

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Biotecnología

Proyecto de integración curricular

**“Optimización de las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos de los géneros de primates *Ateles* mediante los marcadores CytB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop.”**

**Elaborado por**  
Marquez Zambrano Victoria

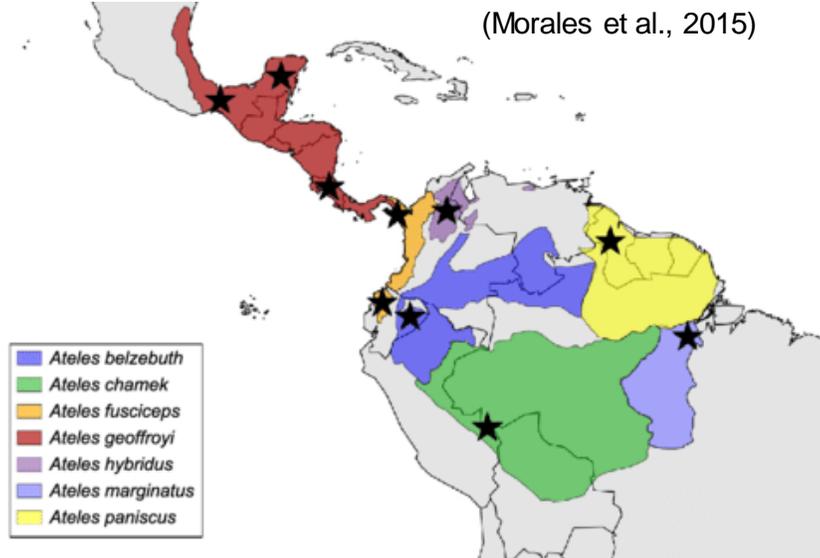
**Tutor**  
Martin Solano, Sarah Ph.D.

**Fecha**  
11 de marzo de 2024





Género *Ateles*



Primates Neotropicales → Mamíferos de relevancia

**Amenazas antropogénicas**

- Cacería
- Tráfico de animales
- Pérdida de hábitat

**Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)**

2017	36% amenazadas
2021	24% en peligro crítico 42% amenazado



(Garbino & Martins, 2018)



Género *Leontocebus*



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Objetivo general

Optimizar las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos del género de primate *Ateles* mediante los marcadores CytB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop.

## Objetivos específicos

- Obtener muestras de ADN de primates no humanos a partir de muestras no invasivas.
- Establecer el protocolo de PCR Barcoding con los marcadores CytB y D-Loop en muestras de ADN de primates no humanos no invasiva.
- Inferir la regionalidad de los individuos de los géneros *Ateles* y *Lentocebus* con las secuencias disponibles de los genes CytB y D-Loop.

## Hipótesis

La optimización de las herramientas moleculares permite inferir la filogeografía de los individuos del género de primate *Ateles* mediante los marcadores CytB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop.



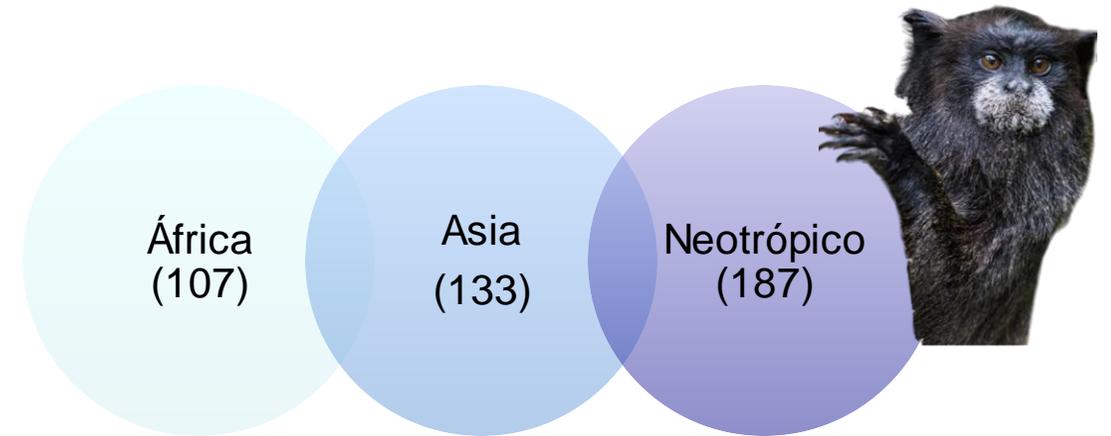
**Tabla 1**

Primates de las familias *Atelidae* y *Callitrichidae* del Ecuador, taxonomía, sinonimias y distribución.

Taxón	Nombre en español	Distribución
<b>ATELIDAE</b>		
<i>Alouatta palliata</i>	Mono aullador de manto dorado	Costa
<i>Alouatta seniculus</i>	Mono aullador rojo de Linneo	Amazonía
<i>Ateles belzebuth</i>	Mono araña de vientre amarillo	Amazonía
<i>Ateles fusciceps</i>	Mono araña de cabeza marrón	Costa
<i>Lagothrix lagothricha</i> <i>lagothricha</i>	Mono lanudo de Humboldt	Amazonía
<i>Lagothrix lagothricha</i> <i>poepigii</i>	Mono lanudo de Pöppig	Amazonía
<b>CALLITRICHIDAE</b>		
<i>Cebuella pygmaea</i>	Tití pigmeo	Amazonía
<i>Leontocebus lagonotus</i>	Tamarín ensillado de dorso rojo	Amazonía
<i>Leontocebus nigricollis</i>	Tamarín de dorso negro	Amazonía
<i>Leontocebus tripartitus</i>	Tamarín ensillado de dorso dorado	Amazonía

## Primates

- Fósiles de 56 a 59 millones de años
- 500 especies vivas



## Ecuador

Familias:

- Callitrichidae
- Cebidae
- Aotidae
- Pitheciidae
- Atelidae



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

***Ateles belzebuth***

Pelaje color negro/marrón oscuro

Color blanco amarillento

Cabeza pequeña

Cuatro dígitos funcionales

Dedos largos

Torso estrecho

Ventre prominente

Brazos largos

Cola larga y prensil

Bosques de tierras bajas



Ateles



Primate ecuatoriano de mayor tamaño

<b>Dieta</b>	Frutas, hojas jóvenes, flores, insectos y madera.
<b>Rol ecológico</b>	Dispersor de semillas. Regeneración de bosques. 230 000 semillas por año.
<b>Estado de Conservación</b>	Peligro de extinción 
<b>Amenazas</b>	Pérdida de hábitat, consumo de "carne de monte" y comercio ilegal de mascotas.



***Leontocebus lagonotus***

Desde 2015

*Callitrichidae*: Primates más pequeños del neotrópico

Tierras y montañas bajas

Bosque primario piemontano

Pequeño tamaño

Pelaje negro o marrón

Tonos rojizos

Hocico blanco

Coloraciones amarillas y naranjas



<b>Dieta</b>	Omnívoros, frutos pequeños, insectos, flores, néctar, resinas, huevos y ranas.
<b>Rol ecológico</b>	Dispensor de semillas. Regeneración del ecosistema. Control de insectos
<b>Estado de Conservación</b>	Casi Amenazado. 
<b>Amenazas</b>	Consumo de “carne de monte” y comercio ilegal de mascotas.



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Estrategias de Conservación

- Asegurar el futuro de poblaciones
- Preservación de hábitats

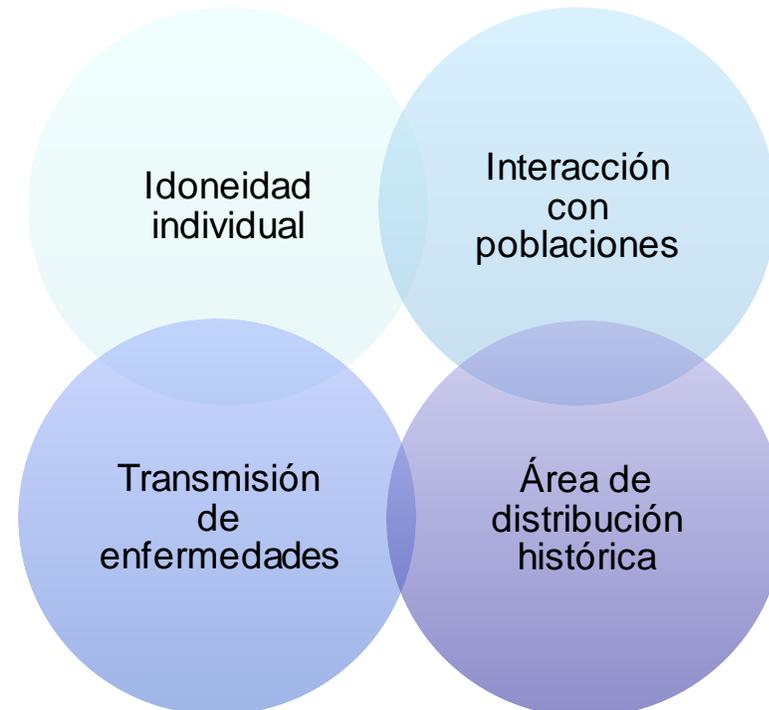
### Herramientas:

- Áreas protegidas
- Aplicación de leyes
- Pagos por servicios ecosistémicos
- **Reintroducción de primates alojados en santuarios**

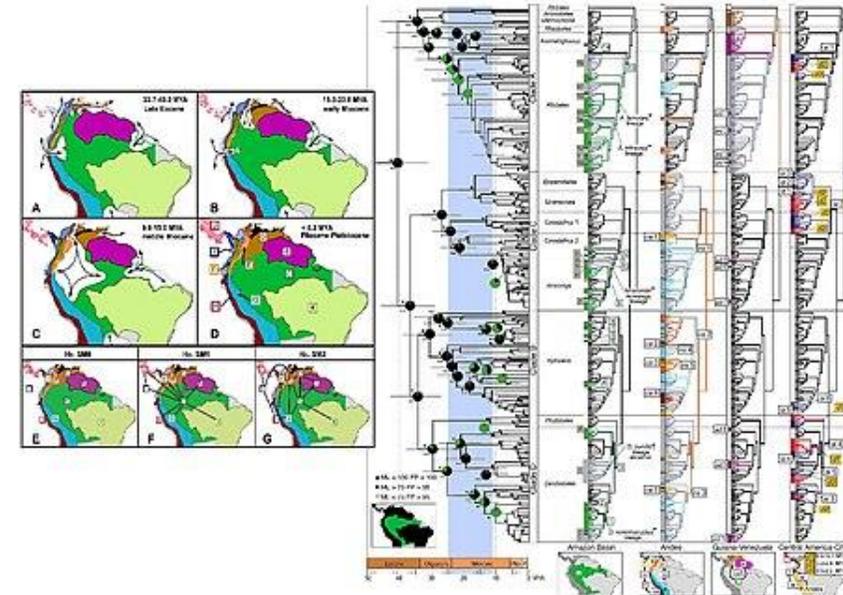


## Reintroducción

*“Movimiento intencional y liberación de un organismo dentro de su área de distribución autóctona.”*

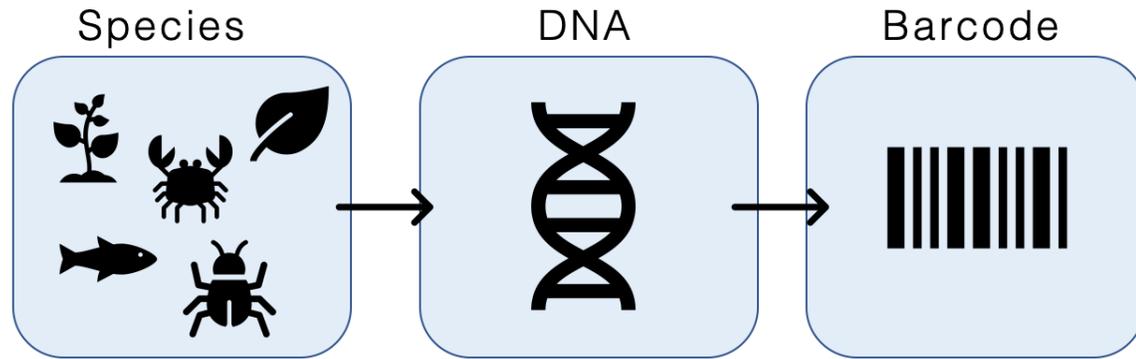


## Filogeografía



***“Genética de la Conservación”***

## PCR Barcoding



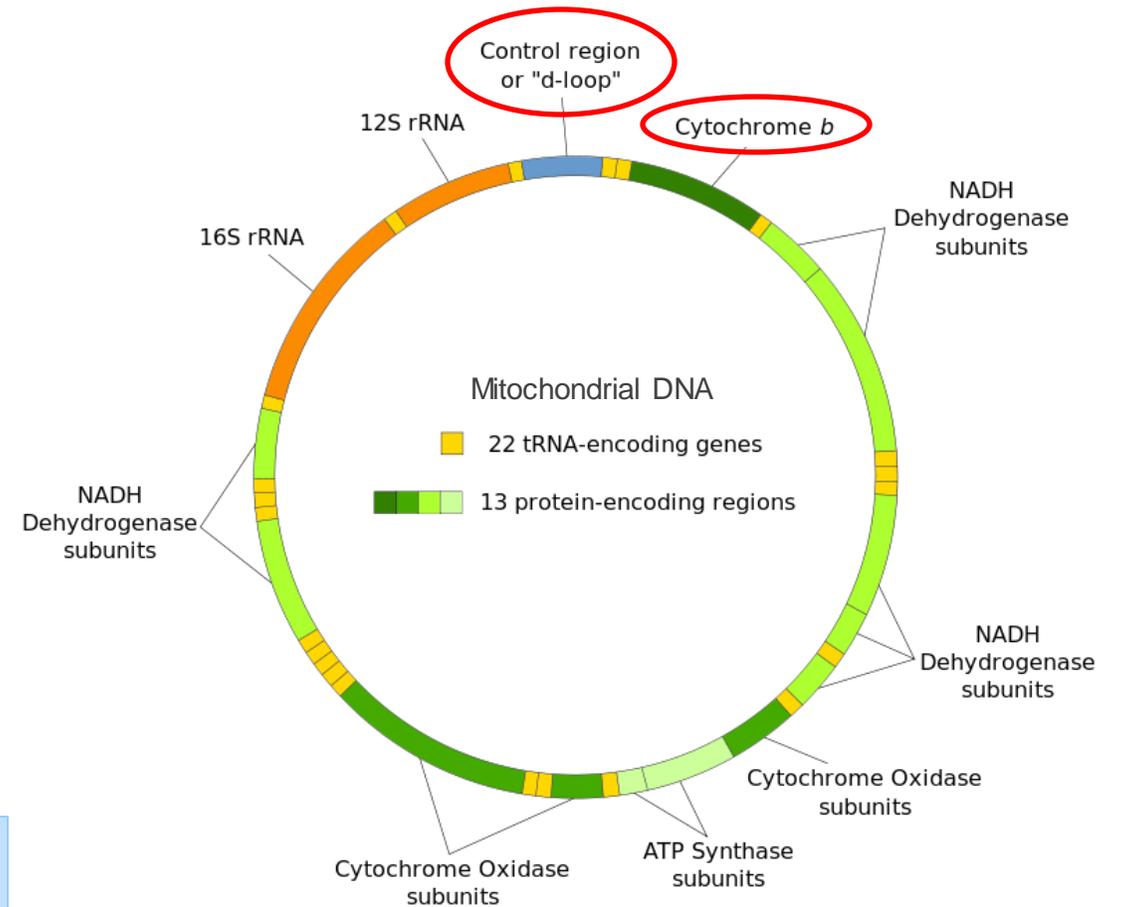
## ADN mitocondrial

Variabilidad intraespecífica

Variación interespecífica



Grados de relación y  
tiempos de divergencia



## Área de Estudio y Muestreo

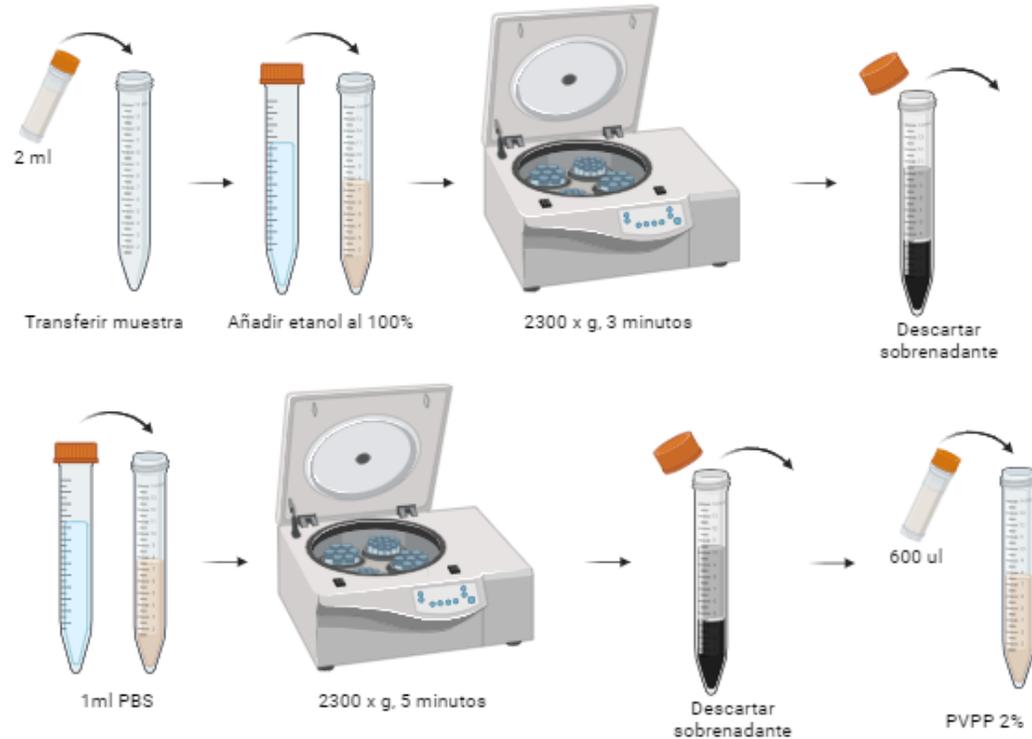
Proyecto Primates Ecuador.

- Zonas: Tena, Pastaza y Morona
- 2011 y el 2021

Centro de Investigación en zoonosis (CIZ)

- Alcohol al 98% a -80 °C

## Preparación de muestras



**Tabla 2**

Información sobre las muestras de heces pertenecientes a *A. belzebuth* y *L. lagonotus*.

Muestra	Especie	Lugar
FD-167	<i>Ateles belzebuth</i>	Yanacocha
FD-172	<i>Ateles belzebuth</i>	Puyo
FD-175	<i>Ateles belzebuth</i>	Puyo
FD-220	<i>Ateles belzebuth</i>	Puyo
PM-001	<i>Ateles belzebuth</i>	Ecuador
PM-006	<i>Ateles belzebuth</i>	Ecuador
FD-48	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macas
FD-49	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macas
FD-52	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macas
FD-57	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macas
FD-123	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Merazonia
FD-128	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Merazonia
FD-154	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Merazonia
FD-163	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo
FD-165	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo
FD-166	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo
FD-174	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo
FD-190	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo
FD-192	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Merazonia
FD-225	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Puyo



## Extracción de ADN

### Kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN

Muestras de *A. belzebuth* y *L. lagonotus*



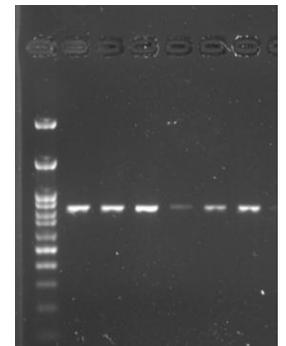
### E.Z.N.A.® Soil DNA Kit

FD-167, FD-172, FD-175, PM-001 y PM-006 de *A. belzebuth*

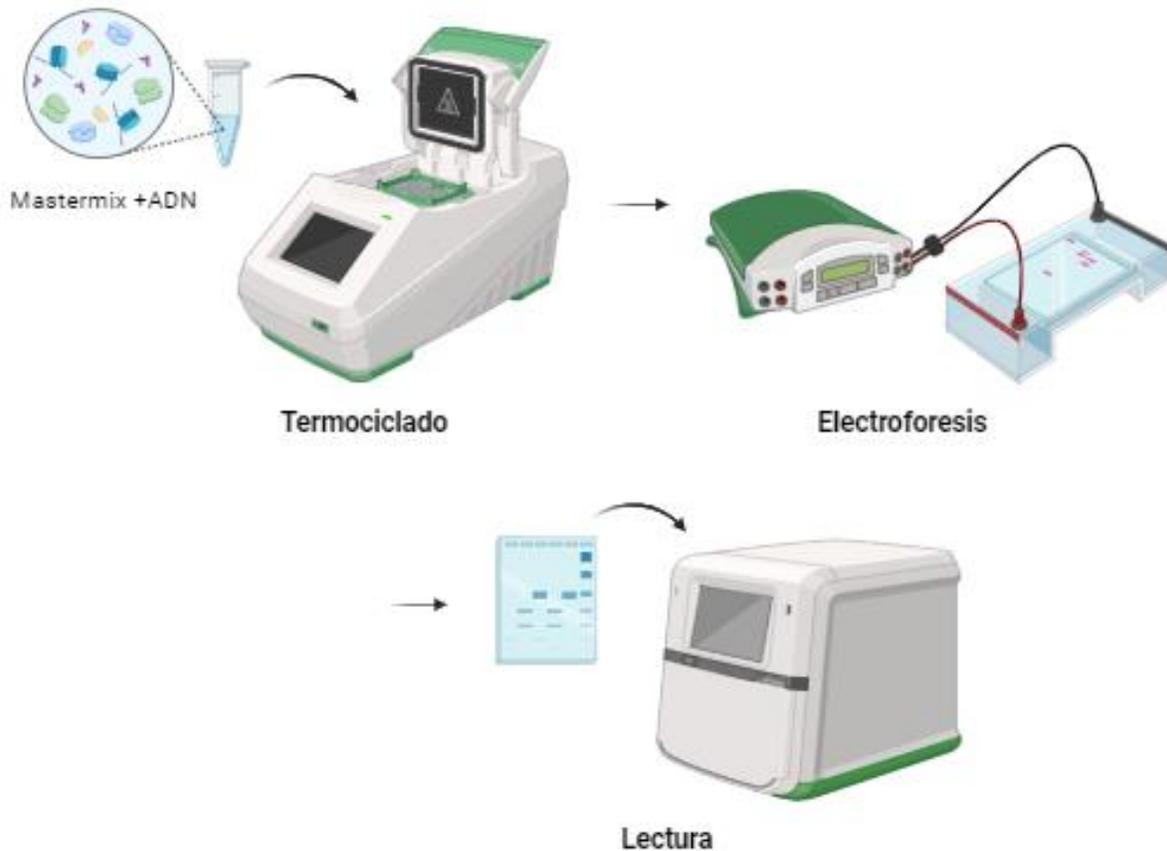


### Rendimientos

Concentración de ADN ( $\mu\text{g/ml}$ ) e intensidad de banda de los amplicones de PCR con CytB.



## Optimización de PCR



**Tabla 3**

Variables a evaluar para la optimización de la PCR con CytB y D-Loop

Parámetro	Marcador	
	Cytb	D-Loop
Concentración de ADN	X	X
Temperatura de hibridación	X	
Concentración de $Cl_2Mg$	X	
Concentración de Taq	X	X
Concentración de primers	X	X
Tiempo de desnaturalización	X	X
Tiempo de hibridación	X	X
Tiempo de elongación		X

## Análisis estadístico

### → Eficacia de los kits

Test de Duncan con intervalos de confianza de 95% y valor  $p \leq 0,05$ .

Gráfico de barras.

### Normalidad

Prueba de Shapiro-Wilk

Diagrama Q-Q plot

### Homocedasticidad

Prueba de Levene

Gráfico de dispersión

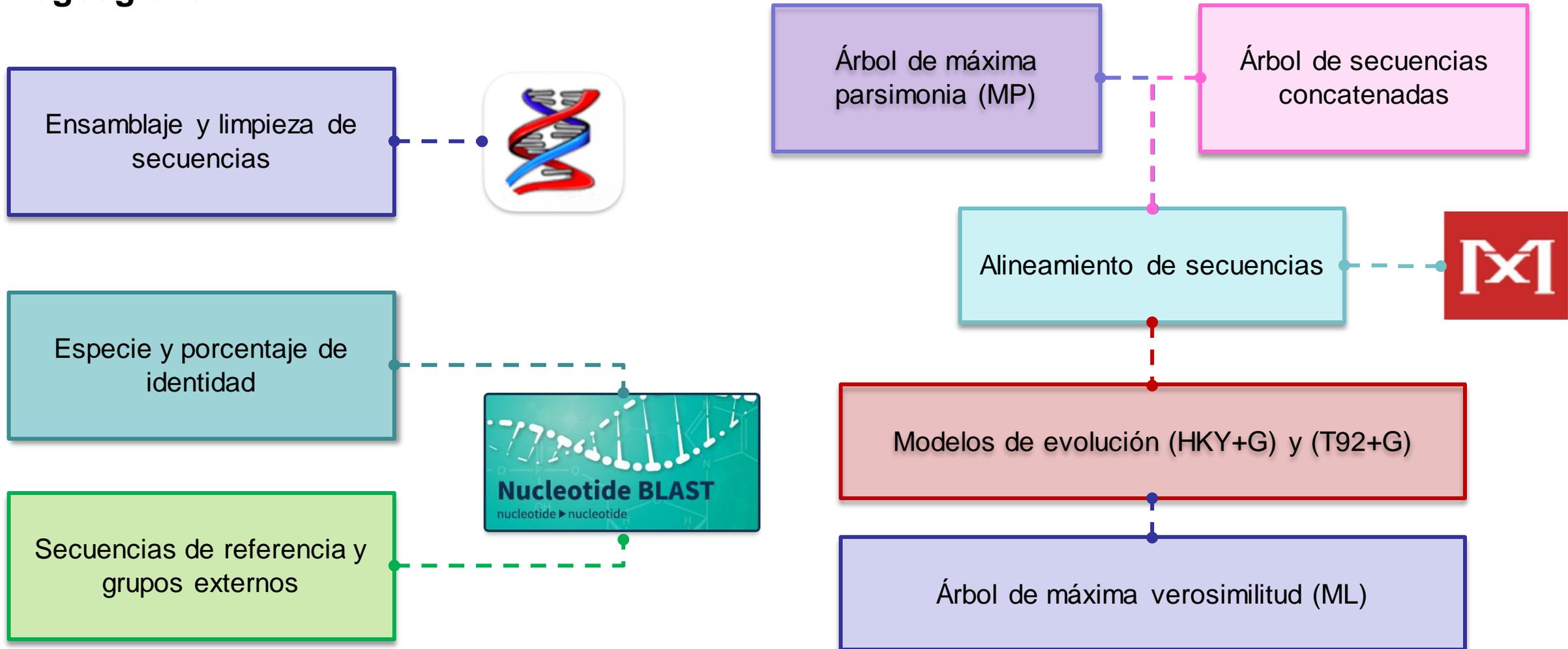


### → Optimización de PCR

Análisis de correlación



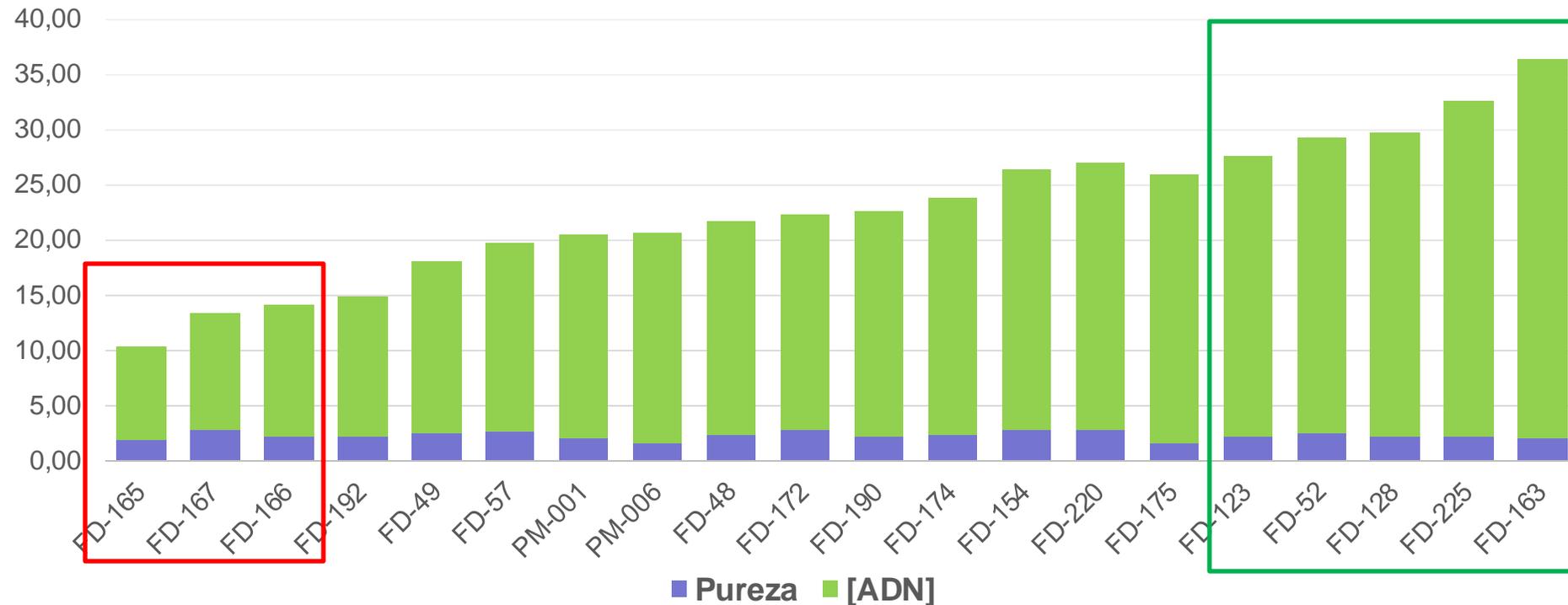
## Filogeografía



## Extracción de ADN

**Figura 1**

Valores de pureza y concentración de ADN de las muestras extraídas con el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN.

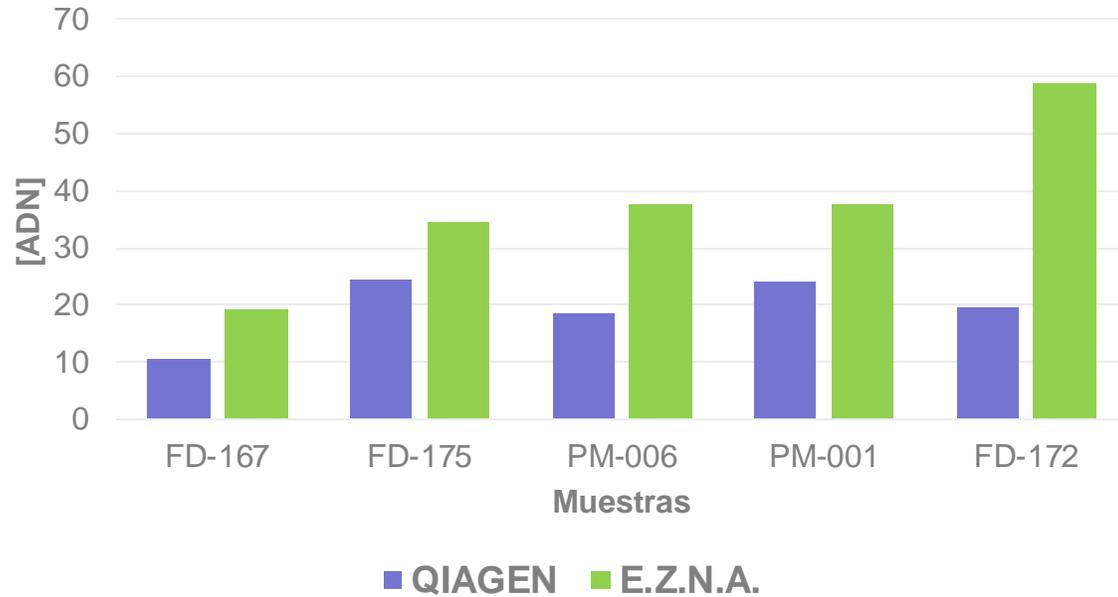


Promedio [ADN]= 39,2 ng/μl

## Comparación de los kits de extracción de ADN

**Figura 2**

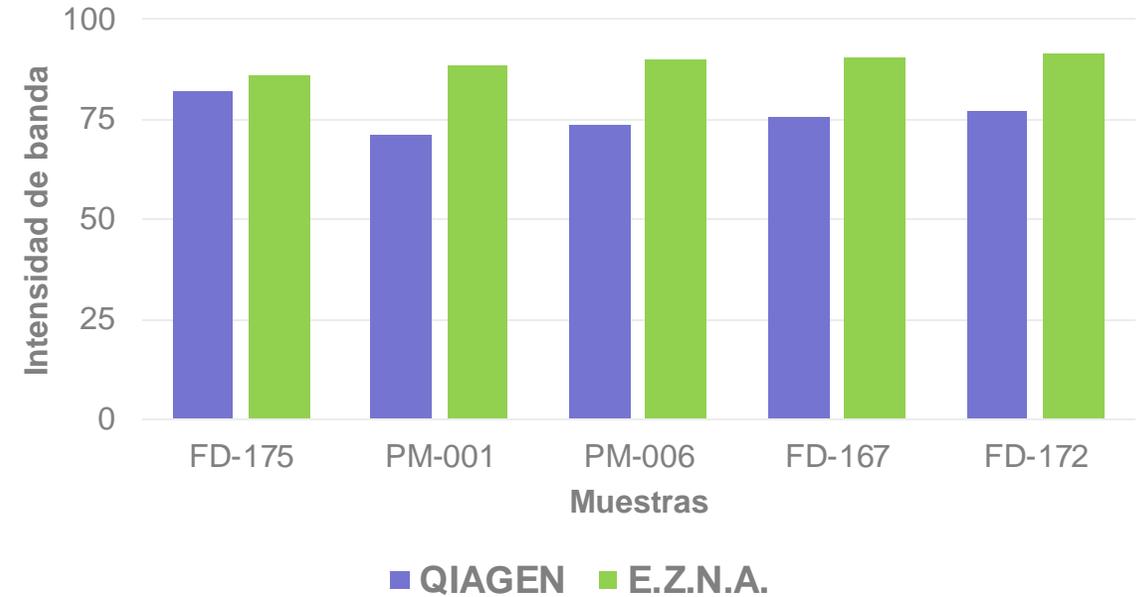
Valores de concentración de ADN obtenidos de las muestras extraídas con los kits de QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y E.Z.N.A.® Soil DNA.



Promedio: 37.48 ng/μl

**Figura 3**

Valores de intensidad de banda obtenidos de las muestras extraídas con los kits de QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y E.Z.N.A.® Soil DNA.



## Comparación de los kits de extracción de ADN

**Tabla 4**

Test de Duncan usando la Concentración de ADN.

Kit	Medias	n	E.E.	
QIAGEN	19.43	5	4.81	A
E.Z.N.A.	37.48	5	4.81	B

Nota. p-valor=0.0291

**Tabla 5**

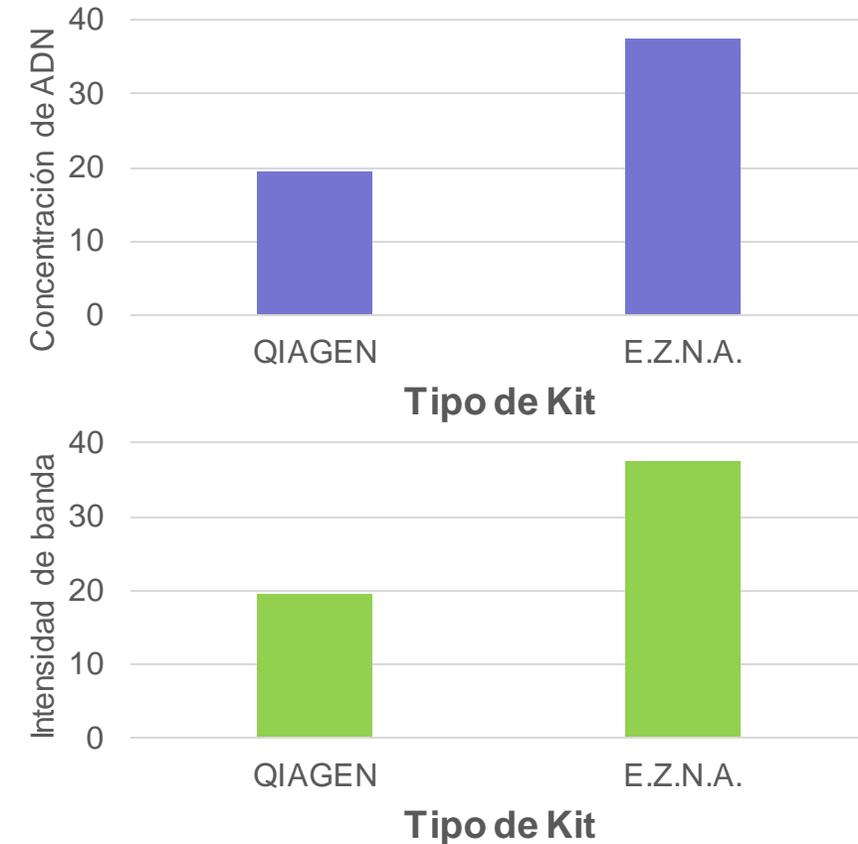
Test de Duncan usando la Intensidad de banda.

Kit	Medias	n	E.E.	
QIAGEN	75.93	5	1.43	A
E.Z.N.A.	89.26	5	1.43	B

Nota. p-valor=0.0002

**Figura 4**

Diagrama de barras de la concentración de ADN y la intensidad de banda en función del kit de extracción empleado.



## Optimización de PCR con CytB

**Tabla 6**

Valores del análisis de correlación para cada parámetro de la optimización de la PCR con CytB.

Parámetro	$R^2$	Pendiente	Valores
Concentración de ADN	0.824	0.015	10 ng/μl
			25 ng/μl
			50 ng/μl
			100 ng/μl
Temperatura de hibridación	0.774	1,342	56 °C
			58 °C
			60 °C
			62 °C
Concentración de $Cl_2Mg$	0.867	0,329	1.5 mM
			2.0 mM
			2.5 mM
			3.0 mM
Concentración de Taq	0.5978	11.610	0.25 U/μl
			0.5 U/μl
			1 U/μl
Concentración de primers	0.973	1,738	0.25 μM
			0.5 μM
			1 μM
Tiempo de desnaturalización	1	0.070	30 segundos
			60 segundos
Tiempo de hibridación	1	-0.178	30 segundos
			60 segundos



## Optimización de PCR con D-Loop

**Tabla 7**

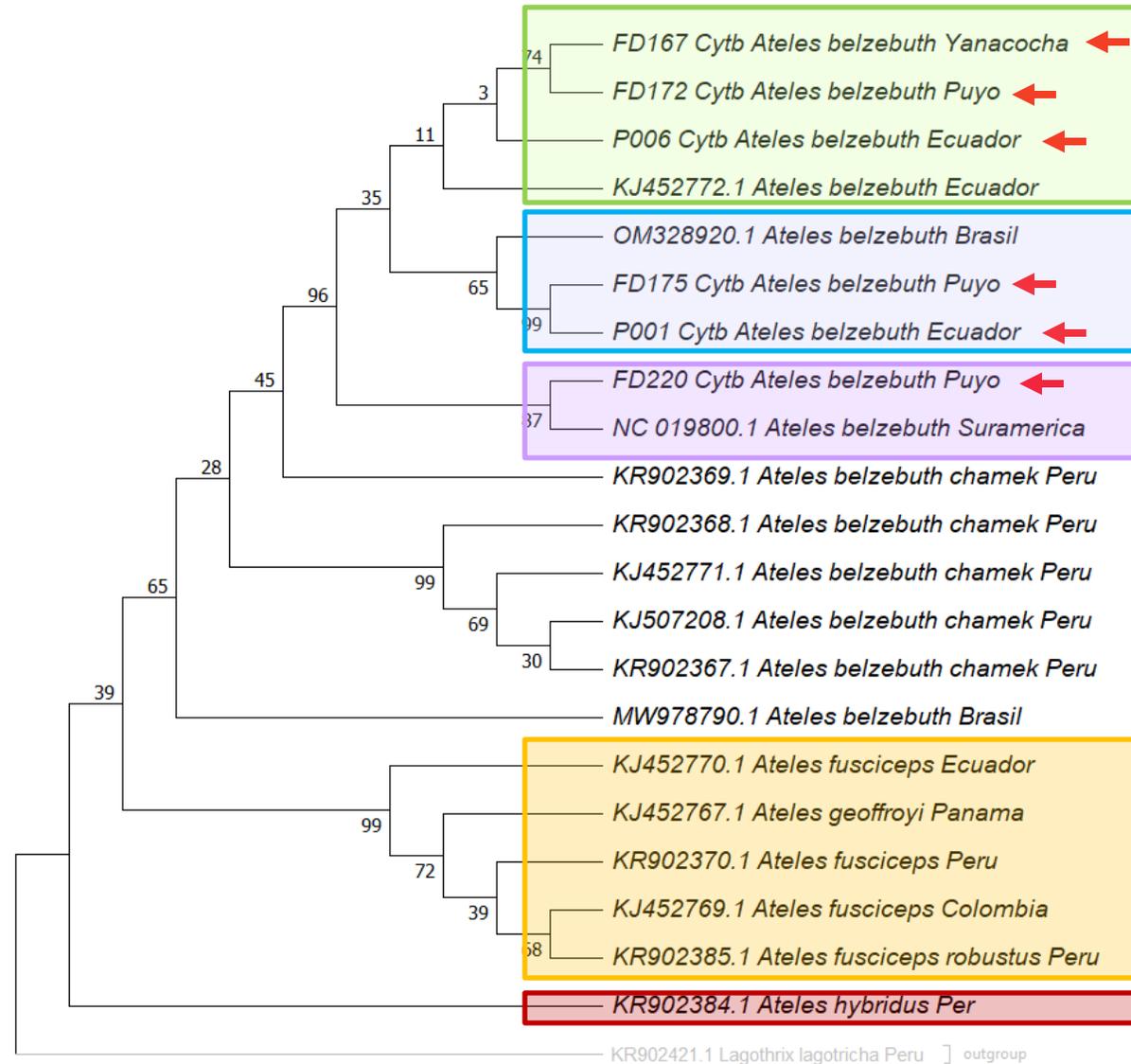
Valores del análisis de correlación para cada parámetro de la optimización de la PCR con D-Loop.

Parámetro	$R^2$	Pendiente	Valores
Concentración de ADN	0.7831	0.0004	6.25 ng/μl
			12.5 ng/μl
			25 ng/μl
			50 ng/μl
			100 ng/μl
Concentración de Taq	0.8929	128.750	0.25 U/μl
			0.5 U/μl
			1 U/μl
Concentración de primers	0.9287	28.3150	0.25 μM
			0.5 μM
			1 μM
Tiempo de desnaturalización	1	0.0860	30 segundos
			60 segundos
Tiempo de hibridación	1	0.1910	30 segundos
			60 segundos
Tiempo de elongación	1	0.0003	45 segundos
			60 segundos



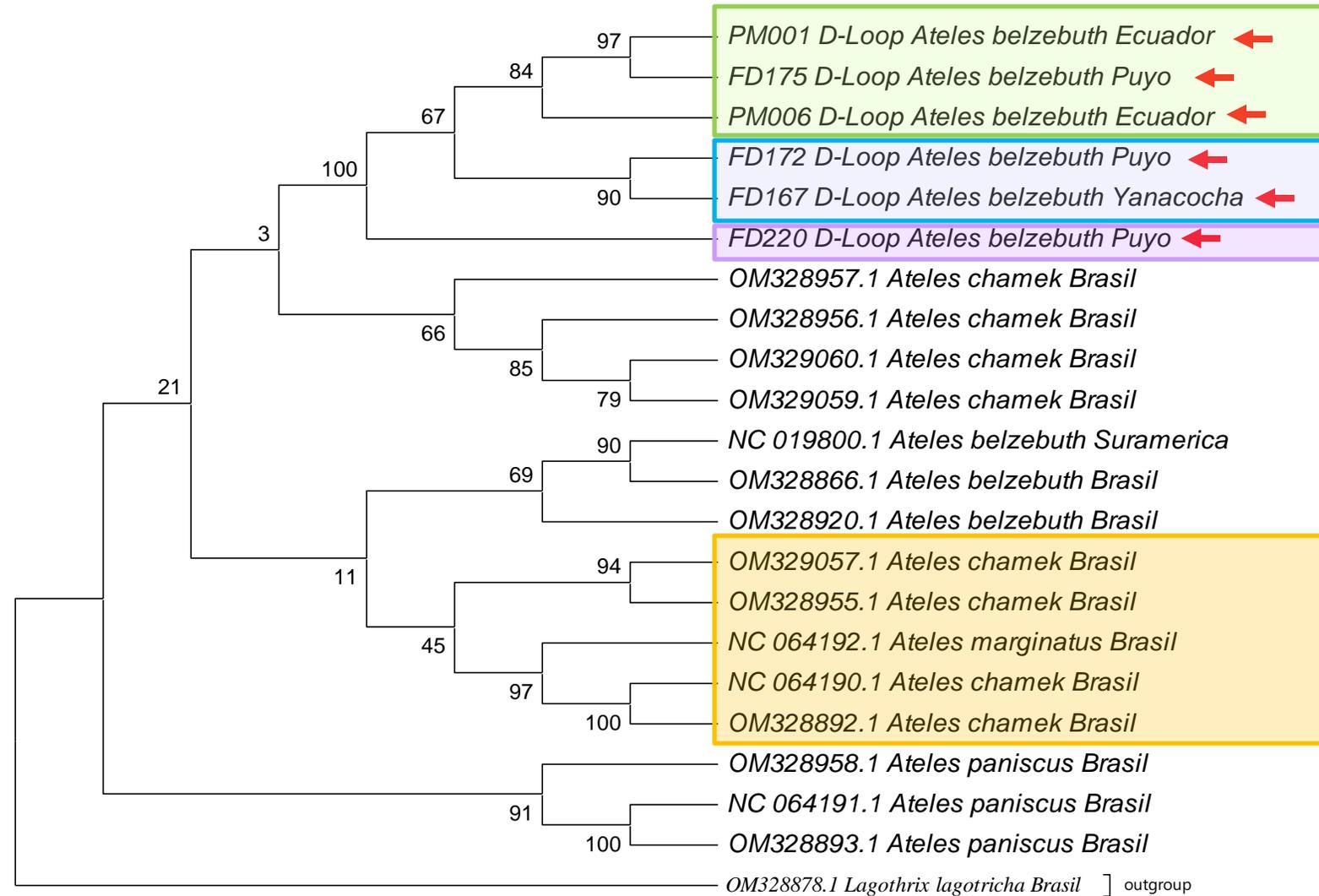
## Filogeografía

**Figura 5**  
Árbol de ML realizado con el modelo Hasegawa-Kishino-Yano, para muestras de *Ateles* con el marcador CytB.



## Filogeografía

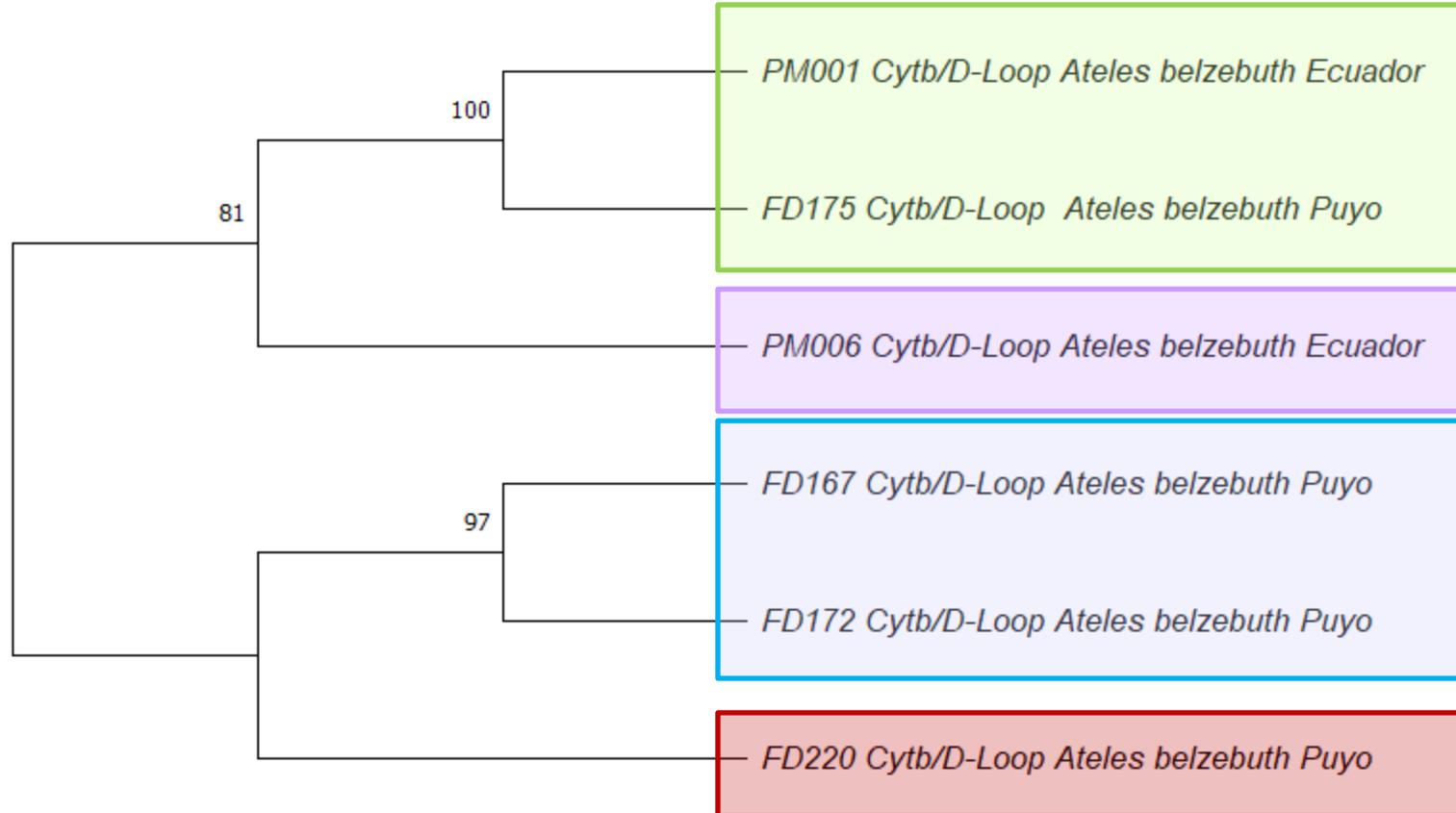
**Figura 6**  
Árbol de ML realizado con el modelo Taruma de 3 parámetros, para muestras de *Ateles* con el marcador D-Loop.



## Filogeografía

### Figura 7

Árbol de ML realizado con el modelo Taruma de 3 parámetros, para muestras de *Ateles* con los marcadores CytB y D-Loop.



## Filogeografía

**Tabla 8**

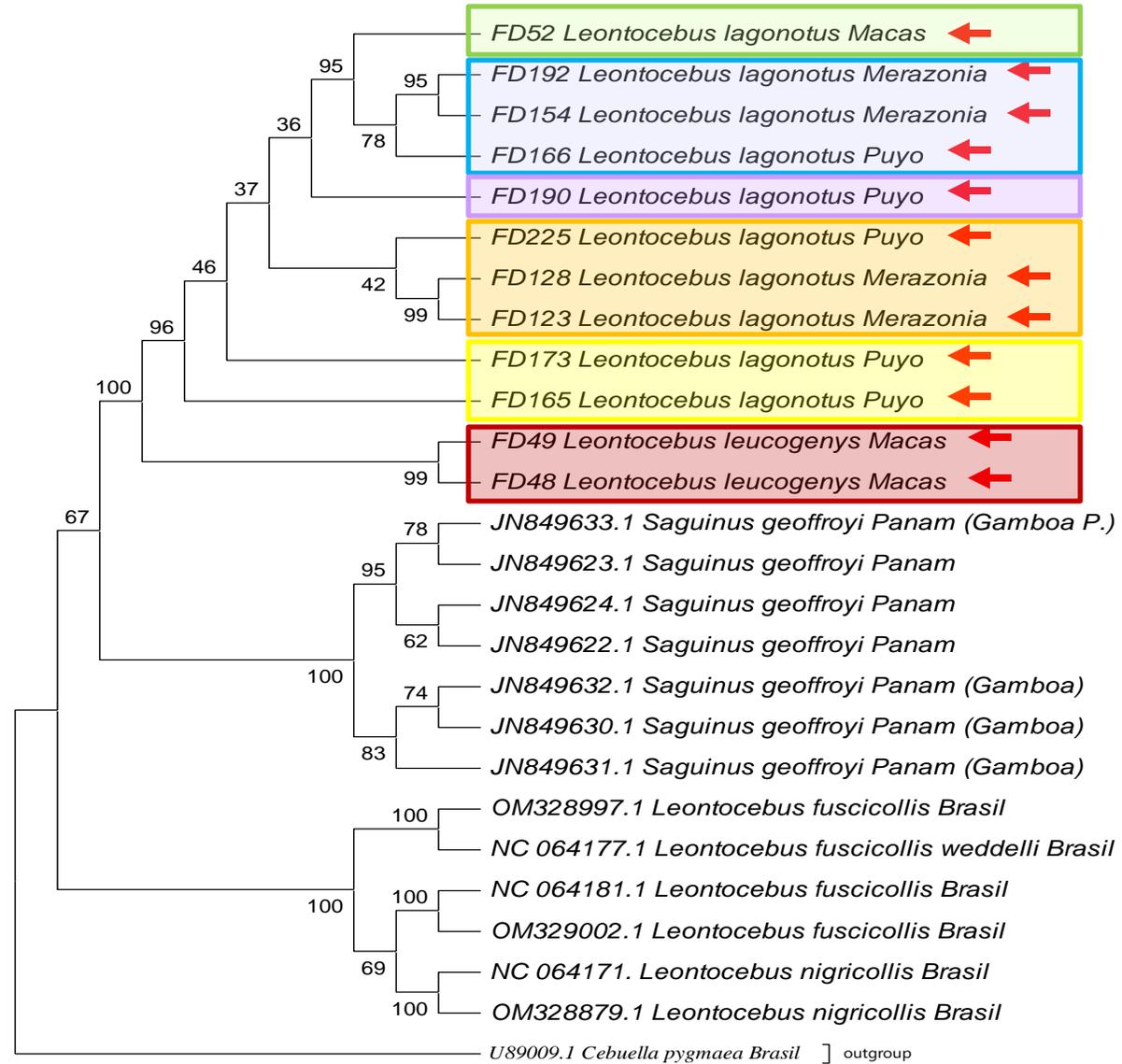
Especies identificadas con la herramienta Blast.

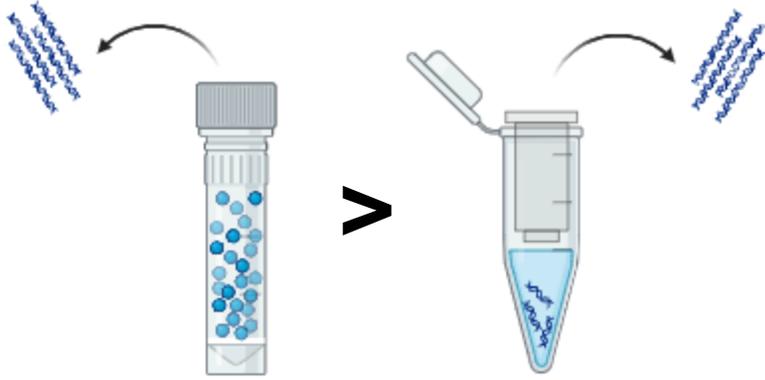
	<b>Muestra</b>	<b>Especie esperada</b>	<b>Especie identificada</b>
	FD-48	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367945: <i>Leontocebus leucogenys</i>
	FD-49	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367945: <i>Leontocebus leucogenys</i>
	FD-52	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-57	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OM328964.1: <i>Cebus unicolor</i>
	FD-123	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-128	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-154	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-163	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OR689238.1: <i>Lagothrix poeppigii</i>
	FD-165	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-166	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
<b>D-Loop</b>	FD-174	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OR689238.1: <i>Lagothrix poeppigii</i>
	FD-190	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-192	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-225	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367952.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>
	FD-167	<i>Ateles belzebuth</i>	KC757386.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	FD-172	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328866.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	FD-175	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	FD-220	<i>Ateles belzebuth</i>	NC_019800.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	PM-001	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	PM-006	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>
	FD-173	<i>Lagothrix lagotricha</i>	HM367952.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>



## Filogeografía

**Figura 8**  
Árbol de MP para muestras de *Leontocebus* con el marcador D-Loop.





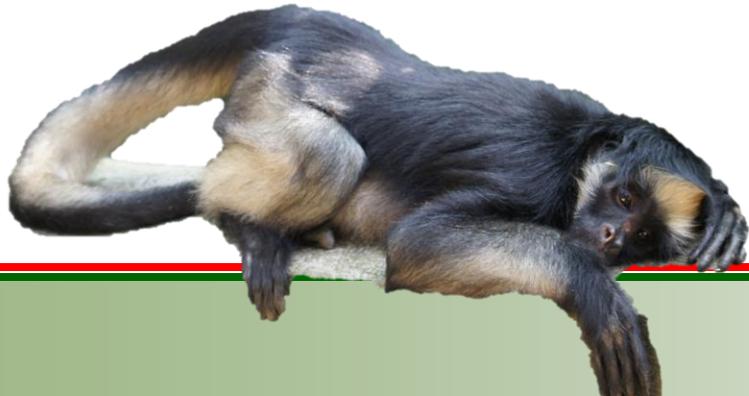
Marcador	Parámetro	Valores
CytB	Concentración de ADN	10 ng/μl
	Temperatura de hibridación	62 °C
	Concentración de Cl <sub>2</sub> Mg	1.5 mM
	Concentración de Taq	0.5 U/μl
	Concentración de primers	0.25 μM
	Tiempo de desnaturalización	60 segundos
	Tiempo de hibridación	30 segundos

Marcador	Parámetro	Valores
D-Loop	Concentración de ADN	12.5 ng/μl
	Tiempo de elongación	45 segundos





- Evaluar el rendimiento de los kits QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y E.Z.N.A.® Soil DNA kit con un mayor número de muestras por individuo y diferentes especies, a fin de obtener resultados de mayor consistencia.
- Realizar estudios filogenéticos en el territorio nacional, usando muestras de primates silvestres.



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Unidad de gestión de la investigación de la  
Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

Sarah Martin Solano Ph.D.

Ing. Cristina Cholota

Familia y Amigos

