

Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes

M. Ruiz–García, A. Murillo, C. Corrales,
N. Romero–Aleán & D. Álvarez–Prada

Ruiz–García, M., Murillo, A., Corrales, C., Romero–Aleán, N. & Álvarez–Prada, D., 2007. Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes. *Animal Biodiversity and Conservation*, 30.2: 115–130.

Abstract

Amazon population genetics: the evolutionary history of the jaguar, ocelot, pink river dolphin, woolly monkey and wattled curassow reconstructed through their genes.— The Amazon has more than the half of the world's biodiversity. Nevertheless, the major fraction of the Amazon species has unknown evolutionary histories. This is also certain for mammals and birds. Population genetics, employing molecular markers and theoretical mathematics models, can reconstruct these evolutionary histories and offer very powerful tools for the application of correct conservation politics. Herein, we show a comparative view of population genetics results obtained for Amazon populations of jaguar, ocelot, pink river dolphin, woolly monkey and wattled curassow and provide recommendation for their biological conservation. Each species showed its own specific evolutionary particularities, characteristics that were not shared by the other species. This finding should be taken into consideration for any effective biological conservation program.

Key words: Amazon, Population genetics, *Panthera*, *Leopardus*, *Inia*, *Lagothrix*, *Crax*.

Resumen

Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí reconstruida a partir de sus genes.— El Amazonas contiene más de la mitad de la biodiversidad a escala mundial. Sin embargo, muchas de las especies que alberga, poseen historias evolutivas totalmente desconocidas. Esto incluye el caso de los mamíferos y de las aves. La genética de poblaciones, mediante el uso de marcadores moleculares, modelos y metodologías matemáticas, puede intentar reconstruir esa historia evolutiva y ofrecer herramientas efectivas para la aplicación de políticas correctas de conservación. Se muestra aquí un resumen de los estudios genético realizados en poblaciones amazónicas de jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí y se proponen algunas recomendaciones para su conservación biológica. En cada especie se observaron particularidades evolutivas propias no compartidas por las otras especies. Este hecho debe ser recogido por cualquier programa de conservación que pretenda ser efectivo.

Palabras clave: Amazonas, Genética de poblaciones, *Panthera*, *Leopardus*, *Inia*, *Lagothrix*, *Crax*.

(Received: 6 IX 06; Conditional acceptance: 26 X 06; Final acceptance: 16 IV 07)

Manuel Ruiz–García, Andrea Murillo, Carolina Corrales, Nathalí Romero–Aleán & Diana Álvarez–Prada, Unidad de Genética (Grupo de Genética de Poblaciones Molecular–Biología Evolutiva), Depto. de Biología, Fac. de Ciencias, Pontificia Univ. Javeriana, Ctra 7ª No. 43–82, Bogotá DC, Colombia.

Corresponding author: Manuel Ruiz–García. E–mail: mruij@javeriana.edu.co

Introducción

La genética de poblaciones es una disciplina que se encarga de estimar y comprender la estructura genética de las poblaciones y a partir de ésta inferir los eventos evolutivos que han modulando la distribución de los genes en y entre las poblaciones. Los fundamentos matemáticos y moleculares de esta disciplina son robustos y poderosos, constituyéndose en una herramienta fundamental para el aporte de conocimientos en aras de la conservación biológica.

El Amazonas constituye el punto neurálgico de la biodiversidad en el planeta Tierra. La cantidad de organismos que alberga es enorme. Se estima que más de la mitad de toda la biodiversidad del planeta se encuentra en esta región del trópico sudamericano. Se ha estimado un mínimo de dos millones de especies en esta región, aunque este valor seguramente representa una subestimación considerable (Vanderlei Anselmi, 2004). El Amazonas almacena el 8% del dióxido de Carbono de la biosfera y de 20% del ciclo del agua dulce en el planeta. Sin embargo, la intervención humana está destruyendo amplias áreas de este formidable ambiente.

Los mamíferos y aves de la Amazonía, seguramente, son algunos de los grandes perjudicados de esta acción antrópica devastadora. Por ello, es muy importante poder realizar estudios genético poblacionales para determinar cuál ha sido la historia evolutiva de algunas de esas especies y cuál es su situación actual de potencial evolutivo ante las nuevas condiciones impuestas por la especie humana.

En la última década, se han empezado a utilizar nuevos marcadores moleculares denominados microsátélites o STRP (Polimorfismos de Tándems Cortos de Repetición). La cantidad requerida de ADN para la aplicación de estos marcadores es mínima. Este tipo de marcador muestra cortos elementos repetitivos que contienen tándems de repetición de dos a seis pares de bases. Además, se caracterizan por ser sumamente abundantes en el genoma de los eucariotas, al igual que por estar distribuidos de forma aleatoria y ser sumamente polimórficos. Se han utilizado hasta el momento presente para múltiples propósitos. Por ejemplo, para analizar la estructura social de la ballena yubarta (*Megaptera novaeangliae*) (Amos et al., 1993), para diagnósticos de paternidad en poblaciones de chimpancés (*Pan troglodytes*) (Morin et al., 1993), o para identificación individual con perspectivas forenses en fauna, como en el caso de los tigres (*Panthera tigris*) (Xu et al., 2005). Pero, quizá, el uso más frecuente ha tenido que ver con la determinación de la variabilidad genética en especies de distribución restringida como el tigre de Amur (Zhang et al., 2004) o en especies que entran en conflicto con los humanos, como el caso del puma (*Puma concolor*) en California (Ernest et al., 2003). Igualmente, estos marcadores se han utilizado para determinar la existencia de cuellos de botella genéticos y fragmentación poblacional. Algunos casos notables son el del lobo

etíope (*Canis simensis*) (Gottelli et al., 1994), el del oso andino (*Tremarctos ornatos*) (Ruiz-García, 2003; Ruiz-García et al., 2005), el de los renos (*Rangifer tarandus*) (Cote et al., 2002) o los efectos de fuertes cuellos de botella en canguros, *Macropus rufogriseus rufogriseus* (Le Page et al., 2000).

El objetivo del presente estudio es evaluar comparativamente los resultados genéticos que hemos obtenido al aplicar marcadores STRP, en cinco especies amazónicas: dos felinos, el jaguar (*Panthera onca*) y el ocelote (*Leopardus pardalis*), un cetáceo, el delfín rosado (*Inia geoffrensis*), un primate, el mono lanudo, o churuco, (*Lagothrix lagotricha*) y un crácido, el piurí (*Crax globulosa*). Adicionalmente, se presentan resultados con otro tipo de marcadores moleculares, RAPD, en el caso del delfín rosado. Se relacionan los resultados genéticos obtenidos con definiciones tales como especie clave, indicadora, sombrilla o paraguas, bandera, vulnerable o de importancia económica (Soulé, 1986; Power & Mills, 1995; Meffe & Carroll, 1997: 1. Una especie clave es aquella que posee una importante función ecológica en el ecosistema que habita; su desaparición, o alteración, cambia significativamente las relaciones tróficas, la estructura de la comunidad, los patrones de sucesión y la extracción de recursos de un ecosistema determinado; si desaparece, otras muchas especies declinan o desaparecen también; 2. Una especie indicadora es aquella que pertenece a un nicho altamente específico y que está especialmente ligada a una comunidad biótica muy particular; por fuera de esas circunstancias ecológicas tan limitadas, la especie no está presente; 3. Una especie sombrilla es aquella que requiere de grandes espacios inalterados para mantener poblaciones viables; 4. Una especie bandera puede ser aquella que se relaciona positivamente con el agrado del público por razones estéticas o emocionales y que fácilmente puede desencadenar una fuerte reacción de protección; 5. Una especie vulnerable posee un tamaño poblacional global muy pequeño, con poblaciones muy fragmentadas y aisladas con escaso poder de dispersión y especialmente afectada por la actividad humana; y 6. Una especie económicamente importante es aquella que se puede cultivar para producción y cuya presencia y comportamiento reporta ganancias o pérdidas económicas a los humanos –Meffe & Carroll, 1997). Sin embargo, los resultados genéticos obtenidos muestran cómo las historias evolutivas de cada una de las especies estudiadas resultan muy diferentes y ninguna de esas definiciones aplicada a una especie concreta protege las particularidades evolutivas de cada una de las otras.

Material y métodos

Jaguar y ocelote

Dos felinos amazónicos fueron caracterizados mediante el uso de marcadores microsátélites (STRP): el jaguar y el ocelote. En el caso del jaguar (*Panthera*

onca), se analizaron parámetros y estadísticos genético poblacionales en la subespecie *P. o. onca*, que es la subespecie morfológicamente descrita en el área de la Amazonía colombiana y Llanos colombianos y en otras partes de la Amazonía peruana y boliviana. Un análisis más exhaustivo de la genética de poblaciones y filogeografía del jaguar puede verse en Eizirik et al. (2001), Ruiz-García (2001, en prensa) y Ruiz-García et al. (2003, 2006b). Para ello, se analizaron 12 STRP (FCA08, FCA24, FCA43, FCA45, FCA96, FCA126, FCA136, FCA176, FCA225, FCA294, FCA391 y FCA506) en 77 jaguares procedentes de la distribución geográfica correspondiente a la subespecie mencionada. Esas muestras fueron recolectadas en Colombia (Departamentos de Caquetá, Meta, Vaupés, Guaviare, Guainía y Amazonas), Perú (ejemplares muestreados a lo largo de los ríos Napo, Curaray, Nanay, Ucayali, Canal del Puinahua, Marañón, Samiria) y Bolivia (en las localidades de Villa Bella, St. Ana de Yacumo, St. Rosa de Vigo a lo largo del río Mamoré). Adicionalmente, se analizaron 30 muestras procedentes de otras subespecies (27 de *centralis*, 1 de *paraguayensis* y 2 de *goldmani*), sumando un total de 107 muestras analizadas. Los objetivos específicos del análisis de resultados con los jaguares fueron los siguientes: 1. Estimar y comparar la variabilidad genética entre las subespecies *onca* y *centralis*; 2. Analizar la posible existencia de equilibrio Hardy-Weinberg en la población amazónica considerada; 3. Determinar el grado de heterogeneidad genética entre las poblaciones de *P. onca onca* de Colombia, Perú y Bolivia, y estimar el flujo genético entre ellas. 4. Determinar el grado de asignación poblacional de los perfiles multi-genotípicos de los diversos jaguares analizados a sus respectivas hipotéticas subespecies (Cornuet et al., 1999); 5. Analizar la posible incidencia de cuellos de botella en las poblaciones amazónicas estudiadas con dos procedimientos diferentes (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart et al., 1998; Garza & Williamson, 2001), al igual que posibles eventos de expansión poblacional (Reich & Goldstein, 1998; Reich et al., 1999) y 6. Determinar posibles números efectivos históricos para la población colombiana de jaguares mediante el método de máxima verosimilitud de Nielsen (1997).

En el caso del ocelote (*Leopardus pardalis*), se analizaron 14 muestras de *L. p. maripensis*, cuyo rango de distribución se encuentra en la zona más oriental de la Amazonía colombiana, además de Brasil y Guyanas, y 49 muestras de *L. p. aequatorialis* procedentes de diferentes puntos de la Amazonía colombiana y peruana, frente a otras 70 muestras de ocelotes representando otras subespecies definidas morfológicamente, tales como *L. p. mearnsi* (Costa Rica, n = 2), *L. p. pseudopardalis* (Colombia y Venezuela, n = 42), *L. p. pusaeus* (Ecuador, n = 14), *L. p. steinbachi* (Bolivia, n = 11) y *L. p. mitis* (Paraguay, n = 1). En total 133 muestras. Se analizaron los mismos 12 marcadores microsatélites que en el caso del jaguar. Los procedimientos moleculares particulares se detallan en Corrales-Duque & Ruiz-García (en prensa) y Ruiz-García et al. (en prensa

b). Los mismos objetivos específicos que fueron determinados para los jaguares, lo fueron, también, para los ocelotes.

Delfín rosado

Otra especie altamente simbólica del Amazonas, es el delfín rosado, boto, bugeo o bufeo (*Inia geoffrensis*). En los últimos tres años analizamos 200 muestras de delfines rosados procedentes de diversos ríos pertenecientes a la distribución geográfica de esta especie: Cuenca del Amazonas, Perú (ríos Napo, Curaray, Ucayali, Tapiche, Canal del Puhinauva, Marañón y Samiria); Colombia (ríos Putumayo y Amazonas). Cuenca del Orinoco: Colombia y Venezuela (ríos Orinoco, Arauca, Guaviare, Bitá). Amazonas boliviano (ríos Mamoré, Iruyañez, Securé, Tijamuchí, Itenez (= Guaporé), Ipurupuru). Procedentes de la amazonía peruana y colombiana se analizaron 109 individuos; procedentes de Bolivia se estudiaron 70 delfines y de la Orinoquía se obtuvieron muestras de 21 ejemplares.

El análisis molecular de los delfines rosados se llevó a cabo con dos metodologías moleculares diferentes. La primera hizo uso de cinco marcadores STRP (Ev37, Ev76, Ev94, Ev96 y KWM2b) con los procedimientos reportados por Valsecchi & Amos (1996) y Hoelzel et al. (1998, 2002). La segunda metodología utilizó la técnica RAPD (Random Amplification Polymorphism DNA) con nueve marcadores oligonucleótidos (A10, AA3, AK5, AK19, C14, D16, G11, M9, OPG03), que previamente habían mostrado ser polimórficos en esta especie. Todos los procedimientos moleculares empleados para ambas técnicas pueden ser obtenidos en Romero-Aleán & Ruiz-García (2006), Ruiz-García & Romero-Aleán (en prensa), Ruiz-García et al. (en prensa a, en prensa e).

Con ambos procedimientos se obtuvieron los siguientes resultados: 1. Determinación de los niveles de variabilidad genética (Nei, 1973); 2. Obtención de estimas indirectas de flujo génico (Nm) entre las poblaciones analizadas; 3. Estimación de identidades y distancias genéticas (Nei, 1972, 1978) entre las poblaciones objeto de estudio; 4. A nivel microgeográfico, es decir, entre lagunas de un mismo río, se determinó la cantidad de flujo génico para un sistema de lagos en el río Ucayali, en el río Marañón y para el sistema fluvial Napo-Curaray en el caso peruano y del río Mamoré en el caso boliviano. También se analizó si las distancias genéticas entre los individuos de diferentes lagunas están correlacionadas con las distancias geográficas entre las mismas (aislamiento por distancia) mediante la prueba normalizada de Mantel (Smouse et al., 1986).

Mono lanudo o churuco

El mono lanudo (*Lagothrix lagotricha lagotricha*) es uno de los primates amazónicos más conocidos ya que, por su gran porte, es cazado habitualmente y las crías utilizadas como mascotas. Por ese moti-

vo, el primer autor (M. R.-G.), en repetidos viajes a las comunidades indígenas cercanas a Leticia (St. Sofía, La Libertad, Zaragoza, El Vergel, Macedonia, Mocagua, Palmeras, St. Martín de Amacayacu; ríos Amazonas y Loreto-Yacu en la Amazonía colombiana), recolectó 30 muestras de esta especie (cráneos, fundamentalmente, y algunas muestras de pelo de crías mantenidas en cautiverio como mascotas). Adicionalmente, se obtuvieron otras 25 muestras de la especie en la región de Loreto en la Amazonía peruana (ríos Napo, Curaray, Nanay, Ucayali, Tapiche, Pacaya, Samiria, Marañón) al visitar el primer autor (M. R.-G.) diversas comunidades indígenas en los ríos comentados (total 55 muestras). Se analizaron 10 STRP. Cuatro de ellos, AP6, AP40, AP68 y AP74, fueron desarrollados para *Alouatta palliata* por Ellsworth & Hoelzer (1998) y los seis restantes, D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S51 y D17S804 fueron desarrollados para humanos y previamente utilizados para *Saimiri boliviensis* (Rogers et al., 1995; Zhong et al., 1995). Los procedimientos de uso de esos microsatélites pueden encontrarse en Ruiz-García et al. (2004, 2006a, 2007) y en Ruiz-García (2005). Los análisis que se llevaron a cabo fueron los siguientes: 1. Determinación de los niveles de diversidad genética (H) para esta especie en la Amazonía colombiana y peruana; 2. Detección de posibles recientes cuellos de botella que afecten la viabilidad de esta especie mediante la técnica de Cornuet & Luikart (1996); y 3. Estimación de números efectivos y números globales en el área estudiada a partir de los niveles promedios de heterocigosis esperada ($H = \text{diversidad genética}$) mediante el modelo mutacional de alelos infinitos (IAM) (Kimura & Crow, 1964) y mediante el modelo mutacional de pasos (SMM, "step-wise", Ohta & Kimura, 1973). Se utilizaron dos posibles estimas de μ . Una de ellas determinada para STRP en humanos (Weber & Wong, 1993), y que presenta una tasa de mutación elevada, $5,6 \times 10^{-4}$. La otra es una tasa de mutación menor, 7×10^{-5} determinada por Ellegren (1995) para STRP con repeticiones dinucleotídicas en cerdos. Para obtener estimas globales se asumieron valores de $N_e / N = 0,15$ y $0,5$ (cociente entre el valor de los números efectivos respecto al número poblacional total). Dietz et al. (1999) determinaron el primer valor para el primate neotropical *Leontopithecus rosalia* del Brasil. El segundo valor proviene de la media aritmética obtenida a partir de las estimas de primates del viejo mundo (Kinnaird & O'Brien, 1991; Nozawa, 1972; Harpending & Cowan, 1986).

Piurí

Uno de los autores (D. A.-P.) obtuvo 58 muestras, básicamente plumas, del piurí (*Crax globulosa*) procedentes de tres islas del río Amazonas, y una bajo jurisdicción colombiana (Mocagua, $n = 46$), y las otras dos bajo jurisdicción peruana (Cacao, $n = 8$; Yaumas, $n = 4$), no separadas por más de 40 km de distancia. Esas plumas se obtuvieron a

partir de recorridos sistemáticos realizados junto con indígenas ticunas y jaguas conocedores de esas islas. Las muestras analizadas presentaron perfiles multi-genotípicos únicos, lo que mostró que representaban diferentes individuos. Se analizaron cinco microsatélites trinucleotídicos (CgAAT11, CgAAT32, CgAAT62, CgAAT82 y CgAAT85; Hughes & Larson, 2000) para los 58 individuos muestreados. Todos los protocolos moleculares empleados pueden verse en Álvarez-Prada & Ruiz-García (en prensa).

Se realizaron los siguientes análisis: 1. Determinación de los niveles de variabilidad genética con STRP; 2. Estimación de los niveles de heterogeneidad genética y flujo génico entre las muestras analizadas procedentes de las tres islas referidas; 3. Cálculo del estadístico $\theta (= 4N_e\mu)$ mediante el método de máxima verosimilitud de Nielsen (1997) y estima de los números efectivos históricos de esas poblaciones de piurí, asumiendo un rango para las tasas mutacionales de $5,6 \times 10^{-3}$ a $5,6 \times 10^{-4}$, ya que este es un rango determinado para STRP en aves; y 4. Detección de cuellos de botella mediante microsatélites.

Resultados y Discusión

En la tabla 1, se muestra de forma comparativa los niveles de variabilidad genética de todas las especies estudiadas, al igual que las estimas de números efectivos y totales encontradas con diversos procedimientos y la posible incidencia de cuellos de botella en cada una de las especies analizadas.

Jaguar

La muestra de jaguares amazónicos procedente de Colombia presentó un número promedio de alelos por locus ($n_A = 11,667 \pm 0,015$) mayor que las muestras procedentes de Perú ($n_A = 7,167 \pm 1,467$) y de Bolivia ($n_A = 7,417 \pm 2,539$), pero esto se debe, probablemente, al mayor tamaño muestral para el primer país. Una medida de riqueza genética menos sesgada que la anterior, la diversidad genética (= heterocigosis esperada) fue prácticamente idéntica para las muestras de los tres países ($H = 0,85 \pm 0,08$, $H = 0,86 \pm 0,07$, $H = 0,86 \pm 0,05$, respectivamente). Nei (1978) demostró que el número de alelos encontrado en una muestra depende del tamaño de ésta, mientras que la diversidad genética es mucho más insensible al tamaño de la misma. La subespecie *onca* presentó más variabilidad genética que la subespecie *centralis*, tanto para $n_A = 12,917 \pm 2,429$ vs $7,334 \pm 2,103$, como para $H = 0,87 \pm 0,04$ vs $0,80 \pm 0,08$, aunque en el caso del último estadístico esa diferencia no alcanzó la significación estadística.

Cuando se analizó la posible existencia de equilibrio Hardy-Weinberg en el seno de la subespecie *onca*, mediante pruebas exactas, todos los marcadores presentaron un exceso significativo de homocigotos, con la excepción de FCA391

($p = 0,0653$). Tomando todos los marcadores conjuntamente, el exceso de homocigotos fue muy elevado estadísticamente ($\chi^2 = \text{infinito}$, 24 gl, $P < 0,000000$). Esto puede interpretarse de dos modos posibles. Existencia de una elevada endogamia en esa población, y/o existencia de una subdivisión geográfica interna que permite la existencia de acervos genéticos diferenciados en la subespecie *onca*. Esta segunda posibilidad, probablemente, sea la más certera porque la endogamia, la cual está asociada con la deriva genética, reduce la diversidad genética de forma sistemática, mientras que en el presente caso los niveles de diversidad genética son muy elevados. Por el contrario, si los diferentes acervos genéticos incluidos en una sola muestra representan cada uno de ellos poblaciones reproductivamente grandes, el efecto de subdivisión reducirá la heterocigosis observada pero no afectará a la heterocigosis esperada (= diversidad genética) como se da en el caso presente.

Cinco de los 12 STRP empleados mostraron heterogeneidad significativa entre las muestras de los tres países (FCA96, $p = 0,00266$; FCA136, $p = 0,0033$; FCA294, $p = 0,00438$; FCA391, $p = 0,00078$; FCA506, $p = 0,01495$). Tomando simultáneamente todos los marcadores empleados, la heterogeneidad también es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 85,219$, 24 gl, $P < 0,0000$). El valor promedio de F_{ST} para los jaguares amazónicos de Colombia, Perú y Bolivia fue $0,017 \pm 0,007$. Aplicando un modelo isla infinito se obtuvo un flujo génico, Nm , de 14,45, mientras que con un modelo isla n -dimensional Nm fue de 6,42. Esos valores de flujo génico son elevados aun cuando existe una heterogeneidad genética significativa entre esas tres muestras amazónicas. Para marcadores con un elevado número de alelos, como ocurre con los STRP, un flujo génico elevado, como el encontrado, puede significar que la mayoría de los alelos detectados se encuentran dispersos por las diferentes poblaciones analizadas pero no necesariamente con las mismas frecuencias alélicas. Esta explicación permite compatibilizar la existencia de heterogeneidades significativas con flujos génicos relativamente elevados.

El porcentaje de correcta asignación poblacional por subespecies resultó elevado. Con el procedimiento "as is" y con el método bayesiano (87,13%) o con las distancias genéticas de Nei (1978) (81,19%) o de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) (80,2%), más del 80% de los individuos estuvieron bien clasificados en sus respectivas subespecies geográficas. Es decir, aunque la heterogeneidad entre esas subespecies es relativamente pequeña (Ruiz-García et al., 2006b), los STRP empleados tienen una cierta eficacia al clasificar cada individuo a la correspondiente subespecie a la que fue asignada "a priori" en función del origen geográfico de la misma.

La aplicación de la técnica de Cornuet & Luikart (1996) para detectar posibles cuellos de botella genéticos recientes en las diversas poblaciones analizadas de jaguares proporcionó los siguientes

resultados: El único caso aparentemente claro de cuello de botella genético reciente fue el de la muestra amazónica peruana. En el caso de la población boliviana, únicamente el test de Wilcoxon con el modelo mutacional IAM mostró un resultado significativo ($p = 0,00671$). Por lo tanto, para esa muestra no existe una evidencia conspicua en favor del fenómeno referido ya que únicamente una de siete pruebas analizadas presentó un valor estadísticamente significativo. Para la población colombiana, y para la subespecie *onca* tomada globalmente, no existió, tampoco, evidencia en favor de la existencia de cuellos de botella. También se aplicó el test de Garza & Williamson (2001), el cual no evidenció la existencia de cuellos de botella afectando a la población colombiana de jaguares. En el siglo XX, el jaguar fue intensamente cazado. Únicamente entre 1968–1970, se cazaron 2.000 jaguares en la región amazónica peruana de Loreto (Ruiz-García et al., 2006b). Solo Estados Unidos importó en 1968, 13.516 pieles de esta especie (Broad, 1987). Aunque el jaguar fue altamente golpeado por la caza de sus pieles, no parece mostrar síntomas evidentes de haber atravesado un cuello de botella genético con la excepción de la población peruana comentada.

Por el contrario, cuando se aplicó el test g (Reich & Goldstein, 1998; Reich et al., 1999) para detectar una posible expansión poblacional, ésta sí fue detectada ($g = 0,0998$, $p < 0,05$). Es decir, el jaguar es una especie que muestra en su genoma la firma inequívoca de una expansión poblacional. Eizirik et al. (2001) también detectaron signos de expansión poblacional en el jaguar a partir del análisis de secuencias mitocondriales.

Mediante el procedimiento de máxima verosimilitud de Nielsen (1997), se determinaron números efectivos históricos a largo plazo para esta especie en territorio colombiano (tabla 1). Asumiendo una tasa de mutación de $5,6 \times 10^{-4}$, esos valores oscilaron entre 10.000 y 11.000 jaguares, mientras que asumiendo una tasa de mutación por generación de $2,5 \times 10^{-4}$, esos valores oscilaron entre 22.000 y 24.000 animales. Las muestras globales analizadas de jaguares colombianos provienen de todas las eco-regiones y departamentos de ese país sudamericano donde el jaguar todavía habita, por lo que las estimas poblacionales presentadas pueden ser representativas para toda Colombia.

Ocelote

La diversidad genética en el conjunto global de ocelotes analizados, medida como el número promedio de alelos encontrados por marcador (n_a) y la heterocigosis esperada (H), fue muy elevada ($n_{aH} = 17,33$; $H = 0,905$). Los valores de heterocigosis esperada para las dos subespecies que encontramos en la Amazonía colombiana fueron muy elevados ($H = 0,930$, *L. p. maripensis*; $H = 0,914$, *L. p. aequatorialis*) y muy similares a los estimados en otras poblaciones de ocelotes geográficamente di-

ferentes ($H = 0,868$, *L. p. pseudopardalis*; $H = 0,853$, *L. p. steinbachi*; $H = 0,941$, *L. p. pusaeus*). Esto significa que todas las poblaciones de ocelotes analizadas poseen una enorme riqueza genética desde esta perspectiva molecular.

Al aplicar diversos procedimientos (pruebas exactas con cadenas de Markov) para determinar si ambas poblaciones amazónicas de ocelotes estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, se observó que la ausencia de este equilibrio se manifestó más profundamente en *L. p. aequatorialis* que en *L. p. maripensis*. Para la segunda subespecie, únicamente FCA45 ($p = 0,0002$) y FCA96 ($p = 0,0000$) no presentaron equilibrio Hardy-Weinberg. Por el contrario, para la primera subespecie citada, 10 de los 12 marcadores no mostraron equilibrio. Concretamente, FCA08 ($p = 0,0000$), FCA24 ($p = 0,0247$), FCA43 ($p = 0,0000$), FCA45 ($p = 0,0000$), FCA96 ($p = 0,0000$), FCA126 ($p = 0,0180$), FCA176 ($p = 0,0001$), FCA225 ($p = 0,0018$), FCA391 ($p = 0,0343$) y FCA506 ($p = 0,0000$). En todos los casos, la desviación se produjo por exceso de homocigotos. Desde la perspectiva genética poblacional esto es interpretable, básicamente, como la posible acción de dos eventos diferentes. O bien, la subespecie *L. p. aequatorialis* presenta niveles de endogamia muy superiores al acervo representado por *L. p. maripensis* y/o existe mayor fragmentación (= subdivisión geográfica = efecto Wahlund) en la primera población respecto a la segunda. Si esta segunda opción es la más válida, entonces, parece existir más heterogeneidad en el seno de la población de ocelotes que se sitúa al oeste de la Amazonía colombiana y en la Amazonía peruana que al este de la Amazonía colombiana.

La obtención del estadístico F_{ST} permitió determinar cuál es el grado de heterogeneidad genética entre ambas posibles subespecies de ocelotes en la zona Amazónica objeto de estudio. Este valor fue, $F_{ST} = 0,0011$, lo cual significa que ambas poblaciones de ocelotes compartieron un 99,89% de la varianza genética detectada. Este resultado aboga en favor de que ambas supuestas subespecies, en realidad, constituyen una única población molecularmente hablando. Esto se ratifica cuando se obtuvieron estimas de flujo génico entre ambas subespecies nominales. A partir del estadístico θ ($= F_{ST}$), el flujo génico fue $Nm = 227,02$, únicamente superado por el obtenido entre *L. p. aequatorialis* y *L. p. pusaeus*, $Nm = 499,75$. Esos valores de flujo génico son elevadísimos y denotan que esas poblaciones, en realidad, forman un continuo genético (*maripensis*, *aequatorialis*, *pusaeus*).

El fenómeno comentado se manifiesta claramente cuando se aplicó un análisis de asignación poblacional mediante el programa GeneClass (Cornuet et al., 1999). Con simulación directa, esos porcentajes oscilaron entre el 1,53% (con la distancia genética $\delta\mu^2$; Goldstein et al., 1995) y el 34,58% (con la distancia genética de Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Con simulación bayesiana, los resultados fueron similares. Entre el 0% (con la distancia genética $\delta\mu^2$) y el 39,23% (con la distan-

cia DAS). Esto es, en el caso más propicio únicamente el 39% de los ejemplares analizados pudieron ser correctamente asignados a la supuesta subespecie morfológica a la que fueron clasificados "a priori" por su origen geográfico. Es una evidencia más de la inexistencia de grupos bien configurados y definidos, posiblemente por la existencia de un flujo génico histórico elevado entre esas poblaciones de ocelotes.

En el caso de *L. p. maripensis* y de *L. p. aequatorialis*, se determinó poca evidencia en favor de un cuello de botella reciente con el método de Cornuet & Luikart (1996). Exactamente, lo mismo se determinó para la otra subespecie colombiana de ocelote (*L. p. pseudopardalis*). Cuando se analizaron exclusivamente los ocelotes procedentes de Perú, sí se obtuvo evidencia de un cuello de botella ostensible. Por lo tanto, la población de ocelotes de Perú, al igual que ocurrió con la población de jaguares de la Amazonía peruana, podría estar reflejando el fuerte impacto de la cacería por pieles que azotó a esta especie en las décadas de los 60 y los 70 del siglo XX. Recuérdese que durante ese periodo, más de 200.000 pieles de ocelotes fueron exportadas anualmente desde Latinoamérica (Gieteling, 1972). De 1976 a 1983, un promedio de 24.600 pieles de esta especie se siguieron comercializando desde Latinoamérica (Broad, 1987). Similar presión recibieron otras especies de pequeños felinos manchados, incluso más escasos, que el ocelote. Broad (1987) registró un promedio de 13.934 pieles de margay (*Leopardus wiedii*) exportadas desde América Latina hacia Norte América y Europa. Igualmente, Broad (1988) registró la exportación, en 1983, de 84.500 pieles de tigrillo (seguramente en esa categoría se reúnen pieles de todos los pequeños felinos manchados sudamericanos) únicamente desde Paraguay. Por lo tanto, a pesar de la elevada variabilidad genética determinada para esta especie, no debe resultar extremadamente insólito detectar ciertas poblaciones de ocelotes que registren la inequívoca firma de un reciente cuello de botella afectando a sus genomas. De hecho, el análisis global de 133 muestras de ocelotes procedentes de toda Latinoamérica, con dos procedimientos analíticos diferentes, mostró rastros de la posible presencia de un cuello de botella afectando a la especie como un todo en cuestión (Ruiz-García et al., en prensa b). Por lo tanto, pese a encontrarnos ante una especie de una amplia variabilidad genética, y de un fuerte potencial evolutivo, también nos encontramos ante una especie que sufre los efectos de un cuello de botella, probablemente, por la devastadora acción humana.

Para ninguna de las poblaciones analizadas, se detectaron eventos de expansión poblacional al aplicar el test g de Reich & Goldstein (1998). Por lo tanto, a diferencia de lo determinado para el jaguar, las poblaciones de ocelote no muestran evidencias de una expansión poblacional, lo cual se correlaciona con la detección de los cuellos de botella reportados para algunas poblaciones.

Tabla 1. Análisis comparativo de los niveles de diversidad genética (heterocigosis esperada = H), números totales históricos calculados a partir de números efectivos mediante diversos procedimientos, existencia de cuellos de botella (CB) y de eventos de expansión poblacional (EP) en cinco especies amazónicas (jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piuri) mediante marcadores microsatélites (STRP): * Números efectivos calculados a partir del método de máxima verosimilitud de Nielsen (1997) asumiendo diversas tasas de mutación por generación; ** Estimaciones más probables; *** Números efectivos calculados a partir de los niveles de heterocigosis; IAM. Modelo mutacional de los alelos infinitos; SMM. Modelo mutacional por pasos ("step-wise").

Table 1. Comparative analyses of the gene diversity levels (expected heterozygosity = H), total historical numbers estimated throughout the effective numbers by means of different procedures, existence of bottleneck events (CB) and population expansion events (EP) in five Amazonian species (jaguar, ocelot, pink river dolphins, woolly monkey and wattled curassow) by using microsatellite (STRP) markers: * Effective numbers estimated by means of Nielsen's (1997) maximum likelihood procedure assuming diverse mutation rates per generation; ** Most probable estimates; *** Effective numbers calculated from heterozygosity levels; IAM. Infinite Allele Mutation model; SMM. Step-wise mutation model.

Especies	Diversidad genética	Números históricos	CB	EP
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)				
Colombia	H = 0,84	10.000–11.000 (5,6 x 10 ⁻⁴)* 22.000–24.000 (2,5 x 10 ⁻⁴)*	total: No total: No <i>onca</i> total: No <i>onca</i> Colombia: No <i>onca</i> Bolivia: No <i>onca</i> Perú : Si	total: Si
Ocelote (<i>Leopardus pardalis</i>)				
Total	H = 0,905	39.168 (5,6 x 10 ⁻⁴)*	total: Si	total: No
<i>maripensis</i> :	H = 0,930	87.410	<i>maripensis</i> : No	
<i>aequatorialis</i> :	H = 0,914	(4,5 x 10 ⁻⁵)*	<i>aequatorialis</i> : No	
<i>pseudopardalis</i> :	H = 0,868	656.495	<i>pseudopardalis</i> : No	
<i>steinbachi</i> :	H = 0,853	(3,34 x 10 ⁻⁵)*,**	Peru: Si	
<i>pusaeus</i> :	H = 0,941	1.176.060 (1,86 x 10 ⁻⁵)*,**		
Delfin rosado (<i>Inia</i> sp.)				
Bolivia	H = 0,4586	No calculado	Bolivia: Si	No
Perú	H = 0,6385		Resto: No	
Putumayo	H = 0,6003			
Orinoco	H = 0,6041			
Mono lanudo (<i>Lagothrix lagotricha</i>)				
Amazonia colombiana y peruana	H = 0,538	5,6 x 10 ⁻⁴ *** IAM: 3.467 SMM: 5.487 Ne / N = 0,15 1.040 Ne / N = 0,50 7 x 10 ⁻⁵ *** 27.727 43.867 Ne / N = 0,15** 8.318 13.160 Ne / N = 0,50	Si	No
Piuri (<i>Crax globulosa</i>)				
Tres islas amazónicas		545	Probable: No	Probable: Si
Mocagua	H = 0,785	(5,6 x 10 ⁻³)*		
Cacao	H = 0,873	5.459		
Yaumas	H = 0,861	(5,6 x 10 ⁻⁴)*		

A nivel global, se determinaron posibles números efectivos históricos en la población de ocelotes mediante el procedimiento de máxima verosimilitud de Nielsen (1997) (tabla 1). A partir de la estimación del parámetro θ ($= 4N_e\mu$) se utilizaron dos tasas de mutación reportadas por Ruiz-García et al. (en prensa d) específicas para ocelotes. Las estimas obtenidas fueron 1.865×10^{-5} y 3.341×10^{-5} , respectivamente. Los valores obtenidos de números efectivos pueden ser reconvertidos a números poblacionales totales si conocemos el valor de N_e/N . Ludlow & Sunquist (1987) determinaron, mediante procedimientos ecológicos, que una población efectiva de 500 ocelotes se correspondería con una población total de 1.334 ejemplares. Esto ofrece un valor de $N_e/N = 0,4$. Por otra parte, Emmons (1988) estimó una población mínima de ocelotes en los bosques de Latinoamérica de unos 800.000 ejemplares. Además sugirió que los valores más reales podrían estar entre 1,5 y 3 millones de individuos. Con esas tasas de mutación, el número de ocelotes oscilaría entre 657.000 y 1.176.000 de ejemplares, lo cual coincidiría con el límite inferior de Emmons (1988). La misma arrojaría cerca de un millón de individuos, mostrando que la elevada diversidad genética estimada en esta especie es paralela a la existencia de grandes tamaños poblacionales todavía hoy en día, pero que la incidencia de cuellos de botella, podría revelar el peligro que se podría estar cerniendo sobre esta especie.

Delfín rosado

Los resultados correspondientes al delfín rosado mediante el uso de STRP fueron los siguientes. En la tabla 1 se muestran los niveles de diversidad genética, y otros estadísticos, para las poblaciones de delfines muestreadas en los ríos de Bolivia, de la Orinoquía, de Perú y del Putumayo colombiano. La población peruana mostró el número promedio de alelos más elevado ($n_A = 6,5$) y, también, la diversidad genética mayor ($H = 0,6385$), aunque de un orden similar, y no significativamente diferente, a los valores encontrados en el Putumayo colombiano y en la Orinoquía. La población boliviana, por el contrario, presentó el menor número promedio de alelos por locus ($n_A = 4,4$) y la variabilidad genética menor ($H = 0,4586$). Las muestras de delfines de los ríos peruanos y del río Putumayo en Colombia mostraron una estima de $Nm = 9,46$, lo que significa que existe una fuerte similitud genética entre las poblaciones de delfines rosados de esos ríos. Este resultado pone de manifiesto claramente que los delfines de la Amazonía occidental forman un acervo genético bastante compacto y altamente diferenciable de los acervos genéticos del Orinoco y de la Amazonía boliviana. La figura 1 muestra un árbol con el método Neighbour-Joining (NJ) y la identidad de coancestralidad. Aunque la relación entre las poblaciones del Orinoco y Bolivia puede ser espúrea desde el punto de vista biológico, ese árbol muestra varios detalles interesantes. En primer lugar, la población peruana y la población del

Putumayo están altamente relacionadas, pero esta última ha sufrido un mayor proceso de deriva genética (o de algún proceso evolutivo diferenciador) que la primera. Esa fuerte relación genética podría ser explicada por la existencia de puntos de conexión entre el río Putumayo y el río Napo, o algunos de sus afluentes, como ocurre a la altura del río San Miguel en la época de aguas altas. Los delfines rosados son conocidos por su extraordinaria habilidad de nadar sin problemas en la selva inundada donde obtienen buena parte de los peces que constituyen sus presas en la época de aguas altas. En segundo lugar, la población boliviana es la que más deriva genética ha sufrido de todas las poblaciones consideradas. Por eso la longitud de su rama es la mayor. Eso confirma lo encontrado con marcadores mitocondriales por Banguera-Hinestroza et al. (2002). La población boliviana parece haberse originado por un efecto fundador hace unos cinco o seis millones de años cuando se originaron los 400 km de rápidos y cachuelas en la parte alta del río Madeira y en la parte baja de los ríos Beni y Mamoré. Un reciente análisis de secuencias de un gen del Complejo Mayor de Histocompatibilidad también diferencia los individuos bolivianos de ejemplares de otras zonas de la Amazonía y Orinoquía (Martínez-Agüero et al., 2006).

Con los marcadores RAPD, la población de delfines rosados del Orinoco mostró el nivel de diversidad genética más elevado ($H = 0,2921$) con una tasa de polimorfismo (tp) del 79,15%. La segunda población con mayor diversidad fue la de Perú ($H = 0,2113$; $tp = 85,31\%$). La población más depauperada genéticamente fue la de Bolivia ($H = 0,1192$; $tp = 38,86\%$). Este resultado coincide básicamente con lo mostrado anteriormente para los STRP y, también, concuerda con lo encontrado mediante el estadístico θ ($= 4N_e\mu$) con 10 marcadores microsátélites, ya que la población boliviana fue la que mostró siempre una menor riqueza genética (Ruiz-García et al., en prensa c). La cantidad de heterogeneidad genética encontrada entre todas las poblaciones estudiadas fue moderadamente elevada ($G_{ST} = 0,1942$), aunque inferior a la encontrada con otros marcadores moleculares (secuencias de región de control del ADN mitocondrial, $\phi_{ST} = 0,97$ entre las muestras del Putumayo y Bolivia, $\phi_{ST} = 0,92$ entre Orinoco y Bolivia, y $\phi_{ST} = 0,76$ entre Orinoco y Putumayo; Banguera-Hinestroza et al., 2002), pero paralela a la encontrada con los cinco marcadores STRP referidos anteriormente. Las poblaciones más similares entre sí (identidad genética) fueron, de nuevo, las correspondientes a diversos ríos peruanos con respecto a la población del Putumayo colombiano ($I = 0,9709$). Las poblaciones de delfines rosados de la Amazonía occidental, en una escala macrogeográfica (ríos amazónicos peruanos, colombianos y presumiblemente ecuatorianos), resultan extremadamente homogéneas para marcadores genéticos nucleares. Esto significa que en el momento de la colonización de esta región

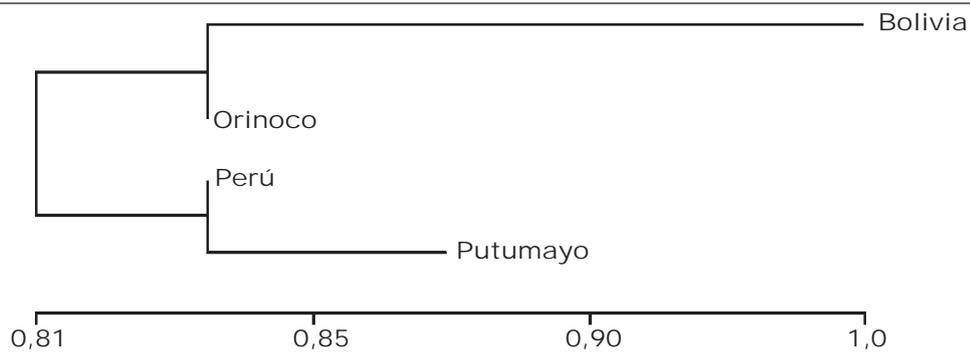


Fig. 1. Árbol "neighborg-joining" utilizando la identidad de coancestralidad mostrando las relaciones genéticas entre cuatro poblaciones de delfines rosados (*Inia* sp.) a partir de cinco marcadores microsatélites.

Fig. 1. Neighbour-joining tree employing the coancestrality identity showing the genetic relationships between four pink river dolphin (*Inia* sp.) populations by means of five microsatellite markers.

amazónica por parte de esta especie, esta colonización fue homogénea y procedente de un mismo acervo genético ancestral. La convergencia de los resultados entre marcadores RAPD y microsatélites es notable y ratifica el aspecto mencionado.

A nivel microgeográfico, se analizaron las poblaciones de delfines en diferentes lagunas de Bolivia y de Perú mediante RAPD. La heterogeneidad genética entre 17 lagunas peruanas (sistema de ríos Ucayali, Marañón y Napo-Curaray) fue considerable ($G_{ST} = 0,2302$), con un flujo génico pequeño entre ellas ($Nm = 0,836$). En el caso de nueve lagunas bolivianas (sistema de ríos Mamoré e Iténez), la heterogeneidad genética fue todavía superior ($G_{ST} = 0,3953$), con un flujo génico, prácticamente inexistente, entre las poblaciones de delfines de las diversas lagunas consideradas ($Nm = 0,382$). Esto muestra que existe una limitada interconexión genética entre los delfines de diferentes lagunas en sistemas fluviales contiguos. Aunque no existen estudios ecológicos u etológicos que muestren claramente cuál es la dinámica poblacional de los delfines rosados, los trabajos de Martin & Da Silva (2004a, 2004b) parecen mostrar una fuerte filopatría, especialmente, en el caso de las hembras.

Se aplicó la prueba de Mantel (1967), para determinar si la heterogeneidad genética detectada a nivel microgeográfico en los citados ríos peruanos y bolivianos seguía un modelo de aislamiento por distancia (Wright, 1943). En el caso peruano, la situación fue la siguiente. Cuando se consideraron globalmente todas las lagunas de los tres sistemas fluviales peruanos estudiados, se detectó evidencia significativa de aislamiento por distancia, tanto al utilizar la distancia geográfica del gran círculo de Sphuler (1972) ($r = 0,46917$; $p = 0,001$) como la distancia geográfica lineal a lo largo del curso de los ríos ($r = 0,45123$; $p = 0,001$). Esto significa que, en ambos casos, la

distancia geográfica explica el 22,01% y el 20,36%, respectivamente, de las diferencias genéticas detectadas entre los puntos de muestreo en los ríos peruanos. Por el contrario, dentro de cada sistema fluvial peruano, no se detectó aislamiento por distancia. Para el río Ucayali, incluso, existió una relación negativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (las muestras más distantes geográficamente resultaron las más similares genéticamente). En el caso boliviano, el aislamiento por distancia fue de mayor magnitud que en el caso peruano. El aislamiento por distancia, únicamente en este río, fue muy considerable (distancia de Sphuler, $r = 0,6743$; $p = 0,014$), ya que la distancia geográfica explicó el 45,47% de las diferencias genéticas entre los delfines de diversas lagunas. Cuando se analizaron conjuntamente los ríos Mamoré e Iténez (= Guaporé), el aislamiento por distancia fue extremadamente elevado ($r = 0,89604$; $p = 0,001$). La distancia geográfica determinó el 80,29% de las distancias genéticas entre los puntos de muestreo. Esto muestra claramente la existencia de estructura espacial significativa a lo largo del río Mamoré y del Mamoré-Iténez. También se debe anotar que, globalmente, las poblaciones peruanas mostraron evidencia de aislamiento por distancia, pero se necesitó evaluar los resultados obtenidos en tres cuencas fluviales diferentes y donde las distancias geográficas implicadas estuvieron cerca de los 1.000 km. Este resultado implica la existencia de diferentes patrones demográficos e históricos que han acontecido en los ríos de ambos países. Una mayor antigüedad de la población peruana y la inexistencia de barreras geográficas obvias en los ríos de la Amazonía de ese país (rápidos, saltos, etc) han podido evitar la formación de estructura espacial significativa para los marcadores RAPD estudiados. Por el contrario, la forma-

ción más reciente, en alopatria, de la población boliviana (Banguera-Hinestroza et al., 2002) y la existencia de barreras geográficas (cachuelas, rápidos) en el entorno del río Mamoré, y afluentes, han podido impedir que el flujo génico histórico haya homogenizado la distribución de características genéticas entre las poblaciones de delfines rosados en esos ríos bolivianos. Igualmente, la existencia de una heterogeneidad genética, relativamente elevada entre diferentes lagunas de un mismo río, favorece la idea de una elevada filopatria reproductiva en los delfines rosados.

Desde la perspectiva de la conservación biológica, varios resultados son relevantes. En primer lugar, la población de delfines de la Amazonía occidental parece saludable desde la perspectiva genética y parece conformar un acervo, más o menos, homogéneo en la escala geográfica mostrada, aunque la población de delfines del Putumayo parece evidenciar una mayor acción de la deriva genética que las poblaciones peruanas. Igualmente, este acervo genético se diferencia notablemente de aquel del Orinoco y, especialmente, del encontrado en Bolivia, lo que refuerza que esta última población constituye una entidad evolutiva independiente de las otras poblaciones estudiadas de delfines rosados, convergiendo con lo observado mediante marcadores genéticos mitocondriales (Banguera-Hinestroza et al., 2002). En segundo lugar, la población boliviana parece más vulnerable, desde la perspectiva conservacionista, ya que su variabilidad genética es menor y, sobre todo, porque existe menor interacción genética entre sus poblaciones, lo cual ha creado una estructura espacial significativa.

Mono lanudo

En el caso del mono lanudo (*Lagothrix lagotricha*), la diversidad genética estimada ($H = 0,538$) es moderada, aunque superior a la encontrada en otras primates neotropicales (ver Ruiz-García, 2005). En la tabla 1 se muestran los números efectivos y totales históricos obtenidos mediante los valores promedios de H , asumiendo un modelo de alelos infinitos y un modelo de pasos, al igual que asumiendo valores de $N_e/N = 0,15$ y de $0,5$. Para la tasa de mutación de $5,6 \times 10^{-4}$, los valores totales oscilarían entre 1.000 y 5.500 ejemplares aproximadamente, mientras que para la tasa de mutación de 7×10^{-5} , las estimas globales oscilarían entre 8.000 y 44.000 individuos. Es posible que estas últimas estimas pudieran estar más próximas a los números poblacionales actuales que las primeras, aunque, en realidad, no tenemos certeza de esos valores porque no existen estimas poblacionales de monos lanudos en la Amazonía peruana y colombiana. Si fuera así, eso significaría que la tasa de mutación menor y el cociente $N_e/N = 0,15$ podrían situarse más próximos a la realidad.

De trece especies analizadas de primates neotropicales (Ruiz-García, 2005), únicamente la

muestra de mono lanudo, aquí comentada, mostró evidencia robusta de haber atravesado un cuello de botella reciente. Por lo tanto, esta es una especie en una situación claramente vulnerable en el área amazónica considerada. El cuello de botella por el que puede estar pasando este primate es relativamente fácil de entender. Las comunidades indígenas y los colonos la utilizan como carne de monte. Redford (1992) comenta un ejemplo altamente dicente. Los 230 habitantes de tres comunidades Waorani en la Amazonía ecuatoriana cazaron 562 monos lanudos en menos de un año. Esta es una especie con una capacidad reproductiva pequeña y donde una generación puede oscilar entre siete y 10 años. Por lo tanto, la presión de caza directa, al igual que la destrucción del hábitat, son factores que explican fielmente el cuello de botella genético detectado. Esta es una especie en la que se deberían centrar muchos planes de conservación y de monitoreo genético para determinar si, paulatinamente, se incrementan los efectos procedentes del cuello de botella detectado y poder proceder a neutralizarlos.

Piurí

A priori, se esperaba que los niveles de diversidad genética en esta especie fueran bajos, ya que nos encontramos con un organismo en una situación demográfica crítica. En la zona de estudio, un censo conducido en 2004 (S. Bennett, com. pers.) determinó, aproximadamente, la existencia de unos 150–200 ejemplares. Pero, contrariamente a esa premisa, los niveles de variabilidad genética fueron muy elevados para los 58 ejemplares analizados con microsatélites. Los niveles promedios de heterocigosis esperada para cada una de las tres poblaciones analizadas fueron $0,785 \pm 0,093$ (Mocagua), $0,873 \pm 0,036$ (Cacao) y $0,861 \pm 0,127$ (Yaumas), lo cual revela unos niveles de variabilidad genética extremadamente elevados en poblaciones tan pequeñas.

Al analizar la heterogeneidad genética entre las muestras de las tres islas, se observó que tres marcadores (CgAAT11, CgAAT62, CgAAT85) mostraron diferencias significativas entre esas poblaciones. De hecho, el análisis de heterogeneidad por pares de poblaciones reveló que, en dos casos, Mocagua-Cacao ($p = 0,00986$) y Mocagua-Yaumas ($p = 0,00298$) se encontraron diferencias significativas utilizando simultáneamente todos los marcadores empleados. Curiosamente, las dos islas más lejanas (Cacao y Yaumas) no presentaron diferencias significativas globales entre ellas. Pero, igualmente, es observable que el valor promedio de la heterogeneidad es relativamente muy pequeño ($F_{ST} = 0,027 \pm 0,013$). De hecho, las estimas teóricas de flujo génico encontradas muestran ese hecho. Para el valor promedio de F_{ST} , se estimó un flujo génico, $Nm = 9$, que se puede considerar notable. Por lo tanto, aunque se obtuvo una cierta evidencia de heterogeneidad genética entre las poblaciones estudiadas de piurí, podemos afirmar

que las muestras estudiadas proceden, en realidad, de una única gran población. Por lo tanto, existe evidencia clara que las poblaciones de estas aves en esas tres islas están conectadas genéticamente pese al tamaño poblacional registrado tan pequeño y pese a que no se poseen reportes de migraciones de este crácido desde la isla Mocagua hacia la zona de tierra firme, o hacia otras islas, durante la época de sequía del río Amazonas. Al aplicar el método de Nielsen (1997), asumiendo tasas de mutación por generación que oscilaron entre $5,6 \times 10^{-3}$ a $5,6 \times 10^{-4}$, se obtuvo que el número efectivo de la región geográfica analizada varió entre 545 y 5.459 individuos ($\theta_{\text{Uni-Step}} = 12.229 \pm 4.155$; $\theta_{\text{Multi-Step}} = 14.094 \pm 6.155$). Resulta evidente que los números efectivos estimados son más elevados que el tamaño censal actual de esa población en el área estudiada (150–200 animales). Esto nos induciría a pensar que la mencionada población debe haber pasado un cuello de botella genético. Sin embargo, cuando se aplicó el método de Cornuet & Luikart (1996) para la detección de este fenómeno, no se evidenció claramente la existencia del mismo. Incluso, la distribución de parejas de secuencias (Rogers & Harpending, 1992) evidenció una expansión poblacional para el gen mitocondrial ND2 (resultados no mostrados). Estos resultados podrían parecer paradójicos ya que se obtuvieron números efectivos bastante más grandes que los números censales actuales que son en extremo pequeños y no se constató evidencia consistente de cuello de botella e, incluso, se determinó una posible expansión poblacional. Sin embargo, debe diferenciarse conceptualmente entre un cuello de botella genético y un cuello de botella demográfico. Resulta evidente que esta población experimenta un intenso cuello de botella demográfico pero este hecho no parece haber tenido, todavía, repercusión a nivel genético. Desde el punto de vista de la conservación biológica este es un hecho notable y afortunado. Pese a una reducción demográfica notable, la riqueza genética del piurí es enorme y no parece haberse visto afectada de forma apreciable por el primer evento.

Por lo tanto, la población analizada es aparentemente viable desde la perspectiva genética. Parece que no es necesario introducir individuos de otras localidades para aumentar la variabilidad genética o realizar cría de individuos "ex situ" con cruzamientos entre animales de diferentes orígenes para una posterior reintroducción. Lo que se torna altamente deseable es tomar medidas estrictas para proteger a esta especie de la caza y de la introducción de posibles enfermedades (gripe aviar, por ejemplo), así como de una protección enérgica de su hábitat insular.

Es posible que algunas de las especies estudiadas y que consideramos que son especies claves (jaguar y delfín rosado, claramente; ocelote y, mas improbablemente el mono lanudo, deberían ser estudiadas desde esta perspectiva), además, sean especies dirigentes, o conductoras, en el sentido de Walker (1992). Esto es, especies que tienden a ser

responsables de la estructura y función del sistema ecológico en el que habitan. Como comentábamos anteriormente, el jaguar y el delfín rosado son especies claves, además, de especies sombrilla y bandera (necesitan grandes espacios para vivir y son emblemáticos para los lugareños, quienes poseen cientos de historias y mitos en su entorno, y también para los foráneos). Su importancia ecológica es del mismo rango que otras especies claramente identificadas como claves. Sería el caso de la estrella de mar (*Pisaster ochraceus*) de la costa Pacífica de América del Norte (Payne, 1969), del elefante africano (*Loxodonta africana*) (Owen-Smith, 1989), del castor (*Castor fiber*) (Snodgrass, 1996), o de la nutria marina (*Enhydra lutris*) (Estes & Palmisano, 1974). Definitivamente, el jaguar y el delfín rosado son especies claves. Si el primero desapareciera, el control biológico de otras muchas especies (pecaríes, tapires, ciervos, primates, caimanes, tortugas, etc) se vería drásticamente afectado y la presión de los segundos por diferentes especies vegetales aumentaría considerablemente, cambiando la composición vegetal de la selva amazónica. Terborgh (1988) describió que predadores de gran tamaño controlan poblaciones de predadores de semillas y de este modo preservan la estabilidad de la comunidad vegetal. Si desapareciera el delfín rosado, uno de los grandes predadores piscícolas de los ríos amazónicos y orinoquenses, se dejaría de controlar las poblaciones de decenas y decenas de especies de peces, cambiando la composición ictiológica de esos ríos. Seguramente, al cambiar la composición ictiológica, muchos ciclos biológicos y de nutrientes de los ríos neotropicales se verían afectados de forma considerable. En general, la extracción de grandes vertebrados, especialmente los que ocupan posiciones en la cúspide de la cadena trófica, puede causar fuertes oleadas de extinción en sistemas naturales complejos (Pimm, 1991). Igualmente, las especies de cuerpo grande acostumbran a tener rangos de movimiento y dispersión mucho mayores que las especies corporalmente pequeñas y pueden ser consideradas especies clave porque viven en simpatria con muchas otras especies. Por ejemplo, East (1981) comentó que la preservación de poblaciones viables de licaón (*Lycan pictus*) y de guepardo (*Acinonyx jubatus*), debido a sus grandes espacios de caza, podría ser suficiente para la conservación a largo término de las comunidades de grandes mamíferos africanos.

La clasificación del ocelote y del mono lanudo como especie clave es más conflictiva. El primero no es un predador de gran porte como el jaguar y es bastante más abundante. Sin embargo, es posible que controle buena parte de la fauna de pequeños mamíferos, aves e invertebrados y que su desaparición tuviera una fuerte repercusión en el ecosistema a través de esas especies. El mono lanudo es un dispersor de semillas y, por lo tanto, ejerce una importante función en el mantenimiento del bosque amazónico, aunque otras especies de mamíferos también lo hacen de forma similar (*Ateles*, *Alouatta*, *Pithecia*, *Cacajao*, perezosos, *Agouti* y *Dasyprocta*).

Todas las especies estudiadas son especies sombrilla (quizá con la excepción del piurí) porque necesitan grandes espacios, muchas veces inalterados, para sobrevivir. Todas, efectivamente, son especies bandera porque son llamativas, apreciadas estéticamente, y conmueven los corazones de muchas personas interesadas por su supervivencia (el piurí también podría ser una excepción). Sin embargo, este último es una especie indicadora y de enorme valor económico y cultural en el pequeño entorno amazónico donde sobrevive. El concepto de especie bandera es interesante porque es más fácil vender al gran público la imagen de una especie nacional espectacular que intentar transmitirle las múltiples interacciones de complicadas redes ecológicas, como ocurre en el bosque húmedo neotropical (Mallinson, 1991). El ejemplo del oso panda como símbolo de "World Wide Fund for Nature" habla en este sentido. La utilización del concepto de especie bandera aplicado "in situ" ha dado buenos resultados en algunos casos, aunque generalmente son excesivamente costosos. Kleiman et al. (1991) estimó que la protección del tití dorado (*Leontopithecus rosalia*) costó anualmente 136.000 dólares \$USA durante una década. Es posible que especies como el jaguar o el delfín rosado necesiten esas cantidades para su conservación efectiva, aunque genéticamente parecen estar en una buena condición. Sin embargo, la protección del jaguar, del mono lanudo, o del delfín rosado, ya sea porque son especies clave, sombrilla o bandera no incorpora la conservación de trazos genéticos y evolutivos característicos de las otras especies estudiadas. Por ejemplo, las dos especies más similares desde la perspectiva filogenética (jaguar y ocelote) muestran notables discrepancias en su dinámica evolutiva. Ambas especies se caracterizan por poseer diversidades génicas elevadas y números efectivos importantes, aunque en una magnitud considerablemente superior en el caso del ocelote. No obstante, existió una considerable mejor asignación poblacional entre las diversas subespecies de jaguares presente en Colombia que entre las subespecies de ocelote. Esto significa que la translocación, o re-introducción, de ocelotes en el área amazónica conlleva menos problemas genéticos (no se encontraron diferencias genéticas entre las poblaciones amazónicas de ocelotes de Colombia, Perú y Ecuador) que en el caso del jaguar, especie en la que se determinó heterogeneidad significativa entre las poblaciones amazónicas de Colombia, Perú y Bolivia. Por lo tanto, se deben tener muchas más precauciones en el posible intento de reubicación de jaguares en el entorno amazónico respecto a lo que ocurriría con los ocelotes. En este último se detectó evidencia más conspicua de la existencia de cuellos de botella recientes que en el jaguar. Esto es, en áreas geográficas donde una población de jaguares podría estar en una situación relativamente adecuada, la correspondiente población de ocelotes puede estar atravesando un cuello de botella genético y necesitar

de medidas de protección urgentes que el jaguar podría no estar necesitando. Por el contrario, el jaguar muestra un sello inequívoco de una expansión poblacional, mientras que el ocelote no lo hace. Esto induce a pensar que el jaguar es una especie mucho más moderna en la Amazonia que el ocelote, que puede representar un linaje de felinos mucho más antiguo en esta área. Sin embargo, ambas especies parecen haber sido más afectadas genéticamente en la Amazonía peruana que en otros lugares, lo que induce a pensar que la caza de estos felinos y la destrucción de hábitat ha podido ser más importante en territorio peruano que en la Amazonía colombiana o boliviana.

Discusión comparativa

Los resultados obtenidos muestran como la historia evolutiva de cada una de las especies estudiadas está llena de particularidades únicas, lo cual obliga a que cualquier política de conservación tenga que ser específica para cada una de ellas. Lo que parecen tener en común todas las especies estudiadas es que ninguna de ellas necesita de programas "ex-situ", o de introducción de animales con características genéticas diferentes, para elevar los niveles de diversidad génica en sus respectivas poblaciones naturales. Por lo tanto, lo que es prioritario es la no destrucción del hábitat acuático, en el caso del delfín rosado, más estrictas medidas de control de la caza y la no alteración del hábitat terrestre para las otras cuatro especies. Para ello, es indispensable la aplicación de programas y recursos para educar convenientemente a las comunidades indígenas y de colonos que ejercen una fuerte presión depredadora en las especies referidas en el contexto amazónico.

Los resultados genéticos mostrados aquí pueden ayudar a consolidar estrategias de protección específicas para las poblaciones amazónicas de las especies reportadas. Este hecho es importante ya que, como reconocen Meffe & Carroll (1997), la persistencia de poblaciones dentro de sistemas locales puede ser más importante que la simple persistencia global de especies porque la pérdida de poblaciones locales representa una declinación importante en la biodiversidad si esas poblaciones contienen trazos genéticos o fenotípicos únicos. Por ejemplo, mientras que en términos de especie no se ha perdido biodiversidad en la familia de los rinocerontidos en los dos últimos siglos porque ninguna especie se ha extinguido, desde el punto de vista poblacional, la pérdida de biodiversidad ha sido mayúscula. En el mejor de los casos han desaparecido más del 95% de las poblaciones que existían hace un siglo (Ashley et al., 1990; Dinerstein & McCracken, 1990; Santiapillai, 1992). Por lo tanto, la biodiversidad poblacional se ha reducido espectacularmente aún cuando las especies no se han extinguido como un todo. Todas las especies amazónicas estudiadas poseen niveles elevados, o

muy elevados, de diversidad genética y, con la excepción del piurí, son demográficamente considerables: jaguar, entre 190.000–410.000 ejemplares a partir de las estimas de Collins (1990), Aranda (1990), Rabinowitz (1991), Swank & Teer (1987); ocelote, entre 800.000–3.000.000 de ejemplares a partir de las estimas de Emmons (1988); delfín rosado, entre 3.000.000–5.000.000 de especímenes, Da Silva (com. pers.); mono lanudo, unos 40.000 ejemplares en la zona amazónica muestreada a partir de los datos genéticos obtenidos. Sin embargo, localmente algunas poblaciones pueden estar sufriendo una reducción de variabilidad genética y de tamaño demográfico, ya sea por la destrucción de hábitat o por su caza directa, y las técnicas genético poblacionales pueden ayudar a detectar las poblaciones que están perdiendo biodiversidad, aun cuando la especie como un todo no presente, aparentemente, ningún problema grave. Este podría ser el caso del ocelote y del mono lanudo tal como hemos reportado.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Instituto von Humboldt (IVH) en Villa de Leyva por proveer algunas muestras de jaguares y ocelotes con origen geográfico reconocido. Este agradecimiento está dirigido especialmente a la entonces responsable de la colección mastozoológica, Yaneth Muñoz-Sabas, y a los directores de esa institución, Dr. Cristian Samper y Dr. Fernando Gaast. Además el primer autor expresa su gratitud a las comunidades indígenas Huitoto, Ticuna, Yucuna y Jaguas en la Amazonía colombiana, a las comunidades indígenas Movima, Moxeño, Sirionó, Canichana, Cayubaba y Chacobo en Bolivia, a las comunidades indígenas Bora, Ocaina, Shipigo-Comibo, Capanahua, Angoteros, Orejón, Cocama, Kishuarana y Alama en la Amazonía peruana y a la gente que colaboró en la obtención de todas las muestras analizadas. Muchas gracias también a Julieta Vargas de la Colección Boliviana de Fauna (La Paz, Bolivia). El estudio de los delfines de río se pudo llevar a cabo gracias a los aportes económicos realizados por Colciencias (Grant 1203-09-11239; Filogeografía, estructura poblacional y diversidad genética en dos especies de delfines de río, *Inia boliviensis* e *Inia geoffrensis*, mediante el uso de marcadores moleculares) y el Fondo para la Acción Ambiental (120108-E0102141; Estructura y conservación genética de los delfines de río, *Inia* y *Sotalia*, en las cuencas de la Amazonía y Orinoquía). Por último, se agradece al Ministerio de Desarrollo Sostenible y Planificación, al Viceministerio de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Desarrollo Forestal, a la Dirección General de Biodiversidad, a la Colección Boliviana de Fauna, a CITES y a Wildlife Conservation Society todos ellos de Bolivia, al Ministerio de Medio Ambiente de Ecuador, y a PRODUCE, Dirección Nacional de Extracción y Procesamiento Pesquero, al Consejo Nacional del

Ambiente y al Instituto Nacional de Recursos Naturales de Perú por los permisos de captura y obtención de muestras de diversas especies neotropicales.

Referencias

- Álvarez-Prada, D. & Ruiz-García, M. (en prensa). Genetic structure and coalescence parameters of the endangered *Crax globulosa* at the Colombian Amazon by means of DNA microsatellites and ND2 mitochondrial sequences. *Conservation Genetics*.
- Amos, B., Schlotterer, C. & Tautz, D., 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 260: 670–672.
- Aranda, J. M., 1990. The jaguar (*Panthera onca*) in the Calakmul reserve: morphometrics, food habits, and population density. Disertación de Msc. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ashley, M., Melnick, D. J. & Western, D., 1990. Conservation genetics of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). I: Evidence from the mitochondrial DNA of three populations. *Conservation Biology*, 4: 71–77.
- Banguera-Hinestroza, E., Cárdenas, H., Ruiz-García, M., Marmontel, M., Gaitan, E., Vázquez, R. & García-Vallejo, F., 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon river dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *The Journal of Heredity*, 93: 312–322.
- Broad, S., 1987. The harvest of and trade in Latin American spotted cats (Felidae) and otters (Lutrinae). Reporte no publicado. World Conservation Monitoring Center, Cambridge.
- 1988. Little spotted cat, tiger cat, or oncilla. In: *Significant trade in wildlife: a review of selected species in CITES Appendix II, Volume 1. Mammals*: 124–130. World Conservation Monitoring Center, Cambridge.
- Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution*, 21: 550–570.
- Collins, N. M., 1990. *The last rainforest*. Mitchell Beazley and IUCN, London.
- Cornuet, J. M. & Luikart, G., 1996. Description of power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001–2014.
- Cornuet, J. M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. & Solignac, M., 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153: 1989–2000.
- Corrales-Duque, C. & Ruiz-García, M. (en prensa). DNA microsatellite differentiation between different ocelot (*Leopardus pardalis*) populations: Are the morphological subspecies different at a molecular level? *Journal of Mammalogy*.
- Cote, S. D., Dallas, J. F., Marshall, F., Irvine, R. J., Langvatn, R. & Albon, S. D., 2002. Microsatellite DNA evidence for genetic drift

- and philopatry in Svalbard reindeer. *Molecular Ecology*, 11: 1923–1930.
- Dietz, J. M., Griffin, J., Camargo, J. L. C., Ballou, J. & Billerbeck, R., 1999. O efeito de reflorestamento e translocacao na conservacao da diversidade genetica em micos leoes-dourados. En: *Livro de Resumos IX Congresso Brasileiro de Primatologia: 52*. Sociedade Brasileira de Primatologia, Museo de Biologia Prof. Mello Leitao, Santa Teresa, Brazil.
- Dinerstein, E. & McCracken, G. F., 1990. Endangered greater one-horned rhinoceros carry high levels of genetic variation. *Conservation Biology*, 7: 53–65.
- East, R., 1981. Species-area curves and populations of large mammals in African savanna reserves. *Biological Conservation*, 21: 111–126.
- Eizirik, E., Kim, J. H., Menotti-Raymond, M., Crawshaw, P., O'Brien, S. J. & W Johnson, W., 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10: 65–79.
- Ellegren, H., 1995. Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*, 6: 376–377.
- Ellsworth, J. A. & Hoelzer, G. A., 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World Primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Molecular Ecology*, 7: 657–658.
- Emmons, L. H., 1988. A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Reviste d' Ecologie (Terre Vie)*, 43: 133–157.
- Ernest, H. B., Boyce, W. M., Bleich, V. C., May, B., Stiver, S. J. & Torres, S. G., 2003. Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics*, 4: 353–366.
- Estes, J. A. & Palmisano, J. F., 1974. Sea otters: Their role in structuring nearshore communities. *Science*, 185: 1058–1060.
- Garza, J. C. & Williamson, E. G., 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305–318.
- Gieteling, C., 1972. *Jaguar en ocelot: biologies, bedreiging en bescherming*. Unpublished report, WWF Netherlands, AA Zeist.
- Goldstein, D. B., Ruiz-Linares, A., Cavalli-Sforza, L. L. & Feldman, M. W., 1995. An evaluation for genetic distances for use with Microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463–471.
- Gottelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G. D., Roy, M. S., Girman, D. J., García-Moreno, J., Ostrander, E. A. & Wayne, R. K., 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3: 301–312.
- Harpending, H. & Cowan, S., 1986. Primate population structure: evaluation of models. *American Journal of Physical Anthropology*, 70: 63–68.
- Hoelzel, A. R., Dahlheim, M. & Stern, S. J., 1998. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the Eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *The Journal of Heredity*, 89: 121–128.
- Hoelzel, A. R., Natoli, A., Dahlheim, M. E., Olavarria, C., Baird, R. W. & Black, N., 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 1467–1473.
- Hughes, C. R. & Larson, E. D., 2000. Characterization of microsatellite loci developed for the wattled curassow, *Crax globulosa*. *Molecular Ecology*, 9: 629–634.
- Kimura, M. & Crow, J. F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725–738.
- Kinnaird, M. F. & O'Brien, T. G., 1991. Viable populations for an endangered forest primate, the Tana River crested mangabey (*Cercocebus galeritus galeritus*). *Conservation Biology*, 5: 203–213.
- Kleiman, D. G., Beck, B. B., Dietz, J. M. & Dietz, L. A., 1991. Costs of a re-introduction and criteria for success: accounting and accountability in the Golden Lion Tamarin Conservation Program. *Symposia Zoological Society, London*, 62: 125–142.
- Le Page, S. L., Livermore, R. A., Cooper, D. W., & Taylor, A. C., 2000. Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Molecular Ecology*, 9: 753–763.
- Ludlow, M. E. & Sunquist, M. E., 1987. Ecology and behavior of ocelots in Venezuela. *National Geographic Research*, 3: 447–461.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Sherwin, B. & Cornuet, J. M., 1998. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89: 238–247.
- Mallinson, J. C., 1991. "Flagship" species aiding the conservation of animals and associated habitat. 46th annual conference of International Union of Directors of Zoological Gardens, Singapore.
- Mantel, N. A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209–220.
- Martín, A. R. & Da Silva, V. M. F., 2004a. River dolphin and flooded forest: seasonal habitat use and sexual segregation of botos (*Inia geoffrensis*) in an extreme cetacean environment. *Journal of Zoology*, 263: 295–305.
- 2004b. Number, seasonal movements, and residency characteristics of river dolphins in an Amazonian floodplain lake system. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 1307–1315.
- Martínez-Agüero, M., Flores-Ramírez, S. & Ruiz-García, M., 2006. First report for the Major Histocompatibility complex (MHC) Class II loci from the Amazon Pink river dolphin (genus *Inia*).

- Genetics and Molecular Research*, 5: 421–431.
- Meffe, G. K. & Carroll, C. R., 1997. *Principles of Conservation Biology*. Second Edition. Sinauer Associates, INC. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Morin, P. A., Wallis, J., Moore, J., Chakraborty, R. & Woodruff, D., 1993. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates*, 34: 347–356.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–292.
- 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 70: 3321–3323.
- 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Nielsen, R., 1997. A likelihood approach to populations samples of Microsatellite alleles. *Genetics*, 146: 711–716.
- Nozawa, K., 1972. Population genetics of Japanese monkeys. I. Estimation of the effective troop size. *Primates*, 13: 381–393.
- Ohta, T. & Kimura, M., 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research*, 22: 201–204.
- Owen-Smith, N., 1989. Megafaunal extinctions: the conservation message from 11000 years B.P. *Conservation Biology*, 3: 405–412.
- Payne, R. T., 1969. The *Pisater–Tegula* interaction: Prey patches, predator food preference, and intertidal community structure. *Ecology*, 50: 950–961.
- Pimm, S. L., 1991. *The balance of Nature?* Chicago University Press, Chicago.
- Power, M. E. & Mills, L. S., 1995. The key-stone cops meet in Hillo. *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 182–184.
- Rabinowitz, A., 1991. *Belize trip report. June 15–July 30, 1991*. Wildlife Conservation Society, Bronx, New York.
- Redford, K. H., 1992. The empty forest. *Bioscience*, 42: 412–422.
- Reich, D. E., Feldman, M. W. & Goldstein, D. B., 1999. Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 453–466.
- Reich, D. E. & Goldstein, D. B., 1998. Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 8119–8123.
- Rogers, A. R. & Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Rogers, J., Witte, S. M. & Slifer, M. A., 1995. Five new Microsatellite DNA polymorphisms in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*). *American Journal of Primatology*, 36: 151.
- Romero-Alean, N. & Ruiz-García, M. (en prensa). Spatial and genetic relatedness among pink river dolphin (*Inia*) populations using RAPD markers. I. Macrogeographical level. *Genetics and Molecular Biology*.
- Ruiz-García, M., 2001. Diversidad genética como herramienta de zonificación ambiental: Estudios moleculares (microsatélites) en el caso de Primates y Félidos neotropicales comportan una nueva perspectiva. En: *Zonificación Ambiental para el Ordenamiento Territorial en la Amazonía Colombiana*: 85–108 (T. Defler & P. A. Palacios, Eds.).
- 2003. Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the Northern Andean Area. *Hereditas*, 138: 81–93.
- 2005. The use of several microsatellite loci applied to 13 Neotropical Primates revealed a strong recent bottleneck event in the woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*) in Colombia. *Primate Report*, 71: 27–55.
- (en prensa). Jaguar, Genes y Conservación: La Historia poblacional Revelada por el ADN. *Investigación y Ciencia*.
- Ruiz-García, M., Álvarez, D., Martínez-Agüero, M. & Escobar-Armel, P. (en prensa a). Coalescence genetic and demographic parameters in the microsatellite evolution of the pink river dolphin (*Inia*). *Molecular Ecology*.
- Ruiz-García, M., Castillo, M. I. & Álvarez, D., 2004. Evolutionary trends of Neotropical Primates according to the AP68 and AP40 microsatellites. En: *A Primatología no Brasil–volumen 8*: 65–100 (S. L. Mendes & A. G. Chiarello, Eds.). Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa, Espirito Santo, Brasil.
- Ruiz-García, M., Corrales-Duque, C. & Castellanos, A. (en prensa b). Hierarchical genetic structure of *Leopardus pardalis* in Latin America: molecular gene diversity and geographical patterns. *Molecular Ecology*.
- Ruiz-García, M., Escobar-Armel, P., Álvarez, D., Mudry, M., Ascunce, M., Gutiérrez-Espeleta, G. & Shostell, J. M., 2007. Genetics variability in four *Alouatta* species measured by means of nine DNA microsatellites markers: Genetic structure and recent bottlenecks. *Folia Primatologica*, 78: 73–87.
- Ruiz-García, M., Escobar-Armel, P., Caballero, S. & Secchi, E. (en prensa c). Determination of microsatellite mutation rates and effective numbers in four Cetacean species (*Inia boliviensis*, *Inia geoffrensis*, *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis*): comparisons with terrestrial mammals. *Molecular Biology and Evolution*.
- Ruiz-García, M., García-Perea, R., Corrales, C., Murillo, A. & Álvarez, D. (en prensa d). Determination of DNA microsatellite mutation rates per generation and mutation models in four main Felidae lineages (European wild cat, *F. silvestris*; ocelot, *Leopardus pardalis*; puma, *Puma concolor*; jaguar, *Panthera onca*). *Molecular Biology and Evolution*.
- Ruiz-García, M., Gaviria, M., Martínez-Agüero,

- M., Escobar-Armel, P. & Banguera, E. (en prensa e). Genetic structure of *Inia geoffrensis* and *Inia boliviensis* by means of heterologous DNA microsatellites. *The Journal of Heredity*.
- Ruiz-García, M., Orozco-Terwengel, P., Castellanos, A. & Arias, L., 2005. Microsatellite analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) across its range distribution. *Genes and Genetics Systems*, 80: 57–69.
- Ruiz-García, M., Orozco-Terwengel, P., Payan, C. E. & Castellanos, A., 2003. Genética de Poblaciones molecular aplicada al estudio de dos grandes carnívoros (*Tremarctos ornatus*–Oso andino, *Panthera onca*–jaguar): lecciones de conservación. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.*, 98(1–4): 135–158.
- Ruiz-García, M., Parra, A., Romero-Alean, N., Escobar-Armel, P. & Shostell, J., 2006a. Genetic Characterization and phylogenetic relationships between *Ateles* species (Atelidae, Primates) by means of DNA microsatellite markers and craniometric data. *Primate Report*, 73: 3–47.
- Ruiz-García, M., Payan, C. E., Murillo, A. & Álvarez, D., 2006b. DNA Microsatellite characterization of the Jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes and Genetics Systems*, 81: 115–127.
- Ruiz-García, M. & Romero-Alean, N. (en prensa). Spatial and genetic relatedness among pink river dolphin (*Inia*) populations using RAPD markers. II. Microgeographical level in Peruvian and Bolivian rivers. *Heredity*.
- Santiapillai, C., 1992. Asian rhino specialist group. *Species*, 18: 55.
- Smouse, P. E., Long, J. C. & Sokal, R. R., 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35: 627–632.
- Snodgrass, J. W., 1996. The influence of beaver ponds on the temporal and spatial dynamics of southeastern stream fish assemblages. Disertación de PhD, University of Georgia, Athens.
- Soulé, M. E., 1986. *Conservation Biology. The science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Spuhler, J. N., 1972. Genetic, linguistic, and geographical distances in native North America. En: *The assessment of population affinities in man*: 82–93 (J. S. Wiener & J. Huizinga, Eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Swank, W. G. & Teer, J. G., 1987. *Status of the jaguar*. National Fish and Wildlife Foundation, Washington D.C.
- Terborgh, J., 1988. The big things that run the world— a sequel to E. O. Wilson. *Conservation Biology*, 2: 402–403.
- Valsecchi, E. & Amos, W., 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, 5: 151–156.
- Vanderlei Anselmi, R., 2004. *Amazonia. Uma abordagem multidisciplinari*. Icone Editora Ltda. Sao Paulo, Brasil.
- Walker, B. H., 1992. Biological diversity and ecological redundancy. *Conservation Biology*, 6: 18–23.
- Weber, J. L. & Wong, C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2: 1123–1128.
- Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- Xu, Y. C., Li, B., Li, W. S., Bai, S. Y., Jin, Y., Li, X. P., Gu, M. B., Jing, S. Y. & Zhang, W., 2005. Individualization of tiger by using microsatellites. *Forensic Sci. Inter.*, 151: 45–51.
- Zhang, Y. G., Li, D. Q., Xiao, Q. M., Rao, L. Q. & Zhang, X. W., 2004. Genetic diversity of microsatellite loci in captive Amur tigers. *Yi Chuan*, 26: 620–624.
- Zhong, F., Brady, A. G. & Shi, J., 1996. Strategy using pooled DNA to identify 56 short tandem repeat polymorphisms for the Bolivian squirrel monkey. *BioTechniques*, 21: 580–586.
-