. PloS one, 5(11), pp. 14156.

Toth G, Gaspari Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Res, 10: 967-981

Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. 1994. Variation in Short Tandem Repeat Sequences: A Survey of Twelve Microsatellite Loci for Use as Forensic Identification Markers. Int. J. Legal. Med, 197: 13-20.

UICN 2013. UICN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.uicnredlist.org. Consultado: 16 de noviembre del 2015.

Van Oosterhout C, Hutchison, WF, Shipley, P and Wills, D. 2004. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology (4). pp. 535-538.

Velásquez CA, Rangel JO, Van der Hammen T. 2004. Paleoecología de alta resolución del Holoceno tardío en el Páramo de Frontino, Antioquia, Colombia. Acta Biológica Colombiana, Vol. 9 No. 2.

Vélez, M. I., Hooghiemstra, H., Metcalfe, S., Wille, M., & Berrío, J. C. 2006. Late Glacial and Holocene environmental and climatic changes from a limnological transect through Colombia, northern South America. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 234(1), 81-96.

Vigilant, L., & Guschanski, K. 2009. Using genetics to understand the dynamics of wild primate populations. Primates, 50(2), 105-120.

Vigilant, L., Roy, J., Bradley, B. J., Stoneking, C. J., Robbins, M. M., & Stoinski, T. S. 2015. Reproductive competition and inbreeding avoidance in a primate species with habitual female dispersal. Behavioral Ecology and Sociobiology, 1-10.

Vogle, A.F. & DeSalle, R. 1994. Evaluating units of conservation management. Conservation Biology 8:1739-1994.

Waples RS & Gaggiotti O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Molecular Ecology, 15: 1419–1439.

Williams BL, Brawn JD & Paige KN. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). Molecular Ecology, 12: 11–20.

Williams JW, Shuman BN, Webb III T, Bartlein PJ, Leduc PL. 2004. Late-Quaternary vegetation dynamics in North America: Scaling from taxa to biomes. Ecol Monogr 74: 309–334.

Wislocki GB. 1939. Observations on twinning in marmosets. The American journal of anatomy, 64(3):445-483.

Woischnik M and Moraes CT. 2002. Pattern of Organization of Human Mitochondrial Pseudogenes in the nuclear genome. Genome Res. 12: 885-893.

Yang J & Jiang Z. 2011. Genetic diversity, population genetic structure and demographic history of Przewalski's gazelle (Procapra przewalskii): implications for conservation Conserv Genet, 12: 1457–1468.

You-Chun L, Abraham BKl, Tzion F, Avigdor B & Eviatar N. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, 11: 2453-2465

Zhang X & Hewitt GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology, 12: 563–584.

Zhang ZD, Frankish A, Hunt T, Harrow J, Gerstein M. 2010. Identification and analysis of unitary pseudogenes: historic and contemporary gene losses in humans and other primates. Genome Biology 2010, 11:R26

Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.