



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

Marquez Zambrano, Victoria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Martin Solano, Sarah Ph.D.

1 de Marzo de 2024

## Análisis de Plagio: Resultados Copyleaks



Escrito final cortado.pdf

### Scan details

Scan time: February 29th, 2024 at 14:38 UTC      Total Pages: 49      Total Words: 12013

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Words
Identical	1.1% 132
Minor Changes	0.1% 11
Paraphrased	3.4% 404
Omitted Words	6.8% 812

### AI Content Detection



Text coverage  
 AI text  
 Human text

### Alerts: (1)

#### Cross Language: Same Document Language

Submitted language and cross-language text are the same language. No credits were used.

2/5 Severity



### Plagiarism Results: (14)

#### CBT 003.pdf

1.2%

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34989/1/cb%20003.pdf>

DELL

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
 CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA Estandarización del...

#### "MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD

0.9%

[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/83174/conicet\\_digital\\_rno.fe0d144b-539e-4da1-8dd3-49524...](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/83174/conicet_digital_rno.fe0d144b-539e-4da1-8dd3-49524...)

Anahí

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS "CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA VITELOGENINA EN EL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGA...

#### Tirira-et-al-2018-Estado-de-conservacion-primates-del-Ecuador.pdf

0.8%

<https://aem.mamiferosdeecuador.com/images/pdf/gepe/tirira-et-al-2018-estado-de-conservacion-primates...>

ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LOS PRIMATES DEL ECUADOR Editado por Diego G. Tirira Stella de la Torre Galo Zapata Ríos Diciembre 2018 EST...



SAVAN MARTIN BOLAND

Certified by

About this report  
[help.copyleaks.com](https://help.copyleaks.com)

copyleaks.com



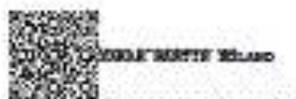
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

#### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Optimización de las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos de los géneros de primate *Ateles* mediante los marcadores CYTB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop" fue realizado por la señorita Marquez Zambrano, Victoria, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 1 de marzo de 2024



Martin Solano, Sarah PhD.

C.C.: 1727221721

Directora del proyecto de integración curricular



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

#### Responsabilidad de Autoría

Yo, **Marquez Zambrano, Victoria**, con cédula de ciudadanía n° 0804404309, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Optimización de las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos de los géneros de primate *Ateles* mediante los marcadores CYTB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 1 de marzo de 2024

**Marquez Zambrano, Victoria**

**C.C.: 0804404309**

---



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

#### Autorización de Publicación

Yo, Marquez Zambrano, Victoria, con cédula de ciudadanía n° 0804404309, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular. **Título:** "Optimización de las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos de los géneros de primate *Ateles* mediante los marcadores CYTB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 1 de marzo de 2024

Marquez Zambrano, Victoria

C.C.: 0804404309

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo, junto con todos mis logros académicos a mi familia. Especialmente a mi madre por ser el ejemplo de trabajo duro y cariño incondicional. A mi hermano Ignacio, por todo el apoyo y la confianza que tuvo en mí, sin él no lo habría logrado. A mi hermana Nathalia, por ser la persona en la que más confío e inspirarme a ser mejor. A Lasio y Blanquita Pérez, quienes, a pesar de no ser mi familia, se convirtieron en parte de ella y me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante. A mis amigos, que han sido una parte significativa durante toda esta experiencia y en los momentos más desafiantes, han sido mi fuente de fortaleza.

Victoria Marquez Zambrano.

## **Agradecimiento**

Quiero agradecer a la Dra. Sarah Martin por la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por el tiempo y la guía proporcionada durante todo el proceso. También, a la Ing. Cristina Cholota, por todo el conocimiento y la orientación proporcionada durante las actividades en el laboratorio. Y de igual forma, agradezco al laboratorio de Biotecnología Animal y a mis compañeros, quienes hicieron del trabajo diario más agradable. A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, junto con todos los docentes que fueron parte de mi formación, gracias por todo el conocimiento y su arduo trabajo.

De igual manera, agradezco a mi familia y seres queridos, por todo el apoyo que me hicieron llegar a pesar de la distancia. Y a los amigos que hice en el camino y a los se quedaron hasta el final, gracias por ser un pilar en los momentos difíciles y celebrar conmigo los buenos momentos.

Gracias a todos por ser parte de mi vida, han hecho esta experiencia realmente significativa y gracias a ustedes este logro cobra mucho más sentido.

Victoria Marquez Zambrano.

## Índice de Contenidos

Análisis de Plagio: Resultados Copyleaks.....	2
Certificación .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento .....	7
Resumen .....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción .....	17
Antecedentes .....	17
Formulación del problema.....	17
Justificación del problema .....	18
Objetivos del Proyecto .....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos .....	20
Hipótesis .....	20
Capítulo II: Marco Teórico .....	21
Primates.....	21
Género Ateles.....	23
<i>Ateles belzebuth</i> .....	23
Género Saguinus.....	25
<i>Leontocebus lagonotus</i> .....	26
Estrategias de Conservación .....	27
Reintroducción.....	28
Filogeografía .....	28

PCR Barcoding .....	29
CytB.....	30
D-Loop.....	30
Capítulo III: Materiales y Métodos .....	31
Área de Estudio y Muestreo .....	31
Preparación de las muestras.....	32
Extracción de ADN.....	32
PCR Barcoding con el Marcador CytB .....	35
PCR Barcoding con el Marcador D-Loop .....	38
Análisis estadístico .....	41
Filogeografía .....	41
Capítulo IV: Resultados .....	43
Extracción de ADN.....	43
Comparación de los kits de extracción de ADN.....	44
Optimización de PCR con CytB .....	49
Optimización de PCR con D-Loop.....	54
Filogeografía .....	59
Capítulo V: Discusión.....	68
Extracción de ADN.....	68
Comparación de los kits de extracción de ADN.....	69
Optimización de PCR con CytB y D-Loop .....	70
Filogeografía .....	71
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones .....	74
Capítulo VII: Referencias .....	75

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Primates de las familias <i>Atelidae</i> y <i>Callitrichidae</i> del Ecuador, taxonomía, sinonimias y distribución .....	22
<b>Tabla 2.</b> Información sobre las muestras de heces pertenecientes a <i>A. belzebuth</i> y <i>L. lagonotus</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de la PCR con CytTB .....	36
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de reactivos para la mastermix de la PCR con CytB .....	36
<b>Tabla 5.</b> Variables a evaluar para la optimización de la PCR con CytB .....	37
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de la PCR con D-Loop .....	39
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones de reactivos para la mastermix de la PCR con D-Loop .....	39
<b>Tabla 8.</b> Variables a evaluar para la optimización de la PCR con D-Loop .....	40
<b>Tabla 9.</b> Valores de pureza y concentración de ADN obtenidos de las muestras extraídas con el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN .....	43
<b>Tabla 10.</b> Valores de concentración de ADN e 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 .....	45
<b>Tabla 11.</b> Prueba de Shapiro-Wilks para el supuesto de normalidad.....	46
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Levene para el supuesto de homogeneidad de varianzas .....	47
<b>Tabla 13.</b> Análisis de la varianza (SC tipo III) .....	48
<b>Tabla 14.</b> Test de Duncan usando la Concentración de ADN.....	48
<b>Tabla 15.</b> Test de Duncan usando la Intensidad de banda.....	48
<b>Tabla 16.</b> Especies identificadas con la herramienta Blast, con su correspondiente porcentaje de identidad.....	59
<b>Tabla 17.</b> Distancias evolutivas entre las muestras de <i>Ateles</i> analizadas con CytB ...	61
<b>Tabla 18.</b> Distancias evolutivas entre las muestras de <i>Ateles</i> analizadas con D-Loop ..	63

**Tabla 19.** Distancias evolutivas entre las muestras de Ateles analizadas con D-Loop ..66

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Amplicones resultantes de la PCR con el marcador CytB de muestras de ADN de <i>A. belzebuth</i> extraídas con diferentes kits. ....	45
<b>Figura 2.</b> Diagrama Q-Q plot de los residuos de los valores de concentración de ADN e intensidad de banda.....	46
<b>Figura 3.</b> Diagrama de dispersión usando los PRED y RDUO de las concentraciones de ADN e intensidades de banda.....	47
<b>Figura 4.</b> Diagrama de barras de la concentración de ADN y la intensidad de banda en función del kit de extracción empleado .....	49
<b>Figura 5.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de ADN.....	50
<b>Figura 6.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes temperaturas de hibridación .....	50
<b>Figura 7.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de $Cl_2Mg$ .....	48
<b>Figura 8.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de Taq .....	48
<b>Figura 9.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de primers .....	49
<b>Figura 10.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes tiempos de desnaturalización .....	49
<b>Figura 11.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes tiempos de hibridación .....	53
<b>Figura 12.</b> Amplicones correspondientes a muestras de <i>A. belzebuth</i> procesadas bajo las condiciones optimizadas de la PCR con el marcador CytB.....	54

<b>Figura 13.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de ADN .....	55
<b>Figura 14.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de Taq .....	55
<b>Figura 15.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de primers.....	56
<b>Figura 16.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes tiempos de desnaturalización e hibridación .....	57
<b>Figura 17.</b> Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes tiempos de elongación.....	58
<b>Figura 18</b> <i>Amplicones correspondientes a muestras de A. belzebuth y L. lagotus procesadas bajo las condiciones optimizadas de la PCR con el marcador D-Loop.</i> .....	58
<b>Figura 19.</b> Árbol obtenido con el método de ML y el modelo Hasegawa-Kishino-Yano, para muestras de Ateles con el marcador CytB .....	61
<b>Figura 20.</b> Árbol obtenido con el método de ML y el modelo Taruma de 3 parámetros, para muestras de Ateles con el marcador D-Loop .....	63
<b>Figura 21.</b> Árbol obtenido con el método de ML y el modelo Taruma de 3 parámetros, para muestras de Ateles con los marcadores CytB y D-Loop.....	65
<b>Figura 22.</b> Árbol obtenido con el método de MP, para muestras de <i>Leontocebus</i> con el marcador D-Loop .....	67

### Acrónimos

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CIZ</b>	Centro Internacional de Zoonosis
<b>CytB</b>	Citocromo b
<b>D-Loop</b>	Bucle D mitocondrial
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>ML</b>	Maximum Likelihood Tree
<b>MP</b>	Maximum Parsimony Tree
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirridona
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

## Resumen

Los géneros de primates *Ateles* y *Leontocebus* se han establecido como mamíferos de relevancia por el rol ecológico que cumplen y por la problemática que presentan en temas de conservación. La filogeografía forma parte del concepto de “Genética de la conservación”, donde los estudios filogeográficos son herramientas fundamentales en trabajos de biodiversidad y conservación. El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de 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. Para ello se obtuvieron muestras de ADN de primates no humanos a partir de muestras no invasivas, las mismas que se emplearon para establecer el protocolo de PCR Barcoding con los marcadores CytB y D-Loop, y finalmente inferir la regionalidad de los individuos de los géneros *Ateles* y *Lentocebus* con las secuencias disponibles de los genes CytB y D-Loop. Se estableció el protocolo de PCR Barcoding con el marcador CytB con una concentración de ADN de 10 ng/μl, 62°C de temperatura de hibridación, Cl<sub>2</sub>Mg a 2.0 mM, Taq a 0.5 U/μL, primers en 0.25 μM y tiempos de desnaturalización e hibridación de 60 y 30 segundos respectivamente. En cuanto al marcador D-Loop, se estableció un tiempo de extensión de 45 segundos y una concentración de ADN de 12.5 ng/μl. Mediante el uso de los marcadores CytB y D-Loop, fue posible agrupar las especies de primates pertenecientes a los géneros *Ateles* y *Leontocebus* en relación a la zona de procedencia del individuo. No fue posible determinar el lugar de origen de las muestras analizadas a falta de datos propios del país. Una suficiente cantidad de información relacionada con las especies podría hacer posible la inferencia del lugar de origen de los individuos a partir de datos moleculares.

*Palabras clave:* primates, Barcoding, filogeografía, conservación

### Abstract

The primate genera *Ateles* and *Leontocebus* are ecologically significant mammals with important conservation challenges. Phylogeography is an essential tool in biodiversity and conservation efforts, and is a component of the "Genetics of Conservation" concept. This study aimed to optimize molecular tools for inferring the phylogeography of *Ateles* individuals using CytB and D-Loop markers, and *Leontocebus* genus using the D-Loop marker. Non-human primate DNA samples were collected from non-invasive sources, to establish the PCR Barcoding protocol using CytB and D-Loop markers. Finally, the regional distribution of *Ateles* and *Leontocebus* individuals was inferred using the obtained sequences and the available sequences of CytB and D-Loop genes in databases. The PCR Barcoding protocol was established with the CytB marker with a DNA concentration of 10 ng/μl, a hybridization temperature of 62°C, Cl<sub>2</sub>Mg at 2.0 mM, Taq at 0.5 U/μL, and primers at 0.25 μM, and denaturation and hybridization times of 60 and 30 seconds, respectively. For the D-Loop marker, an extension time of 45 seconds and a DNA concentration of 12.5 ng/μl were established. The primate species belonging to the *Ateles* and *Leontocebus* genera were grouped based on the individual's region of origin, using the CytB and D-Loop markers. It was not possible to determine the place of origin of the analyzed samples due to the lack of country-specific data. Inferring the place of origin of individual from molecular data would require a sufficient amount of species-related information.

*Keywords:* primates, Barcoding, phylogeography, conservation

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

Los géneros *Ateles* y *Leontocebus* forman parte de la gran diversidad de primates no humanos presentes en el Ecuador (de la Torre, 2010). En el caso de *Ateles*, solo se han reportado ejemplares de *Ateles fusciceps* en la zona noroccidental del país en registros anteriores a 1963 (Madden R. & Albuja L., 1989). Posteriormente, el estudio realizado por Madden y Albuja en 1989 dio un vistazo al estado de esta especie, dando pauta para el desarrollo de estudios similares (de la Torre, 2010). La mayor parte de estas investigaciones se han realizado en bosques del noroccidente del país, enfocándose únicamente en *A. fusciceps* (Gallo-Viracocha et al., 2022; Morelos, 2016; Moscoso, 2010; Rivera Román, 2017). Otros trabajos han llevado a cabo un análisis más generalizado sobre todos los primates ecuatorianos (de la Torre, 2010; Tirira D. G. et al., 2018), de los cuales, solo pocos incluyen a *Ateles belzebuth* (Pozo & Youlatos, 2022; Snodderly et al., 2019).

Por otro lado, el género *Leontocebus*, se ha identificado en la región amazónica del país (de la Torre, 2010). Desde 1904 se han descrito ejemplares pertenecientes a este género (Tirira D. G. et al., 2018). Si bien existen algunos estudios filogenéticos relacionados con este género (Matauschek et al., 2011; Vallinoto et al., 2000), ninguno se ha llevado a cabo en territorio nacional. Pese a que los estudios primatológicos en el país están en aumento (Cervera et al., s. f.; de la Torre & Morelos-Juárez, 2022; Ruiz-García et al., 2018; Tirira, 2021), aún se requiere de mayor información relacionada con primates, sobre todo de la región amazónica (Tirira D. G. et al., 2018).

### Formulación del problema

En la región neotropical, los primates no humanos han sido establecidos como mamíferos de relevancia, no solo por el rol ecológico que cumplen como dispersores de semillas (Fernández et al., 2022), sino también por la problemática que presentan en temas de

conservación (Tirira, 2021; Tirira D. G. et al., 2018). Para el 2017, el 36% de las especies de primates neotropicales se encontraban amenazadas (Estrada et al., 2017), y para el 2021 se encontró que el 24% estaba en peligro crítico y el 42% amenazado (IUCN, 2021).

Teniendo en cuenta las amenazas antropogénicas existentes, como la cacería, el tráfico de animales y la pérdida de hábitat (de la Torre, 2010), y el papel crucial de estas especies en los ecosistemas donde habitan (Orna, 2018), su conservación requiere de acciones inmediatas (de la Torre & Morelos-Juárez, 2022). La reintroducción se ha propuesto como una estrategia para actuar frente a la actual crisis de biodiversidad, debido a que puede restaurar procesos ecológicos e interacciones (Landim et al., 2022). Sin embargo, para ello se requieren de diversas estrategias y estudios cuidadosos sobre los individuos, las condiciones y los desafíos presentes en el entorno (Wich & Marshall, 2016).

Tomando en cuenta la situación descrita en relación a los primates ecuatorianos, resulta de relevancia establecer herramientas para precautelar su conservación (Tirira D. G. et al., 2018). Con este fin, el presente trabajo busca optimizar las herramientas moleculares para inferir la filogeografía de los individuos del género de primate *Ateles* mediante el marcador CytB y D-Loop, y del género *Leontocebus* con el marcador D-Loop.

### **Justificación del problema**

*Ateles* spp. es un género ampliamente distribuido en las selvas del neotrópico (Orna, 2018), perteneciente a la familia Atelidae. Estos mamíferos son susceptibles a la fragmentación de su hábitat (Orna, 2018) y se han visto afectados por el consumo de carne de monte (Tirira D. G. et al., 2018). Su conservación se complica por una tasa de reproducción baja, propia del género (Bergamo, 2020). En Ecuador, se han registrado dos especies, *A. belzebuth* y *A. fusciceps*, las mismas que se encuentran en peligro y en peligro crítico, respectivamente (Tirira D. G. et al., 2018).

El género *Lentocebus*, anteriormente conocido como *Saguinus* (Tirira D. G. et al., 2018), se distribuye en países sudamericanos como Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Downey, 2022). En la Amazonía ecuatoriana habitan 3 especies, las cuales se encuentran en estado vulnerable y casi amenazadas (Tirira D. G. et al., 2018), sobre todo, a causa del comercio ilícito de mascotas silvestres y la pérdida de hábitat (Downey, 2022).

La filogeografía estudia la interacción entre linajes genealógicos de especies estrechamente relacionadas y su distribución espacial (Machado & Perez, 2023; Simpson, 2019). Con esta herramienta se infieren relaciones genealógicas, útiles para identificar la historia biogeográfica de poblaciones, flujo de genes e identificar fragmentaciones y expansiones de áreas de distribución (Simpson, 2019).

En este sentido, la filogeografía ha logrado incluirse en el concepto de “Genética de la conservación”, el cual busca contribuir a la preservación de especies empleando historias evolutivas (Machordom et al., 2003). Se ha establecido que los estudios filogeográficos son herramientas fundamentales en trabajos de biodiversidad y conservación (Liang et al., 2019; Machordom et al., 2003), sobre todo en especies neotropicales (Machado & Perez, 2023; Mello et al., 2018; Thalmann, 2007).

El citocromo b mitocondrial (CytB) es uno de los genes más secuenciados para establecer la distancia genética entre especies de vertebrados (Johns & Avise, 1998; Levin, 2001; Parson et al., 2000), y se ha usado ampliamente en mamíferos (Castresana, 2001; Tobe et al., 2010). Se ha empleado para establecer la filogenia y taxonomía de primates (Andrews et al., 1998; Castresana, 2001), e incluso para establecer relaciones filogenéticas entre especies del género *Ateles* (Collins & Dubach, 2000; Grant, 2023; Ruiz-García et al., 2016).

El bucle D mitocondrial o D-loop es un gen presente en la región no codificante de muchos genomas mitocondriales (Nicholls & Minczuk, 2014). Tiene una longitud promedio de

1100 nucleótidos (Scotto, 2006) y se ha establecido como una herramienta útil en estudios filogenéticos (Susanti et al., 2017; Xie et al., 2006), de estructura genética e identidad biológica (Zhang et al., 2012), de mamíferos (Cardoso et al., 2011; Zhang et al., 2012), e incluso en primates (Matauschek et al., 2011; Scotto, 2006).

## **Objetivos del Proyecto**

### ***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 *Leontocebus* 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.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Primates

La palabra primate viene del latín *Primas, -ātis* que significa “primero” o “prócer” (RAE, 2022). Este grupo euterio, hembras con mamas y placenta completamente desarrolladas (OED, 2023), es antiguo. Los primeros fósiles datan de hace 56 a 59 millones de años (Myers, 2000). Este grupo es considerado muy diverso, con aproximadamente 500 especies vivas (Napier & Groves, 1999; NEPC, 2021).

Dentro del orden de los primates se incluyen mamíferos como prosimios, monos y simios (Napier & Groves, 1999; Vonk, 2020). Actualmente, los primates se pueden dividir en dos subórdenes, estrepsirrhinos y haplorrhinos, en función de si cuentan con una nariz desnuda o peluda, respectivamente (Myers, 2000). El suborden Strepsirrhini, lémures y loris, cuenta con 6 familias, mientras que, Haplorrhini se conforma por 9 familias, entre ellos, tarseros, monos y simios, incluidos los humanos (Napier & Groves, 1999).

Los primates no humanos pueden encontrarse en zonas como bosques tropicales y complejos vegetales de bosques y pastizales (Myers, 2000; Napier & Groves, 1999). Si bien existen varias especies de primates en África (107) y Asia (133) (IUCN, 2021), el Neotrópico contiene la mayor abundancia y diversidad de especies en el mundo (187) (Napier & Groves, 1999; Shostell & Ruiz-García, 2016).

En Ecuador existen 21 especies pertenecientes a 5 familias: Callitrichidae (4), Cebidae (5), Aotidae (2), Pitheciidae (5) y Atelidae (6) (Tirira D. G. et al., 2018), y en su mayoría residen en la región amazónica del país (de la Torre, 2010). Las 6 especies de la familia Atelidae se distribuyen en 3 géneros *Alouatta*, *Ateles* y *Lagothrix* (Tirira D. G. et al., 2018), mientras que, parte de la familia Callitrichidae son los géneros *Cebuella* y *Leontocebus* (Tirira D. G. et al., 2018). Esto se puede evidenciar en la Tabla 1.

**Tabla 1**

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

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

*Nota.* Adaptado de *Estado de conservación primates del Ecuador* (p. 17), Tirira D. G. et al., 2018.

## **Género *Ateles***

Las 7 especies existentes del género *Ateles*, mono araña, se distribuyen en los bosques tropicales del neotrópico (Hinchliffe, 2022). Pese a que el género tiene una vasta distribución geográfica, los monos araña tienen preferencias de hábitat restringidas, bosques lluviosos y húmedos por debajo de los 800 m.s.n.m. (Campbell, 2008). Son individuos frugívoros (Hinchliffe, 2022), prefiriendo frutos rojos, además de hojas y flores tiernas (Campbell, 2008).

El género tomó este nombre en 1806 y hace referencia a los individuos cuyas manos cuentan con cuatro dígitos funcionales (Campbell, 2008; Morales et al., 2015). Estos se caracterizan por su rostro corto en una cabeza pequeña, y por tener brazos largos y delgados, en un torso estrecho y de vientre prominente (Campbell, 2008), junto con una cola larga y prensil, y dedos largos para facilitar su locomoción suspensiva (Hinchliffe, 2022). Junto con un ágil esqueleto diseñado para suspender y lanzar el peso de su cuerpo (Campbell, 2008), su dieta rica en energía facilita la búsqueda de alimentos en el dosel superior del bosque tropical (Campbell, 2008).

En el país existen dos especies de mono araña, *Ateles fusciceps* que se encuentra en la zona noroccidental (Madden R. & Albuja L., 1989) y *Ateles belzebuth* que habita en la región amazónica (Campbell, 2008).

### ***Ateles belzebuth*.**

*Ateles belzebuth*, también denominado mono araña de vientre blanco, es el primate no humano de mayor tamaño en el territorio ecuatoriano (Tirira D. G. et al., 2018). Se caracteriza por poseer pelaje largo y abundante, de color negro o marrón oscuro en el dorso y por la presencia de un color blanco amarillento en el vientre y en la parte interior de las extremidades y cola (Boada & Vallejo, 2010; Tirira D. G. et al., 2018).

Esta especie se distribuye en bosques de tierras bajas, por debajo de los 1000 m.s.n.m. (Abrams, 2022; Mourthé et al., 2019). Habita en la región amazónica ecuatoriana, predominantemente al sur del río Napo (Boada & Vallejo, 2010; Tirira D. G. et al., 2018), en zonas de difícil acceso para el ser humano (Tirira D. G. et al., 2018).

En el Yasuní se ha identificado una densidad de población aproximada de 11.5 individuos/km<sup>2</sup> (Mourthé et al., 2019; Tirira D. G. et al., 2018). Por lo general, se movilizan en grupos de 15 a 35 individuos (Mourthé et al., 2019; Tirira D. G. et al., 2018), con una predominancia de hembras, tres veces más hembras que machos (Ceitlin, 2004). Estos primates poseen un largo periodo de gestación de 210 a 232 días (Ceitlin, 2004; Mourthé et al., 2019). En Ecuador se ha observado una estacionalidad reproductiva, los nacimientos, se restringen al período entre los meses de mayo y diciembre (Mourthé et al., 2019).

Su dieta se compone mayoritariamente por el consumo de frutas, y en menor cantidad por hojas jóvenes, flores, insectos e incluso madera en descomposición (Ceitlin, 2004; Tirira, 2021).

**Rol ecológico.** El mono araña se considera un gran polinizador y dispersor de semillas (Abrams, 2022; Mourthé et al., 2019). Se ha visto que aumenta la tasa de germinación de algunas plantas (Ceitlin, 2004). Además, tienen un rol de relevancia en la regeneración de los bosques tropicales (Abrams, 2022), movilizan semillas a largas distancias desde la planta madre (Pozo & Youlatos, 2022) y se calcula que un solo mono puede esparcir un promedio de 230 000 semillas por año (Abrams, 2022). La disminución de este primate podría poner en riesgo la dinámica del bosque (Boada & Vallejo, 2010; Mourthé et al., 2019).

**Estado de Conservación.** De acuerdo con la lista roja de Especies Amenazadas de la UICN y con el Libro Rojo de Mamíferos del Ecuador, *Ateles belzebuth* se encuentra en peligro de extinción (Abrams, 2022; Boada & Vallejo, 2010; Mourthé et al., 2019; Tirira D. G. et al.,

2018), es considerado el primate más amenazado de la Amazonía ecuatoriana (Tirira D. G. et al., 2018). Sus principales amenazas vienen relacionadas con la actividad humana (Ceitlin, 2004), entre ellas la pérdida de hábitat por la deforestación (Ceitlin, 2004; Tirira D. G. et al., 2018) y por el avance de la agricultura y ganadería (Mourthé et al., 2019; Tirira D. G. et al., 2018). Además, por su gran tamaño, el mono araña se ve afectado por la caza para el consumo de “carne de monte” (Abrams, 2022; Mourthé et al., 2019; Tirira, 2021), y se considera que puede existir una amenaza relacionada con el comercio ilegal de mascotas (Mourthé et al., 2019).

### **Género *Saguinus***

El género *Saguinus* cuenta con 10 especies, siendo uno de los géneros más grandes de primates del Nuevo Mundo (Dantas & Barros, 1997). Existen estudios filogenéticos que sugieren dividir a *Saguinus* en dos géneros *Leontocebus* y *Saguinus* (Buckner et al., 2015; Rylands et al., 2016) e inclusive en tres: *Leontocebus*, *Saguinus* y *Tamarinus* (Morales et al., 2015).

De manera general, estos primates se distribuyen en bosques de América del Sur y Central (Rylands et al., 2016), desde Panamá hasta la alta cuenca del Amazonas en Brasil (Arciniegas, 2015; Dantas & Barros, 1997). *Saguinus* junto con *Callitrichidae*, son los géneros con los primates más pequeños del neotrópico (Buckner et al., 2015). Son individuos de hábitos diurnos, se desplazan en las ramas de los árboles de bosques densos en zonas cercanas a cuerpos de agua y son frugívoros e insectívoros (Arciniegas, 2015; Rylands et al., 2016).

En Ecuador, existen 3 especies *Leontocebus nigricollis*, *Leontocebus tripartitus* y *Leontocebus lagotus*, todas distribuidos en la región amazónica (Tirira D. G. et al., 2018).

### ***Leontocebus lagonotus***

Desde 2015, la especie conocida como *Saguinus fuscicollis* fue denominada *Leontocebus lagonotus*, tomando en cuenta análisis filogenéticos donde se sugería que los tamarines pequeños de hocico blanco deben formar parte del género *Leontocebus* (Tirira D. G. et al., 2018). Sin embargo, aún es necesario estudiar la evolución de los caracteres fenotípicos y la variación genética de estas poblaciones en el país para obtener propuestas taxonómicas adecuadas (Garbino & Martins-Junior, 2018; Tirira D. G. et al., 2018). A nivel regional se conoce a *Leontocebus lagonotus* como tamarín de dorso rojo (Mena et al., 2007; Vallejo & Boada, 2016).

Este grupo se distribuye en la región amazónica del país hasta el Perú (Tirira D. G. et al., 2018; Vallejo & Boada, 2016). Se ha identificado en el trópico y subtropical oriental, desde el sur del río Napo hasta el río Curaray (Tirira D. G. et al., 2018), cubriendo 32 643 km<sup>2</sup> (Vallejo & Boada, 2016). Estos primates habitan en bosques tropicales de tierras bajas, montañas bajas y en el bosque primario piemontano, prefiriendo bosques de tierra firme e inundados estacionalmente (Carrillo, 2010; Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018).

Los tamarinos de esta especie destacan por su pequeño tamaño (Tirira D. G. et al., 2018), con una longitud corporal de 20 cm y una cola de 40 cm (Downey, 2022; Vallejo & Boada, 2016). Su pelaje es de color negro o marrón con tonos rojizos en el cuello, hombros y extremidades, la espalda posee coloraciones amarillas y naranjas y la cabeza es de color negro con el hocico blanco (Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018).

Acostumbran vivir en grupos familiares de 2 a 12 individuos (Tirira D. G. et al., 2018). El período de gestación dura de entre 140 a 150 días y por lo general las hembras siempre tienen gemelos (Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018). Duermen en el dosel bajo del bosque en agujeros de los troncos y seleccionan áreas con diversos árboles frutales (Downey, 2022). Son

omnívoros, se alimentan de frutos pequeños y ciertos insectos, con menor frecuencia ingieren flores, néctar, resinas e incluso huevos y ranas (Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018).

**Rol ecológico.** Este primate, además de participar como dispersor de semillas y en la regeneración del ecosistema forestal por su inclinación dietética por las frutas (Tirira D. G. et al., 2018), también participa en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema donde habita, pues ayuda a controlar la población de insectos (Downey, 2022).

**Estado de Conservación.** Esta especie se encuentra en la categoría de Preocupación Menor de acuerdo con la UICN (Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018), y bajo los criterios del Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador este primate se encuentra Casi Amenazado (Tirira D. G. et al., 2018; Vallejo & Boada, 2016). Pese a ser una especie adaptable a la perturbación del hábitat, su población se ha reducido en un 15 % (Vallejo & Boada, 2016). Entre las principales amenazas para estos tamarinos están: el consumo de carne de monte (Downey, 2022) y tráfico ilícito como mascotas (Downey, 2022; Tirira D. G. et al., 2018).

### **Estrategias de Conservación**

La conservación de primates es un campo que requiere la implementación de acciones basadas en conocimiento científico y que aseguren el futuro de las poblaciones de primates no humanos junto con la preservación de sus hábitats (Wich & Marshall, 2016). Actualmente, las 22 especies de primates no humanos existentes en el Ecuador afrontan graves problemas (de la Torre & Morelos-Juárez, 2022). Lo cual ha desencadenado un reciente interés en temas de conservación (Wich & Marshall, 2016), provocando un aumento en el número de investigaciones relacionadas con el tema (Tirira, 2021; Tirira et al., 2018).

Si bien solo se habla de la extinción de una especie de primate (Wich & Marshall, 2016), estudios revelan que las amenazas hacia este grupo van en aumento, sobre todo, aquellas relacionadas con la perturbación y fragmentación del ecosistema (Wich & Marshall, 2016). Estas

amenazas crecientes complican los esfuerzos de los conservacionistas de primates (Wich & Marshall, 2016), para lo cual, han desarrollado diversas herramientas, entre ellas, el establecimiento de áreas protegidas, la aplicación de leyes, pagos por servicios ecosistémicos y la reintroducción de primates alojados en santuarios (Brando et al., 2020; Wich & Marshall, 2016).

### **Reintroducción**

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) define a la reintroducción como el movimiento intencional y la liberación de un organismo dentro de su área de distribución autóctona de la que ha desaparecido (Baker, 2002). Este proceso puede llevarse a cabo con diversos objetivos, ya sea para fines de bienestar, conservación o el reforzamiento de la población (Brando et al., 2020). La UICN recomienda direccionar los esfuerzos hacia un enfoque de conservación (Baker, 2002).

Pese a que estos procesos pueden aportar bienestar tanto para el individuo como para el hábitat natural y el entorno social (Brando et al., 2020), es importante tomar en cuenta la idoneidad individual, la interacción con las poblaciones existentes, la transmisión de enfermedades (Brando et al., 2020) y el área de distribución histórica de esa especie (Baker, 2002).

### **Filogeografía**

La filogeografía es una disciplina que hace uso de la filogenia y la biogeografía para comprender los cambios en patrones de flujo de genes, contacto entre poblaciones y la distribución de especies (Wang et al., 2018). Esta herramienta se ha incluido en temáticas de conservación como "Genética de la Conservación" con el fin de contribuir a la preservación de la diversidad de las especies (Machordom et al., 2003).

Estas herramientas tienen el potencial de direccionarse hacia especies en peligro de extinción para generar un programa de conservación específico con el fin de mantener la

variabilidad de las especies, esencial para su evolución y supervivencia (Machordom et al., 2003).

### **PCR Barcoding**

Una parte importante dentro de la biología de conservación está fundamentada en los principios evolutivos de los organismos (Hays & Fagan, 2016). Estos influyen en la diversidad genética y esto puede tener impactos en procesos comunitarios y ecosistémicos (Hays & Fagan, 2016). De esta forma, la genética de la conservación se enfoca en la preservación de especies mediante el uso de herramientas moleculares y métodos genéticos (Guo et al., 2022; Hays & Fagan, 2016).

El Barcoding consiste en una o varias secuencias de ADN, recuperadas de una porción estándar del genoma (Guo et al., 2022). La PCR barcoding permite la obtención de estas secuencias (Ståhlberg et al., 2016), las mismas que pueden compararse con bibliotecas de códigos de barras de ADN de taxonomía conocida para lograr asignar una muestra a su especie correspondiente (Guo et al., 2022; Wilson et al., 2019).

Parte importante de esta técnica son los marcadores moleculares, como los microsatélites y las secuencias de ADN (Hays & Fagan, 2016), puesto que han demostrado su utilidad en determinación de parentescos (Archie & Chiyo, 2012), en la identificación de orígenes geográficos (Goldberg, 1997) y en la determinación de especies (C. S. Baker & Palumbi, 1996).

El ADN mitocondrial exhibe secuencias con poca variabilidad intraespecífica y suficiente variación interespecífica para facilitar el establecimiento de grados de relación y tiempos de divergencia, haciendo que los loci del genoma mitocondrial funcionen como marcadores moleculares en estudios taxonómicos y filogenéticos (Tobe et al., 2010). El citocromo b y el bucle D son ejemplos de genes mitocondriales empleados con este objetivo.

**CytB**

El citocromo b (CytB) es un gen codificado a nivel mitocondrial que posee dominios conservadores y variables (Farias et al., 2001; Levin, 2001), características que lo han establecido como un marcador molecular de gran utilidad para estudios filogenéticos (Farias et al., 2001).

Este gen se ha empleado en diversos niveles taxonómicos entre especies de vertebrados (Farias et al., 2001; Levin, 2001), y se ha usado ampliamente en mamíferos (Castresana, 2001). CytB ha sido útil en el establecimiento de la filogenia y taxonomía de primates (Andrews et al., 1998; Castresana, 2001), e incluso para establecer relaciones filogenéticas entre especies del género *Ateles* (Collins & Dubach, 2000; Grant, 2023; Ruiz-García et al., 2016).

**D-Loop**

El bucle D mitocondrial o D-loop es un gen presente en la región no codificante de muchos genomas mitocondriales (Nicholls & Minczuk, 2014). Tiene una longitud promedio de 1100 nucleótidos (Scotto, 2006) y se ha establecido como una herramienta útil en estudios de taxonomía, filogenia, estructura genética e identidad biológica (Zhang et al., 2012), de mamíferos (Cardoso et al., 2011; Zhang et al., 2012), entre ellos los primates (Matauschek et al., 2011; Scotto, 2006).

### Capítulo III: Materiales y Métodos

#### Área de Estudio y Muestreo

Las muestras de heces se recolectaron por el proyecto Primates Ecuador. Se obtuvieron un total de seis muestras fecales pertenecientes a *A. belzebuth* y catorce de *L. lagonotus* de las zonas de Tena, Pastaza y Morona entre el 2011 y el 2021 (Tabla 2), las mismas que se almacenaron en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) en alcohol al 98% a -80 °C hasta su posterior análisis.

**Tabla 2**

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

<b>Muestra</b>	<b>Especie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Lugar</b>
FD-167	<i>Ateles belzebuth</i>	Macho	Adulto	Yanacocha
FD-172	<i>Ateles belzebuth</i>	Hembra	Subadulto	Puyo
FD-175	<i>Ateles belzebuth</i>	Macho	Juvenil	Puyo
FD-220	<i>Ateles belzebuth</i>	Macho	Subadulto	Puyo
PM-001	<i>Ateles belzebuth</i>	-	-	Ecuador
PM-006	<i>Ateles belzebuth</i>	-	-	Ecuador
FD-48	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Adulto	Macas
FD-49	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Adulto	Macas
FD-52	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Macas
FD-57	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Adulto	Macas
FD-123	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Subadulto	Merazonia
FD-128	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Merazonia
FD-154	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Merazonia
FD-163	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Puyo

<b>Muestra</b>	<b>Especie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Lugar</b>
FD-165	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Puyo
FD-166	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Adulto	Puyo
FD-174	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Puyo
FD-190	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Puyo
FD-192	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Hembra	Adulto	Merazonia
FD-225	<i>Leontocebus lagonotus</i>	Macho	Subadulto	Puyo

### **Preparación de las muestras**

Previo a la extracción de ADN se lavaron las muestras con el fin de eliminar desechos de mayor tamaño y homogenizarlas. Para ello se transfirieron las muestras (2 ml) a un tubo Falcon de 15 ml previamente etiquetados y se agregaron 6 ml de etanol al 100% (1:3 una parte de heces simples y tres partes de etanol). Los tubos se llevaron a centrifugar a 2300 x g por 3 minutos a temperatura ambiente.

Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de tampón PBS, llevando a centrifugar a 2300 x g por 5 minutos y eliminando el sobrenadante al finalizar. La muestra se debe diluir completamente previo a la centrifugación. Este lavado se realizó tres veces, procurando eliminar todo el sobrenadante en la última repetición con ayuda de una pipeta. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 600 µl de PVPP (polivinilpolipirridona) al 2% y se llevó a -20°C hasta su extracción.

### **Extracción de ADN**

Para la obtención del ADN genómico a partir de las muestras de heces se empleó el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN. Al protocolo del fabricante se añadieron pasos previos para eliminar el PVPP usado para conservar las muestras y todos los pasos de centrifugación se realizan a 14000 RPM.

Para el lavado se inició con la homogenización de la muestra por vortex durante 10 segundos. De esta se tomaron 600  $\mu$ l, los cuales se depositaron en un tubo de centrifuga de 1.5 ml, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó por 5 minutos. El sobrenadante, producto de este paso, se descartó y se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer PBS. Esto se homogenizó por vortex durante 10 segundos, se llevó a centrifugar por 5 minutos y para finalizar el lavado se descartó el sobrenadante.

En este punto se siguieron todas las instrucciones proporcionadas en el protocolo del kit. Al pellet se agregó 1 ml de buffer InhibitEX, se homogenizó por vortex por un minuto y se centrifugó la muestra durante 1 minuto. En un nuevo tubo de 1.5 ml se pipetearon 25  $\mu$ l de Proteinasa K y 600  $\mu$ l del sobrenadante del paso anterior. Luego se agregaron 600  $\mu$ l de buffer AL y se homogenizó por vortex durante 15 segundos. Este producto se incubó a 70°C por 10 minutos. Luego se añadieron 600  $\mu$ l de etanol (96-100%) y se mezcló por vortex.

Posteriormente se aplicaron 600  $\mu$ l del lisado a la columna de centrifugación QIAamp, se cerró la tapa y se llevó a centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y se colocó la columna de centrifugación en el tubo de recolección y se repitió la centrifugación hasta transferir el lisado por completo. La columna se pasó a un nuevo tubo de recolección, donde se añadieron 500  $\mu$ l de tampón AW1, se centrifugó por 1 minuto y se desechó el filtrado. En la columna se colocaron 500  $\mu$ l del tampón AW2, se llevó centrifugar durante 3 minutos y se desechó el filtrado. Se colocó la columna en el tubo de recolección y se centrifugó durante 3 minutos.

Finalmente se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo y etiquetado, donde se pipetearon 200  $\mu$ l de tampón ATE y se llevó a incubar 1 minuto a temperatura ambiente para luego centrifugar durante 1 minuto. Estas muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Las muestras FD-167, FD-172, FD-175, PM-001 y PM-006 de *A. belzebuth*, se procesaron con el kit de extracción de ADN de suelos E.Z.N.A.® Soil DNA Kit, a fin de comparar la utilidad de los kits en la extracción de ADN a partir de muestras de heces. En este caso, una vez realizado el lavado se traspasó el pellet a un tubo disruptor junto con 725 µl de tampón SLX-Mlus, se agitaron a velocidad máxima durante 5 minutos y se llevó a centrifugar a 500 x g durante 5 segundos. Luego se agregaron 72 µl de tampón DS, se mezcló con vortex y se llevó a incubar a 70°C durante 10 minutos, agitando brevemente el tubo una vez durante la incubación. Estas muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, para luego transferir 400 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, en este se añadieron 135 µl de tampón P2 enfriado, se mezcló con vortex y se dejó reposar en hielo durante 3 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de reactivo cHTR, se mezcló bien con vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 minutos. Se llevó a centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se agregó un volumen igual de XP1 Buffer, se mezcló con vortex y se puso una minicolumna de ADN HiBind® en un tubo de recolección de 2 ml, en el cual se transfirieron 700 µl de muestra. Se llevó a centrifugar a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente, se desechó el filtrado y en el mismo tubo de recolección se repitió este paso hasta que todo el lisado haya pasado a través de la minicolumna.

Luego se añadieron 500 µl de tampón HBC diluido con isopropanol al 100 %. Se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto, se desechó el filtrado y el tubo de recolección. La minicolumna se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se colocaron 700 µl de tampón de lavado de ADN diluido con etanol al 100 %. Se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto, se desechó el filtrado y en el tubo de recolección se repitió este paso de lavado del

tampón de lavado de ADN. Se llevó a centrifugar la minicolumna HiBind® DNA vacía a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente y se transfirió la minicolumna de ADN HiBind® a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml. Se agregaron 50 µl de tampón de elución calentado a 70 °C directamente en el centro de la matriz HiBind®, dejando reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto, el filtrado se colocó en el centro de la misma minicolumna de ADN HiBind®, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto y finalmente se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. El ADN eluido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Los rendimientos de extracción de ambos protocolos se analizaron mediante cuantificación de ADN con los resultados de concentración de ADN (µg/ml) obtenidos con el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh, y mediante la determinación de la intensidad de banda de los amplicones resultantes de la PCR con el marcador CytB, usando el software Image Lab de Bio.Rad.

### **PCR Barcoding con el Marcador CytB**

Se realizó una búsqueda en la página del GeneBank de secuencias del marcador CytB para el género *Ateles* en regiones cercanas a Ecuador. Con estas secuencias se crearon los primers CytB forward (5´- CGCAAACACACCCACTAGC- 3´) y CytB reverse (5´-TATGGGGTGGGGTGTGAGA), los cuales se enviaron a sintetizar en MacroGen Korea. Se tomaron en cuenta parámetros teóricos para establecer las condiciones y concentraciones iniciales de la PCR, como se muestra en las tablas 3 y 4, respectivamente.

**Tabla 3***Condiciones de la PCR con CytTB.*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	35
Hibridación	60 °C	1 minuto	35
Extensión	72 °C	1 minuto	35
Extensión final	72 °C	7 minutos	1
Mantenimiento	4 °C	-	-

**Tabla 4***Concentraciones de reactivos para la mastermix de la PCR con CytB.*

<b>TAQ PLATINUM INVITROGEN</b>				
<b>Reactivos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen (µl)</b>
H <sub>2</sub> O	µl	-	-	17.05
Buffer	X	10.00	1.00	2.50
CytB F	µM	10.00	0.50	1.25
CytB R	µM	10.00	0.50	1.25
Cl <sub>2</sub> Mg	mM	50.00	2.50	1.25
dNTP	mM	10.00	0.20	0.50
Taq	U/ µl	5.00	1.00	0.20
ADN	Ngr/ µl	-	-	1

25.00

Con estos parámetros se realizó la primera PCR y partiendo de esta se modificaron las variables descritas en la tabla 5, hasta optimizar la PCR con el marcador CytB.

**Tabla 5**

*Variables a evaluar para la optimización de la PCR con CytB.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valores</b>
Concentración de ADN	10 ng/μl
	25 ng/μl
	50 ng/μl
	100 ng/μl
Temperatura de hibridación	56 °C
	58 °C
	60 °C
	62 °C
	64 °C
Concentración de Cl <sub>2</sub> Mg	1.5 mM
	2.0 mM
	2.5 mM
	3.0 mM
	3.5 mM
Concentración de Taq	0.25 U/μl
	0.5 U/μl
	1 U/μl

Parámetro	Valores
Concentración de primers	0.25 $\mu$ M
	0.5 $\mu$ M
	1 $\mu$ M
Tiempo de desnaturalización	30 segundos
	60 segundos
Tiempo de hibridación	30 segundos
	60 segundos

Las amplificaciones resultantes se cargaron en geles de agarosa al 1.5% y se observaron en un fotodocumentador y transiluminador UV, para evaluar los resultados. Una vez optimizada la PCR, se corrieron todas las muestras correspondientes a *Ateles* con los nuevos parámetros y los productos que se obtuvieron en este paso se enviaron a secuenciar para su posterior análisis.

### PCR Barcoding con el Marcador D-Loop

Para la PCR con el marcador D-Loop se utilizaron los primers universales H16340 (5' – CCTGARGTAGGAACCARATG - 3') y L15926 (5' -SAATTACCCCGGYCTTGTA ACC - 3') y se establecieron las condiciones (Tabla 6) y concentraciones de reactivos (Tabla 7) en base a la información proporcionada en el trabajo de Acuña (2020).

**Tabla 6***Condiciones de la PCR con D-Loop.*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	35
Hibridación	55 °C	1 minuto	35
Extensión	72 °C	1 minuto	35
Extensión final	72 °C	7 minutos	1
Mantenimiento	4 °C	-	-

*Nota.* Se modificó el tiempo de extensión en base al tamaño teórico del fragmento a amplificar.

**Tabla 7***Concentraciones de reactivos para la mastermix de la PCR con D-Loop.*

<b>TAQ PLATINUM INVITROGEN</b>				
<b>Reactivos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen (µl)</b>
H <sub>2</sub> O	µl	-	-	17.55
Buffer	X	10.00	1.00	2.50
H16340	µM	10.00	0.50	1.25
L15926	µM	10.00	0.50	1.25
Cl <sub>2</sub> Mg	mM	50.00	1.50	0.75
dNTP	mM	10.00	0.20	0.50
Taq	U/ µl	5.00	1.00	0.20

Reactivos	Unidades	Stock	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l)
ADN	Ngr/ $\mu$ l	-	-	1
				25.00

Con estos parámetros se realizó la primera PCR y se evaluó la posibilidad de optimizar los parámetros presentados en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Variables a evaluar para la optimización de la PCR con D-Loop.*

Parámetro	Valores
Concentración de ADN	6.25 ng/ $\mu$ l
	12.5 ng/ $\mu$ l
	25 ng/ $\mu$ l
	50 ng/ $\mu$ l
	100 ng/ $\mu$ l
Concentración de Taq	0.25 U/ $\mu$ l
	0.5 U/ $\mu$ l
	1 U/ $\mu$ l
Concentración de primers	0.25 $\mu$ M
	0.5 $\mu$ M
	1 $\mu$ M
Tiempo de desnaturalización	30 segundos
	60 segundos
Concentración de primers	30 segundos
	60 segundos

<b>Parámetro</b>	<b>Valores</b>
Tiempo de elongación	45 segundos
	60 segundos

Los productos de PCR se evaluaron, de igual manera, en geles de agarosa al 1.5% y en un fotodocumentador y transiluminador UV. Se corrieron todas las muestras correspondientes a *Ateles* y *Leontocebus* con los nuevos parámetros y los productos obtenidos se enviaron a secuenciar para su posterior análisis.

### **Análisis estadístico**

Para comparar la eficacia de los kits, se evaluaron los rendimientos de extracción de ADN y la intensidad de banda de los amplicones de los productos de la PCR mediante un gráfico de barras y un test de Duncan con intervalos de confianza de 95% y un valor  $p \leq 0,05$ . Para ello, primero se comprobaron los supuestos de normalidad con el diagrama Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilk y el supuesto de homocedasticidad con la prueba de Levene y un gráfico de dispersión. Todo esto se llevó a cabo con ayuda del software Infostat. Por otro lado, se realizó un análisis de correlación en Excel para establecer la asociación entre los resultados de la optimización de ambos marcadores.

### **Filogeografía**

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y limpiaron utilizando el programa MacVector y se ingresaron en la plataforma de base datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) para obtener la especie y el porcentaje de identidad. Esta plataforma también se empleó para buscar las secuencias de referencia y los grupos externos para ambas especies. Para llevar a cabo el estudio de la filogeografía se hizo uso del software Mega 11, se obtuvieron datos de las distancias evolutivas y se construyeron los árboles de máxima verosimilitud (ML) y de máxima parsimonia (MP), usando 1000 bootstraps. Los modelos

empleados para los árboles ML fueron: Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) para las muestras de *Ateles* con CytB y el modelo Taruma de 3 parámetros (T92+G) para los árboles restantes.

## Capítulo IV: Resultados

### Extracción de ADN

Producto de la extracción con el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN se obtuvieron los valores de la Tabla 9. En este caso, las muestras con mayor concentración de ADN fueron FD-163, FD-225, FD-128, FD-52 y FD-123. Además, gran parte de las muestras contaban con la cantidad necesaria de ADN requerido para llevar a cabo la PCR, a excepción de las muestras FD-165, FD-166 y FD-167, las cuales se encontraban por debajo de los 12.5 ng/μl, necesarios para la PCR con D-Loop.

En relación a los ratios de pureza, las muestras PM-001, FD-163 y FD-165 presentaron purezas aceptables, FD-175 y PM006 podrían presentar contaminación con compuestos aromáticos y en su mayoría los ratios refieren una contaminación con proteínas.

**Tabla 9**

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

Muestra	Pureza (A260/A280)	Concentración ADN (ng/μl)
FD-167	2.817	10.61
FD-172	2.704	19.59
FD-175	1.566	24.29
FD-220	2.82	24.18
PM-001	2.057	18.47
PM-006	1.52	19.08
FD-48	2.375	19.39
FD-49	2.533	15.51

<b>Muestra</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>	<b>Concentración ADN (ng/μl)</b>
FD-52	2.481	26.84
FD-57	2.585	17.14
FD-123	2.184	25.41
FD-128	2.231	27.55
FD-154	2.817	23.57
FD-163	2.042	34.39
FD-165	1.787	8.571
FD-166	2.208	11.94
FD-174	2.245	21.53
FD-190	2.128	20.41
FD-192	2.155	12.76
FD-225	2.19	30.41

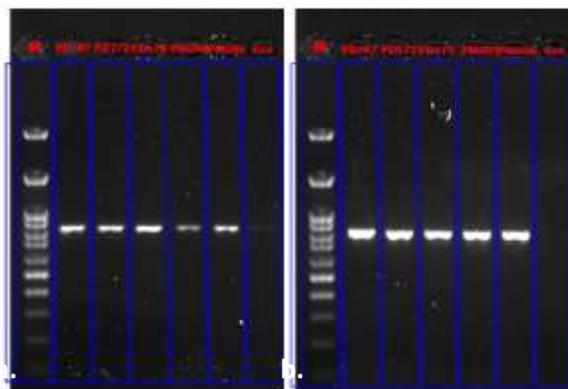
### **Comparación de los kits de extracción de ADN**

Como resultado de la extracción de ADN con los kits de QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y E.Z.N.A.® Soil DNA, junto con el análisis de los amplicones obtenidos de la PCR con CytB de las muestras (Figura 1), se obtuvieron los datos presentados en la Tabla 10. En la Figura 1, se observa bandas con buena intensidad en todos los amplicones.

Previo a la elaboración de las pruebas estadísticas, dentro del grupo de concentraciones de ADN del kit E.Z.N.A., se identificó la presencia de dos datos atípicos (9.49 y 1.837 correspondientes a las muestras PM-001 y PM-006, respectivamente), los mismos que fueron reemplazados por un promedio de los valores restantes, 37.48, a fin de evitar interferencias en los resultados posteriores.

### Figura 1

*Amplicones resultantes de la PCR con el marcador CytB de muestras de ADN de A. belzebuth extraídas con diferentes kits.*



*Nota.* Amplicones de las muestras extraídas con a. kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y b. E.Z.N.A.® Soil DNA Kit.

### Tabla 10

*Valores de concentración de ADN e 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.*

Kit de extracción	Muestra	Concentración ADN (ng/μl)	Intensidad de banda (%)
Kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN	FD-167	10.61	75.43
	FD-172	19.59	77.01
	FD-175	24.29	81.99
	PM-001	24.18	71.38
	PM-006	18.47	73.86
E.Z.N.A.® Soil DNA Kit	FD-167	19.08	90.30
	FD-172	58.78	91.70

Muestra	Concentración ADN (ng/μl)	Intensidad de banda (%)
FD-175	34.59	86.08
PM-001	9.49*	88.30
PM-006	1.837*	89.91

Nota: \* Valores atípicos

La concentración de ADN y la intensidad de banda mostraron un comportamiento normal (Tabla 11). Mediante el diagrama Q-Q plot (Figura 2) se pudo evidenciar esta normalidad en los datos, tanto en el caso de concentración de ADN como para intensidad de banda.

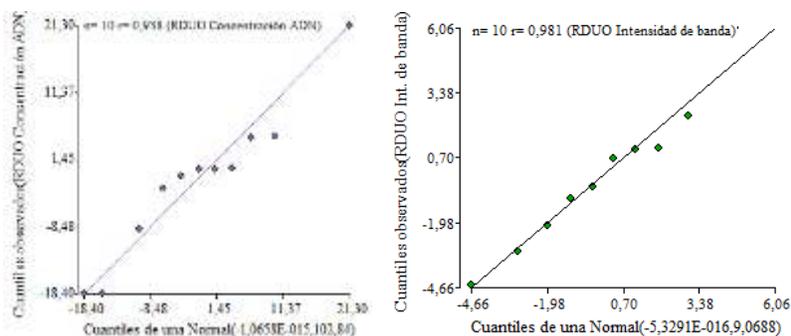
**Tabla 11**

*Prueba de Shapiro-Wilks para el supuesto de normalidad.*

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO Concentración	10	0.00	10.14	0.94	0.6966
RDUO Intensidad de banda	10	0.00	3.01	0.97	0.9400

**Figura 2**

*Diagrama Q-Q plot de los residuos de los valores de concentración de ADN e intensidad de banda.*



Se corroboró el supuesto de homogeneidad de varianzas tanto para la concentración de ADN como para los datos de intensidad de banda (Tabla 12). Además, se confirmó la homocedasticidad de los dos grupos de manera gráfica (Figura 3).

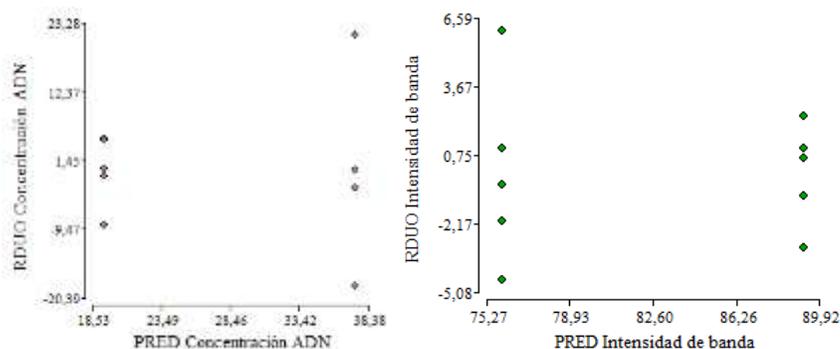
**Tabla 12**

*Prueba de Levene para el supuesto de homogeneidad de varianzas.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo Conc.	53.10	1	53.10	0.87	0.3773
Modelo Int.	3.59	1	3.59	1.05	0.3345

**Figura 3**

*Diagrama de dispersión usando los PRED y RDUO de las concentraciones de ADN e intensidades de banda.*



Una vez comprobados todos los supuestos, se encontró que las medias correspondientes a cada kit son significativamente diferentes ( $p=0.0291$ ) (Tabla 13) y los datos correspondientes al kit E.Z.N.A proporcionan mejores resultados (Tabla 14). En cuanto a los valores de intensidad de banda, se mostraron diferencias significativas entre los dos kits empleados ( $p=0.0002$ ) (Tabla 13). Y se identificó una media superior para el kit de E.Z.N.A. (Tabla 15).

**Tabla 13***Análisis de la varianza (SC tipo III).*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo Concentración	814.87	1	814.87	7.04	0.0291
Modelo Intensidad	443.82	1	443.82	43.50	0.0002

**Tabla 14***Test de Duncan usando la Concentración de ADN.*

<b>Kit</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
QIAGEN	19.43	5	4.81	A
E.Z.N.A.	37.48	5	4.81	B

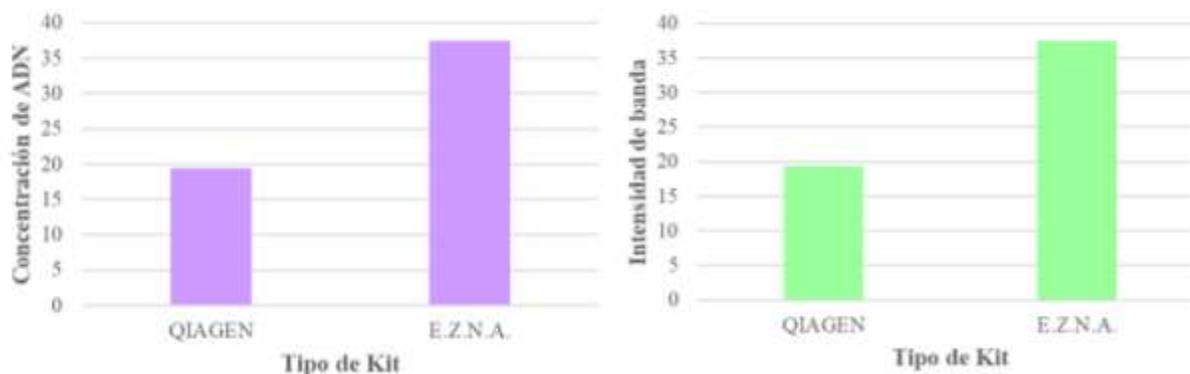
**Tabla 15***Test de Duncan usando la Intensidad de banda.*

<b>Kit</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
QIAGEN	75.93	5	1.43	A
E.Z.N.A.	89.26	5	1.43	B

Estas diferencias en relación a las medias también se evidencian en la Figura 4. Para la concentración de ADN el kit E.Z.N.A. proporcionó una media de 37.48, sobre un valor de 19.43 para el kit de QIAGEN. Y en el caso de intensidad de banda fue del 75.93% para el kit QIAGEN y de 89.26 para el de E.Z.N.A.

**Figura 4**

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

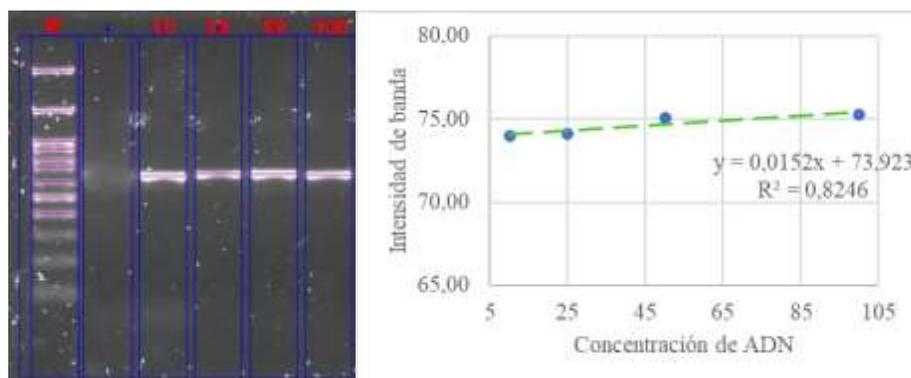


### **Optimización de PCR con CytB**

Como parte del proceso de optimización, primero se estableció la concentración de ADN a emplear en todas las pruebas. En este caso, en la Figura 5 se identificó una correlación positiva entre la concentración de ADN ( $R^2=0.8246$ ) y la intensidad de banda generada, sin embargo, el aumento de intensidad es mínimo dentro de este intervalo y a nivel visual las concentraciones evaluadas no mostraron diferencias en los amplicones, por lo tanto, se eligió la menor de ellas, correspondiente a 10 ng/ $\mu$ l (tercer carril).

### Figura 5

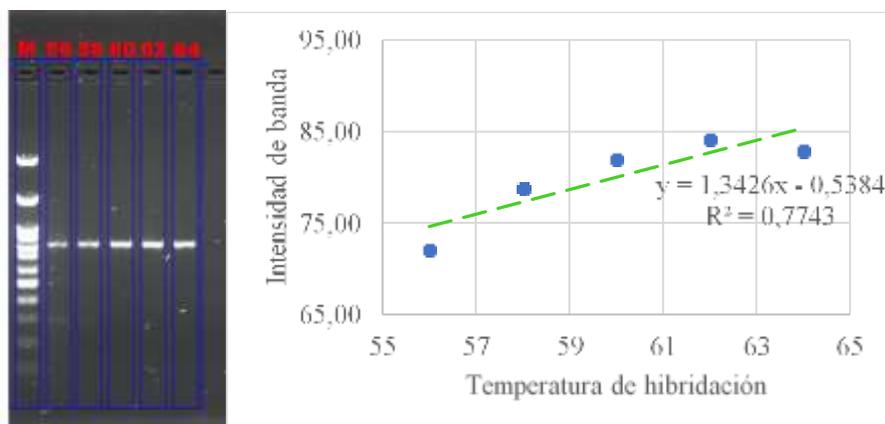
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de ADN.*



Luego se procedió con la variación de la temperatura de hibridación Figura 6. Se identificó una correlación positiva ( $R^2=0.7743$ ). Las temperaturas correspondientes a 56 °C y 58 °C (segundo y tercer carril) provocaron bandas inespecíficas, siendo 62 °C (quinto carril) la temperatura que dio mejores resultados.

### Figura 6

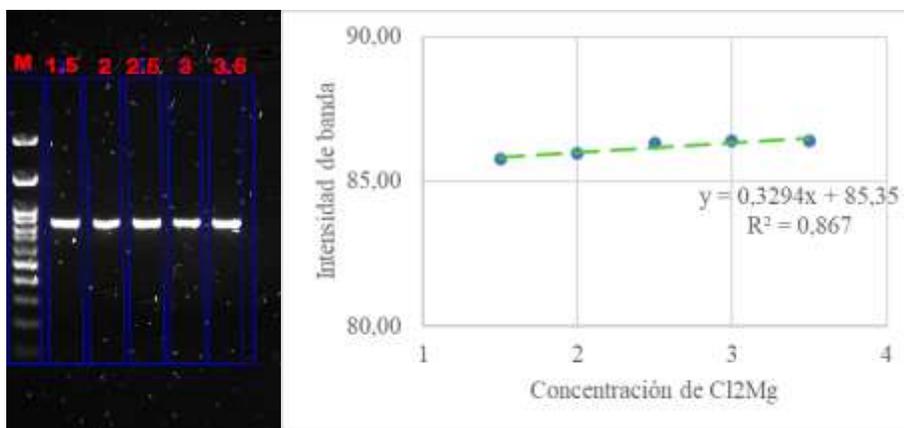
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes temperaturas de hibridación.*



Los amplicones resultantes de la prueba de concentración de  $Cl_2Mg$  (Figura 7) fueron en su mayoría similares y esto se corroboró con el análisis de correlación con una pendiente de 0.32. De manera que se seleccionó la concentración correspondiente a 2.0 mM (tercer carril) para el protocolo final.

### Figura 7

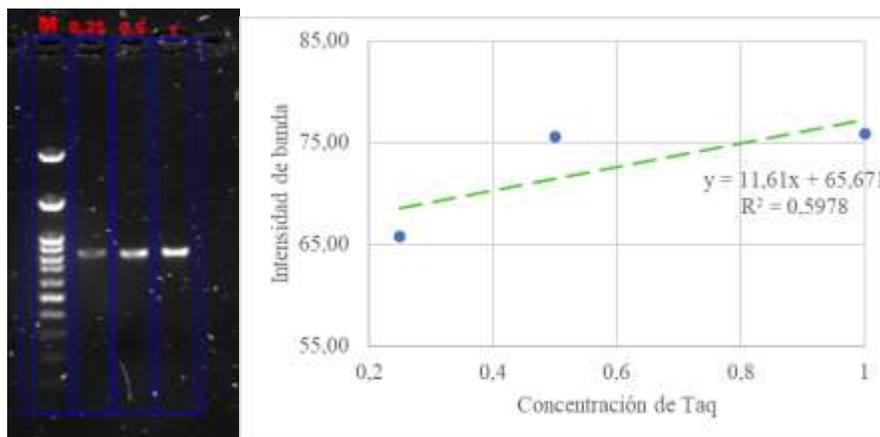
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de  $Cl_2Mg$ .*



En la concentración de Taq se eligió el amplicón resultado de 0.5 U/ $\mu$ l de Taq (tercer carril), debido a que la banda presentó mayor visibilidad respecto a la de menor concentración e igual a la de mayor concentración, además, pese a existir una correlación positiva, la pendiente no aumenta de manera significativa (Figura 8).

### Figura 8

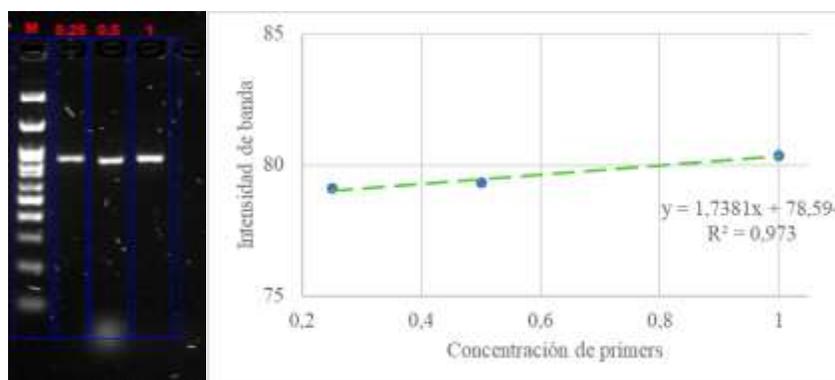
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de Taq.*



En cuanto a la concentración de primers (Figura 9), en todos los casos las bandas fueron similares y no hubo gran variación en los valores de intensidad de banda, por lo tanto, se seleccionó el valor de 0.25  $\mu$ M (segundo carril).

### Figura 9

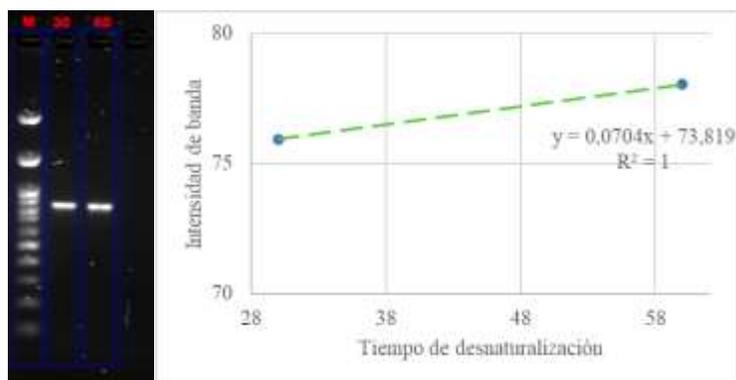
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes concentraciones de primers.*



Se probaron tiempos de desnaturalización (Figura 10) e hibridación (Figura 11). Solo en el caso de la hibridación se evidenció una mayor intensidad de banda, por tanto, se estableció 60 segundos de desnaturalización y 30 segundos en la fase de hibridación.

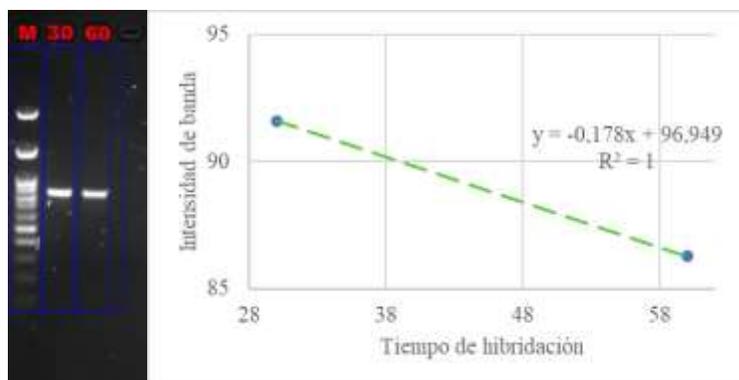
**Figura 10**

*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes tiempos de desnaturalización.*



**Figura 11**

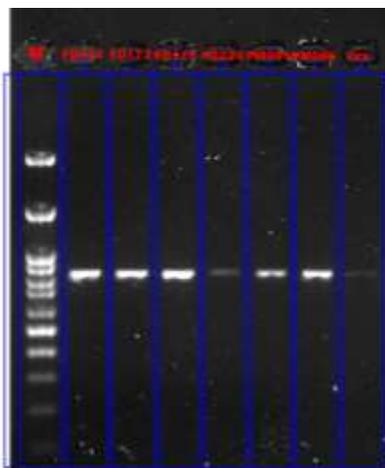
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador CytB bajo diferentes tiempos de hibridación.*



Una vez optimizada la PCR con el marcador CytB, se corrieron todas las muestras pertenecientes a *A. belzebuth* bajo las nuevas condiciones, obteniendo como resultado las bandas de la Figura 12. En este caso, en su mayoría las bandas mostraron gran intensidad, a excepción de la muestra FD-220 (quinto carril), cuya banda fue poco perceptible.

### Figura 12

*Amplicones correspondientes a muestras de A. belzebuth procesadas bajo las condiciones optimizadas de la PCR con el marcador CytB.*

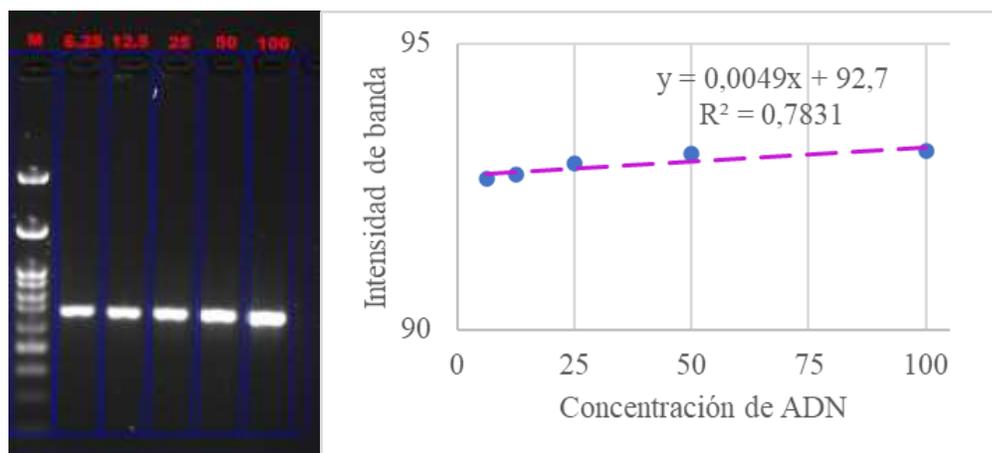


### Optimización de PCR con D-Loop

Se inició con la determinación de la cantidad de ADN a utilizar. Se obtuvieron bandas de gran intensidad en todas las concentraciones (Figura 13) en concordancia con la pendiente generada en el análisis de correlación, por lo tanto, se eligió trabajar con 12.5 ng/μl (tercer carril).

**Figura 13**

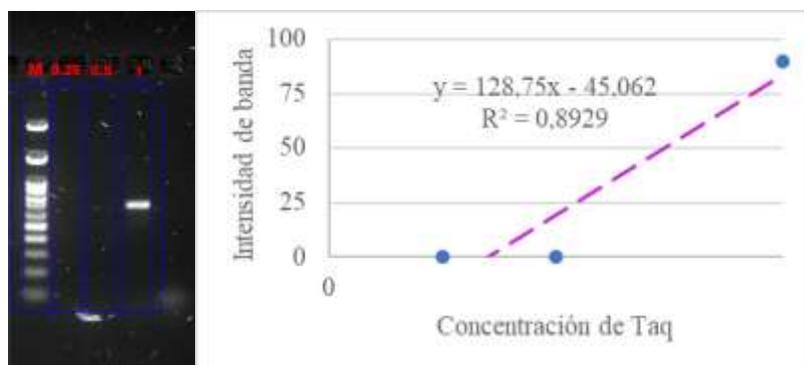
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de ADN.*



En el caso de la concentración de Taq (Figura 14), se observó una correlación positiva y a concentraciones inferiores a 1 U/μl no existía banda, por consiguiente, se mantuvo la concentración anteriormente establecida.

**Figura 14**

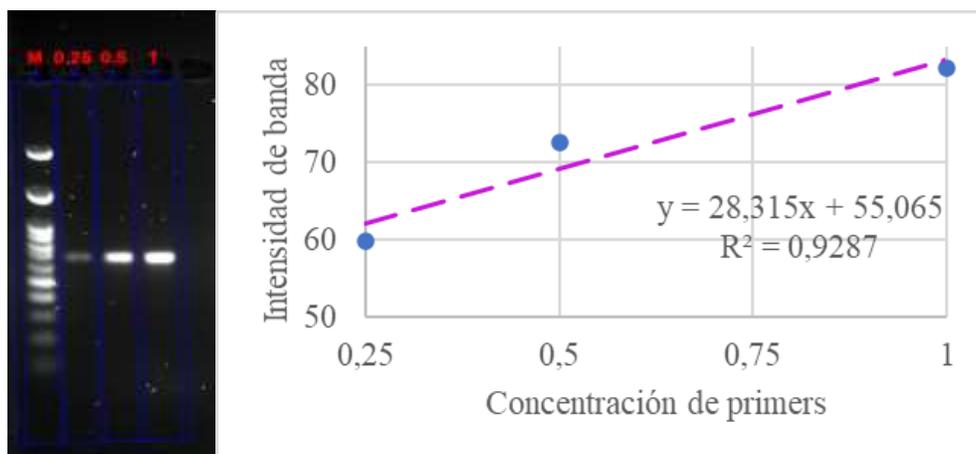
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de Taq.*



De manera similar, los primers se mantuvieron a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 15), puesto que, se identificó una correlación positiva. Al disminuir la concentración, las bandas también mostraron menor intensidad en comparación con la original (cuarto carril).

### Figura 15

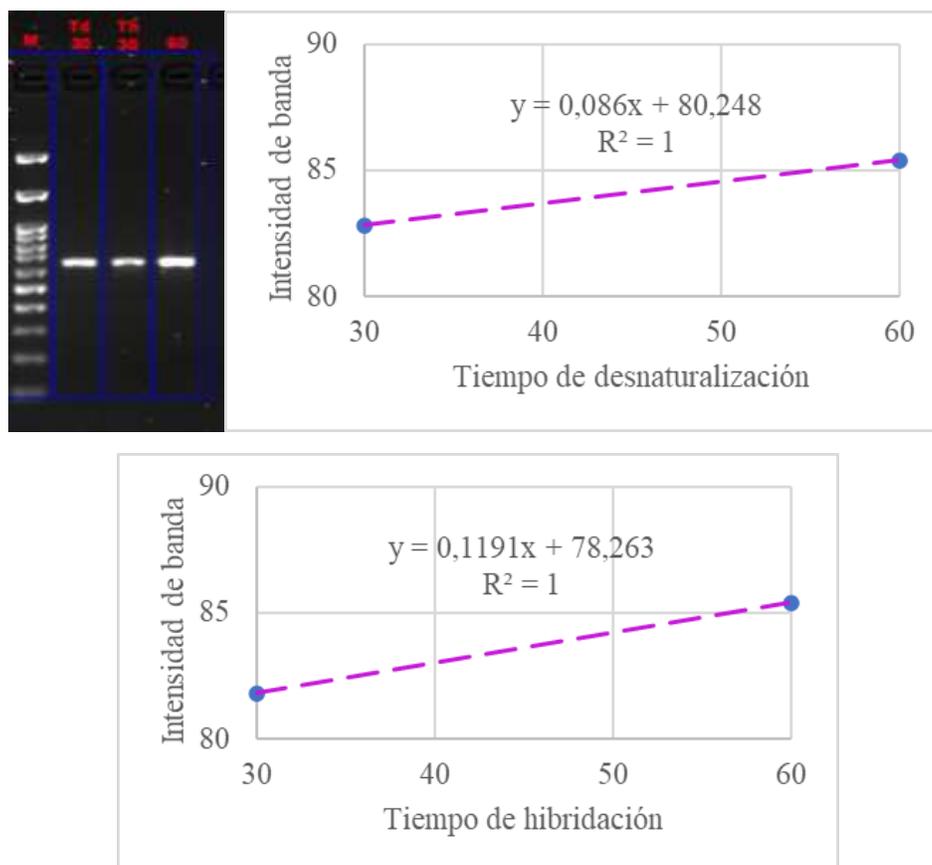
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes concentraciones de primers.*



Luego se evaluaron cambios en los tiempos de desnaturalización e hibridación (Figura 16), donde se observó bandas de menor intensidad en comparación con los tiempos originales, por lo tanto, se mantuvieron las condiciones establecidas previamente.

## Figura 16

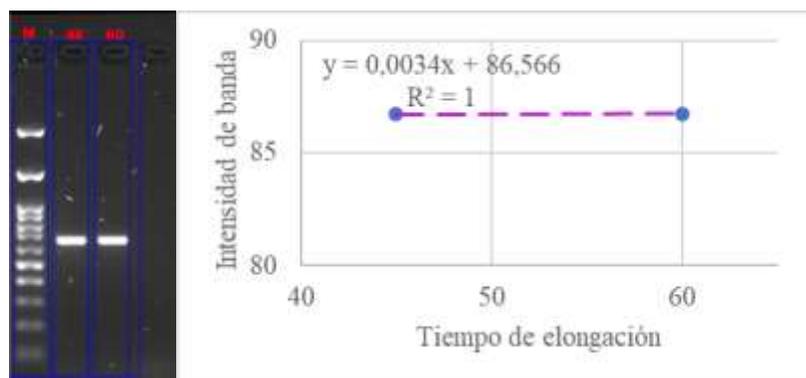
*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes tiempos de desnaturalización e hibridación.*



Además, se varió el tiempo de elongación tomando en cuenta el tamaño de fragmento a amplificar. Como resultado se obtuvo que un tiempo de 45 segundos de elongación provocaba una banda de igual intensidad que a 60 segundos, y se corroboró con una pendiente pequeña (Figura 17), por lo tanto, se estableció este nuevo tiempo para posteriores ensayos.

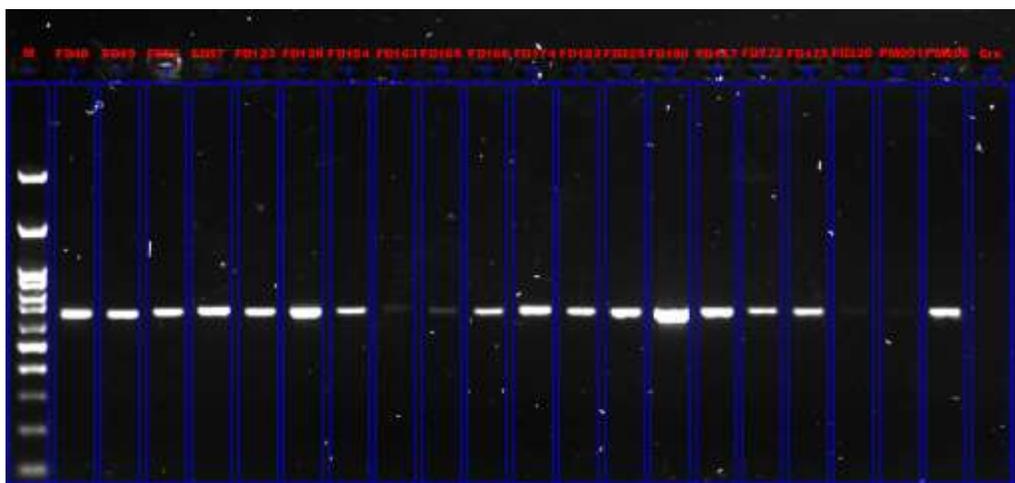
**Figura 17**

*Amplicones y análisis de correlación obtenidos de la PCR con el marcador D-Loop bajo diferentes tiempos de elongación.*



Con las nuevas condiciones establecidas se procesaron todas las muestras, tanto de *A. belzebuth* como de *L. lagonotus*, y se evaluaron mediante un gel de agarosa, cuyo resultado se puede observar en la Figura 8. En general, la intensidad de las bandas fue buena, menos en el caso de las muestras FD-163, FD-165, FD-220 y PM001, las mismas que se mostraron más tenues.

**Figura 18** *Amplicones correspondientes a muestras de A. belzebuth y L. lagonotus procesadas bajo las condiciones optimizadas de la PCR con el marcador D-Loop.*



## Filogeografía

En Blast del NCBI se ingresaron las secuencias de las muestras analizadas, con lo cual se obtuvieron las especies a las que corresponden los individuos junto con el porcentaje de identidad, esta información se recopiló en la Tabla 16.

Dentro del grupo de *Leontocebus*, en su mayoría pertenecían a la especie *L. lagonotus*, a excepción de FD-48 y FD-49 que se identificaron como *Leontocebus leucogenys*, tres muestras no coincidieron con la especie esperada, este fue el caso de FD-57 que se identificó como *Cebus unicolor*, FD-163 y FD-174 que resultaron ser de *Lagothrix poeppigii*. Además, en un análisis con *Lagothrix* se encontró una muestra correspondiente a *Leontocebus lagonotus*, la misma que se incluyó para análisis posteriores.

**Tabla 16**

*Especies identificadas con la herramienta Blast, con su correspondiente porcentaje de identidad.*

Muestra	Especie esperada	Especie identificada	% Identidad
FD-167	<i>Ateles belzebuth</i>	KJ452772.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.73
FD-172	<i>Ateles belzebuth</i>	KJ452772.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.87
FD-175	<i>Ateles belzebuth</i>	KJ452772.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.21
<b>CytB</b> FD-220	<i>Ateles belzebuth</i>	NC_019800.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.87
PM-001	<i>Ateles belzebuth</i>	KJ452772.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.21
PM-006	<i>Ateles belzebuth</i>	KJ452772.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.48
FD-48	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367945: <i>Leontocebus leucogenys</i>	97.98

<b>D- Loop</b>	<b>Muestra</b>	<b>Especie esperada</b>	<b>Especie identificada</b>	<b>% Identidad</b>
	FD-49	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367945: <i>Leontocebus leucogenys</i>	98.98
	FD-52	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.37
	FD-57	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OM328964.1: <i>Cebus unicolor</i>	94.05
	FD-123	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	97.96
	FD-128	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	97.96
	FD-154	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.19
	FD-163	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OR689238.1: <i>Lagothrix poeppigii</i>	95.83
	FD-165	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.19
	FD-166	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.37
	FD-174	<i>Leontocebus lagonotus</i>	OR689238.1: <i>Lagothrix poeppigii</i>	95.78
	FD-190	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367940.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.78
	FD-192	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367926.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.19
	FD-225	<i>Leontocebus lagonotus</i>	HM367952.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.58
	FD-167	<i>Ateles belzebuth</i>	KC757386.1: <i>Ateles belzebuth</i>	95.08
	FD-172	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328866.1: <i>Ateles belzebuth</i>	95.81
	FD-175	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>	96.38
	FD-220	<i>Ateles belzebuth</i>	NC_019800.1: <i>Ateles belzebuth</i>	99.66
	PM-001	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>	93.77

Muestra	Especie esperada	Especie identificada	% Identidad
PM-006	<i>Ateles belzebuth</i>	OM328920.1: <i>Ateles belzebuth</i>	95.92
FD-173	<i>Lagothrix lagotricha</i>	HM367952.1: <i>Leontocebus lagonotus</i>	98.39

Para los individuos de *Ateles* analizados con CytB se encontraron 16 secuencias de referencia de zonas cercanas al país y se trabajó con un grupo externo correspondiente *Lagothrix lagotricha* de Perú. Los árboles resultantes se compararon junto con las distancias evolutivas (Tabla 17), y se dio un agrupamiento similar, por lo tanto, los resultados se pueden evidenciar en cualquiera de los árboles obtenidos. En el árbol ML (Figura 19), las muestras obtenidas de los diferentes refugios se encuentran agrupadas en un mismo clado junto con una secuencia de referencia proveniente de Ecuador, siendo la muestra FD-220 la más lejana del grupo y asociada con una secuencia de Suramérica. En la parte inferior del árbol se corrobora la diferenciación por zonas y especies.

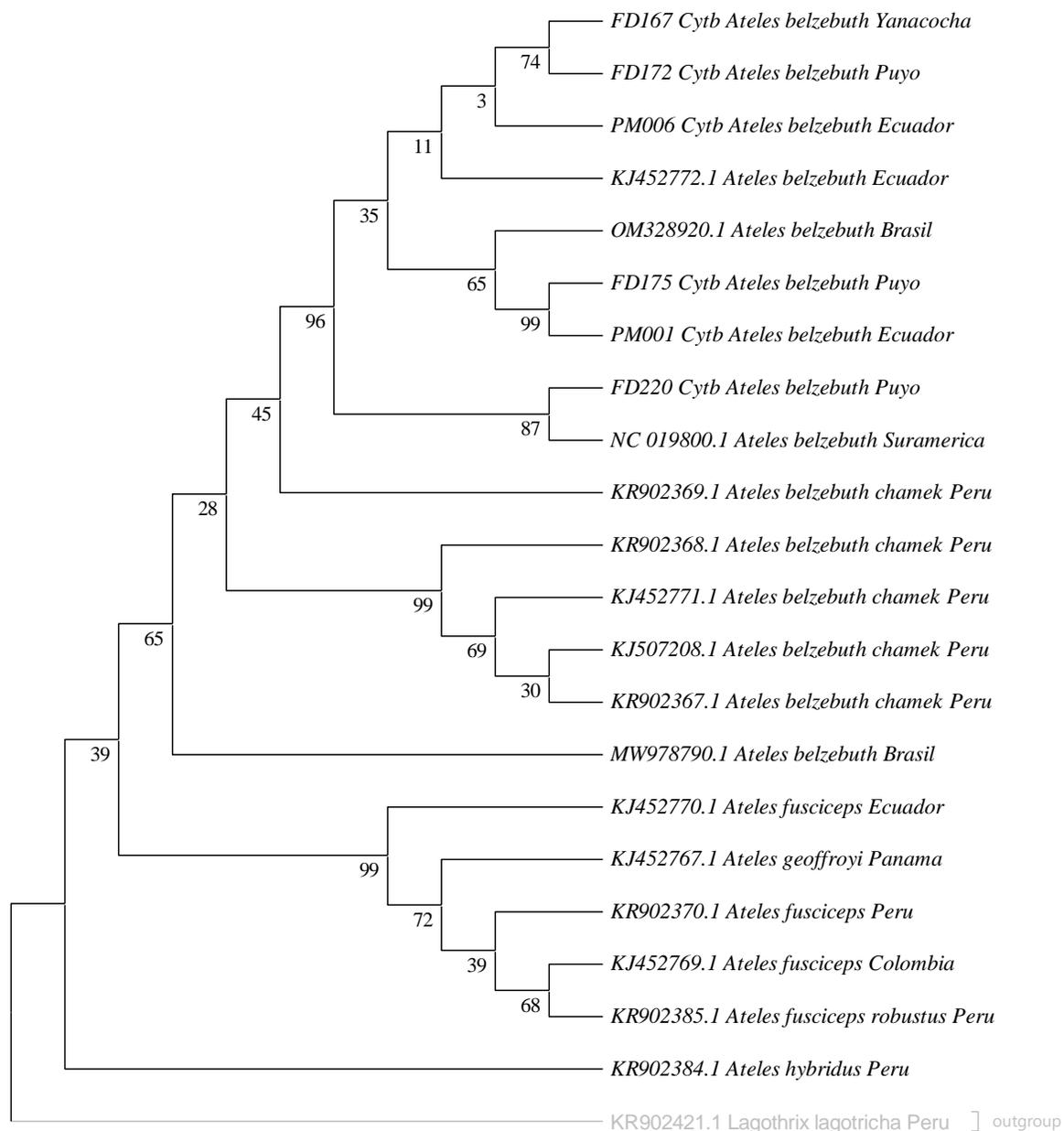
**Tabla 17**

*Distancias evolutivas entre las muestras de a Ateles analizadas con CytB.*

	P006	Outgroup	P001	FD220	FD175	FD172	FD167
<b>P006</b>							
<b>Outgroup</b>	0.13094						
<b>P001</b>	0.01612	0.13784					
<b>FD220</b>	0.00933	0.12927	0.01475				
<b>FD175</b>	0.01338	0.13596	0.00265	0.01203			
<b>FD172</b>	0.00665	0.13259	0.01204	0.00531	0.00934		
<b>FD167</b>	0.01207	0.13989	0.01754	0.01072	0.01479	0.00533	

**Figura 19**

Árbol obtenido con el método de ML y el modelo Hasegawa-Kishino-Yano, para muestras de *Ateles* con el marcador *CytB*.



Para las muestras de *Ateles* analizadas con D-Loop, se encontraron 15 secuencias de referencia y el grupo externo fue *Lagothrix lagotricha* de Brasil. El árbol ML (Figura 20) generó resultados similares al árbol MP y ambos en concordancia con los datos de las distancias evolutivas (Tabla 18).

**Tabla 18**

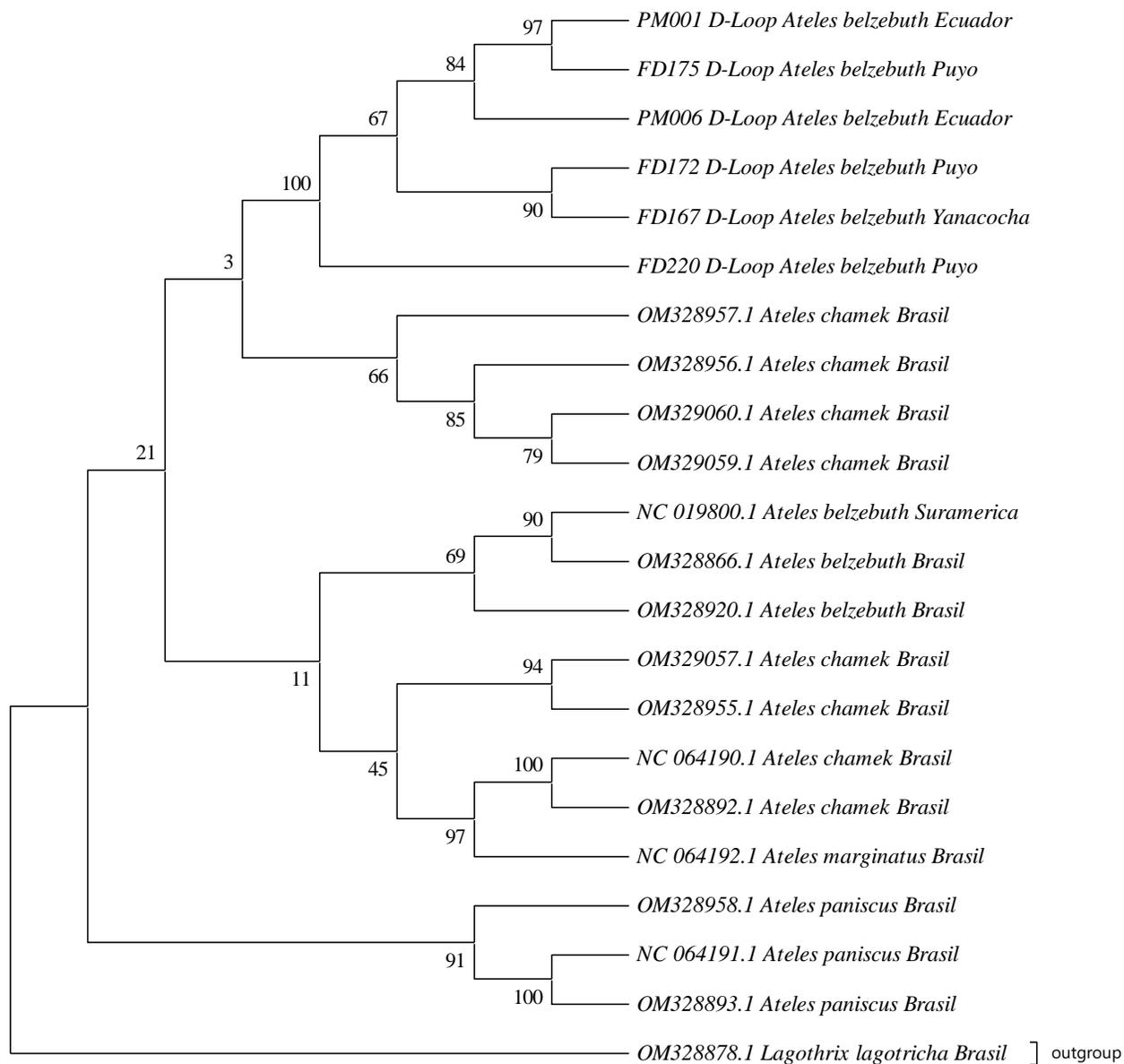
*Distancias evolutivas entre las muestras de Ateles analizadas con D-Loop.*

	Outgroup	PM006	PM001	FD220	FD175	FD172	FD167
<b>Outgroup</b>							
<b>PM006</b>	10.33987						
<b>PM001</b>	10.62508	0.04956					
<b>FD220</b>	10.34118	0.04944	0.05840				
<b>FD175</b>	10.34244	0.04221	0.00983	0.05091			
<b>FD172</b>	10.34191	0.04758	0.05473	0.04035	0.04381		
<b>FD167</b>	10.34133	0.05659	0.06198	0.04381	0.05088	0.01978	

En la imagen se observan agrupaciones similares a las obtenidas con el marcador CytB, sin embargo, en este caso no se encontraron secuencias de referencia del Ecuador. Además, en la parte inferior se observa que individuos de la especie *A. chamek* se mezclan con *A. belzebuth* en un mismo clado, e inclusive *A. marginatus* se encuentra cercana a *A. chamek*.

**Figura 20**

Árbol obtenido con el método de ML y el modelo Taruma de 3 parámetros, para muestras de *Ateles* con el marcador D-Loop.

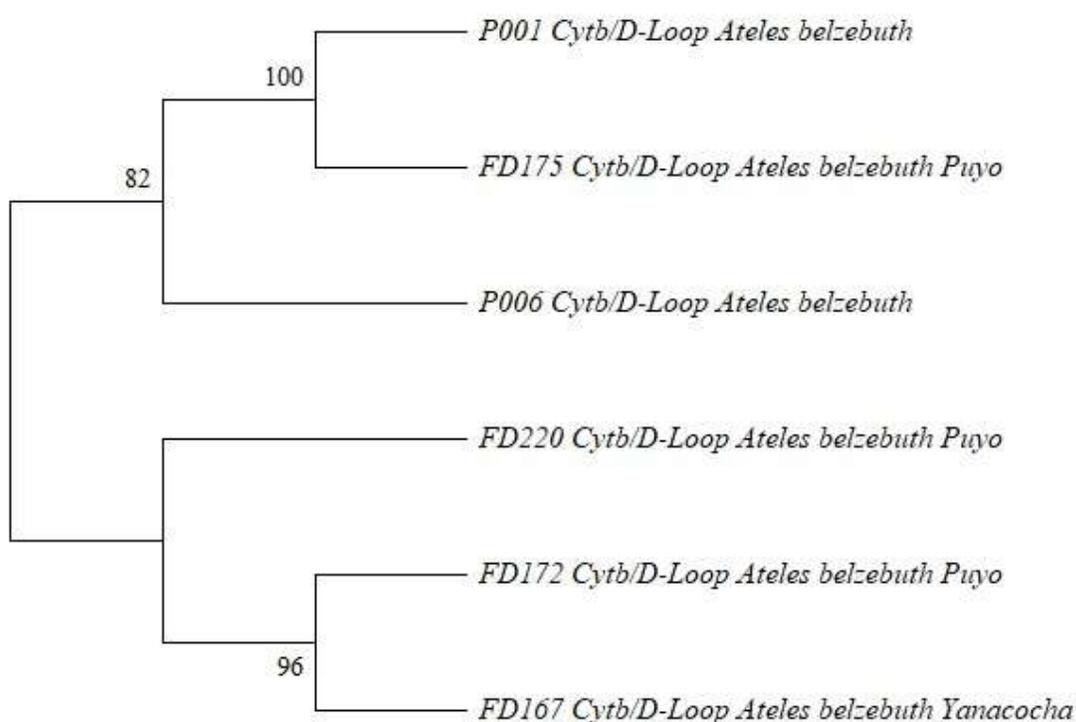


Las secuencias correspondientes a *Ateles* se concatenaron a fin de corroborar los agrupamientos obtenidos de manera individual para ambos marcadores. En árbol ML (Figura 21),

se puede ver que mediante el uso de estos dos marcadores es posible diferenciar a individuos de la misma especie a partir del lugar de procedencia.

### Figura 21

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



Finalmente, se encontraron 13 secuencias de referencia para *Leontocebus* con el marcador D-Loop y se estableció como grupo externo a un individuo de *Cebuella pygmaea* de Brasil. El árbol MP mostró grupos similares al ML y ambos estaban en concordancia con los datos de distancias evolutivas (Tabla 19).

**Tabla 19**

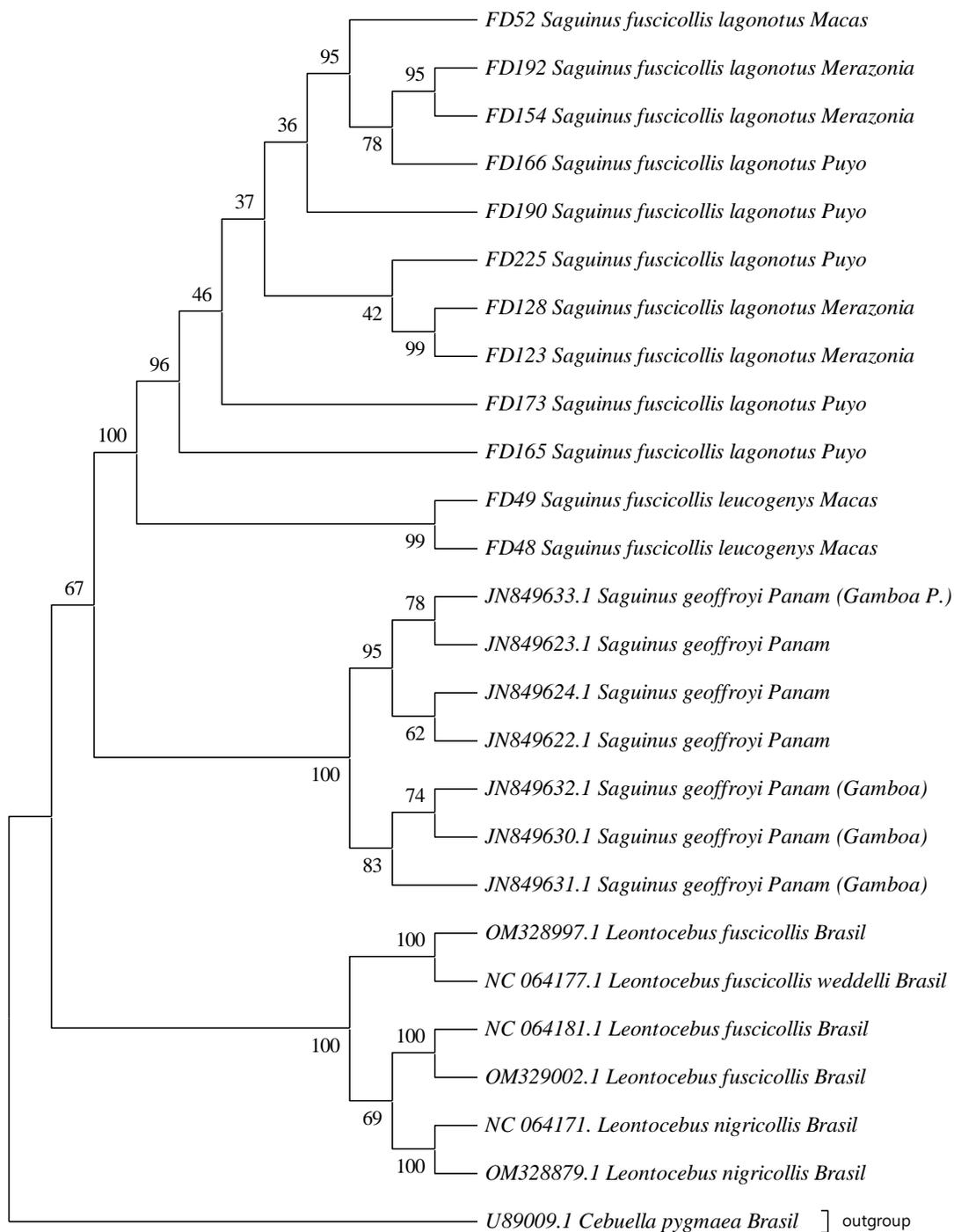
*Distancias evolutivas entre las muestras de Ateles analizadas con D-Loop.*

	FD52	FD49	FD48	FD225	Outgroup	FD192	FD190	FD166	FD165	FD154	FD128	FD123	FD173
<b>FD52</b>													
<b>FD49</b>	0.08261												
<b>FD48</b>	0.09832	0.02039											
<b>FD225</b>	0.01338	0.07112	0.08650										
<b>Outgroup</b>	3.50595	3.66854	3.59290	3.54197									
<b>FD192</b>	0.00332	0.08656	0.09428	0.01678	3.47169								
<b>FD190</b>	0.01338	0.07870	0.09428	0.00665	3.54330	0.01678							
<b>FD166</b>	0.00000	0.08261	0.09832	0.01338	3.50595	0.00332	0.01338						
<b>FD165</b>	0.02360	0.07503	0.08261	0.01676	3.50837	0.02015	0.01337	0.02360					
<b>FD154</b>	0.00332	0.08656	0.09428	0.01678	3.47169	0.00000	0.01678	0.00332	0.02015				
<b>FD128</b>	0.02358	0.07865	0.09422	0.00999	3.53760	0.02705	0.01336	0.02358	0.02356	0.02705			
<b>FD123</b>	0.02187	0.07677	0.09230	0.00832	3.53760	0.02533	0.01167	0.02187	0.02186	0.02533	0.00165		
<b>FD173</b>	0.01678	0.07498	0.08256	0.00332	3.50734	0.01338	0.01001	0.01678	0.01336	0.01338	0.01337	0.01169	

En el árbol MP (Figura 22) fue posible evidenciar la agrupación de los individuos en función de la zona y la especie a tratar. Los individuos estudiados se muestran más cercanos a aquellos pertenecientes a Brasil. Para este grupo tampoco se encontraron datos propios del país ni en países cercanos.

Figura 22

Árbol obtenido con el método de MP para muestras de *Leontocebus* con el marcador D-Loop.



## Capítulo V: Discusión

### Extracción de ADN

La obtención de muestras representa un grave desafío dentro de la genética de conservación de primates (Orkin et al., 2021). Pese a que las muestras de sangre y tejidos son de gran utilidad en estudios genéticos, para los primatólogos éstas presentan varias desventajas relacionadas con la salud y el comportamiento de los animales silvestres (da Silva & Bruford, 2017; Orkin et al., 2021), ya que representan un desafío logístico para obtenerlas (da Silva & Bruford, 2017).

En este sentido, las muestras no invasivas, como heces y cabello, se han establecido como solución a esta problemática de recolección (Lynn et al., 2016; Orkin et al., 2021), ya que no implican la manipulación de los individuos en el proceso. Las heces pueden proporcionar información sobre la dieta y genética poblacional de los individuos (Eriksson et al., 2004; Srivathsan et al., 2016) y en comparación con el cabello, cuentan con una mayor cantidad de ADN total (Orkin et al., 2021). Además, las especies *A. belzebuth* y *L. lagototus* son especies amenazadas, lo cual justifica el uso de heces como fuente de ADN para el desarrollo de este trabajo.

Una desventaja del ADN fecal es que suele encontrarse en pocas cantidades, fragmentado y degradado (Costa et al., 2016; Taberlet & Luikart, 1999). Por ello, se recomienda el uso de kits de extracción (Taberlet & Luikart, 1999) y de primers altamente específicos (Hernandez et al., 2018). Referente a esto, se usó un kit de QIAGEN para heces y se llevó a cabo la síntesis de primers específicos para la PCR con ambos marcadores.

En relación a los resultados del protocolo de extracción, se ha visto que el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN proporciona concentraciones cercanas a los  $38.3 \pm 7.6$  ng/ $\mu$ l y que la pureza resultante del ratio A260/280 no influye en la sensibilidad de la PCR (Stauffer et al., 2008). Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en este estudio, puesto

que se encontraron concentraciones de hasta 34.39 ng/μl y pese a que la mayoría de los ratios referían una contaminación con proteínas, no se reflejaron en una inhibición de las PCR posteriores.

### **Comparación de los kits de extracción de ADN**

Las concentraciones de ADN obtenidas difirieron significativamente de acuerdo al kit empleado, siendo el kit de suelos de mayor utilidad en relación a la concentración de ADN obtenida. En algunos estudios (LeFrançois & Cunningham, 2019; Lim et al., 2020; Yang et al., 2020), se menciona que los protocolos que incluyen métodos de disrupción con perlas generan mejores resultados en la extracción de ADN a partir de muestras de heces, el cual es el caso del kit E.Z.N.A.® Soil DNA.

Además, se ha visto que los protocolos de extracción de ADN influyen en el desarrollo de análisis moleculares (Stauffer et al., 2008), entre ellos la PCR (Ariefdjohan, et al., 2010). A pesar de que la PCR puede funcionar con ADN de baja calidad, la purificación de inhibidores a la par del proceso de extracción (Taberlet & Luikart, 1999), puede afectar los resultados obtenidos (Rodríguez-Riveiro et al., 2022). Esto se evidenció en los resultados de la PCR con las muestras obtenidas de los dos kits, puesto que las bandas se mostraron con mayor intensidad en el caso del ADN extraído con el kit E.Z.N.A.® Soil DNA, mismo que proporcionó mejores concentraciones de ADN.

Es importante tomar en cuenta que parte del éxito del protocolo de extracción de ADN a partir de heces se encuentra relacionado con la dieta del animal, esto se debe a que en su mayoría el ADN proviene de las células epiteliales del intestino, las mismas que pueden variar en cantidad de acuerdo al tipo de fibra digerida (Costa et al., 2016). Por lo tanto, la eficacia del kit de extracción puede variar en función de la dieta del animal estudiado. Hay que tomar en cuenta que la dieta de *Ateles belzebuth* se compone de frutas, hojas jóvenes, flores, insectos y

madera en descomposición (Ceitlin, 2004; Tirira, 2021), lo cual podría influir en la cantidad de células presentes en las heces.

### **Optimización de PCR con CytB y D-Loop**

En estudios con el marcador CytB se ha establecido un tamaño de fragmento de entre 380 y 800 pb para las secuencias obtenidas (Mundy et al., 2000; Nascimento et al., 2005). En este caso, con los primers creados a partir de secuencias del marcador CytB para el género *Ateles* en regiones cercanas a Ecuador se obtuvo un tamaño de 790 pb. Tomando en cuenta esto y que la Taq platimun coloca aproximadamente 1000 pb por minuto (Invitrogen, 2015), se estableció un tiempo de extensión de 1 minuto. La concentración de ADN se estableció en 10 ng/ $\mu$ l. Se obtuvieron buenos resultados con 62°C de temperatura de hibridación, a temperaturas menores se identificaron bandas inespecíficas, al igual que en el estudio de (Rosli et al., 2011) donde temperaturas de 53 a 58 °C provocaron manchas y bandas múltiples. Invitrogen (2015) recomienda emplear una concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  de 1.5 mM, Taq a 2 U/ $\mu$ l y primers en 0.5  $\mu$ M. En nuestro caso, se logró optimizar la PCR para CytB con Taq a 0.5 U/ $\mu$ l y primers en 0.25  $\mu$ M, mientras que el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  se estableció en 2 mM.

En cuanto al marcador D-Loop, se ha visto que el tamaño de fragmento ronda entre los 300 y 600 pb (Botero et al., 2015; Saccone et al., 1987), por lo tanto, un tiempo de extensión de 45 segundos resultó suficiente para obtener buenos resultados de la PCR. Este fue el único parámetro que se modificó en relación al protocolo establecido por Acuña, 2020, quién obtuvo un tiempo de extensión de 1 hora con 30 minutos. Los demás parámetros se mantuvieron en 1 U/ $\mu$ l de Taq, 1  $\mu$ M de primers y 1 minuto en los tiempos de desnaturalización e hibridación. En cuanto a la cantidad de ADN a utilizar, se estableció una concentración de 12.5 ng/ $\mu$ l.

Dentro de la PCR es importante tomar en cuenta que cuando el amplicón no se presenta con una intensidad y forma adecuada se requiere de un proceso de optimización. Los

resultados pueden verse influenciados por modificaciones a nivel de concentraciones de reactivos y condiciones de ciclado (Lorenz, 2012).

### **Filogeografía**

El marcador molecular CytB es uno de los más usados en estudios de biosistemática (Ruiz-García et al., 2016) y filogeografía (Castresana, 2001; Davidović et al., 2022), debido a que posee regiones conservadas y variables, que evolucionan lenta y rápidamente (Cantatore et al., 1994; Davidović et al., 2022). Varios estudios han empleado este marcador en análisis relacionados con la filogeografía de especies de la familia *Atelidae*, por ejemplo: en la clasificación taxonómica de la especie *Ateles fusciceps rufiventris* (Cepeda Duque & Link, 2018), en la determinación de la taxonomía y biogeografía de especies amazónicas del género *Ateles* (Grant, 2023), en la evaluación de relaciones filogenéticas de especies de la familia *Atelidae* (Ruiz-García et al., 2016) y en el establecimiento de escenarios biogeográficos para monos araña, a partir de análisis de datación e inferencia filogenética (Morales et al., 2015). En este sentido, el marcador CytB también fue de utilidad en el desarrollo de este trabajo, puesto que mostró diferencias a nivel de especies relacionadas con la zona de origen.

En el árbol ML para las secuencias de *Ateles* evaluadas con CytB, las muestras obtenidas de los diferentes refugios se agruparon con la secuencia de referencia perteneciente a Ecuador, en un mismo clado. La muestra FD-220 se ubicó en un sitio lejano dentro de este grupo, junto con una secuencia de Suramérica, marcando una posible diferencia en el lugar de origen del individuo. En cuanto a las secuencias de referencia, se agrupó a *A. belzebuth* con la subespecie *A. belzebuth chamek* en un mismo clado, de igual manera sucedió con *A. fusciceps* y *A. geoffroyi*. Y la especie *A. hybridus* se separó de los demás clados.

De manera similar, el marcador molecular D-Loop se ha empleado con éxito en estudios de filogeografía del género *Ateles*, como es el caso de *A. hybridus* (Link et al., 2015) y en el

establecimiento de relaciones filogenéticas de la especie *A. geoffroyi* (Morales-Jimenez et al., 2015), lo cual está en concordancia con el uso dado al marcador D-Loop en este trabajo.

En el árbol ML obtenido a partir de secuencias de D-Loop se agruparon nuevamente las muestras de los refugios en un mismo clado, y la muestra FD-220 volvió a ser la más lejana del grupo. Se identificó una cercanía entre los grupos *A. belzebuth* y *A. chamek*. Además, *A. marginatus* se ubicó en un mismo clado con algunos individuos de *A. chamek*.

Estos resultados concuerdan con el estudio de Morales et al. (2015), donde colocan a *A. belzebuth* y *A. chamek* en un mismo clado. Mencionan que *A. fusciceps* y *A. geoffroyi* comparten un ancestro común, mientras que *A. hybridus* pertenece a un clado distinto de *A. belzebuth* y *A. chamek* y *A. marginatus* de Brasil no pertenece al mismo clado que *A. belzebuth*.

En adición, mediante el uso concatenado de estos dos marcadores moleculares (CytB y D-Loop) se obtuvieron resultados similares en las agrupaciones. De manera que, el uso de ambos permite inferir la filogeografía de individuos del género *Ateles*.

Por otro lado, se empleó con éxito el marcador D-Loop para establecer diferencias entre individuos del género *Leontocebus*. En un clado se pudo observar la aparición de la subespecie *L. leucogenys*, la cual se caracteriza por ser de estribación de cordillera en Perú (Charpentier et al., 2022), lo que resalta la importancia de este tipo de estudios, al ser animales víctimas del tráfico de especies.

Existen estudios donde se ha empleado la región D-Loop para determinar la filogeografía de especies del género *Leontocebus* (Carvalho et al., 2022; Cropp et al., 1999; Matauschek et al., 2011), e inclusive emplean como marcador adicional a la región CytB. Respalda el uso de este marcador para el objetivo planteado en este estudio.

Si bien, no fue posible determinar el lugar de origen de las muestras analizadas, esto fue consecuencia de la inexistencia de datos propios del país. Una suficiente cantidad de

información relacionada con las especies podría hacer posible la inferencia del lugar de origen de los individuos a partir de datos moleculares, haciendo posible la aplicación del concepto “genética de la conservación” para la reintroducción de especies.

Tomando en cuenta que, dentro de los estudios de filogeografía, el uso de muestras no invasivas (heces) proporciona ADN degradado, se puede establecer como alternativa el uso de microsatélites, puesto que estos son cortos y por lo tanto tienen una facilidad de amplificación a partir de este tipo de muestras (Rodríguez et al., 2010; Taberlet & Luikart, 1999). Además, permite inferir de mejor forma la regionalidad de las muestras, mediante el uso de redes de haplotipos y solventar de alguna forma la falta de información en el país (Rodríguez et al., 2010; Vázquez-Domínguez et al., 2009).

## Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Mediante el desarrollo de este trabajo se optimizaron 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.

Se evaluaron dos kits de extracción de ADN, el kit QIAamp Fast DNA Stool de QIAGEN y E.Z.N.A.® Soil DNA kit, usando muestras no invasivas de primates no humanos. Las concentraciones de ADN obtenidas fueron significativamente diferentes. Se demostró un mayor rendimiento del ADN extraído con el kit E.Z.N.A.® Soil DNA para PCR. Se recomienda 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, a fin de obtener resultados de mayor consistencia.

Se estableció el protocolo de PCR Barcoding con el marcador CytB con una concentración de ADN de 10 ng/μl, 62°C de temperatura de hibridación, Cl<sub>2</sub>Mg a 2.0 mM, Taq a 0.5 U/μL, primers en 0.25 μM y tiempos de desnaturalización e hibridación de 60 y 30 segundos respectivamente. En cuanto al marcador D-Loop, se estableció un tiempo de extensión de 45 segundos y una concentración de ADN de 12.5 ng/μl.

Mediante el uso de los marcadores CytB y D-Loop, fue posible agrupar las especies de primates pertenecientes a los géneros *Ateles* y *Leontocebus* en relación a la zona de procedencia del individuo. Si bien, en este estudio no fue posible determinar el lugar de origen de las muestras analizadas, esto fue consecuencia de la inexistencia de datos propios del país. Una suficiente cantidad de información relacionada con las especies podría hacer posible la inferencia del lugar de origen de los individuos a partir de datos moleculares. Además, se puede establecer como alternativa el uso de microsatélites como marcadores para el desarrollo de estudios filogenéticos.

## Capítulo VII: Referencias

Abrams, S. (2022, enero 16). *Mono araña de vientre blanco, Ateles belzebuth*. New England Primate Conservancy. <https://neprimateconservancy.org/white-bellied-spider-monkey/>

Acuña, D. A. (2020). *Inferencia molecular de la identidad y origen geográfico de las especies de primates no humanos Cebus sp. Y Lagothrix sp. A partir de la región mitocondrial de control hipervariable (D-loop) mediante el uso de redes de haplotipos en centros de rescate de la Amazonía ecuatoriana* [Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de ingeniero en biotecnología]. Universidad de las Fuerzas Armadas -ESPE.

Andrews, T. D., Jermin, L. S., & Easteal, S. (1998). Accelerated evolution of cytochrome b in simian primates: Adaptive evolution in concert with other mitochondrial proteins? *Journal of Molecular Evolution*, 47(3), 249-257. <https://doi.org/10.1007/pl00006382>

Archie, E. A., & Chiyo, P. I. (2012). Elephant behaviour and conservation: Social relationships, the effects of poaching, and genetic tools for management. *Molecular Ecology*, 21(3), 765-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05237.x>

Arciniegas, J. S. A. (2015). *Caracterización Genética de Poblaciones Naturales de Saguinus leucopus (Primates: Callitrichidae) a lo Largo de su Rango de Distribución*. [Tesis de Maestría para optar al título en Maestría en Ciencias - Biología, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56720/1010178839.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ariefdjohan, M., Savaiano, D., & Nakats, C. (2010). Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Springermedizin*. <https://www.springermedizin.de/comparison-of-dna-extraction-kits-for-pcr-dgge-analysis-of-human/25654772>

Baker, C. S., & Palumbi, S. R. (1996). *Population Structure, Molecular Systematics, and Forensic Identification of Whales and Dolphins* (J. C. Avise & J. L. Hamrick, Eds.; pp. 10-49). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2504-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2504-9_2)

Baker, L. (2002). Guidelines for Nonhuman Primate Re-introductions. En *Re-introduction News: Special: Primate Issue: Vol. No. 21*.

Bergamo, B. (2020, abril 16). *El Mono Araña - ¿Dónde vive? - Características*. Del Amazonas. <https://delamazonas.com/fauna/mono-arana-ateles/>

Boada, C., & Vallejo, A. F. (2010, febrero 11). *Ateles belzebuth*. Mamíferos del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Ateles%20belzebuth>

Botero, S., Stevenson, P. R., & Di Fiore, A. (2015). A primer on the phylogeography of *Lagothrix lagotricha* (sensu Fooden) in northern South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 511-517. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.019>

Brando, S., Atencia, R., Botting, J., Colin, C., Cunneyworth, P., Dorenmalen, A. van, Janssen, P., Mungania, N., Torres, S., Williams, S., & Tully, G. (2020). *Study on Reintroductions and Releases of African Primates: Understanding the impact of releases on primate conservation and determining the factors that contribute to their success* [Study on Reintroductions and Releases]. PASA. <https://pasa.org/wp-content/uploads/2021/09/PASA-Reintroduction-Study-Report.pdf>

Buckner, J. C., Lynch Alfaro, J. W., Rylands, A. B., & Alfaro, M. E. (2015). Biogeography of the marmosets and tamarins (*Callitrichidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 413-425. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.031>

Campbell, C. J. (Ed.). (2008). *Spider monkeys: Behavior, ecology and evolution of the genus Ateles* (Vol. 46). Cambridge University Press.

<http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.46-5023>

Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M. N., & Saccone, C. (1994). Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 39(6), 589-597. <https://doi.org/10.1007/BF00160404>

Cardoso, S., Valverde, L., Palencia, L., Pancorbo, M. M. de, Quintana, J. C. L., & Lizasu, A. G. (2011). Análisis de ADN Mitocondrial en los Restos Humanos de la Cueva de Santimamiñe (Kortezubi, Bizkaia). *koBie Serie Bizkaiko arkeologi induSketak*, 1. [https://www.bizkaia.eus/fitxategiak/04/ondarea/Kobie/PDF/7/Kobie\\_BAI\\_01\\_web-17.pdf?hash=71c9ce1b57b050f5abb46297368ca542](https://www.bizkaia.eus/fitxategiak/04/ondarea/Kobie/PDF/7/Kobie_BAI_01_web-17.pdf?hash=71c9ce1b57b050f5abb46297368ca542)

Carrillo, G. A. (2010). Estudio preliminar sobre la comunidad de primates en el bosque protector del Oglán Alto. Arajuno-Pastaza. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 31(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.26807/remcb.v31i1-2.45>

Carvalho, I., Carneiro, J., Ruiz-García, M., Boubli, J. P., Silva-Júnior, J. de S. e, Farias, I., Hrbek, T., Schneider, H., & Sampaio, I. (2022). Phylogenetics and an updated taxonomic status of the Tamarins (*Callitrichinae*, *Cebidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 173, 107504. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107504>

Castresana, J. (2001). Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 465-471. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003825>

Ceitlin, J. (2004). *Ateles belzebuth* (white-bellied spider monkey). Animal Diversity Web. [https://animaldiversity.org/accounts/Ateles\\_belzebuth/](https://animaldiversity.org/accounts/Ateles_belzebuth/)

Cepeda Duque, J. C., & Link, A. (2018). Incertidumbre taxonómica de un primate neotropical; el caso de *Ateles fusciceps rufiventris sclater*, 1871 (primates: *Atelidae*).

*Mastozoología Neotropical*, 25(2), 455-460.

Cervera, L., Crowe, O., Cueva, R., Fuentes, N., Larriva, D., Maila, D., Mantilla, D., Mariscal, A., Mariscal, C., Molina, E., Morales, M., Morelos-Juárez, C., Narváez-Ruano, V., Naveda-Rodríguez, A., Palacios, J., Ramis, L., Rivera, E., Rubio, A., Salas, J. A., ... Veloz, O. A. (s. f.). *Working Together Towards One Goal: Results of the First Primate Census in Western Ecuador*.

Charpentier, E., García-Mendoza, G., Cruz-Guimaraes, J., Aquino, R., & Heymann, E. W. (2022). Southern range extension of Spix's saddle-back tamarin, *Leontocebus fuscicollis fuscicollis*, in Peru. *Primate Biology*, 9(2), 19-22. <https://doi.org/10.5194/pb-9-19-2022>

Collins, A., & Dubach, J. (2000). Phylogenetic Relationships of Spider Monkeys (*Ateles*) Based on Mitochondrial DNA Variation. *International Journal of Primatology*, 21, 381-420. <https://doi.org/10.1023/A:1005435718241>

Costa, V., Rosenbom, S., Monteiro, R., O'Rourke, S. M., & Beja-Pereira, A. (2016). Improving DNA quality extracted from fecal samples—A method to improve DNA yield. *European Journal of Wildlife Research*, 63(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1058-1>

Cropp, S. J., Larson, A., & Cheverud, J. M. (1999). Historical biogeography of tamarins, genus *Saguinus*: The molecular phylogenetic evidence. *American Journal of Physical Anthropology*, 108(1), 65-89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199901\)108:1<65::AID-AJPA4>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199901)108:1<65::AID-AJPA4>3.0.CO;2-4)

da Silva, M. J. F., & Bruford, M. W. (2017). Genetics and Primate Conservation. En *The International Encyclopedia of Primatology* (pp. 1-6). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119179313.wbprim0199>

Dantas, S. M. M. de M., & Barros, R. M. de S. (1997). Cytogenetic study of the genus *Saguinus* (*Callithrichidae*, Primates). *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 649-649.

<https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000400014>

Davidović, S., Marinković, S., Kukobat, M., Mihajlović, M., Tanasić, V., Hribšek, I., Tanasković, M., & Stamenković-Radak, M. (2022). Genetic Diversity Analysis of Mitochondrial Cytb Gene, Phylogeny and Phylogeography of Protected Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) from Serbia. *Life*, 12(2), 164. <https://doi.org/10.3390/life12020164>

de la Torre, S. (2010). Los primates ecuatorianos, estudios y perspectivas. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.18272/aci.v2i2.30>

de la Torre, S., & Morelos-Juárez, C. (2022). Primate Conservation Efforts and Sustainable Development Goals in Ecuador, Combining Research, Education and Capacity Building. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 12(20), 2750.

<https://doi.org/10.3390/ani12202750>

Downey, K. (2022, enero 20). *Tití ensillado*, *Leontocebus fuscicollis*. Conservación de primates de Nueva Inglaterra. <https://neprimateconservancy.org/saddleback-tamarin/>

Eriksson, J., Hohmann, G., Boesch, C., & Vigilant, L. (2004). Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 13(11), 3425-3435.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02332.x>

Estrada, A., Garber, P. A., Rylands, A. B., Roos, C., Fernandez-Duque, E., Di Fiore, A., Nekaris, K. A.-I., Nijman, V., Heymann, E. W., Lambert, J. E., Rovero, F., Barelli, C., Setchell, J. M., Gillespie, T. R., Mittermeier, R. A., Arregoitia, L. V., de Guinea, M., Gouveia, S., Dobrovolski, R., ... Li, B. (2017). Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Science Advances*, 3(1), e1600946. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946>

Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. (2001). The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53(2), 89-103.

<https://doi.org/10.1007/s002390010197>

Fernández, D., Kerhoas, D., Dempsey, A., Billany, J., McCabe, G., & Argirova, E. (2022). The Current Status of the World's Primates: Mapping Threats to Understand Priorities for Primate Conservation. *International Journal of Primatology*, 43(1), 15-39.

<https://doi.org/10.1007/s10764-021-00242-2>

Gallo-Viracocha, F., Urgilés-Verdugo, C., Fuentes, N., Alfonso-Cortes, F., Zurita-Arthos, L., Torres, T. C., & Tirira, D. G. (2022). Distribución, conservación y vulnerabilidad al cambio climático del mono araña de cabeza marrón ecuatoriano (Primates: *Atelidae*). *Mammalia aequatorialis*, 4, 39-52. <https://doi.org/10.59763/mam.aeq.v4i.50>

Garbino, G. S. T., & Martins-Junior, A. M. G. (2018). Phenotypic evolution in marmoset and tamarin monkeys (*Cebidae*, *Callitrichinae*) and a revised genus-level classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 118, 156-171.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.10.002>

Goldberg, T. L. (1997). Inferring the Geographic Origins of «Refugee» Chimpanzees in Uganda from Mitochondrial DNA Sequences. *Conservation Biology*, 11(6), 1441-1446.

Grant, C. (2023). *A review of taxonomic history and phylogeography for the spider monkeys (genus Ateles), with habitat suitability modelling for Amazonian Ateles*. <https://salford-repository.worktribe.com/output/2015241/a-review-of-taxonomic-history-and-phylogeography-for-the-spider-monkeys-genus-ateles-with-habitat-suitability-modelling-for-amazonian-ateles>

Guo, M., Yuan, C., Tao, L., Cai, Y., & Zhang, W. (2022). Life barcoded by DNA barcodes. *Conservation Genetics Resources*, 14(4), 351-365. <https://doi.org/10.1007/s12686-022-01291-2>

Hays, C. G., & Fagan, C. M. (2016). Conservation Biology, Evolution and. En R. M. Kliman (Ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (pp. 347-353). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00301-2>

Hernandez, J., Arandjelovic, M., Lester, J., de Filippo, C., Weihmann, A., Meyer, M., Angedakin, S., Casals, F., Navarro, A., Vigilant, L., Kühl, H. S., Langergraber, K., Boesch, C., Hughes, D., & Marques-Bonet, T. (2018). The impact of endogenous content, replicates and pooling on genome capture from faecal samples. *Molecular Ecology Resources*, 18(2), 319-333. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12728>

Hinchliffe, B. (2022). *Ateles (spider monkeys)*. Animal Diversity Web. <https://animaldiversity.org/accounts/Ateles/>

Invitrogen. (2015). *Platinum Taq DNA Polymerase*. thermofisher. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Platinum\\_Taq\\_DNA\\_Polymerase\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Platinum_Taq_DNA_Polymerase_UG.pdf)

IUCN. (2021). *An Assessment of Endangered Primates—The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN/SSC PRIMATE Specialist Group. [http://www.primatesg.org/red\\_list\\_threat\\_status/](http://www.primatesg.org/red_list_threat_status/)

Johns, G. C., & Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11), 1481-1490. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

Landim, A. R., Fernandez, F. A. S., & Pires, A. (2022). Primate reintroduction promotes the recruitment of large-seeded plants via secondary dispersal. *Biological Conservation*, 269, 109549. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109549>

LeFrançois, B., & Cunningham, L. (2019). *Evaluation of DNA extraction methods to obtain accurate and reliable results from gut microbiome samples*. 1.

Levin, S. (2001). *Encyclopedia of Biodiversity* (Vol. 7).  
<http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780123847201/encyclopedia-of-biodiversity>

Liang, Z., Chen, W., Wang, D., Zhang, S., Wang, C., He, S., Wu, Y., He, P., Xie, J., Li, C., Merilä, J., & Wei, Q. (2019). Phylogeographic patterns and conservation implications of the endangered Chinese giant salamander. *Ecology and Evolution*, 9(7), 3879-3890.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.5014>

Lim, M. Y., Park, Y.-S., Kim, J.-H., & Nam, Y.-D. (2020). Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC Microbiology*, 20(1), 212.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01894-5>

Link, A., Valencia, L. M., Céspedes, L. N., Duque, L. D., Cadena, C. D., & Di Fiore, A. (2015). Phylogeography of the Critically Endangered Brown Spider Monkey (*Ateles hybridus*): Testing the Riverine Barrier Hypothesis. *International Journal of Primatology*, 36(3), 530-547.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-015-9840-6>

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 63, 3998.  
<https://doi.org/10.3791/3998>

Lynn, M. S., Sechi, P., Chikhi, L., & Goossens, B. (2016). Genética de conservación de primates en los albores de la genómica de conservación. En S. A. Wich & A. J. Marshall (Eds.),

*An Introduction to Primate Conservation* (p. 0). Oxford University Press.

<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198703389.003.0005>

Machado, C. B., & Perez, M. F. (2023). Phylogeography for Neotropical Species Conservation: Lineages Through Time and Space. En P. M. Galetti Jr. (Ed.), *Conservation Genetics in the Neotropics* (pp. 119-143). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-031-34854-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-031-34854-9_6)

Machordom, A., Araujo, R., Erenbeck, D., & Ramos, M.-Á. (2003). Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea).

*Biological Journal of the Linnean Society*, 78(2), 235-252. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00158.x>

Madden R. & Albuja L. (1989). *Estado actual de Ateles fusciceps fusciceps en el noroccidente ecuatoriano*. XIV(2). <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4742>

Matauschek, C., Roos, C., & Heymann, E. W. (2011). Mitochondrial phylogeny of tamarins (*Saguinus*, Hoffmannsegg 1807) with taxonomic and biogeographic implications for the *S. nigricollis* species group. *American Journal of Physical Anthropology*, 144(4), 564-574.

<https://doi.org/10.1002/ajpa.21445>

Mello, B., Vilela, J. F., & Schrago, C. G. (2018). Conservation phylogenetics and computational species delimitation of Neotropical primates. *Biological Conservation*, 217, 397-406. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.11.017>

Mena, J. L., Dosantos, A., Grocio Gil, J., Escobedo, M., Aquino, R., & Peres, J. (2007). Primer registro de *Saguinus fuscicollis melanoleucus* (Miranda Ribeiro, 1912) en la Amazonía peruana. *Revista Peruana de Biología*, 14(1), 39-42.

Morales, A. L. M., Disotell, T., & Di Fiore, A. (2015). Revisiting the phylogenetic relationships, biogeography, and taxonomy of spider monkeys (genus *Ateles*) in light of new molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 467-483.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.019>

Morales-Jimenez, A. L., Cortés-Ortiz, L., & Di Fiore, A. (2015). Phylogenetic relationships of Mesoamerican spider monkeys (*Ateles geoffroy*): Molecular evidence suggests the need for a revised taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 484-494.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.025>

Morelos, C. (2016). *Conservation of brown-headed spider monkeys (Ateles fusciceps fusciceps) in NW Ecuador: Applying an agent-based model* [Thesis, University of Sussex].

[https://sussex.figshare.com/articles/thesis/Conservation\\_of\\_brown-headed\\_spider\\_monkeys\\_Ateles\\_fusciceps\\_fusciceps\\_in\\_NW\\_Ecuador\\_applying\\_an\\_agent-based\\_model/23439404/1](https://sussex.figshare.com/articles/thesis/Conservation_of_brown-headed_spider_monkeys_Ateles_fusciceps_fusciceps_in_NW_Ecuador_applying_an_agent-based_model/23439404/1)

Moscoso, P. (2010). *Estado poblacional del mono araña de cabeza café (Ateles fusciceps) en el noroccidente del Ecuador, con notas ecológicas de una relación interespecífica con Alouatta palliata*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28637.41447>

Mourthé, Í., Muniz, C. C., Moscoso, P., Torre, S. de la, Stevenson, P. R., Link, A., Boubli, J. P., Urbani, B., Group, S. S. (Neotropical P. C. / I. S. P. S., Erwin Palacios (Conservación Internacional Colombia, B., Fanny M. Cornejo (Dept. of Anthropology, S. B. U., International), A. B. R. (Conservation, & International), R. A. M. (Conservation. (2019). IUCN Red List of Threatened Species: *Ateles belzebuth*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>

Mundy, N. I., Pissinatti, A., & Woodruff, D. S. (2000). Multiple Nuclear Insertions of Mitochondrial Cytochrome b Sequences in Callitrichine Primates. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1075-1080. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026388>

Myers, P. (2000). *Primates (primates)* [Universidad de Michigan-Ann Arbor]. Animal Diversity Web. <https://animaldiversity.org/accounts/Primates/>

Napier, J. N., & Groves, C. P. (1999, julio 26). *Primate—Primates, Taxonomía, Evolución* [Encyclopædia Britannica]. Británica. <https://www.britannica.com/animal/primate-mammal/Classification>

Nascimento, F. F., Bonvicino, C. R., Da Silva, F. C. D., Schneider, M. P. C., & Seuánez, H. N. (2005). Cytochrome b polymorphisms and population structure of two species of *Alouatta* (Primates). *Cytogenetic and Genome Research*, 108(1-3), 106-111. <https://doi.org/10.1159/000080808>

NEPC. (2021, julio 22). *Primate facts*. New England Primate Conservancy. <https://neprimateconservancy.org/primate-facts/>

Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>

OED. (2023). *Eutheria*. Oxford English Dictionary. <https://www.oed.com/search/dictionary/?scope=Entries&q=Eutheria>

Orkin, J. D., Kuderna, L. F. K., & Marques-Bonet, T. (2021). The Diversity of Primates: From Biomedicine to Conservation Genomics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 9(1), 103-124. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-061220-023138>

Orna, G. O. (2018). *Definición de Posibles Santuarios y Estrategias de Conservación dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas Snap, para el Mono Araña de Cabeza Café*

*Ateles Fusciceps ssp. Fusciceps, a través del Modelamiento de Hábitats Potenciales Actuales.*

[Disertación Previa a la Obtención del Título de Ingeniera Geógrafa en Gestión Ambiental, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador].

<https://www.repositoriointerculturalidad.ec/jspui/bitstream/123456789/2731/1/Definici%C3%B3n%20de%20posibles%20santuarios%20estrategias%20de%20conservacion%20para%20A.%20fusciceps%20ssp%20fusciceps%20a%20t.pdf>

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., & Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 114(1-2), 23-28. <https://doi.org/10.1007/s004140000134>

Pozo, W. E., & Youlatos, D. (2022). *Male Responses to Characteristics of Fruit Production in a Fission- Fusion Group of Spider Monkeys.*

RAE. (2022). *Primate | Diccionario de la lengua española*. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. <https://dle.rae.es/primate>

Rivera Román, E. S. (2017). *Filogeografía del mono araña de cabeza café (Ateles fusciceps fusciceps) en el Ecuador.*  
<https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/6b7ba0bf-acbd-4e94-8e30-faf099233d8a>

Rodríguez, F., Pérez, T., Hammer, S. E., Albornoz, J., & Domínguez, A. (2010). Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 222. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-222>

Rodríguez-Riveiro, R., Velasco, A., & Sotelo, C. G. (2022). The Influence of DNA Extraction Methods on Species Identification Results of Seafood Products. *Foods*, 11(12), 1739. <https://doi.org/10.3390/foods11121739>

Rosli, M. K. A., Zamzuriada, A. S., Syed-Shabthar, S. M. F., Mahani, M. C., Abas-Mazni, O., & Md-Zain, B. M. (2011). Optimization of PCR conditions to amplify Cyt b, COI and 12S rRNA gene fragments of Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) mtDNA. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 10(4), 2554-2568. <https://doi.org/10.4238/2011.October.19.2>

Ruiz-García, M., Lichilín Ortiz, N., Escobar-Armel, P., Rodríguez Suárez, G., & Gutiérrez-Espeleta, G. (2016). *Historical Genetic demography and some insights into the systematics of Ateles (Atelidae, Primates) by means of diverse mitochondrial genes.*

Ruiz-García, M., Sánchez-Castillo, S., Castillo, M. I., Luengas, K., Ortega, J. M., Moreno, P., Albuja, L., Pinto, C. M., & Shostell, J. M. (2018). How Many Species, Taxa, or Lineages of *Cebus albifrons* (Platyrrhini, Primates) Inhabit Ecuador? Insights from Mitogenomics. *International Journal of Primatology*, 39(6), 1068-1104. <https://doi.org/10.1007/s10764-018-0062-6>

Rylands, A. B., Heymann, E. W., Lynch Alfaro, J., Buckner, J. C., Roos, C., Matauschek, C., Boubli, J. P., Sampaio, R., & Mittermeier, R. A. (2016). Taxonomic review of the New World tamarins (Primates: Callitrichidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 177(4), 1003-1028. <https://doi.org/10.1111/zoj.12386>

Saccone, C., Attimonelli, M., & Sbisà, E. (1987). Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 26, 205-211. <https://doi.org/10.1007/BF02099853>

Scotto, C. (2006). Análisis filogenético comparativo entre secuencias codificadoras (Cyt b y ATPasa 8) y secuencias no codificadoras (D-Loop) del ADN mitocondrial de primates y sus implicancias evolutivas en los homínidos. *Revista Horizonte Médico*, 6(2). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637114008>

Shostell, J. M., & Ruiz-García, M. (2016). An introduction to neotropical primates. En *Phylogeny, Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Primates* (pp. 3-38). Nova Science Publishers, Inc.

<http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85153420145&partnerID=8YFLogxK>

Simpson, M. G. (2019). 19—Species and Conservation in Plant Systematics. En M. G. Simpson (Ed.), *Plant Systematics (Third Edition)* (pp. 671-690). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812628-8.50019-5>

Snodderly, D., Ellis, K. M., Lieberman, S. R., Link, A., Fernandez-Duque, E., & Fiore, A. D. (2019). Initiation of feeding by four sympatric Neotropical primates (*Ateles belzebuth*, *Lagothrix lagotricha poeppigii*, *Plecturocebus (Callicebus) discolor*, and *Pithecia aequatorialis*) in Amazonian Ecuador: Relationships to photic and ecological factors. *PLoS ONE*, 14(1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210494>

Srivathsan, A., Ang, A., Vogler, A. P., & Meier, R. (2016). Fecal metagenomics for the simultaneous assessment of diet, parasites, and population genetics of an understudied primate. *Frontiers in Zoology*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0150-4>

Ståhlberg, A., Krzyzanowski, P. M., Jackson, J. B., Egyud, M., Stein, L., & Godfrey, T. E. (2016). Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Research*, 44(11), e105.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw224>

Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Marr, H., & Gookin, J. L. (2008). Evaluation of Four DNA Extraction Methods for the Detection of *Tritrichomonas Foetus* in Feline Stool Specimens by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(5), 639-641. <https://doi.org/10.1177/104063870802000518>

Susanti, R., Iswari, R. S., Fibriana, F., & Sari, R. I. (2017). Mitochondrial D-loop sequence variation among Central Javanese Duck in Indonesia. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 39(4), 449-456.

Taberlet, P., & Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1), 41-55.  
<https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0329>

Thalmann, U. (2007). Biodiversity, phylogeography, biogeography and conservation: Lemurs as an example. *Folia Primatologica*, 78(5-6), 420-443.  
<https://doi.org/10.1159/000105153>

Tirira, D. G. (2021). Primates del Ecuador: Aportes al conocimiento de su diversidad, distribución y conservación. *Mammalia aequatorialis*, 3, 101-102.  
<https://doi.org/10.59763/mam.aeq.v3i.9>

Tirira D. G., de la Torre S., & Zapata G. (Eds.). (2018). Estado de Conservación de los Primates del Ecuador. *Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador*, 12.  
<https://aem.mamiferosdeecuador.com/images/pdf/Gepe/Tirira-et-al-2018-Estado-de-conservacion-primates-del-Ecuador.pdf>

Tirira, D. G., Torre, S. de la, & Ríos, G. Z. (2018). *Plan de acción para la conservación de los primates del Ecuador*. Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) / Grupo de Estudio de Primates del Ecuador (GEPE) / Asociación Ecuatoriana de Mastozoología (AEM).  
<https://aem.mamiferosdeecuador.com/images/pdf/Gepe/Tiriraetal2018Plan-de-accion-primates-del-Ecuador.pdf>

Tobe, S. S., Kitchener, A. C., & Linacre, A. M. T. (2010). Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLOS ONE*, 5(11), e14156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014156>

- Vallejo, A. F., & Boada, C. (2016). *Leontocebus lagonotus*. Mamíferos del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Leontocebus%20lagonotus>
- Vallinoto, M., Sena, L., Sampaio, I., Schneider, H., & Schneider, M. P. (2000). Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of *Saguinus* (Callitrichinae, Primates): Transfer estimation. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 35-42. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000100006>
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., & Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82(2), 277-297. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2009000200009>
- Vonk, J. (2020). Nonhuman Primates. En V. Zeigler-Hill & T. K. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Personality and Individual Differences* (pp. 3256-3259). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24612-3\\_986](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24612-3_986)
- Wang, M.-N., Duan, L., Qiao, Q., Wang, Z.-F., Zimmer, E. A., Li, Z.-C., & Chen, H.-F. (2018). Phylogeography and conservation genetics of the rare and relict *Bretschneidera sinensis* (Akaniaceae). *PLOS ONE*, 13(1), e0189034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189034>
- Wich, S., & Marshall, A. J. (2016). *An introduction to primate conservation* (2016.<sup>a</sup> ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198703389.001.0001>
- Wilson, J.-J., Sing, K.-W., & Jaturas, N. (2019). DNA Barcoding: Bioinformatics Workflows for Beginners. En S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 985-995). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20468-8>

Xie, Z.-Y., Du, J.-Z., Chen, X.-Q., Wang, Y.-X., & Murray, B. W. (2006). [The significance of mitochondria control region (D-Loop) in intraspecific genetic differentiation of fish]. *Yi Chuan = Hereditas*, 28(3), 362-368.

Yang, F., Sun, J., Luo, H., Ren, H., Zhou, H., Lin, Y., Han, M., Chen, B., Liao, H., Brix, S., Li, J., Yang, H., Kristiansen, K., & Zhong, H. (2020). Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies. *GigaScience*, 9(7), giaa071.

<https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa071>

Zhang, T., Lu, H., Chen, C., Jiang, H., & Wu, S. (2012). Genetic Diversity of mtDNA D-loop and Maternal Origin of Three Chinese Native Horse Breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(7), 921-926. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11483>