



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Estudio poblacional de Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en los páramos del
Parque Nacional Podocarpus Loja - Ecuador.**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORES: Arias Calvachi, Daniela Elizabeth
Calle Castro, Rocío Estefanía

DIRECTOR: Cisneros Vidal, Rodrigo, Blgo.

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Biólogo.

Rodrigo Cisneros Vidal.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “Estudio poblacional de Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en los páramos del Parque Nacional Podocarpus Loja – Ecuador”, realizado por las profesionales en formación: Arias Calvachi Daniela Elizabeth y Calle Castro Rocío Estefanía; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, octubre de 2013



Blgo. Rodrigo Cisneros Vidal

CI: 1102744941

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Arias Calvachi Daniela Elizabeth y yo, Calle Castro Rocío Estefanía, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales..

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f. 
Arias Calvachi Daniela Elizabeth
1105039976

f. 
Calle Castro Rocío Estefanía
1105025520

DEDICATORIA

El siguiente trabajo investigativo va dedicado a mis amados padres Patricia y Pablo, por ser mi ejemplo a seguir, mi roca, por brindarme su apoyo incondicional, por ser siempre el incentivo que me ha permitido superarme y ser una mejor persona; a mis hermanas María Isabel, Claudia, María Belén y Ana Paula, por ser mi fuente de fortaleza y bondad; a mis Abuelitos Wilson, Zoila, Nicolás e Isabel (†) por ser modelos de vida y mi inspiración; a toda mi familia y amigos con quienes he tenido la dicha de compartir valiosos recuerdos y experiencias durante los años transcurridos.

Daniela Arias C.

El presente trabajo que ha sido realizado con mucho esfuerzo y sacrificio va dedicado a mis padres Marco Calle y Gloria Castro por ser siempre mi apoyo incondicional, mis amigos, mi ejemplo a seguir y quienes me han enseñado que la vida es un luchar continuo y que con dedicación y responsabilidad se puede conseguir todas las metas anheladas; a mi Hija Paulette Abigail que es el mayor motivo que me llevo a la culminación de mi carrera profesional; a mi hermana Elizabeth por su bondad y cariño; a toda mi familia y amigos que han compartido momentos inolvidables y que han estado presentes a lo largo de estos años.

Estefanía Calle C.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos, en primer lugar a Dios, por darnos salud, vida, fuerza y sabiduría para concluir este proyecto y poder cumplir con nuestras metas académicas y así culminar con esta etapa en nuestras vidas. A nuestro director de tesis Blgo. Rodrigo Cisneros Vidal, quien nos ha guiado a través de este proceso con su dedicación, conocimiento y apoyo incondicional, permitiéndonos concluir este trabajo y así crecer tanto personal como profesionalmente. A la Dra. Lisette Waits quien nos ha brindado su ayuda desinteresada tanto personal, profesional y académica. A la Universidad Técnica Particular de Loja por facilitar sus instalaciones e instrumentos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Agradecemos a nuestros queridos padres, Patricia y Pablo, Marco y Gloria quienes han estado presentes durante todo este proceso; quienes con sus consejos y enseñanzas nos han impulsado a seguir adelante y a cumplir con nuestras metas. A nuestros familiares y amigos por el apoyo brindado.

Daniela Arias
Estefanía Calle

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. Fin, Propósito y Componentes del Proyecto.....	6
1.1 Fin del Proyecto.	6
1.2 Propósito del Proyecto.....	6
1.3 Componentes del Proyecto.	6
CAPÍTULO II.....	7
2. Aspectos Generales.....	8
2.1 Oso Andino de Anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).....	8
2.2 Genética de Poblaciones.....	10
2.3 Muestreo Genético No Invasivo.....	10
2.4 Recolección y Conservación de Muestras.....	10
2.5 Extracción de ADN.....	11
2.6 Cuantificación Espectrofotométrica.....	11
2.7 Electroforesis del ADN en Geles de Agarosa.....	12
2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	12
2.8.1 PCR Multiplex.....	13
2.8.2 PCR Touchdown.....	13
2.8.3 Etapas de la PCR.....	14
2.8.3.1 Desnaturalización del ADN.....	14
2.8.3.2 Anillamiento/Unión del primer a la secuencia complementaria.....	14
2.8.3.3 Extensión/Elongación de la cadena.....	14
2.8.3.4 Elongación final.....	15
2.9 Marcadores Moleculares (Microsatélites) y su utilidad en Genética Poblacional.....	15

2.10	RelioType, GILMET y Equilibrio Hardy-Weinberg.	16
CAPÍTULO III.....		18
3. Materiales y Métodos.....		19
3.1	Extracción de ADN.....	20
3.2	Cuantificación y Comprobación.....	20
3.2.1	Análisis de ADN por Espectrofotometría.....	20
3.3	Electroforesis en geles de agarosa.	20
3.4	Amplificación de ADN nuclear.....	22
3.5	Análisis de Microsatélites.....	23
3.6	Análisis Estadístico y Poblacional.....	25
CAPÍTULO IV.....		26
4. Resultados y discusión.....		27
4.1	Cuantificación de ADN extraído.....	27
4.2	Adaptación de PCR “touchdown”	28
4.3	Tipificación genética y Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).....	30
CONCLUSIONES.....		35
RECOMENDACIONES.....		36
BIBLIOGRAFIA.....		37

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Temperatura de anillamiento, secuencias (dirección 5' -> 3') y rango de tamaño en pares de base (pb) de tres <i>loci</i> de microsatélites. FAM (azul) y HEX (amarillo) denotan las etiquetas de tinción.....	22
Tabla 2. Cuadro comparativo de las diferentes condiciones de PCR aplicadas a los 4 experimentos de adaptación.....	24
Tabla 3. Temperatura de anillamiento, secuencias (dirección 5' -> 3') y rango de tamaño en pares de base (pb) de 9 <i>loci</i> de microsatélites. FAM, HEX y TET denotan las etiquetas de tinción.....	25
Tabla 4. Valores significativos de concentraciones de ADN en ng/μl, cuantificados con Nanodrop.....	27
Tabla 5. Resultados de Reliotype.....	31
Tabla 6. Prueba Hardy-Weinberg.....	32

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. El Oso Andino (<i>Tremarctos ornatus</i>) y su coloración característica. Individuo en la vida silvestre.....	8
Figura 2. Rango de distribución del Oso Andino en Áreas protegidas (negro) y no protegidas (gris).....	9
Figura 3. Fundamento de la PCR: Fases de desnaturalización, anillamiento/unión del iniciador a la secuencia complementaria y extensión.....	15
Figura 4. Resumen de la metodología utilizada en el Estudio Poblacional de Oso Andino (<i>Tremarctos ornatus</i>) en los páramos del Parque Nacional Podocarpus Loja - Ecuador.....	19
Figura 5. Esquema de protocolo QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN® para extracción de ADN fecal.. ..	21
Figura 6. Esquema de protocolo QIAGEN® Dneasy Blood and Tissue para extracción de ADN.....	22
Figura 7. Gel de agarosa 3% de ADN extraído de muestras del 2009-2011. C+A y C+P hacen referencia a los controles positivos de muestras de sangre de los Osos Augusto y Penélope del Zoológico Municipal de Loja.. ..	28
Figura 8. Plano de GENEMAPPER donde se observa ruido y ningún pico para el <i>loci</i> G100, con el 1 ^{er} y 2 ^{do} Experimento.	29
Figura 9. Plano de GENEMAPPER donde se observa picos débiles para el <i>loci</i> G100, con el 3 ^{er} Experimento.	29
Figura 10. Plano de GENEMAPPER donde se observa picos claros para el <i>loci</i> G100, con el 4 ^{to} Experimento.....	29

RESUMEN

Se trabajó con 64 muestras de heces y pelo de Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) colectadas entre el 2009-2011 por el grupo de trabajo de mamíferos del departamento de Ciencias Naturales de la UTPL, en las que se adaptó cuatro condiciones diferentes de PCR; además se analizaron genéticamente cinco muestras de pelo colectadas durante el año 2006. Los resultados de los experimentos de adaptación permitieron encontrar tres nuevos alelos fiables no reportados para la región. Las muestras del 2006 presentaron una riqueza alélica de 3.11 para los 8 *loci* analizados, una heterocigosidad observada de 0.53 y la presencia de dos nuevos alelos no reportados. Los resultados genéticos poblacionales muestran una primera aproximación de las características de la población de osos de la región. La riqueza alélica muestra valores similares a los reportados en investigaciones previas, pero siguen siendo bajos en comparación a otras especies de osos. La aparición de alelos nuevos representa un indicio de estructuración genética que deberá confirmarse con posteriores estudios exhaustivos de otras poblaciones de Oso Andino a nivel eco regional.

Palabras Clave: Oso Andino de Antejos, PCR, riqueza alélica, alelos, población.

ABSTRACT

We worked with 64 feces and hair samples of Spectacled Andean Bear (*Tremarctos ornatus*) collected between 2009-2011 by the UTPL Biology team, in which, a chain reaction polymerase (PCR) conditions were adapted; also five hair samples of this specie collected in 2006 were genetically analyzed. The adaptation results allowed us to find three new reliable alleles not reported for the region. Hair samples from 2006 had an allelic richness of 3.11 for the 8 *loci* analyzed, an observed heterozygosity of 0.53 and the presence of two new alleles not reported. The population genetic results represent a first approximation of the characteristics of the population of bears in the region. The allelic richness found shows similar values to those reported in previous research, but remain low compared to other species of bears. The emergence of new alleles is an indication of genetic structuring that needs to be confirmed by further in-depth studies of other populations of Andean Bear at an ecoregional level.

Key Words: Spectacled Andean Bear, PCR, allelic richness, new alleles, population.

INTRODUCCIÓN

Los estudios genéticos de poblaciones de animales silvestres a menudo se ven obstaculizados por las dificultades en la obtención de muestras de sangre (Lathuillière et al., 2001; Piggott et al., 2003; Ruiz-García, 2005); los métodos no invasivos de recolección de muestras, como el ADN fecal, puede ser el único método viable para la obtención de datos genéticos de poblaciones (Kovach, I., Litvaitis, K., & Litvaitis. A., 2003). Los avances recientes en biología molecular han permitido el uso de muestras no invasivas como fuente de ADN (por ejemplo, pelo o heces), pero un problema fundamental es que estas muestras pueden proporcionar baja cantidad y calidad del ADN y evitar que la determinación de los genotipos sea verdadera en el análisis de ADN (Lathuillière et al., 2001). Este tipo de muestreo es un método para obtener muestras genéticas de rara y difícil procedencia. En los últimos años, los investigadores han demostrado una variedad de aplicaciones para este tipo de muestreo que incluye la detección de especies raras a través de aplicaciones forenses (Waits & Paetkau, 2005). Otros investigadores han considerado algunos inconvenientes tales como: las bajas tasas de éxito en la amplificación, la contaminación frecuente de este tipo de muestras y las altas tasas de errores de genotipado con microsatélites (Taberlet et al., 1996, 1997 & 1999; Goossens et al., 1998; Piggott, 2004).

La obtención de información sobre las características genéticas de los animales salvajes es de considerable interés para los estudios de la estructura de la población y para la determinación del parentesco. Las características genéticas son una herramienta muy útil para dilucidar la dinámica y la organización social de las poblaciones silvestres (Paetkau et al., 1995; Chapuisat et al., 1997; Petit et al., 1997), y también proporcionar información valiosa para la conservación de las especies (Taylor et al., 1994; Kohn et al., 1995; Taberlet et al., 1997). Algunos métodos de preservación óptimos pueden mejorar el éxito de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y aumentar la factibilidad de usar ADN fecal; las muestras preservadas en etanol al 90% tienen mayores tasas de éxito de amplificación (26-88%) comparado con otros métodos, tanto para ADNmt (86.5%) y ADNn (84%) (Murphy et al., 2002).

Los microsatélites (STRs) son regiones del genoma eucarionte en las que una secuencia corta (2-6 pb) se repite cierto número de veces. A partir de la demostración de la existencia de variabilidad genética en estas regiones y la posibilidad de su detección mediante amplificación por PCR se puede lograr millones de copias de la región. (Weber & May, 1989). Los STRs se han convertido en la principal fuente de marcadores genéticos para estudios poblacionales, ya que son abundantes, están distribuidos regularmente en el

genoma, se heredan de forma co-dominante y poseen un elevado grado de variabilidad en las poblaciones (Petit et al., 1997; Moazami-Goudarzi et al., 1997). Estos STRs para locus específicos se encuentran flanqueados por cebadores (*primers*) que han sido sintetizados con un grupo de colorantes fluorescentes (un fluorocromo por primer) en el extremo 5' para permitir la detección y el tamaño de los fragmentos en un secuenciador de ADN, permiten identificar precisamente a los alelos y brindan también ventajas determinantes para evitar combinación durante la separación de las bandas; con ventaja para genotipificación de alto rendimiento y simultáneos análisis de múltiples loci. Los fluorocromos son detectados por un rango de longitud de onda específico para cada colorante lo que permite dar un tamaño estimado de la banda, creando así una mejor señal y definición en los picos obtenidos (Buchanan et al., 1994). El colorante LIZ de color naranja, es el marcador de peso molecular de tamaño estándar, el cual es el necesario para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Ya que el uso de muestras no invasivas de pelo y heces como fuente de ADN pueden generar diversos errores, este proyecto se enfocó en la adaptación de la PCR usando microsatélites marcados con fluorocromos para mejorar la calidad del ADN amplificado y su posterior secuenciación; además de disminuir la tasa de error de genotipado en muestras de Oso Andino que habita en los páramos del Parque Nacional Podocarpus.

CAPITULO I

1. Fin, Propósito y Componentes del Proyecto

1.1. Fin del Proyecto.

Contribuir al conocimiento de la genética poblacional del Oso Andino en el sur del Ecuador y aportar con la adaptación de técnicas moleculares que permitan el estudio poblacional de especies silvestres.

1.2. Propósito del Proyecto.

Disminuir la cantidad de error de amplificación y secuenciación de ADN debido a la baja cantidad y degradación de ADN proveniente de muestras no invasivas para obtener resultados confiables para realizar el estudio poblacional de la especie.

1.3. Componentes del Proyecto.

Adaptar la técnica de PCR (con microsatélites marcados) para el uso en ADN fecal y de pelo.

Secuenciar los productos de PCR.

Realizar el análisis del tamaño mínimo poblacional de la especie en estudio, intentar definir variables genéticas poblacionales como la diversidad y estructura genética de la población de estudio.

CAPÍTULO II

2. Aspectos Generales

2.1. Oso Andino de Anteojos (*Tremarctos ornatus*).

La fauna de mamíferos del Ecuador está integrada por más de 380 especies, en su mayoría de pequeño y mediano tamaño, el Oso Andino es el mamífero más grande de los páramos y de las estribaciones andinas. En Ecuador las poblaciones de oso Andino habitan en un área aproximada de 58.000 km² entre páramo y bosque montano y nublado. Es una especie emblemática importante en planes de conservación de la riqueza biológica de los ecosistemas donde habita; tiene dieta omnívora, pero eventualmente oportunista, alimentándose de maíz y ganado bovino causando conflictos con los campesinos y ganaderos razón por la cual en algunos sectores son perseguidos y eliminados (Castellanos et al., 2010). El Oso Andino es de talla mediana, llega a medir entre 1,75 y 2 metros de longitud, de cabeza a cola y pesa entre 140 y 170 kilogramos, su pelaje es negro pero puede variar de café hasta rojizo (Figura 1).

Figura 1. El Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) y su coloración característica. Individuo en estado silvestre.



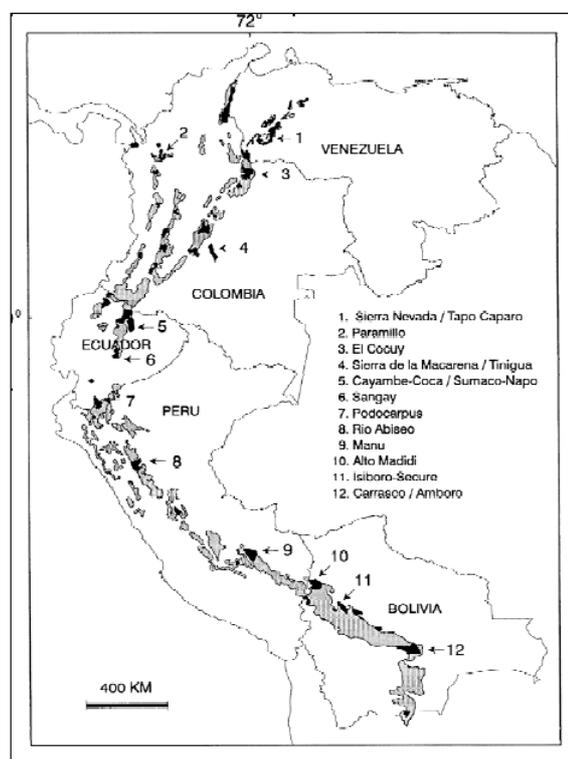
Fuente: Fotografía de Rodrigo Cisneros, Parque Nacional Podocarpus, 2006.

Desempeña papeles ecológicos importantes en los ecosistemas que habita. Por sus hábitos alimenticios frugívoros y vegetarianos, transportan semillas dentro de su sistema digestivo, a distancias que pueden superar los 54 km. Al ser eliminadas las heces, las semillas pueden germinar, promoviendo así la regeneración de la vegetación; también participa activamente en la sucesión vegetal de los bosques: ya que al subir a los árboles, por su gran peso y tamaño, en ocasiones rompe ramas y crean claros en el dosel, lo que permite la entrada de

luz solar al suelo activando el desarrollo de plántulas y árboles jóvenes. Como depredador cumple un papel casi nulo (la proporción de carne ingerida es menor al 10%) (Vela et al., 2011).

El Oso Andino, es considerado una especie vulnerable (IUCN 2008) y se ha catalogado como en peligro de extinción. Este animal ocupa grandes extensiones de bosques, muchos de los cuales no se hallan protegidos; tan sólo cerca de la quinta parte del hábitat potencial del oso se encuentra dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Figura 2). Otra de las principales amenazas a la conservación del oso Andino en el país es la reducción y fragmentación de bosques y páramos. Esta situación se da principalmente en el sector occidental de la cordillera andina, donde varios bosques se hallan fragmentados con poblaciones aisladas. Las estribaciones orientales constituyen por ahora, importantes refugios de esta especie. En esta zona se encuentran algunas áreas protegidas que con un manejo efectivo podrían asegurar la conservación de poblaciones viables de osos en el Ecuador. Si se logra conservar esta especie estaremos conservando el único oso de Sudamérica; así como mucha de la diversidad de los ecosistemas donde éste habita y como consecuencia los servicios ambientales que permiten asegurar la vida de la gente y del planeta (Leite Pitman et al., 2008).

Figura 2. Rango de distribución del Oso Andino en Áreas protegidas (negro) y no protegidas (gris).



Fuente: Peyton, 2007.

2.2 Genética de Poblaciones.

La genética de poblaciones estudia la microevolución de los organismos, es decir, la variación de las frecuencias de alelos, las frecuencias de genotipo y frecuencias de fenotipo de las poblaciones de cada especie; predice la diversidad que está determinada por un número de factores que incluyen la selección, la tasa de mutación, recombinación, la deriva genética y el tamaño efectivo de la población. La cantidad y la naturaleza de la variación genética en una población permite las estimaciones de: el tamaño efectivo de la población, historia de la población (migración, cuello de botella, la expansión reciente), estructura de la población; cómo la selección actúa sobre los genes y la ubicación de genes enfermos (mapeo de QTL) (Mburu & Hanotte, 2005). La importancia de la variación genética radica en que es uno de los predictores más poderosos de la probabilidad de la persistencia de las poblaciones (Kasworm et al., 2007).

2.3 Muestreo Genético No Invasivo.

Los estudios genéticos de poblaciones de animales salvajes a menudo se ven obstaculizados por las dificultades para obtener muestras directas. El muestreo genético no invasivo ofrece un gran potencial para aplicaciones de investigación y de gestión en biología de vida silvestre. Los investigadores pueden obtener ADN a partir de una variedad de fuentes incluyendo pelo, heces, orina, plumas, piel mudada, saliva y cáscaras de huevo, sin manipulación o la observación de los animales. Estas muestras se pueden utilizar para identificar la presencia de especies raras o difíciles de alcanzar, contar e identificar individuos, determinar el género e identificar los elementos de dieta, o para evaluar la diversidad genética, la estructura de la población, y sistema de apareamiento (Waits & Paetkau, 2005). Sin embargo, trabajar con muestras de este tipo puede presentar ciertas limitantes ya sea debido a la degradación del ADN, a la presencia de inhibidores de la PCR, dificultad en el proceso de amplificación y por lo tanto, errores en la genotipificación (Taberlet et al., 1999). El desarrollo de la PCR ha permitido obtener un elevado número de copias de una región concreta de ADN, incluso partiendo de una mínima cantidad inicial (<300pb), facilitando así, el estudio con muestras no invasivas que contienen poco ADN (Bosch et al., 2005). El muestreo genético no invasivo se enfoca principalmente en la conservación y manejo de especies en peligro de extinción (Piggott & Taylor, 2003) y en la detección y el recuento de especies raras y amenazadas (Paetkau, 2003).

2.4 Recolección y Conservación de Muestras.

El análisis de muestras fecales se está convirtiendo rápidamente en una herramienta importante en Ecología Molecular, Genética de Conservación y manejo de la vida salvaje (Murphy et al., 2000). La identificación de métodos óptimos de preservación puede aumentar la tasa de amplificación por PCR. En diversos estudios de ADN fecal, se han probado distintos métodos de conservación, tales como: etanol al 90%, tampón de DETs, sílica gel, secado en estufa almacenado a temperatura ambiente, y secado al horno con posterior almacenamiento a -20°C, siendo las muestras conservadas en etanol las que obtuvieron índices más altos de amplificación por PCR. El tiempo de almacenamiento debe ser una consideración importante, siendo lo ideal realizar la extracción al poco tiempo de recolectada la muestra independientemente de las condiciones de recogida en el campo (Murphy et al., 2002 y Frantzen et al., 1998), ya que mientras la edad de las muestras de heces aumenta, hay menos ADN de buena calidad presente en su superficie (Piggott, 2004).

2.5 Extracción de ADN.

El método de extracción debe asegurar un alto rendimiento y la calidad del ADN obtenido y debe ser seleccionado cuidadosamente, ya que incluso los componentes de las soluciones de extracción de ADN pueden influir en las reacciones de PCR (Gankar et al., 2006). Una gran cantidad de protocolos de extracción han sido desarrollados a través de los años, cuyo fundamento se basa en romper las paredes celulares y solubilizar el ADN, remover proteínas y otras macromoléculas contaminantes por medio de enzimas de digestión (Ausubel et al., 2003). La ubicación del ADN de interés varía dependiendo del tipo de muestra a analizar, por ejemplo, en muestras de pelo se obtiene ADN de las células localizadas alrededor del folículo capilar siendo ideal realizar la extracción si hay la presencia de folículo, para asegurar que esto pase y haciendo énfasis en el uso de técnicas de muestreo no invasivo, se usan trampas de pelo que no suponen riesgo alguno para el animal en estudio (Piggott & Taylor, 2003; Bosch et al., 2005). Cuando se usa muestras de heces para estudios moleculares, la principal dificultad presente es que especies relacionadas pueden presentar morfología y tamaño de excrementos similares lo que puede causar confusión al momento de su recolección. La fuente de ADN en este tipo de muestras procede de las células epiteliales del lumen del intestino las mismas que en las heces, son escasas y el ADN que brindan suele estar degradado (Bosch et al., 2005).

2.6 Cuantificación Espectrofotométrica.

El NanoDrop ND-2000, es un equipo conectado a un sistema informático que permite cuantificar la materia de forma muy exacta y precisa en base a la medida de absorbancia de la misma. Luego de iniciar el sistema con la opción de medición de muestras de ácidos

nucleicos y efectuar un lavado de las lentes (base y tapa) con agua destilada des ionizada, mide las distintas concentraciones de ácidos nucleicos y arroja resultados en ng/ μ l, mg/ml o μ g/ml (purificación y cuantificación de productos de PCR, s.f). Este equipo además de valores de concentración, también da valores de longitud de onda de 260/280 y 260/230 que aportan información sobre pureza del producto.

2.7 Electroforesis del ADN en geles de Agarosa.

La concentración e integridad de ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos (por ejemplo, productos de PCR) pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Possoy-Ghneim, 2008).

La agarosa es un polímero lineal extraído de algas marinas, en el cual las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 (log 10) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre hacia el polo positivo (Puerta-Ureña, 2005). Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a migrar de forma distinta en un gel de electroforesis. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema. El agente revelante de preferencia para este tipo de geles es GelRed™, un colorante fluorescente de ácidos nucleicos muy sensible, extremadamente estable y ecológicamente seguro, diseñado para sustituir el bromuro de etidio (EB), altamente tóxico, para la tinción de ADN de doble cadena, ADN monocatenario o ARN (Stryer, 2003). La concentración de agarosa y el voltaje con los que se debe trabajar y dependen del tamaño del segmento de ADN que se quiera visualizar (Posso & Ghneim, 2008).

2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de Biología Molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis que permite la síntesis “*in vitro*” de secuencias específicas de ADN. La

técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5' – 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (primers). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Este proceso se lleva a cabo mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre si tras cada fase de replicación y, la unión sucesiva de estas hebras con la polimerasa para que vuelvan a duplicarse (Bartlett & Stirling, 2003).

2.8.1 PCR Multiplex.

La PCR multiplex es una PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares de primers en un único tubo de reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de primers de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varios loci en una sola reacción, utilizando menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos (Elnifro et al., 2000).

2.8.2 PCR Touchdown.

PCR *Touchdown* (PCR-TD) ofrece una manera rápida y simple para optimizar la PCR, aumentando la especificidad, sensibilidad y rendimiento, sin necesidad de optimizaciones largas o de rediseño de los primers (Korbie & Mattick, 2008). En lugar de múltiples tubos de reacción, cada uno con diferente concentración de reactivo y/o parámetros de los ciclos; un solo tubo o un pequeño conjunto de tubos se ejecuta bajo condiciones de ciclación iguales. Los ciclos múltiples se programan de modo que el anillamiento en ciclos secuenciales se ejecutan a temperaturas progresivamente más bajas. Mientras los ciclos avanzan, el segmento de temperatura de anillamiento, el cual inicialmente fue seleccionado para estar sobre la temperatura de fusión, disminuye gradualmente y cae por debajo de este nivel (Roux, 2013), al comienzo de la etapa de ciclo, la temperatura de hibridación se ajusta entre 5 y 10 °C más alta que la temperatura de fusión de los primers lo que favorece sólo el emparejamiento de bases más específica entre el primer y el molde y por lo tanto se amplifican solamente productos específicos (Don et al., 1991).

2.8.3 Etapas de la PCR.

La PCR consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos. Por lo general el número de ciclos es de 20 a 30, cada ciclo consiste en tres cambios de temperatura. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo, dependen de algunos parámetros en los que se incluye, la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción así como la temperatura de unión de los primers (Sambrook, 2001).

2.8.3.1 Desnaturalización del ADN.

En la primera etapa, antes de iniciar la desnaturalización por ciclos se realiza una desnaturalización inicial; en ambos procesos, la reacción es llevada a una temperatura de 94-96°C y se mantiene entre 30 segundos y un minuto. A estas temperaturas el ADN se desnaturaliza (se separan las dos hebras que lo constituyen). La temperatura a la cual se decide llevar a cabo esta etapa va a depender de la proporción de Guanina-Citocina (G-C) que tenga la hebra, así como también del largo de la misma (Figura 3), (Sambrook, 2001).

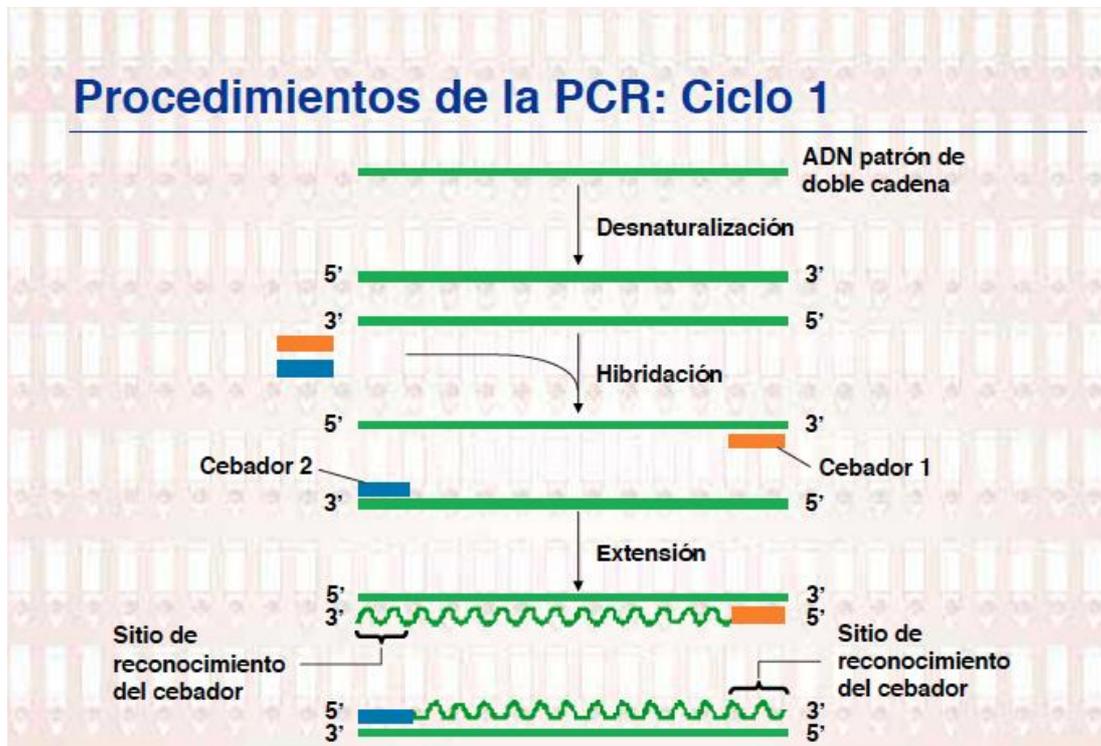
2.8.3.2 Anillamiento/Unión del primer a la secuencia complementaria.

En la segunda etapa también conocida como hibridación, los primers se unen a las regiones 3' complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar. Para ello, es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos, permitiendo así el anillamiento. La polimerasa se une entonces al híbrido formado por la cadena molde y el primer y empieza la síntesis del ADN. Los primers actúan como límite de la región de la molécula que va a ser amplificada (Figura 3), (Sambrook, 2001).

2.8.3.3 Extensión/Elongación de la cadena.

En la tercera etapa, la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementario a la hebra molde, añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'- 3' uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente. La temperatura en esta etapa depende de la ADN polimerasa que se utilice. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre 74-80°C, aunque por lo general se usa 74°C. El tiempo de elongación va a depender del tipo de polimerasa empleado, así como también del tamaño del fragmento de ADN que se requiere amplificar (Figura 3), (Sambrook, 2001).

Figura 3. Fundamento de la PCR: Fases de desnaturalización, anillamiento/unión del iniciador a la secuencia complementaria y extensión.



Fuente: Griffiths y Col, 1996.

2.8.3.4 Elongación final.

En la etapa final, la temperatura es regulada de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR, con el objeto de asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado. Por último, el producto amplificado es mantenido a una temperatura de 4°C por un periodo indefinido lo cual permite conservar el producto de la reacción. La detección del producto de la PCR se realiza normalmente mediante una corrida electroforética. Dependiendo del tamaño del producto de la amplificación y la resolución que se desea, se utilizan diferentes matrices de separación (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones (Sambrook, 2001 y Mathews, 2003).

2.9 Marcadores Moleculares (Microsatélites) y su utilidad en Genética Poblacional.

En los últimos años, la utilización de microsatélites como marcador molecular ha aumentado considerablemente, debido a dos características principales: su elevada tasa de polimorfismo y la posibilidad de poder trabajar con reducidas cantidades de ADN, que se pueden obtener sin que resulte necesario el sacrificio de ejemplares, es decir, trabajando

con muestras no invasivas. Los microsatélites, al igual que los mini satélites, son marcadores repetitivos o VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), constituidos por secuencias cortas de 1 a 6 pares de bases nucleotídicas que se repiten en tándem un elevado número de veces (SSRs, *Short Sequence Repeats*). Son muy abundantes en los genomas nucleares de todos los eucariotas, algunos procariontes, en los genomas de cloroplastos de las plantas (McCauley, 1995; Provan et al., 2001), e incluso hay evidencias de su presencia en algunos genomas mitocondriales de vertebrados (Hoelzel et al., 1993; Zardoya & Meyer, 1998). Presentan herencia mendeliana simple, son co-dominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigóticos de los heterocigóticos), y con un número muy alto de alelos en un mismo locus (altamente polimórficos). Su “genotipado” resulta relativamente fácil y automatizable, con la posibilidad de realizar amplificaciones múltiples en una misma reacción de PCR, con resultados fáciles de analizar, fiables y repetitivos (González, 2003).

Se sabe que se trata de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Ellegren, 2004).

Son marcadores apropiados para el estudio de genética de poblaciones en especies en peligro de extinción porque se pueden amplificar a partir de muestras de pelo, heces, hueso (Hoss & Paabo, 1993), plumas (Ellegren, 1993), biopsias, sangre, entre otros; que no suponen el sacrificio de los individuos a estudiar, como ya se mencionó. De esta forma es posible analizar el área de distribución, movimiento y estructura social de las poblaciones sin tener que tomar contacto directo con los individuos (Beheregaray et al., 2000; Sloane et al., 2000; Ernest, et al., 2000). A pesar de las grandes ventajas que poseen los microsatélites como marcadores moleculares, existen también otros factores negativos a considerar que pueden disminuir el poder y/o la sensibilidad de éstos como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Estos factores son: el patrón de mutación, los alelos nulos y la homoplasia (Aranguren-Méndez et al., 2004; González, 2003).

2.10 RelioType, GILMET y Equilibrio Hardy-Weinberg.

GENEPOP V4.2 (Raymond & Rousset, 1995), es un software diseñado para el análisis de genética de poblaciones, permite evaluar datos de individuos haploides o diploides. Tiene dos ventajas principales, en primer lugar, calcula la prueba exacta o su estimación imparcial del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), diferenciación de la población y desequilibrio genotípico; y en segundo lugar, convierte el archivo de entrada de GENEPOP a los formatos utilizados por otros programas populares, como BIOSYS, DIPLOIDL, LINKDOS Programa Slatkin's aislamiento por distancia; permitiendo de este modo la comunicación entre ellos (Raymond & Rousset, 2003). El modelo de Hardy-Weinberg se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas, para establecer si la composición genética de una población está en equilibrio. Esta prueba representa a una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación y migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación y, además, existe una relación simple entre ambas. Así, una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio H-W (Aranguren-Méndez, 2004).

RelioType es un programa para evaluar la fiabilidad de un genotipo multilocus y para direccionar a más replicaciones si es que el genotipo no es lo suficientemente fiable. Este programa es basado en el modelo desarrollado en la investigación descrita por Miller & Waits (2002).

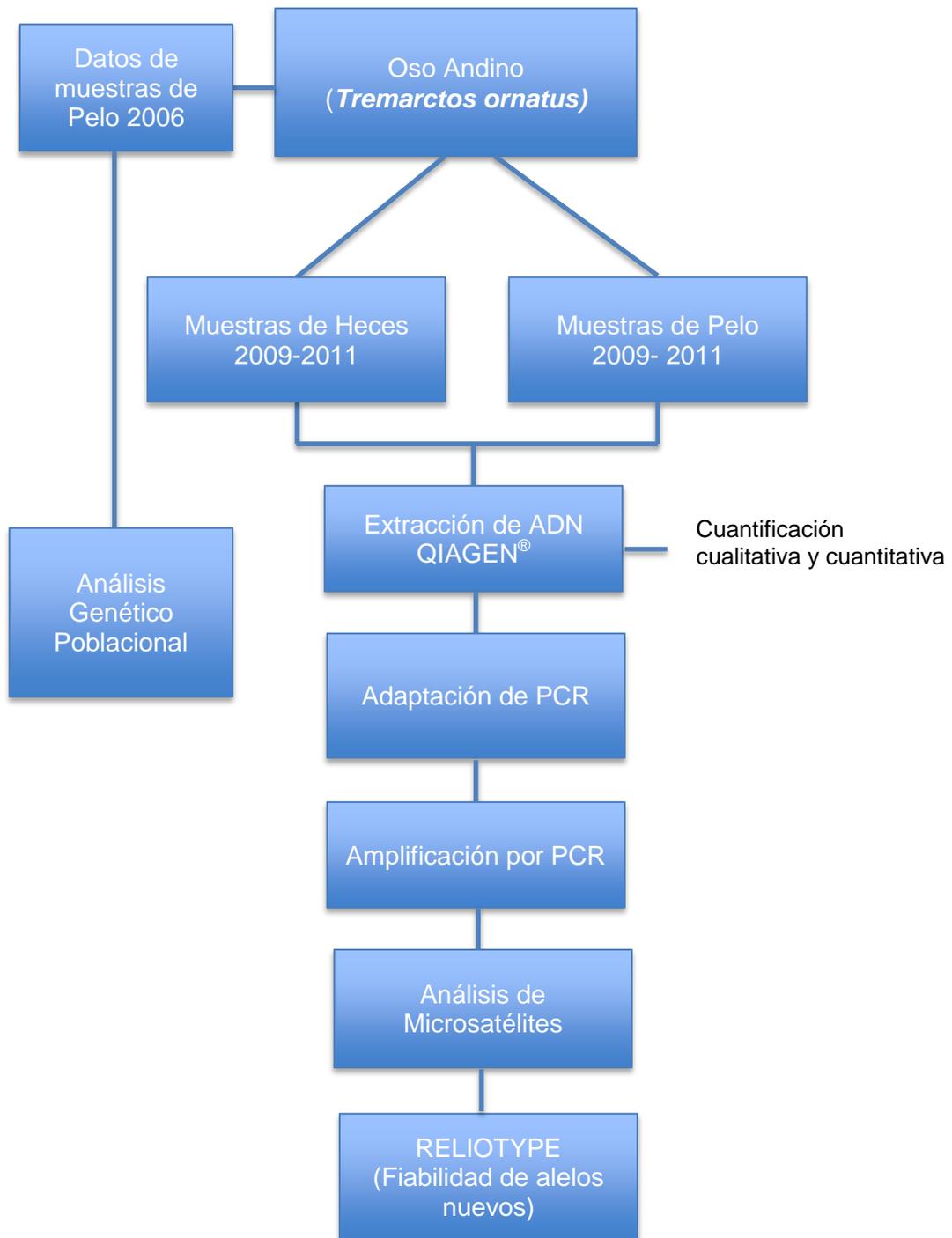
GIMLET V1.3.3 (*Genotypic identification with Multilocus Tags*) es un software que trabaja en la identificación individual utilizando marcadores moleculares en especies diploides. Las etiquetas moleculares son genotipos compuestos en varios *loci*, cada uno compuesto por dos alelos. Por lo tanto, N pares de valores de codificación componen la etiqueta molecular para una muestra. Los valores de codificación podrían ser de dos dígitos o podrían ser del tamaño del alelo. GIMLET realiza: la estimación de las tasas de error durante la determinación del genotipo y la construcción de los genotipos de consenso de genotipado repetido, reagrupando genotipos idénticos, la identificación de uno o varios genotipos, la comparación con referencias, determinar el parentesco entre los individuos, la estimación de varios parámetros de producción de datos (frecuencias alélicas, la probabilidad de identidad, tamaño de la población) (Valière, 2002).

CAPÍTULO III

3. Materiales y Métodos

En la **Figura 4** se indica la metodología usada para este estudio.

Figura 4. Resumen de la metodología utilizada en el Estudio Poblacional de Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en los páramos del Parque Nacional Podocarpus Loja - Ecuador.



3.1. Extracción de ADN.

Las muestras de excretas fueron conservadas en etanol al 96.6% (Jiménez y Cisneros, 2009). La sangre entera fue conservada con EDTA y almacenada a -80°C para evitar la hemólisis. Se trabajó con un total de 64 muestras (44 de heces y 20 de pelo) provenientes del monitoreo de Osos Andinos (*Tremarctos ornatus*), realizado en El Tiro, Cerro Toledo y Cajanuma en el Parque Nacional Podocarpus por el grupo de trabajo de mamíferos del departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) durante el periodo 2009 – 2011.

Se extrajo el ADN de muestras de heces con el kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* y de muestras de pelo con el *Kit QIAGEN® Dneasy Blood and Tissue*, haciendo uso de los protocolos establecidos (QIAGEN®); para las muestras de heces, se aplicó un procedimiento previo de centrifugación durante 30 minutos a 6000 rpm con el objetivo de concentrar el ADN (Jiménez, 2009). Posterior a la extracción, el ADN fue almacenado a -80°C para evitar su degradación hasta realizar la amplificación por PCR. Por otro lado, se extrajo muestras de sangre de dos Osos de Anteojos del Zoológico Municipal de Loja (Penélope [hembra] y Augusto [macho]), recolectadas durante un control veterinario; dichas muestras fueron usadas como controles positivos (Figura 5 y 6).

3.2 Cuantificación y Comprobación.

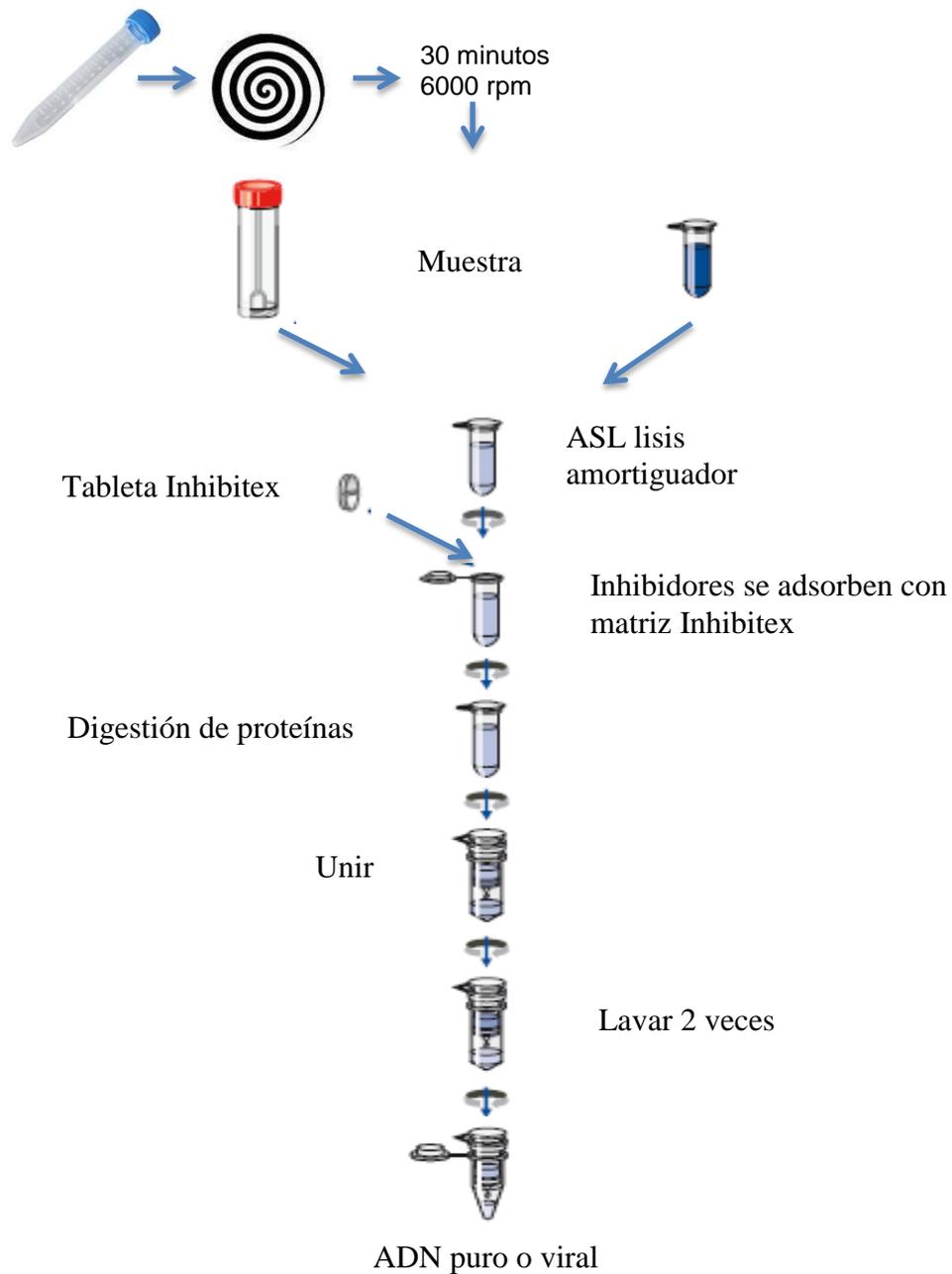
3.2.1 Análisis de ADN por espectrofotometría.

Debido al grado de degradación que presentan las muestras estudiadas (Nsubuga et al., 2004), antes de llevar a cabo la amplificación del ADN, se cuantificó espectrofotométricamente los ácidos nucleicos por medio de Nanodrop.

3.3 Electroforesis en geles de agarosa.

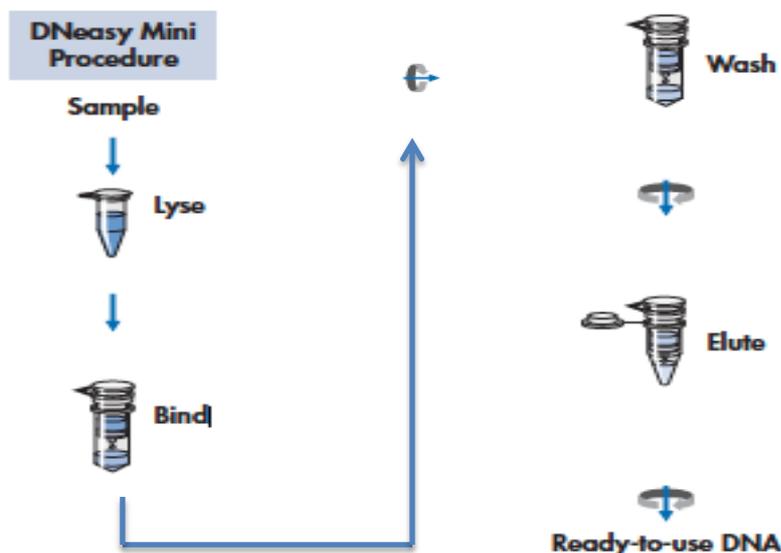
Se determinó de manera cualitativa la presencia de ADN extraído, mediante la electroforesis en geles de agarosa al 3%. Se colocó 2,5 µl de la muestra de PCR más 0,5 µl de azul de bromofenol; se usó un marcador de peso molecular de 50pb al igual que un control positivo y negativo. Las condiciones de corrida fueron: 120V, 300mA por 60 minutos. Para la visualización del gel reveló mediante luz ultravioleta para visualizar las distintas bandas; es muy importante comprobar que no aparezcan bandas en los controles negativos, si estas aparecen, son un indicio de contaminación.

Figura 5. Esquema de protocolo QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN® para extracción de ADN fecal.



Fuente: QIAamp DNA Stool Handbook 04/2010.

Figura 6. Esquema de protocolo QIAGEN® Dneasy Blood and Tissue para extracción de ADN.



Fuente: Dneasy Blood and Tissue Handbook 04/2010

3.4 Amplificación de ADN nuclear.

Para la adaptación de la técnica PCR se utilizaron tres pares de primers marcados (G10B, G10O, Mu23), descritos en la Tabla 1, desarrollados para cánidos (*Ostrander et al., 1993*), osos cafés (*Ursus arctos*) (*Taberlet et al., 1997*) y osos negros (*Ursus americanus*) (*Paetkau and Strobeck 1994, Paetkau et al., 1995*). Se realizó una dilución de los mismos hasta alcanzar una concentración final de 10 mM. Cada primer contiene un grupo colorante fluorescente FAM (para G10B, G10O) y HEX (para Mu23), en el extremo 5' (la disponibilidad de dos colorantes permite el análisis de loci cuyos productos de PCR se superponen en tamaño en el mismo carril).

Tabla 1. Temperatura de anillamiento, secuencias (dirección 5' -> 3') y rango de tamaño en pares de base (pb) de tres *loci* de microsatélites. FAM (azul) y HEX (amarillo) denotan las etiquetas de tinción.

Locus	Secuencia	T. de Anillamiento °C	Rango de Tamaño (pb)
<i>Mu23</i>	F: 5'-/5HEX/GCC TGT GTG CTA TTT TAT CC-3' R: 5'-/AAT GGG TTT CTT GTT TAA TTA C-3'	52	105-113
<i>G10O</i>	F: 5'-TGG TTA TGA ATC AGG ATA TTG-3' R: 5'-/56-FAM/CAA CAG AAC AAT CCA AAG ATG-3'	50	171-179
<i>G10B</i>	F: 5'-GCC TTT TAA TGT TCT GTT GAA TTT G-3' R: 5'/56-FAM/GAC AAA TCA CAG AAA CCT CCA TCC-3'	57,5	151-159

Fuente: Viteri, 2007.

Las reacciones de PCR se realizaron con el kit "Multiplex PCR" (QIAGEN®): Qiagen Mastermix, Q solución y agua. Para el proceso de adaptación de la técnica, se tomó al azar cinco muestras de heces y pelo, se utilizó el ADN de sangre como control positivo y un control negativo. Se realizaron cuatro experimentos de adaptación, en donde se modificaron, tanto los volúmenes de reacción como los ciclos y temperaturas en la etapa de touchdown, como se indica a continuación:

El primer experimento se corrió con el programa optimizado original desarrollado en los laboratorios de Waits (Idaho, USA), que consiste en una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C, 13 ciclos de 30s a 94°C, 90s a 62°C - 0,5°C (touchdown), 1min a 72°C; 40 ciclos de 30s a 94°C, 90s a 55°C, 1 min a 72°C seguido por un paso de extensión final de 10min a 60°C y una etapa de enfriamiento de 10min a 4°C, el volumen de reacción fue de 6 µl de MasterMix y 1 µl de ADN, dando un total 7 µl. En el segundo experimento se corrió con las mismas condiciones del experimento uno descritas anteriormente, pero se cambió las cantidades de primers (aumentados al doble) para mejorar las posibilidades de amplificación, el volumen final de reacción se mantuvo en 7µl. Para el tercer experimento, se cambió el programa por otro que fue probado para la amplificación de saliva, el volumen final de reacción fue de 10 µl y la cantidad de ciclos cambio de 40 a 32. En el cuarto experimento, el programa se modificó en algunas etapas: en el touchdown, los ciclos aumentaron de 13 a 18 y se cambió la temperatura de 62°C - 0,5°C a 58°C - 0,5°C; la cantidad de ciclos se volvió a cambiar de 32 a 40; y, el volumen final de reacción se aumentó a 100 µl, es decir, 50 µl de MasterMix y 50 µl de la muestra (Tabla 2).

Luego de adaptar el programa de PCR para su uso en muestras de heces y pelo (Tabla 2), Se realizaron tres repeticiones con las 66 muestras (incluyendo controles positivos) y se cargaron en el secuenciador ABI 3500 de Applied Biosystems.

3.5 Análisis de Microsatélites.

Una vez obtenidos los productos de PCR usando el programa adaptado, se realizó el mix para el análisis de microsatélites. Se usó 1 µl de cada producto de PCR multiplex al que se le añadió 10,25 µl de un tampón de carga que contiene 0,25 µl de Lizz 600 y 10 µl de formamida; todo esto se cargó en un plato de 96 pocillos. El mix pasó por un proceso de desnaturalización que consiste en una etapa de calentamiento a 95°C durante 3 minutos y una de enfriamiento en hielo durante 5 minutos, luego, se cargó el plato en el Secuenciador ABI 3500 de Applied Biosystems y los resultados se analizaron en GENEMMAPER V4.1.

Tabla 2. Cuadro comparativo de las diferentes condiciones de PCR aplicadas a los 4 experimentos de adaptación.

	Volumen de Reacción Final en μl	Volumen de AND usado en μl	Inicial Denature		Touchdown						Cycling						Final Extention	Cooldown		
			Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en minutos	Número de Ciclos	Denature		Annealing		Extention		Número de Ciclos	Denature		Annealing				Extention	
						Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en segundos	Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en segundos	Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en minutos		Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en segundos	Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en segundos			Temperatura en $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en minutos
EXP. 1	7	1	94	10	13	94	30	62-0,5	90	72	1	40	94	30	55	90	72	1	60 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
EXP. 2	7	1	94	10	13	94	30	62 -0,5	90	72	1	40	94	30	55	90	72	1		
EXP. 3	10	2	94	10	13	94	30	62 -0,5	90	72	1	32	94	30	55	90	72	1		
EXP. 4	100	50	94	10	18	94	30	58 -0,5	90	72	1	40	94	30	55	90	72	1		

Modificaciones:

Cambio en Volumen de Reacción Final

Cambio en Número de ciclos "Touchdown"

Cambio en el Volumen de ADN usado

Cambio en la temperatura "Touchdown"

Cambio en Número de ciclos "Cycling"

3.2 Análisis Estadístico y Poblacional.

Para determinar la confianza de los alelos obtenidos, se usó el programa RELIOTYPE. En una segunda fase, se realizó un análisis genético poblacional, examinando estadísticamente mediante GENEPOP y ensayos como el equilibrio Hardy–Weinberg, datos de 5 individuos identificados mediante muestras de pelo recolectadas en el Parque Nacional Podocarpus en el año 2006 y analizadas en el Departamento de Pesca y Recursos de Vida Silvestre de la Universidad de Idaho.

Luego de realizar el análisis de microsatélites a las 64 muestras de pelo y heces del periodo 2009-2011, los alelos observados fueron analizados en RELIOTYPE V2.0. Este programa estima el número de veces que se repite cada alelo en los diversos locus estudiados, permitiéndonos estimar la fiabilidad del genotipo y el número de repeticiones necesarias para alcanzar el 99% de precisión (Miller et al., 2002). En el caso del estudio genético poblacional se trabajó con datos obtenidos a partir de muestras de pelo del año 2006 de 9 *loci* analizados (Tabla 3) y 5 individuos identificados. Mediante el uso del software GENEPOP y GIMLET se calculó la riqueza alélica, la prueba de Hardy-Weinberg para observar si hay equilibrio heterocigótico, las frecuencias alélicas y otras variables para medir la diversidad genética (tasa de polimorfismo, proporción de *loci* polimórficos, número medio de alelos por locus, número efectivo de locus).

Tabla 3. Temperatura de anillamiento, secuencias (dirección 5' -> 3') y rango de tamaño en pares de base (pb) de 9 *loci* de microsatélites. FAM, HEX y TET denotan las etiquetas de tinción.

Locus	Secuencia	Anillamiento T. °C	Rango de tamaño (pb)
UarMu23	F: 5'-/5HEX/GCC TGT GTG CTA TTT TAT CC-3' R: 5'-/AAT GGG TTT CTT GTT TAA TTA C-3'	52	105-113
G10O	F: 5'-TGG TTA TGA ATC AGG ATA TTG-3' R: 5'-/56-FAM/CAA CAG AAC AAT CCA AAG ATG-3'	50	171-179
G10B	F: 5'-GCC TTT TAA TGT TCT GTT GAA TTT G-3' R: 5'/56-FAM/GAC AAA TCA CAG AAA CCT CCA TCC-3'	57,5	151-159
UarMu50	F: 5'-/HEX/GGA GGC GTT CTT TCA GTT GGT-3' R: 5'-TGG AAC AAA ACT TAA CAC AAA TG-3'	51	105-131
G10P	F: 5'-/AGT TTT ACA TAG GAG GAA GAA-3' R: 5'-/5HEX/TCA TGT GGG GAA ATA CTC TGA A-3'	52	148-162
G10H	F: 5'-/5TET/CAA CAA GAA GAC CAC TGT AA-3' R: 5'-AGA GAC CAC CAA GTA GGA TA-3'	51	233-249
G10J	F: 5'-/5HEX/GAT CAG ATA TTT TCA GCT TT-3' R: 5'-AAC CCC TCA CAC TCC ACT TC-3'	48	94-102
G10M	F: 5'-/56-FAM/TTC CCC TCA TCG TAG GTT GTA-3' R: 5'-GAT CAT GTG TTT CCA AAT AAT-3'	52	209-225

Fuente: Viteri, 2007.

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

4.1. Cuantificación de ADN extraído.

La tabla 4 muestra concentraciones de ácidos nucleicos en ng/μl que confirman la presencia de ADN. Las longitudes de onda (280/260 y 260/230) indican que el ADN está contaminado ya sea por componentes propios de las muestras degradadas y expuestas a condiciones ambientales como melanina en el pelo y sales biliares o sacáridos para las heces (Taboada, 1998) o por sustancias que componen a los organismos consumidos, parásitos, bacterias, etc., (Murphy et al., 2000) y además, se encuentra en bajas concentraciones lo que se puede atribuir a que en este tipo de muestras no invasivas el ADN suele estar degradado (Bosch et al., 2005). Los contaminantes cuantificados pueden interferir en distintas etapas de los análisis moleculares desde la extracción de ADN (ruptura de células no exitosa o por la captura de ADN) hasta en el proceso de la PCR en donde los inhibidores bloquean el sitio activo de la polimerasa evitando la correcta replicación, y por consiguiente, la incorrecta tipificación alélica (Taboada, 1998). Además al ser ADN procedente de las células epiteliales del lumen del intestino que son escasas en las heces y estas al mismo tiempo tienden a contener microorganismos, vegetales y en algunos casos restos de animales, lo que indica que el ADN cuantificado no es específico (Piggott & Taylor, 2003; Bosch et al., 2005).

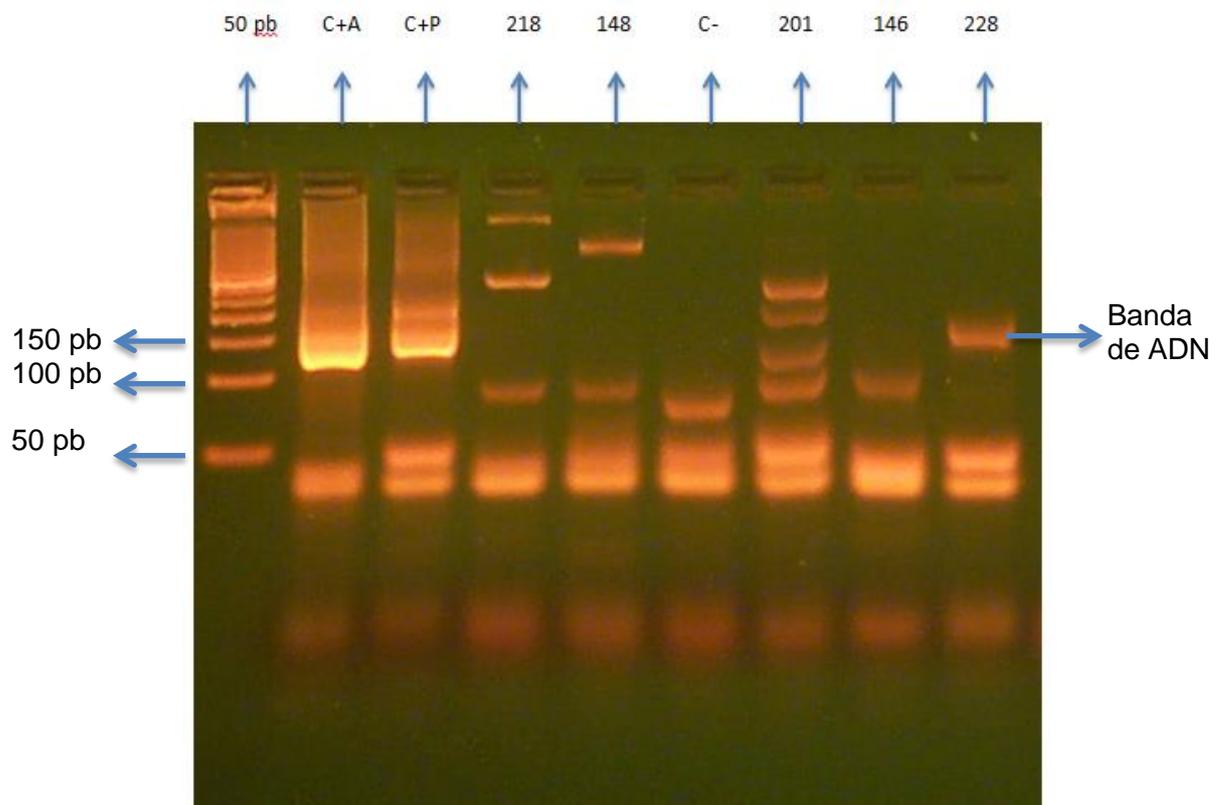
Tabla 4. Valores significativos de concentraciones de ADN en ng/μl, cuantificados con Nanodrop. La longitud de onda 260/280 evalúa la pureza en un rango de 1.8 para ADN, valores inferiores indican contaminación por proteínas, fenoles u otros contaminantes que se absorben fuertemente en o cerca de los 280nm. La longitud de onda 260/230 es una medida secundaria de pureza del ácido nucleico. Los valores de 260/230 para un ácido nucleico "puro" son a menudo superiores a los valores de 260/280, en el rango de 1.8 a 2.2. Si la proporción es sensiblemente inferior, indica la presencia de contaminantes co-purificados.

Tipo de Muestra	Concentración (ng/ μl)	260/280	260/230
Pelo	48.2	2.1	1.11
Pelo	50.1	2	1.05
Pelo	3.5	2.19	0.18
Pelo	2.9	2.51	0.13
Pelo	1.6	2.36	0.08
Pelo	2.6	2.6	0.12
Pelo	7.7	1.36	0.29

Pelo	2.5	1.75	0.12
Excreta	3.7	2.39	0.12
Excreta	12.8	2.12	0.63
Excreta	4.2	1.63	0.25
Excreta	3.7	2.22	0.16
Excreta	3.7	2.08	0.16
Excreta	4.8	1.61	0.21
Excreta	4	1.87	0.18
Excreta	75.6	1.49	0.34
Excreta	11.2	2.28	0.5
Excreta	8.9	1.61	0.27

Cualitativamente también se evidenció presencia de ADN mediante geles de agarosa al 3% como se observa en la Figura 7. La presencia e intensidad de las bandas varía de acuerdo a la cantidad de ADN cuantificado (Possoy-Ghneim, 2008).

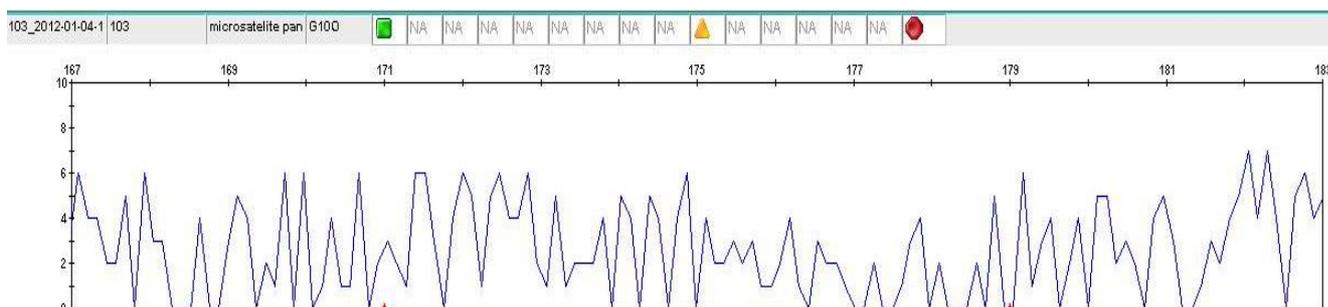
Figura 7. Gel de agarosa 3% de ADN extraído de muestras del 2009-2011. C+A y C+P hacen referencia a los controles positivos de muestras de sangre de los Osos Augusto y Penélope del Zoológico Municipal de Loja.



4.2 Adaptación de PCR “touchdown”.

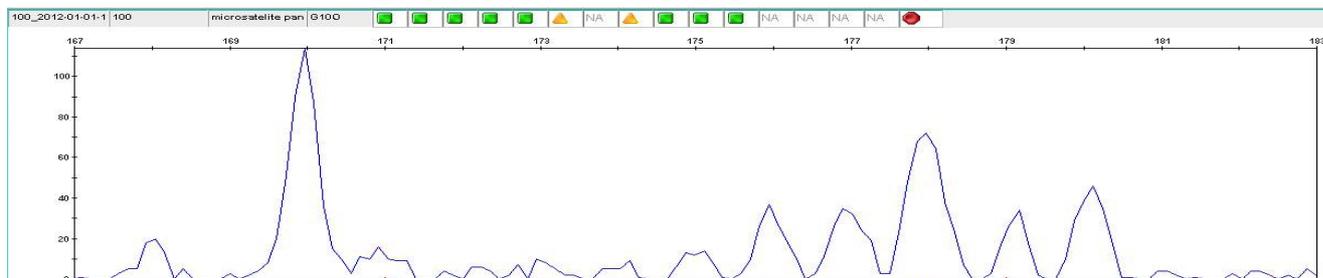
En el primer y segundo experimento de PCR, no se observaron picos confiables en las muestras de pelo o de heces después del análisis de microsatélites (Figura 8). El tercer experimento de PCR mostró picos débiles en los locus G10B y G10O y picos desordenados en loci Mu23 (Figura 9). La cuarta réplica de PCR mostró buenos picos en los locus G10B G10O y Mu23 (Figura 10).

Figura 8. Plano de GENEMAPPER donde se observa ruido y ningún pico para el loci G10O, con el 1^{er} y 2^{do} experimento.



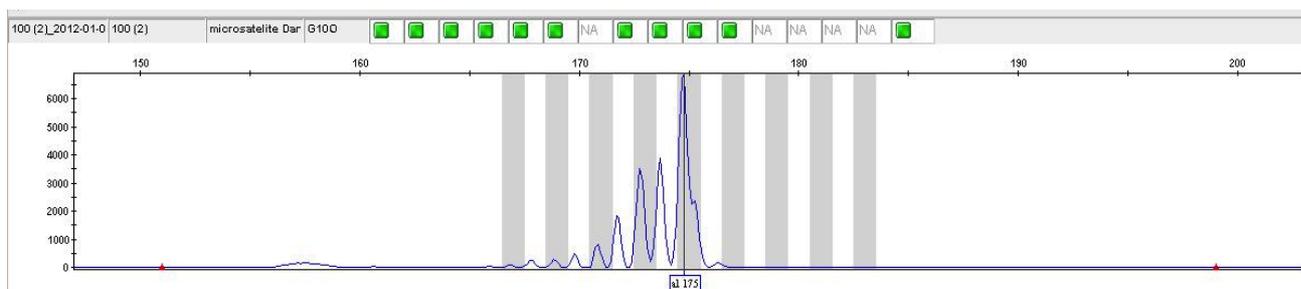
Fuente: GENEMAPPER V.4.1

Figura 9. Plano de GENEMAPPER donde se observa picos débiles para el loci G10O, con el 3^{er} experimento



Fuente: GENEMAPPER V4.1

Figura 10. Plano de GENEMAPPER donde se observa picos claros para el loci G10O, con el 4^{to} experimento.



Fuente: GENEMAPPER V4.1

En este estudio, se adaptó las condiciones de PCR con el fin de disminuir la tasa de errores en el genotipado y aumentar la calidad de los análisis con microsatélites mientras se trabaja con muestras de ADN degradado. La cantidad de ADN usado, el volumen de reacción final, la temperatura y el número de ciclos, son piezas claves en la obtención de genotipado de buena calidad (Roux, 1995).

La falta de amplificación de alelos en análisis de microsatélites cuando se trabaja con volúmenes menores a 10 µl, puede deberse a la presencia de inhibidores o a la cantidad de ADN presente en la muestra usada para alcanzar el volumen final de reacción de 7 µl, en donde solo 1 µl de ADN fue usado; estos factores pueden causar errores de amplificación - 1^{er} y 2^{do} experimento- (Figura 8). Cuando se cambió el programa a uno con un número aumentado de ciclos en la etapa de cycling y un volumen de reacción de 10 µl, las amplificaciones mejoraron pero solo se observaron picos débiles (Figura 9); los cambios en las condiciones podrían mejorar la calidad de amplificación debido al aumento de la cantidad de ADN usado (2 µl) combinado con diferentes concentraciones de primers, pero aún así los picos no son lo suficientemente buenos como para ser tipificados como alelos. Los cambios finales hechos en el programa del experimento 4, permitieron observar picos de buena calidad (Figura 10), estos siguen el patrón estándar de un microsatélite (Paetkau et al., 1995) probablemente al aumento del volumen de reacción y, por lo tanto, la cantidad de ADN usado, pero el punto clave podría ser el cambio en el rango de temperatura de dos grados centígrados sobre y debajo de la temperatura de anillamiento de los primers (Mburu & Hanotte 2005); el aumento de 5 ciclos en la etapa de touchdown y de 8 ciclos en la etapa de cycling permitió magnificar las replicaciones y garantizar la obtención de más copias del segmento de ADN de interés (Roux, 1995). Los tamaño de los picos puede que no correspondan exactamente a la longitud de los productos de PCR debido a la diferencia en la composición entre el estándar y la muestra (Paetkau et al., 1995).

4.3 Tipificación genética y Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

Una vez analizados los plots de GENEMAPPER V4.1, en 49 de 66 muestras (incluyendo dos controles positivos) se pudieron tipificar alelos. De acuerdo con RELIOTYPE, 21 de 49 muestras poseen alelos fiables y no necesitaron más replicaciones para confirmar su genotipo (Tabla 5). Se encontraron tres alelos nuevos que fueron observados en 3, 5 y 1 muestras diferentes.

A pesar del número limitado de muestras y *loci* empleados en la primera parte de este estudio, creemos que los tres microsatélites evaluados proporcionan información importante

relacionada con la diversidad alélica del Oso Andino, siendo un claro indicio de que la diversidad genética de esta especie está en aumento ya que dichos alelos no se han descrito en investigaciones previas (Ruíz-García et al., 2005).

Tabla 5. Resultados de Reliotype. G100 es uno de los *loci* analizados, los números en paréntesis indican la cantidad de repeticiones de PCR necesarias para que los alelos sean confiables. Locus Expected Reliability indica la confiabilidad de genotipificación del locus, (1 son genotipos aceptados que no necesitan ninguna repetición).

Tipo de Muestra	G100	Locus Expected Reliability
Pelo	0(0,0)	1
Excreta	0(0,0)	1

En los datos de las muestras de pelo del año 2006, la prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) mostró que los 8 *loci* estudiados se encuentran en equilibrio heterocigótico (Tabla 6).

Para cada población, el p-val de la prueba exacta de HWE será presentada junto con su error estándar (SE). La hipótesis nula a ser probada es que los gametos se unen al azar (hay apareamiento al azar en la población), si el apareamiento al azar ocurre, los estimados (W&C y R&H) del coeficiente de endogamia (FIS) se espera que sean cero (Robertson & Hill, 1984). En la Tabla 6, se observa que los valores de S.E. son mayores en los valores de p-val más bajos; al ser p-val mayor a 0.05 (error mínimo aceptable), no se considera un valor significativo, demostrando que todos los *loci* están en equilibrio.

Tabla 6. Prueba Hardy-Weinberg. S.E. denota el error estándar. *Fis Estimates*, hace referencia a los estimados del coeficiente de endogamia. Los valores positivos de las pruebas de W&C (Weir and Cockerham) y R&H (Robertson and Hill) indican una deficiencia de heterocigosidad mientras que los valores negativos un exceso de la misma (Rousset & Raymond, 2003).

Locus	P-val	S.E.	Fis Estimates		
			W&C	R&H	Steps
G10B	1.0000	0.0000	-0.2069	-0.0909	6823
G10H	0.0521	0.0038	0.2329	0.0317	11439
G10J	1.0000	0.0000	-0.2537	-0.2262	24333
G10M	0.0892	0.0079	0.3412	0.3929	5118
G10O	1.0000	0.0000	-0.2174	-0.2262	26919
G10P	1.0000	0.0000	-0.1667	-0.1758	20057
Mu23	1.0000	0.0000	-0.1915	-0.1071	10850
Mu50	0.4848	0.0016	-0.4000	-0.4156	48905
Prob:	0.7309				

Los valores de p-val representan un valor de probabilidad del error obtenido de lo observado frente a lo esperado; mientras mayor sea el valor de p-val, más probable es que ese error sea simplemente por azar. Si el p-val es mayor a 0.05 el SE no es significativo y podemos aceptar que lo observado es igual a lo esperado, en este caso, al obtener una probabilidad global de 0.7309, se acepta la hipótesis nula planteada bajo la ley del Equilibrio de Hardy –Weingber.

El análisis HWE en las muestras de pelo del año 2006 acepta la hipótesis nula de que existe equilibrio heterocigótico ya que “p-val” muestra valores que son mayores al del error estándar ($p > 0.05$). HWE establece una serie de suposiciones que la población debe cumplir para estar en equilibrio; si se infringe alguna de éstas, el equilibrio desaparece. El coeficiente de endogamia (Fis) calculado anteriormente, confirma la no existencia de la misma y por lo tanto no existe desequilibrio que por lo general suele ser causado por subdivisiones en las poblaciones, el flujo de genes entre diferentes poblaciones, la tasa de migración, la acción de la selección natural sobre genes particulares (conduce a la pérdida de todos los alelos excepto el favorecido), cuando las poblaciones están genéticamente desconectadas unas de otras, o si los individuos son vistos como una sola población debido al pequeño número de individuos estudiados (Ruíz-García et al., 2005).

Los trabajos de Ruiz-García (2003, 2005) muestran niveles bajos de diversidad genética en Ecuador. Hay varias posibles explicaciones para esto, la principal es que el número de muestras utilizadas para el análisis no fue representativo de la población total de Osos

Andinos en esta región. La diversidad genética puede ser naturalmente baja en esta especie debido a la baja densidad y pequeño tamaño efectivo de la población, o los efectos antropogénicos recientes puede haber dado lugar a una pérdida de la diversidad debido a la fragmentación del hábitat y la disminución de tamaño de la población (Primmer et al., 1996).

Las muestras de pelo del 2006 presentan una riqueza alélica de 3.11 para los 8 *loci* analizados, una heterocigosidad esperada de 0.47 y una heterocigosidad observada de 0.53, siendo esta mayor a la reportada por Ruíz-García (2003) en donde se señala un valor de $H_o=0,24$; la presencia de 2 nuevos alelos no reportados en los *loci* G10M y G10B; una frecuencia alélica global de 0.32 y un 100% de polimorfismo (frecuencias alélicas $>0,99$) en los *loci* analizados. Los 8 *loci* analizados son claramente polimórficos (2 a 6 alelos por locus). La identificación de marcadores polimórficos en Osos Andinos es importante para evaluar la diversidad y flujo genético y distinguir osos individuales mediante muestreo genético no invasivo (Viteri & Waits, 2009).

La riqueza alélica de 5 individuos es de 3,11; debido a que no se cuenta con datos empíricos de la abundancia de osos se encuentran en el Parque Nacional Podocarpus (PNP), podemos estimar la riqueza alélica de la población del PNP considerando datos de densidad y área de vida determinados en otros estudios realizados en el Ecuador (García-Rangel, 2006). En este sentido y considerando un rango aproximado de 2000 a 4000 hectáreas por individuo, en el Parque Nacional Podocarpus (146000 Ha), existirían entre 30 a 70 osos, haciendo una extrapolación de la riqueza alélica a esta población, puede estimársela entre 18,66% a 43,54%. Estos valores serán una referencia útil en futuras investigaciones en donde el número de individuos estudiados sea más representativo.

Actualmente no hay datos sobre el desplazamiento de estos animales. Posiblemente la existencia de un corredor biológico permite el flujo genético entre las poblaciones de osos en el sur de Ecuador y el norte de Perú. Este corredor puede formar una unidad del hábitat del oso. Es probable que existan poblaciones aisladas entre el Podocarpus y el bosque Corazón de Oro y entre Amaluza y el Podocarpus (Callebaut, 2001).

La falta de información acerca de la distribución y uso de hábitat del Oso Andino a escala local, representa un vacío de información que pone en duda la viabilidad y supervivencia de la población a este nivel. Así, estudios para aclarar estos problemas son fundamentales para la conservación de la especie. Actualmente la distribución del Oso Andino esta fuertemente influenciada por las actividades humanas, ya que el hábitat está fragmentado principalmente por la expansión de la frontera agrícola, aislando los fragmentos de hábitat que aún se

mantienen relativamente libres del desarrollo humano. La pérdida de hábitat, degradación y fragmentación son las mayores amenazas para la supervivencia del Oso Andino. La caza furtiva, incluyendo la captura de crías de oso para el comercio ilegal de mascotas, es otra de sus mayores amenazas (García-Rangel, 2012). La gran importancia que tiene el estudio poblacional de esta especie radica también en el conocimiento de los puntos de conectividad que existe entre las diversas regiones.

CONCLUSIONES

Los muestreos genéticos no invasivos son una fuente alternativa y confiable, que hace posible la ejecución de estudios genéticos poblacionales de animales silvestres como el Oso Andino, que serían muy complicado y costoso analizar por métodos de captura directa.

El éxito del proceso de adaptación de la PCR radica en la aparición de 3 nuevos alelos confiables no reportados para la especie, cuya fiabilidad fue comprobada por medio de RelioType. Los alelos nuevos encontrados muestran la relevancia en diversidad y estructura que tendría la población de Osos de la región con respecto a otras poblaciones estudiadas en el Ecuador y plantea por tanto interrogantes respecto a la posible conexión con las poblaciones del norte del Perú.

Los análisis con marcadores genéticos del tipo microsatélite para el estudio de poblaciones de Oso Andino, resultan muy útiles, ya que permiten estudiar la variabilidad genética, la estructura genética y la caracterización molecular de las poblaciones y/o razas posibilitando desarrollar planes de conservación y mejoramiento animal.

La riqueza alélica y la heterocigosis encontradas, brindan indicios de un posible mantenimiento de los procesos históricos de flujo génico a escala regional, a pesar de la problemática de pérdida y fragmentación de hábitat que enfrenta el Oso Andino en el Sur del Ecuador, dicho flujo podría estar ocurriendo hacia los sitios de conexión biogeográfica más cercanos como el norte de Perú y las zonas bajas del sur oriente de Ecuador.

RECOMENDACIONES

Para obtener análisis exitosos de microsatélites, se recomienda realizar el proceso de extracción una vez recolectada la muestra independientemente de la edad de las mismas o de las condiciones en el campo en las que fueron recogidas, así evitaremos que el ADN que de por sí es de baja calidad, se degrade aún más.

Para obtener resultados más exactos en análisis genéticos poblacionales se recomienda trabajar con un mayor número de individuos ya que la veracidad de los resultados radica en que se muestree un número significativo que represente a la población completa.

Se recomienda continuar con estudios genéticos poblacionales del Oso Andino con el objetivo de contestar interrogantes que nos permitirán preservar la especie y la integridad de los ecosistemas en los que habitan.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranguren-Méndez, R., Román-Bravo, W. Isea., Villasmil, Y. & Jordana, J. (2004). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *ALPA*, 13(1), 30-42.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D., Seidman, J., Smith, A. & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Publishing and Wiley-Interscience. Recuperado de <http://www.justmed.eu/files/st/biocel/Molecular%20Biology%20-%20Current%20Protocols%20%5BF.%20Ausubel,%202003%5D.pdf>
- Bosch, B. Marmi, J. Ferrando, A. López-Giráldez, F. Andrés, O. García-Franquesa, E. Ponsá, M. Kellermann ,T. Guallar, B. Bisbal, F. & Domingo-Roura, X. (2005). Genotipar sin Capturar. *Galemys: Sociedad Española para la conservación y estudio de mamíferos*, 17(1), 81-102. Recuperado de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1433353>
- Buchanan, F.C. Adams, L. J. & Littlejohn, R. P. (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 22(2), 397-403.
- Callebaut, J. (2001). Planificación para Conservación de Sitios Parque Nacional Podocarpus y su área de influencia Oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) Pava barbada (*Penelope barbata*). Amenazas, Actores y Acciones. Recuperado en: https://utplbiodiversity.wikispaces.com/file/view/DOC_OSO_PAVA.do
- Castellanos, A. Cevallos, J. Laguna, A. Achig, L. Viteri P. & Molina, S. (2010). Estrategia nacional de conservación del oso Andino. Imprenta Anyma. 1-15 pp. Quito-Ecuador.
- Chapuisat, M. Goudet, J. & Keller, L. (1997). Microsatellites reveal high population viscosity and limited dispersal in the ant *formica paralugubris*. *Evolution*, 51(2), 475-482. doi: 10.1554/03-351
- Don, R., Cox, T., Wainwright, J., Baker, K. & Mattick, S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids*, 19(14), 4008. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328507/pdf/nar00094-0209.pdf>
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics*, 5(6), 435-445. doi: 10.1038/nrg1348
- Elnifro, E.M. Ashshi, A.M. Cooper, R.J. & Klapper, P.E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Review*, 13 (4), 559-570.
- Ernest, H. B., Penedo, M. C. T., May, B. P., Syvanen, M. & Boyce, W. M. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic

- analysis using microsatellites and fecal DNA. *Molecular Ecology*, 9, 433-441. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00890.x
- Frantzen, M., Silk, J., Fergusson, J., Wayne, R. & Kohn, M. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7(4), 1423–1428. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1020503330767>
 - Gankar, K. Stebih, D. Dreo, T. Žel, J. & Gruden, K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, 6, 37 doi:10.1186/1472-6750-6-37
 - García-Rangel, S. (2012). Andean bear *Tremarctos ornatus* natural history and conservation. *Mammal Review*, 42(2), 85-119.
 - González, E. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, (CSIC). *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
 - Goossens, B. Waits, L. P. & Taberlet, P. (1998). Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology*, 7, 1237–1241.
 - Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R. & Gelbart, W. (1996). An introduction to genetic analysis. Recuperado de http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/documents/publications/Molecular_Markers_Volume_1_es/III_3_PCR.pdf
 - Kasworm, W. Proctor, M. Servheen, C. Paetkau, D. (2007). Success of Grizzly Bear Population Augmentation in Northwest Montana. *Journal of Wildlife Management*, 71(4), 1261–1266. doi: 10.2193/2006-266
 - Kohn, M. Knauer, F. Stoffella, A. Schröder, W. & Pääbo, S. (1995). Conservation genetics of the European brown bear a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*, 4, 95–103.
 - Korbie, D. & Mattick, J. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3, 1452 – 1456. doi:10.1038/nprot.2008.133
 - Kovach, I. A. Litvaitis, K. M. & Litvaitis, A. J. (2003). Evaluation of fecal mtDNA analysis as a method to determine the geographic distribution of a rare lagomorph. *Wildlife Society Bulletin*, 31(4), 1061–1065.
 - Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strobom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. (2006). The real time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), 95-125. Recuperado de: <http://www.cilad.org/archivos/rondon/rondon2009/pcr.pdf>

- Lathuillière, M. Ménard, N. Gautier-Hion, A. & Crouau-Roy, B. (2001). Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analyses of blood and fecal samples in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *American Journal of Primatology*, 55(3), 151-8.
- Leite Pitman, R., Scott, A., Scott, J. & Apaza, J. (2008). Manual de la biología de la conservación del oso de anteojos. Programa Ciencia para todos. Proyecto Pasos para la Vida Silvestre. Recuperado de <http://www.rufford.org/files/Manual%20Oso%20de%20Anteojos.pdf>
- López-Gómez, A. y Williams-Linera, G. (2006). Evaluación de Métodos no Paramétricos para la Estimación de Riqueza de Especies de Plantas Leñosas en Cafetales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 78, 7-15.
- Martínez, R. Azpiroz, H. Rodríguez, J. Cetina, V. Gutierrez, M. Sañudo, R. Félix, J. Ayala, R. López, M. Rojo, G. Bernal, I. Osomo, Y. Sánchez, F. López, J. Gutierrez, M. Guillén, H. Vidalez, J. Serrato, R. Armenta, A. Rodriguez, G. Olaldel, V. Jasso, J. (2010). Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Libros Técnicos: Serie Forestal. Cuerpo Académico Desarrollo Sustentable. Universidad Autónoma Indígena de México. 1ª edición, México. ISBN: 875-935-543-2.
- Mburu, D. & Hannote, O. (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity Project. Nairobi, Kenya.
- McCauley, D. E. (1995). The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Ecology and Evolution*, 10, 198-202.
- Miller, C. Joyce, P. & Waits. L. (2002). Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357-366.
- Moazami-Goudarzi, K. Furet, J. P. Grosclaude, F. & Laloë, D. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *International Society for Animal Genetics*, 28(5), 338–345. doi: 10.1111/j.1365-2052.1997.00176.x
- Mohammed, M. A., Al-Fayadh, Maani. N., Al-Shemari & Ihsan, E. Al-Saimary. (2010). Molecular Characterization of Antigens Extracted From Hydatid Cysts of Human and Other Intermediate Hosts. *Bioresearch*, 17(2), 117-126.
- Murphy, M. A., Lisette P. Waits, Katherine, C. Kendall, Samuel K. Wasser, Jerry A. Higbee & Robert Bogden (2002). An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics*, 3(2), 435–440.
- Murphy, M., Waits, L., & Kendall, K. (2000). Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin*, 28(4), 951–957.

Recuperado

de

<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1046&context=natlpark>

- Paetkau, D. (2003). An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*, 12(6), 1375–1387.
- Paetkau, D. W. Calvert, I. Stirling & C. Strobeck. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Biology*, 4(3), 347-354.
- Petit, E. Aulagnier, S. Vaiman, D. Bouissou, C. & Crouau-Roy B. (1997). Microsatellite variation in an introduced mouflon population. *J Hered*, 88(6), 517-20.
- Peyton, B. (1980). Ecology, Distribution, and Food Habits of Spectacled Bears, *Tremarctos ornatus*, in Peru. *Journal of Mammalogy*, 61(4), 639-652.
- Piggott, M. P. (2004). Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research*, 31(6), 485–493. doi.org/10.1071/wr03096
- Piggott, M. P. & Taylor, A. C. (2003). Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology*, 51(4), 341-355. doi:10.1071/ZO03012
- Posso, D., Ghneim, T., Pérez, I., Torrealba, G., Pieters, J., Martinez, C., Tohme, J. 2008. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. *Molecular Biology and Genetics*. doi: 10.2225/vol11-issue5-fulltext-6
- Primmer, C. Møller, A & Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5(3), 365–378. doi 10.1046/j.1365-294X.1996.00092.x
- Provan, J., Powell, W. & Hollingsworth, P. M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Ecology & Evolution*, 16, 142-147.
- Puerta, C. & Urueña, C. (2005). Prácticas de biología molecular. Editorial Colección Biblioteca del Profesional. Pontificia Universidad Javeriana.
- Purificación y cuantificación de productos de PCR. (s.f). En Secuenciación y Genotipado. Recuperado de http://www.ikerkuntza.ehu.es/p273-genotct/es/contenidos/informacion/secuenciacion_genotipado/es_secuenc/adjuntos/Purificacion_PCR.pdf
- QIAamp DNA Stool Mini Kit. For isolation of DNA from stool. Recuperado de <http://www.qiagen.com>
- Raymond, M. & Rousset, F. (2003). Population Genetics Software for Exact Test and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 104(5), 248-249. Recuperado de: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/86/3/248.short>

- Robertson, A. and Hill, W.C. (1984). Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, 107, 713-718.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementación of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 8, 103-106.
- Roux, K. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4, S185-S194. Recuperado de: <http://genome.cshlp.org/content/4/5/S185.short>
- Ruíz- García, M. Orozco-terWengel. P. Castellanos, A. & Arias, L. (2005). Microsatellite Analysis of the Spectacled Bear (*Tremarctos ornatus*) Across its Range Distribution. *Genes Genetic Systems*, 80, 57-89.
- Sambrook, J & Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York. 3rd ed. edición.
- Taberlet, P. Camarra, J. J. Griffin, S. Uhrès, E. Hanotte, O. Waits, L. P. Dubois-Paganon, C. Burke, T. & Bouvet, J. (1997). Non-invasive genetic tracing of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 869–876. doi 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x
- Taberlet, P. Griffin, S. Goossens, B. & Questiau, S. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res*, 24(16), 3189–3194. doi: 10.1093/nar/24.16.3189
- Taberlet, P. Waits, L. P. & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 323-327. doi: 10.1016/S0169-5347(99)01637-7
- Taboada, V. (1998). Note about ancient DNA studies in fossil bones from Galicia quaternary large mammals. *Cuadernos Lab. Xeolóxico de Laxe*, 23, 263-270. Recuperado de http://www.udc.es/iux/almacen/articulos/cd23_art17.pdf
- Taylor, A.C. Sherwin, W. B. Wayne, R. K. (1994). Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3(4), 277–290. doi: 10.1111/j.1365-294X.1994.tb00068.x
- Valière, N. (2002). GIMLET: A Computer Program for Analysing Genetic Individual Identification Data. *Molecular Ecology Notes*. doi 10.1046/j.1471-8278.2002.00228.x
- Vela, I., Vázquez, G., Galindo, J. & Pérez, J. (2011). El Oso Andino: Su importancia y conservación. *Ciencia*, 4(6), 45-51. Recuperado de http://www.academia.edu/1857324/El_oso_andino_sudamericano_su_importancia_y_conservacion
- Viteri, M. P. (2007). Conservación del oso andino in situ: Determinación de la variabilidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos poblaciones de osos silvestres, en

el norte y sur del Ecuador. VI International Conference on Wildlife Management in the Amazon region and Latin America, Iquitos-Perú.

- Viteri, P. & Waits, L. (2009). Identifying polymorphic microsatellite loci for Andean bear research. *Ursus*, 20(2), 102-108. doi <http://dx.doi.org/10.2192/09GR004.1>
- Waits, L. & Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic tools for wildlife biologist: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal Wildlife Management*, 69, 1419-1433. doi: 10.2193/0022-541X(2005)69[1419:NGSTFW]2.0.CO;2
- Waits, L. Taberlet, P. Swenson, J. Sandegren, F. & Franzén, R. (2000). Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 9, 421–431.
- Weber, J. L. & May. P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism, which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 388-396.