

**UNIVERSIDAD DE PANAMA**

**VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

**ORIENTACION EN GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y  
TECNOLOGIA**

**TESIS DE GRADO**



Variabilidad genética y caracterización espermática de las poblaciones en cautiverio del Tapir Centroamericano (*Tapirus bairdii*) en Panama

**GINA DELLA TOGNA**

**Asesores:**

**Oris Sanjur, Ph.D.  
Budhan Pukazhenth, Ph.D.**

**11 de agosto de 2008**

ST

**Nota:** Todas las copias deben llevar firmas originales y el original de este formulario debe remitirse a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, la que a su vez la enviará a la Secretaría General para la debida inscripción de la calificación.

25 MAY 2010

Título de la Tesis: "**VARIABILIDAD GENÉTICA Y CARACTERIZACIÓN ESPERMÁTICA DE LAS POBLACIONES EN CAUTIVERIO DEL TAPIR CENTROAMERICANO (TAPIRUS BAIRDII) EN PANAMÁ**"

**TESIS**

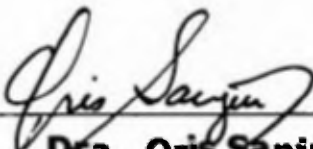
Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas, con orientación en Genética y Biología Molecular.

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

*Abogada del autor*

APROBADO POR:

  
**Dra. Oris Sanjur**  
PRESIDENTA

  
**Dr. Carlos Ramos**  
MIEMBRO

  
**Dra. Magaly de Chial**  
MIEMBRO

REFRENDADO POR:

  
**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA: 22-08-08

224

## INDICE

	Página
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
a. Biología y genética de la conservación.....	6
b. Biología Reproductiva.....	12
a. Espermatozoides.....	12
b. Anormalidades espermáticas.....	15
c. Aplicaciones.....	17
III. Justificación.....	17
IV. Objetivos.....	20
V. Metodología.....	21
a. Estudio Biomédico.....	21
b. Variabilidad genética y estructura poblacional.....	23
c. Análisis de las características espermáticas.....	28
a. Obtención de muestras de semen.....	28
b Análisis morfológico.....	29
VI. Resultados.....	30
a. Pedigrí y evidencias de endogamia.....	30
b. Estructura poblacional y variabilidad genética.....	34
c. Características espermáticas.....	52
VII. Discusión.....	57
VIII. Conclusión.....	61
IX. Literatura consultada y citada.....	63
IX. Anexos.....	68

## **Agradecimiento**

Este trabajo no hubiese sido posible sin la participación, apoyo y ayuda de muchas personas e instituciones.

Quisiera agradecer, en primer lugar, a Dios y a mi familia, en especial a mis padres y hermanos, quienes me han prestado su apoyo y consejo en cada momento.

No puedo continuar sin expresar mi agradecimiento a dos personas sumamente importantes en mi vida y quienes se han esforzado mucho por la realización de este trabajo: mi Asesora Principal: la Doctora Oris Sanjur y mi Coasesor:el Doctor Budhan Pukazhenthii. Estas personas han marcado una diferencia en mi vida, me han enseñado, corregido, apoyado y empujado, cuando ha sido necesario y, sobre todo, me han brindado su amistad. Oris y Buddha: Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a ustedes, se han convertido en modelos a seguir para mi, gracias mil!

No puedo dejar de mencionar al Doctor Luis Padilla, quien ha sido responsable del bienestar de los animales en todo momento, sin el cual este trabajo simplemente no se hubiese podido realizar y de quien he aprendido enormemente. Muchas gracias Luis!

Gretel Grajales, quien me ha brindado su apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio: gracias Gretelunchis!

Al Dr. Ricardo Leonart y la Dra. Kristin Saltonstall por su apoyo en el análisis de los datos.

Al Dr. Julio Escobar, quien ha apoyado el desarrollo de este proyecto mediante la aprobación de un Sabático financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología en Innovación, SENACyT, para el Dr. Budhan Pukazhenthii y su equipo.

Especial agradecimiento para el Lic. Adrián Benedetti (Summit), la Dra. Diorene Smith (Summit), Claudia Hidalgo (Villa Griselda), al Dr. Mauricio Caballero (Nispero) y al Lic. Jorge García (ANAM), quienes me han abierto las puertas para trabajar en sus instituciones y quienes han puesto su confianza en nuestro equipo de trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Científicas Avanzadas y Servicios de Alta Tecnología, INDICASAT, en especial a la Lic. Zuleyka Maynard y la Dra. Carmenza Spadafora, por brindarme el apoyo necesario en tiempo, infraestructura y equipos para el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales por permitirme utilizar sus laboratorios y al Smithsonian National Zoological Park, Washington, DC., por brindar la colaboración internacional por medio del Dr. Budhan Pukazhenthii, el Dr. Luis Padilla y la Dra. Katey Pellican.

Es necesario agradecer a mis compañeros de trabajo: Alejandro, Laura, Michelle, Liuris y Patricia, quienes me han apoyado increíblemente brindadome su ayuda, tiempo y soporte durante todo este tiempo: Gracias Chicos!

## **RESUMEN**

El Tapir (mamífero de mayor tamaño de Centroamérica) se encuentra en peligro de extinción. Una de las dificultades que se presentan para su conservación es el alto costo económico que representa el planeamiento e implementación de planes de preservación de un número mínimo de animales para mantener la variabilidad genética que garantice la supervivencia de la especie. Además, se requiere mucho esfuerzo para su reproducción en cautiverio y es difícil mantener poblaciones de este tipo que se "auto-sustenten" genéticamente. Esto es debido al limitado espacio disponible que no permite mantener poblaciones suficientemente grandes para evitar los impactos negativos de la endogamia ni la disminución de la variabilidad debido a la deriva genética. Los desarrollos biotecnológicos en el campo de la reproducción, ofrecen alternativas muy interesantes y únicas para el mejoramiento genético y el rescate de diferentes especies animales. Entre los objetivos de este estudio están: 1) caracterizar el nivel de variabilidad genética y endogamia presentes en las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá y 2) caracterizar la biología reproductiva del macho del tapir. Para tal fin, se recolectaron muestras de semen por electroeyaculación, sangre y pelo de todos los individuos. Se realizaron estudios moleculares, a partir de DNA extraído de las muestras de sangre, utilizando la técnica de microsatélites (mediante la técnica de PCR con cola M13) para determinar la variabilidad genética de los individuos y el nivel de endogamia presente en las poblaciones estudiadas. Los estudios relacionados a la caracterización espermática de la especie consistieron en la determinación de características generales del eyaculado más las características morfológicas del esperma, llevados a cabo por primera vez a nivel mundial gracias a este proyecto. Los resultados indican que el nivel de variabilidad genética presente en estas poblaciones refleja la variabilidad presente en las poblaciones silvestres y, hasta el momento, no se ha visto afectado por la endogamia. Con respecto a las características espermáticas, las poblaciones presentan teratospermia, sin embargo, esto parece no estar relacionado a los niveles de variabilidad genética, sino a factores de manejo como la dieta, y no ha afectado la capacidad reproductiva de los individuos por el momento. Este estudio es un medio para desarrollar técnicas y planes de manejo que se conviertan en una garantía para la conservación de la biodiversidad genética de esta especie en peligro de extinción.

## **INTRODUCCION**

Panamá representa una de las regiones biológicamente más interesantes e importantes del planeta debido a su posición geográfica, su variada riqueza de ecosistemas y especies (Heckadon, 1998). La preocupación sobre el estado de los recursos biológicos, de los cuales depende significativamente la vida humana, está aumentando debido a la crítica situación sobre la pérdida de la diversidad biológica.

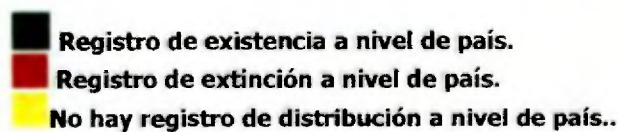
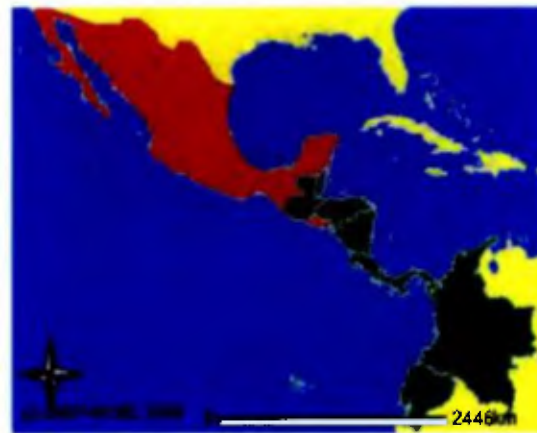
En el planeta Tierra se conocen a la fecha 11,167 especies de animales y plantas que están en peligro de extinción (Lista Roja UICN, 2000). Como ha ocurrido en otras latitudes, en Panamá la influencia humana ha tenido serios efectos sobre la diversidad biológica. En la fauna panameña existen unas 80 especies de vertebrados terrestres (Anexo 1), incluyendo al Tapir (mamífero de mayor tamaño de Centroamérica), sobre los que pesa un fuerte grado de amenaza (Lista de Especies en Peligro, ANAM).

Una de las dificultades para la conservación del Tapir es el alto costo económico que representa el planeamiento e implementación de planes de preservación de un número mínimo de animales que se requiere para mantener la variabilidad genética que garantice la supervivencia de la especie. Otra de las dificultades es que se requiere mucho esfuerzo para su reproducción en cautiverio (Leibo y Songsassen, 2002). Además, es difícil mantener poblaciones en cautiverio que se "auto-sustenten" genéticamente. Esto se da debido al limitado espacio disponible que no permite mantener poblaciones suficientemente grandes para evitar los impactos negativos de la endogamia y, por lo tanto, de la disminución de la variabilidad debido a la deriva genética (Norton y Ashley, 2004).

El Tapir Centroamericano (*Tapirus bairdii*. Perisodactila, Tapiridae) está distribuido desde el sur de México hasta la región norte de Colombia y se encuentra generalmente en hábitat húmedos, desde el nivel del mar hasta los

3,600 m.s.n.d.m. Su hábitat comprende áreas pantanosas, manglares, bosque tropical húmedo, bosque deciduo de monzón, bosque deciduo seco y bosque montano nuboso (Matola *et al.*, 1997).

*Tapirus bairdii* se encuentra en Belice, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá (Figura 1). También se encontraba en El Salvador, donde ahora se considera extinto. Existe evidencia de que la especie fue observada en Ecuador para la década de 1930, sin embargo, este reporte no ha sido confirmado y no se encuentran evidencias concretas de la existencia de la especie en este país (IUCN Red List, 2006).



**FIGURA 1.** Mapa de distribución del Tapir Centroamericano

El tapir se encuentra primordialmente amenazado por la destrucción del hábitat y, en menor grado, por la cacería. La tasa reproductiva del tapir es muy baja ya que el periodo de gestación de esta especie es de 13 meses, dando a luz una sola cría por parto. La cría permanece junto a la madre por un periodo promedio de dos años. La baja tasa reproductiva, sumada a las amenazas de caza y destrucción del hábitat son factores que contribuyen seriamente al detrimento de las poblaciones silvestres (Matola *et al.*, 1997).

Las especies que se encuentran en la Lista Roja de la UICN (The World Conservation Union) son portadoras de diversidad genética y son bloques importantes sobre los que se construyen los ecosistemas. Información sobre su estatus de conservación y distribución provee los cimientos para tomar decisiones con las bases adecuadas sobre la conservación de la biodiversidad, tanto a nivel local como global (Lista Roja UICN, 2000).

Según la Lista Roja de la IUCN del año 1996, el Tapir estaba catalogado como vulnerable, esto es, que las mejores evidencias indican que la especie cumple con alguno de los criterios (del A al E) para vulnerabilidad de la UICN y, por lo tanto, se considera que está enfrentando un alto riesgo de extinción en su hábitat silvestre (IUCN, Red List, 2000). Actualmente las condiciones han cambiado, según la Lista Roja del año 2006, La Comisión de la Supervivencia de Especies (Especies The Species Survival Commission) y El Grupo de Especialistas de Tapires (The Tapir's Specialist Group) de la UICN, el Tapir se encuentra catalogado como especie en peligro de extinción bajo los criterios **A2abcd+3bce**. De acuerdo con la IUCN, una especie en peligro de extinción es aquella en la que las mejores evidencias indican que la especie cumple con alguno de los criterios (del A al E) para la categoría de "en peligro de extinción" de la IUCN y, por lo tanto, se considera que está enfrentando un alto riesgo de extinción en su hábitat silvestre (IUCN, Red List, 2000).

Los criterios **A2abcd+3bce** indican que ha habido una drástica disminución en el tamaño de la población basado en:

- Una reducción observada, estimada o inferida de la población de  $\geq 80\%$  en los pasados 10 años o tres generaciones, de estos, el periodo mas largo, donde la reducción o sus causas pueden no haber cesado o ser irreversibles basándose en observación directa, en un índice de abundancia apropiado para el taxón, una disminución en el área de



ocupación, extensión de ocurrencia y/o calidad del hábitat y en los niveles potenciales actuales de explotación de la especie.

- Una reducción del tamaño de la población de  $\geq 80\%$  proyectada o sospechada a llevarse a cabo en los próximos 10 años o tres generaciones, de estos, el periodo mas largo (hasta un máximo de 100 años), basado y especificado en un índice de abundancia apropiado para el taxón, en una disminución en el área de ocupación, extensión de ocurrencia y/o calidad del hábitat y en los efectos de especies introducidas, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos.

Según La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), CITES, el tapir se encuentra bajo el Apéndice I, el cual lista las especies que enfrentan diferentes niveles de protección contra la sobre-explotación y que están catalogadas como las más amenazadas por CITES. Estas especies se encuentran en peligro de extinción y CITES prohíbe el comercio de estos especímenes. Sin embargo, algún tipo de intercambio puede ser permitido bajo circunstancias excepcionales, por ejemplo, para fines de investigación científica. En estos casos, el Intercambio debe ser autorizado y se debe contar con un certificado de exportación o importación, según sea el caso (CITES Listed Species, 2006).

El estimado actual de la población total de tapires centroamericanos es  $< 5000$  ejemplares. Los cambios drásticos que están ocurriendo en el rango ocupacional del tapir son deletéreos para el mismo ya que esta especie está sujeta a persecución y, a la vez, restringida a cierta variedad de hábitat, los cuales son víctima de fragmentación o destrucción total. Se estima que alrededor del 70% de los bosques de América Central se han perdido por causa de la deforestación y fragmentación durante los pasados 40 años (Primack *et al.*, 1998).

Según la Lista Roja de la IUCN del 2006, el Tapir se encuentra seriamente amenazado por los siguientes factores:

- Pérdida y Degradación del hábitat por plantación y extracción de madera.
- Pérdida y Degradación del hábitat por desarrollo de infraestructuras humanas.
- Pérdida y Degradación del hábitat por desarrollo de infraestructuras para el transporte (tierra y aire).
- Pérdida y Degradación del hábitat por plantaciones diferentes a las de obtención de madera.
- Caza y cosecha para alimentación, uso de subsistencia y comercio local.

En el lado Pacífico Colombiano existen grandes fragmentos de bosque (160,000 hectáreas), que sumados a la región del Darién, en Panamá, constituyen unas 227,000 hectáreas de hábitat. Cada Tapir adulto requiere 500 ha promedio de hábitat, por lo que se estima que en esta área podrían estar existiendo alrededor de 450 animales (Red List, 2006). La caza, la guerrilla y la fragmentación del hábitat pueden estar variando este estimado (Lista Roja UICN, 2006).

## **I. Biología y Genética de la Conservación**

La Biología de la conservación tiene como propósito revertir o reducir la tasa de especies en extinción y conservar la biodiversidad, sin embargo, el tiempo es un factor crítico, ya que a medida que éste avanza, ciertas especies nunca volverán

a recuperarse (Cseh y Solti, 2000). La genética de la conservación, la cual aplica los principios y técnicas de la genética con miras a resolver la crisis global del declive de la biodiversidad, también surge como una parte importante de la biología de la conservación, la cual contribuye a reducir el riesgo de extinción, proporcionando la información necesaria para un manejo apropiado de la población (Pope, 2000).

Uno de los factores que afecta la variabilidad genética de las poblaciones en cautiverio es la endogamia. Altos niveles de endogamia han sido asociados con reducción de la fertilidad, con la disminución de la viabilidad de la descendencia, con la supervivencia individual y con la aparición de mutaciones (Norton y Ashley, 2004).

El manejo apropiado de poblaciones de especies amenazadas en cautiverio es un componente necesario e importante para la recuperación de estas especies en peligro de extinción. La meta final de la mayoría de los programas de manejo de especies amenazadas debería apuntar a la reintroducción de individuos saludables a los hábitats silvestres. Para poder alcanzar esta meta, las instituciones que mantienen poblaciones en cautiverio deben trabajar en asegurar, no solo el bienestar, sino también la salud genética de estos animales (Asa *et al.*, 2007). Específicamente, los individuos deben ser lo más similares posible a sus contrapartes nacidas en el medio silvestre. El cruzamiento entre individuos saludables y no relacionados entre sí es una práctica que contribuye a reducir los efectos detrimentales de la endogamia (Jiménez *et al.*, 1994; Keller *et al.*, 1994).

La depresión por endogamia y su rol en la conservación de especies en peligro ha sido, por mucho tiempo, tema de detallado estudio y enfático debate (Hedrick *et al.*, 1992; Hedrick & Kalinowski, 2000). Los análisis estadísticos de la relación entre el nivel individual de endogamia (medido por el coeficiente de endogamia,  $f_i$ , para cada individuo) y algunas características de adaptación específicas, como

la supervivencia de los individuos a una edad dada, es el método estándar para evaluar la severidad de la depresión por endogamia en poblaciones para las cuales la información sobre el pedigrí está disponible (Asa *et al.*, 2007). Algunos investigadores han utilizado esta metodología para estudiar poblaciones en cautiverio de lobos grises y no han encontrado evidencia en un periodo de 180 días de que la depresión por endogamia esté afectando el tamaño de las crías o su supervivencia (Kalinowski *et al.*, 1999). Sin embargo, un análisis más reciente ha demostrado depresión por endogamia para el tamaño de los individuos en las poblaciones en cautiverio (Fredrickson & Hedrick, 2002).

Mientras que características de adaptación como la supervivencia de las crías y el tamaño del cuerpo son los parámetros más fáciles de medir en un análisis de depresión por endogamia (Lacy *et al.*, 1996), el impacto de este fenómeno puede manifestarse en otros aspectos de las funciones biológicas. Por ejemplo, estudios en guepardos y panteras de Florida machos con baja variabilidad genética han demostrado que estos producen espermatozoides de pobre calidad (Wildt *et al.*, 1987; Barone *et al.*, 1994). Otros estudios indican que la calidad del espermatozoides difiere entre dos poblaciones de leones en cautiverio, siendo la población geográficamente aislada y la que se presume presenta mayor endogamia, la que peor calidad de espermatozoides produce. Sin embargo, estos estudios comparan la variabilidad genética y la calidad del espermatozoides solo a nivel de población y la relación entre la magnitud de la endogamia y el grado de anomalía espermática no fue analizada. Solo un estudio realizado en gacelas de Cuvier ha demostrado una relación directa entre la endogamia y la calidad espermática (Roldant *et al.*, 1998), pero no relacionó la calidad del espermatozoides con la fertilidad individual de los machos.

Resultados del estudio realizado en lobos grises (Asa *et al.*, 2007) relacionan la endogamia a la calidad espermática. Bajos niveles de heterocigocidad se han correlacionado con la baja calidad del espermatozoides en la gacela de Cuvier (Roldant *et al.*, 1998), conejos silvestres *Oryctolagus cuniculus* (Gage *et al.*, 2006), leones

*Panthera leo* (Wildt et al, 1987) y gatos domésticos (Pukazhenth, Wildt & Howard, 2001). Por lo tanto, la reducción en la calidad del espermatozoides puede no ser una consecuencia inusual de la endogamia y puede explicar las reducidas tasas de reproducción en algunas poblaciones. En particular, poblaciones severamente restringidas o aquellas que han atravesado un cuello de botella reciente pueden ser particularmente vulnerables (Asa et al., 2007).

Los desarrollos biotecnológicos en el campo de la reproducción, ofrecen alternativas muy interesantes y únicas para el mejoramiento genético y el rescate de diferentes especies animales (Leibo y Songssassen, 2002). Varias técnicas se han desarrollado y refinado para obtener un mayor número de crías de animales genéticamente superiores (Solti et al., 2000). Estas técnicas incluyen la inseminación artificial (AI), la criopreservación (congelación) y transferencia de semen y embriones, la inducción de la ovulación múltiple, la Fertilización *in Vitro* (IVF), la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), la determinación del sexo del semen o de los embriones y la clonación. Estas técnicas son de gran valor para la difícil pero importantísima tarea de preservar y multiplicar las especies animales de interés comercial y también para aquellas especies que garantizan el equilibrio ecológico de nuestro planeta (Wildt et al., 2001).

Dentro de la Biología y Genética de la reproducción, una herramienta importante para la conservación de especies son los Criobancos Genómicos (CBG). Estos son valiosos repositorios de material biológico vivo criopreservado, incluyendo semen y embriones, tejido, productos sanguíneos y DNA. Los CBG ayudan a preservar la biodiversidad. Para su aplicación se generan nuevas tecnologías que ayudan a entender la biología de las especies en peligro, la crianza y manejo genético de las mismas (Wildt et al., 1997).

El análisis molecular utilizando ADN, obtenido a partir de muestras biológicas como sangre y pelo, puede ser aplicado para identificación individual, definición

del sexo y para adquirir información acerca de la estructura reproductiva, tamaño de la población y niveles de diversidad genética; datos que son importantes para formulación de estrategias para la conservación de especies en peligro (Wildt *et al.*, 1997). El análisis molecular también contribuye a la implementación de leyes para la protección de especies en peligro (Pope, 2000).

Los microsatélites, o SSR (Simple Sequence Repeats) son loci polimórficos presentes en el DNA nuclear que consisten de repeticiones de motivos de 1 a 6 nucleótidos que se ubican uno tras otro. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. A pesar de esto, la variabilidad que presentan útil para su uso como marcadores moleculares, es respecto al número de repeticiones, no de la secuencia repetida. Son utilizados como marcadores moleculares en una gran variedad de aplicaciones en el campo de la genética como parentescos y estudios de poblaciones (Goldstein y Schlötterer, 2001).

Los microsatélites son uno de los marcadores moleculares más populares, son ampliamente utilizados para estudios de biodiversidad, huella génica, análisis de parentesco, selección asistida por marcadores y estudios de mapeo genético. Su amplio uso se fundamenta en propiedades como: naturaleza co-dominante, gran abundancia en genomas eucariotas, fortaleza, hipervariabilidad, alto contenido informacional y su docilidad para ser automatizados (Morgante y Olivieri, 1993; Powell *et al.*, 1996; Weising *et al.*, 1998).

Los microsatélites son particularmente atractivos para genotipificar individuos debido a que el nivel de polimorfismo que son capaces de detectar es uno de los más altos detectados por los marcadores moleculares conocidos hasta el momento (Powell *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1997; Jakše *et al.*, 2001).

Norton y Ashley, 2004, basándose en la técnica de microsatélites, encontraron que las poblaciones de tapires centroamericanos estudiadas por ellos se encuentran entre las poblaciones de grandes mamíferos con menores niveles de

heterocigocidad y diversidad génica (Tabla 1). Además, los niveles de heterocigocidad de estas poblaciones de tapires son también consistentes con niveles de poblaciones de grandes mamíferos con historia de aislamiento o cuellos de botella. Bajos niveles de variabilidad genética, heterocigocidad y diversidad alélica han sido utilizados como evidencia de la existencia de cuellos de botella en poblaciones que han experimentado severas reducciones en el número de individuos (Houlden *et al.*, 1996; LePage *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 2001; Whitehouse & Harley, 2001; Williams *et al.*, 2002).

**TABLA 1.** Variabilidad Genética comparada entre algunas especies de grandes mamíferos

Especie	N	n	He	Ho	FST	L	A
Asian water buffalo ( <i>Bubalus bubalis</i> ): Barker et al. (1997)	200	25	0.48	0.51	0.168	21	7.1
Atlantic walrus ( <i>Odobenus rosmarus</i> ): Andersen et al. (1998)	105	26.5	0.61	0.65	0.058	11	5.6–6.0
Barbary Macaques ( <i>Macaca sylvanus</i> ): Von Segesser et al. (1999)	159	17.6	0.65	0.32–0.77	0.118	6	5.16
Black-footed rock-wallaby ( <i>Petrogale lateralis</i> ): Eldridge et al. (1999)							
(mainland)	22	22	0.562	–	–	10	4.4
(island bottleneck)	14	14	0.053	–	–	10	1.2
Cougar ( <i>Puma concolor</i> ): Sindair et al. (2001)	50	5	0.655	0.626	0.039	9	4.44
Koala ( <i>Phascolarctos cinereus</i> ): Houlden et al. (1996)							
(Non-bottleneck)	80	–	0.851	–	0.09–0.16	6	11.5
(Bottleneck)	160	–	0.436	–	0.03–0.21	–	5.3
Moose ( <i>Alces alces</i> ): Broders et al. (1999)							
(Source)	208	34.6	–	0.41	–	5	3.4
(Founded)	263	65.8	–	0.22–0.31	–	5	2.6
Baird's tapir ( <i>Tapirus bairdii</i> ) Norton and Ashley (2004)	33	15	0.37–0.43	0.39–0.41	0.059–0.18	6	2.5–3.33
Spanish Celtic horse ( <i>Caballus cabalus</i> ):	541	20	0.78	0.72	0.078	13	5.8
Canon et al. (2000)							
Swayne's hartebeest:	44	20	0.7	0.64	–	8	5
Grey wolf ( <i>Canis lupus</i> ): Forbes & Boyd (1997)	172	39.7	0.64	0.59	0.168	9	4.1

*N*: número total de la muestra; *n*: tamaño promedio de la sub-muestra; *He*: heterocigocidad esperada; *Ho*: heterocigocidad observada; *L*: número de loci; *A*: número promedio de alelos por locus

## **II. Biología Reproductiva**

Uno de los problemas presentes en las poblaciones en cautiverio es el manejo reproductivo de la población (Pukazhenthil *et al.*, 2001). Es necesario contar con conocimientos básicos de la biología reproductiva de la especie en cuestión para lograr un programa de reproducción exitoso. No se cuenta con este tipo de información para los Tapires centroamericanos. Este estudio generará información no existente sobre la biología reproductiva del macho del tapir a partir de los resultados encontrados.

### **a. Espermatozoides**

Un espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino en los animales. Los espermatozoides se forman en el interior de los testículos. Las paredes de los túbulos seminíferos se encuentran tapizadas de espermatogonias, las cuales se dividen primero mitóticamente y luego por meiosis para originar las células haploides, llamadas espermatidas que, por diferenciación (espermiogénesis), se convierten finalmente en espermatozoides (Howard *et al.*, 1990).

La estructura de los espermatozoides (Figura 2) consiste en (Pukazhenthil *et al.*, 2001):



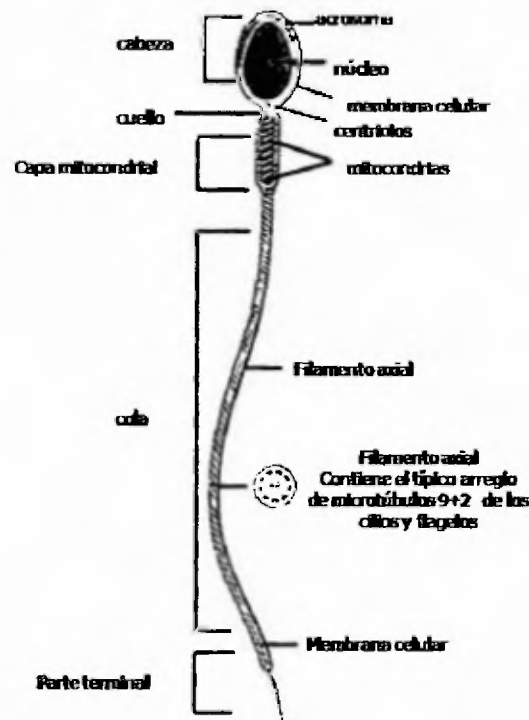


FIGURA 2. Estructura de un espermatozoide

**La cabeza**, que contiene al **pronúcleo**: portador de la información genética, el **acrosoma**: contiene enzimas que degradan las paredes del óvulo y producen activación ovular, y una delgada capa de citoplasma, todo envuelto en una membrana plasmática que lo une al *cuello*. Tiene una media promedio de 4-5  $\mu\text{m}$  de largo.

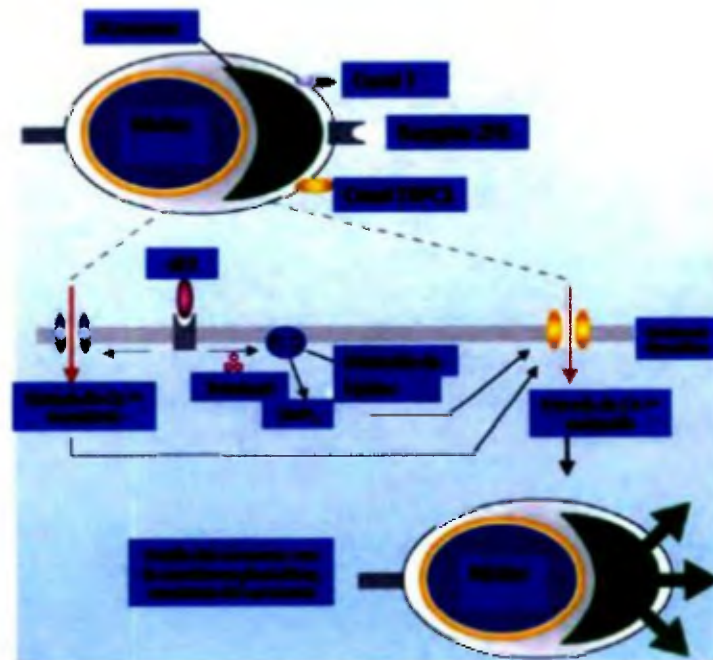
**El cuello**, corto y estrecho. Contiene una placa basal que lo separa de la cabeza y los centríolos modificados. De uno de ellos (el distal) se origina el flagelo.

**La parte intermedia** (de unos 4-5  $\mu\text{m}$  de longitud promedio), posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide mediante la producción de ATP.

**La cola**, que le proporciona movilidad (zona flagélica funcional recubierta sólo de membrana).

El acrosoma es de especial importancia para el proceso de la fertilización. Es un organelo que se desarrolla sobre la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide. Es una estructura a manera de gorro derivada del Aparato del Golgi. La formación del acrosoma se completa durante la maduración testicular.

En los mamíferos euterios, el acrosoma contiene enzimas digestivas (que incluyen la hialuronidasa y la acrosina) que rompen la membrana exterior del óvulo, llamada zona pelúcida, permitiendo que el núcleo haploide del espermatozoide se una con el núcleo haploide del óvulo. Este último proceso tiene como nombre Reacción Acrosomal (Figura 3), durante el cual la membrana que rodea al acrosoma se une con la membrana plasmática del espermatozoide, exponiendo el contenido del acrosoma, haciendo al espermatozoide capaz de fusionarse con el óvulo (Spindler *et al.*, 2004).



**FIGURA 3.** Reacción acrosomal

En la cabeza del espermatozoide, la activación de los receptores TRPC2-ZP3 durante la adhesión a la zona pelúcida, resulta en la entrada de calcio a través de los canales tipo T, lo que a su vez aumenta transitoriamente la concentración de calcio citosólico y la activación de PLC a través de la vía mediada por las proteínas  $G_1$  y/o  $G_2$ , resultando en la producción de  $InsP_3$  y diacilglicerol. PLC y el aumento transitorio de calcio funcionan en conjunto para producir una entrada constante de calcio a través de los canales TRPC2 que directamente conducen a la reacción acrosomal, produciendo la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana citoplasmática, dándose la liberación del contenido acrosomal.

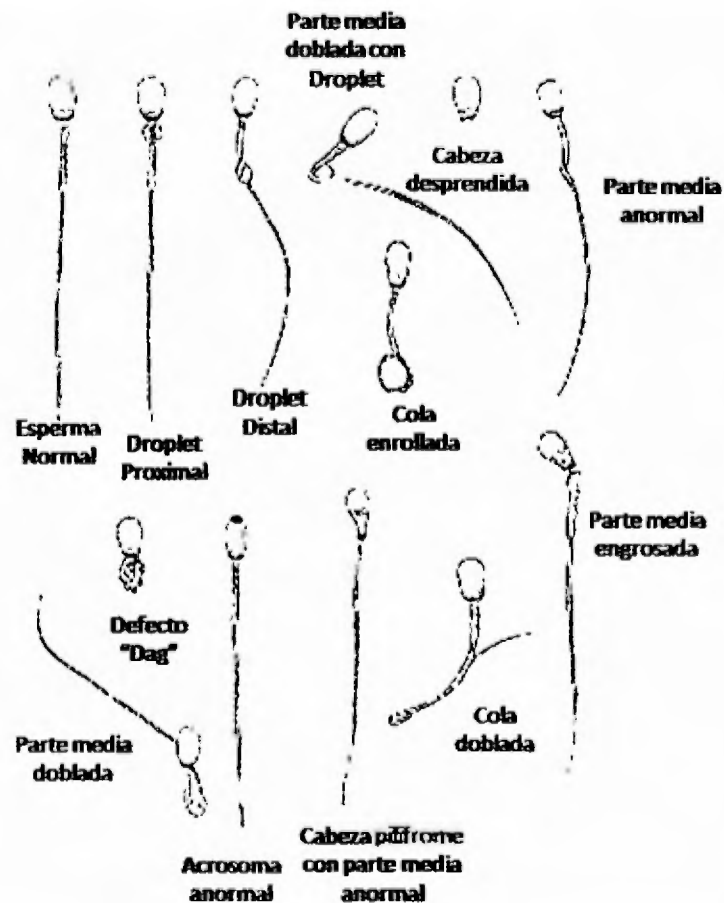
## **b. Anormalidades espermáticas**

La teratospermia es una condición en la que un 60% o más del espermatozoide muestra formas aberrantes (Pukazhenti *et al.*, 2001). Entre las anomalías (Figura 4) predominantes se encuentran: parte intermedia doblada con o sin gotita citoplasmática, flagelo doblado y flagelo altamente enrollado. Además, grandes proporciones de espermatozoides muestran defectos en el acrosoma como grandes vacuolas, protrusiones de la matriz acrosomal y dobleces del acrosoma sobre sí mismo (Pukazhenti *et al.*, 2001).

La motilidad de los espermatozoides puede evaluarse como porcentaje de motilidad y como motilidad progresiva. Esta última se clasifica de acuerdo a una escala cuyo rango es entre 0 (no hay movimiento) y 5 (progresión rectilínea constante y rápida) (Howard, 1993).

Existen muchas clasificaciones de las anomalías morfológicas de los espermatozoides en semen fresco. Las más comunes se clasifican en:

- a. **Anormalidades Primarias:** son aquellas que ocurren durante la espermatogénesis en los testículos como flagelo enrollado y defectos micro o macrocefálicos.
- b. **Anormalidades Secundarias:** son aquellas que ocurren debido a daños durante la maduración y transporte a lo largo del epidídimo como parte intermedia doblada, flagelo doblado, gotitas citoplasmáticas y anomalías acrosomales.



**FIGURA 4.** Anormalidades morfológicas más comunes en espermia

Las anomalías primarias se consideran más perjudiciales para la fertilidad que las secundarias (Wildt *et al.*, 1987 y Howard *et al.*, 1990). Con respecto a la preservación de espermia, la evaluación de las anomalías se enfoca en la región del acrosoma, ya que esta estructura es muy vulnerable y frecuentemente alterada por procesos de enfriamiento y congelación (Wildt *et al.*, 1987).

Se han desarrollado metodologías específicas para la evaluación del daño en el acrosoma ya existente o inducido por frío como indicador de la habilidad de fertilización. Entre estas técnicas está la tinción que utiliza un anticuerpo conjugado de isotiocianato de fluoresceína FITC-PNA, aglutinina de *Arachis hipogea* (maní). Esta tinción es específica para la membrana acrosomal externa, al teñirse, los acrosomas que presentan un brillo uniforme son clasificados como

*acrosomas intactos* y aquellos que presentan apariencia fragmentada o brillo solo en la región ecuatorial son clasificados como *acrosomas dañados* (Pukazhenthii *et al.*, 1999 y Pukazhenthii *et al.*, 2001). Otra técnica para evaluar el daño acrosomal es la tinción con Clorotetraciclina (CTC), la cual es un antibiótico con un componente fluorescente que puede ser utilizado para visualizar el curso de la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosomal. Al utilizar CTC, parece posible discriminar entre espermatozoides con acrosoma intacto capacitado y no capacitado, lo cual no puede determinarse por otros métodos de tinción, que solo pueden diferenciar entre la presencia y ausencia del acrosoma (Tsien, 1989).

### **c. Aplicaciones**

Las muestras de semen criopreservadas pueden ser utilizadas para fines reproductivos futuros, principalmente, en métodos como inseminación artificial (IA). Ésta técnica ha sido utilizada para la generación de crías provenientes de machos genéticamente superiores desde hace más de 200 años (Luvoni *et al.*, 2003). Mejoras en los métodos de criopreservación y almacenamiento del semen han permitido que la IA sea accesible a los productores. Así mismo, la congelación de semen y de embriones ha incentivado la comercialización global de animales con altas cualidades genéticas. La IA es una técnica simple, económica y exitosa. Esta técnica ha sido utilizada para reproducir muchas especies en peligro de extinción como los osos panda, grandes felinos, osos pardos, gacelas, ciervos, reptiles y especies domésticas (Wildt *et al.*, 1997).

## **JUSTIFICACION**

El tapir es el mamífero terrestre más grande existente en Panamá y se encuentra en peligro de extinción. Entre los países de Centroamérica, Panamá es uno de los pocos que carece de información sobre esta especie altamente amenazada, clasificada como especie en peligro de extinción por la UICN; y por el Gobierno Panameño como críticamente amenazada (Samudio, 2002). Sin embargo, existen

frecuentes reportes a manera de anécdotas de la presencia de la especie en áreas boscosas a través del país. Esta información no ha sido sistemática ni científicamente verificada (Samudio, 2002). El único estudio de campo que se ha realizado en Panamá, se llevó a cabo con el fin de reintroducir la especie en la Isla Barro Colorado (Terwilliger, 1978). Subsecuentemente, "El estudio de la viabilidad de poblaciones y hábitat del Tapir Panameño" (Barongi *et al.*, 1992) arrojó información sobre las regiones en las que "supuestamente" se encuentra la especie, basándose fundamentalmente en entrevistas y encuestas realizadas a los pobladores de estas localidades y enfatiza la necesidad de subsecuentes estudios sistemáticos. Aunque Panamá se encuentra catalogado como el país que contiene la mayor población en cautiverio de esta especie en el mundo y la mayor población esperada de tapires silvestres de Centro América y México, no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre los tapires desde los años 70 y tampoco existen programas de manejo de la especie en cautiverio (Reporte IUCN/Tapir Specialist Group, 2005).

A través de esta investigación obtendremos información sobre dos aspectos de gran importancia: la capacidad de reproducción de la especie a través de la determinación de los factores que afectan la viabilidad del esperma y la determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones de tapires en Panamá.

Actualmente no existe información disponible sobre la biología reproductiva fundamental del tapir. Hasta la fecha, se consideraba imposible lograr la extracción de semen en esta especie. La mayoría de los esfuerzos se han concentrado en el monitoreo hormonal. Algunos datos preliminares de nuestro grupo de investigación demuestran que hemos logrado exitosamente, por primera vez, coleccionar semen de la especie *Tapirus bairdii* utilizando el método de electroeyaculación. Esta técnica nos permitirá la caracterización de los eyaculados como también intentar la criopreservación. La extracción de semen es un método efectivo para estudiar el estatus reproductivo de los animales.

Como un resultado a largo plazo de este estudio, trataremos de establecer el primer CrioBanco Genómico (colecta, almacenamiento y uso sistemático de materiales biológicos para manejo genético) del mundo para esta especie en Panamá.

La información obtenida sobre la variabilidad genética de estas poblaciones y la viabilidad espermática, contribuirá a desarrollar mejores planes para el mantenimiento en cautiverio de esta especie en nuestro país, ayudará al desarrollo de programas para la reproducción, rescate y mantenimiento de esta especie, como también para su futura reinserción en el medio silvestre y utilización comercial. Además, proveerá apoyo, por medio del establecimiento de una fuerte cooperación internacional en nuevas técnicas de reproducción asistida y genética, transferencia de tecnología y conocimiento para los investigadores panameños. También contribuirá con soluciones biotecnológicas a los sectores conservacionistas nacionales e internacionales y en la reinserción de especies en peligro de extinción, importantes para el mantenimiento de la biodiversidad nacional y el ecoturismo.

Para el desarrollo de programas de conservación y utilización sostenible de un recurso natural en peligro de extinción es necesario contar con la mayor cantidad de información para la toma apropiada de decisiones de manejo. Consideramos que la información que se generará a través de este proyecto tendrá gran impacto en las siguientes áreas:

- 1) Para la especie: permitirá obtener información relevante en cuanto a su diversidad genética y su capacidad de reproducción. Los resultados obtenidos permitirán un mejor manejo de este recurso.
- 2) La diversidad biológica de Panamá: este proyecto impulsará la conservación, la utilización sostenible y la distribución justa y equitativa de los beneficios que brinda la diversidad biológica de nuestro país. Se

enmarca dentro de los objetivos de la Estrategia Nacional de Biodiversidad, de la Ley 23, que dicta medidas de carácter urgente para la protección y conservación de la Fauna Silvestre, y de los convenios internacionales sobre Biodiversidad, comprometiéndose a la conservación de la diversidad biológica y la cultura, a utilizar adecuadamente los recursos biológicos y a compartir equitativamente los beneficios que se deriven del uso de los recursos genéticos de nuestro país.

- 3) Transferencia de tecnología y capacitación de personal: a través de este proyecto tendremos la oportunidad de brindar entrenamiento a panameños (estudiantes y profesionales) en técnicas de reproducción animal, lo que es una necesidad para el manejo de poblaciones de animales en cautiverio.

### **OBJETIVO GENERAL**

- A.** Determinar el nivel de variabilidad genética y las características espermáticas presentes en las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- A.** Determinar el nivel de variabilidad genética y endogamia presentes en las poblaciones de Tapires en cautiverio de Panamá mediante la técnica de microsatélites.
- B.** Determinar las características espermáticas de los Tapires en cautiverio de Panamá mediante las técnicas estándar de caracterización.



## **METODOLOGIA**

Este es un estudio de tipo descriptivo-correlacional, con muestreo no probabilístico ya que los individuos no fueron escogidos al azar, más bien, es un muestreo dirigido en donde la selección de los individuos depende del criterio del investigador.

Este estudio incluyó las poblaciones de Tapires en cautiverio del país (Parque Natural Summit de Panamá, Zoológico El Nispero y Reserva Privada Villa Griselda). Se colectaron muestras de 24 individuos, distribuidos de la siguiente manera: 6 individuos en el Parque Natural Summit de Panamá, 4 individuos en el Zoológico El Nispero y 14 individuos en la Reserva Privada Villa Griselda (los dos últimos situados en El Valle de Antón). El ratio de distribución de sexos de la población total es 11♀/13♂. De acuerdo a su origen, 6 individuos provienen de hábitat silvestres y 18 son nacidos en cautiverio. El rango de edad promedio es desde 11 meses hasta 30 años.

### **I. Estudio Biomédico**

Los animales fueron manipulados en todo momento por expertos veterinarios del Zoológico de Washington quienes aseguraron el bienestar de cada uno de ellos. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo bajo estado de sedación (inducción con Detomidina y Butorphanol, suplementación con ketamina, Propofol y Guanfenisina y reversión con Yohimbina y Naltrexone). A cada individuo se le realizó un examen físico externo y se le extrajeron muestras de sangre, pelo, heces y espermatozoides (en el caso de los machos).



**FIGURA 5.** Manejo de los animales por el equipo de investigación. De izquierda a derecha: Dra. Katey Pellican, Dr. Budhan Pukazhenthí, Gina Della Togna, Dra. Diorene Smith y Dr. Luis Padilla

El examen físico externo (Figura 6) incluyó análisis de ultrasonido abdominal, transrectal y de las glándulas sexuales accesorias, inspección intravaginal, observación de la condición de la dentadura, del estado de la almohadilla de las patas y de la piel.



**FIGURA 6.** Ultrasonido abdominal y examen intravaginal llevado a cabo por la Dra. Katey Pellican y el Dr. Budhan Pukazhenthí, respectivamente.

Se tomó un promedio de 20 ml de sangre por individuo (Figura 7). Una parte de estas muestras (1.5 ml) se utilizó para el análisis de variabilidad genética y

endogamia, mientras que el resto se utilizó para llevar a cabo un extenso diagnóstico sobre el estado de salud de cada uno de los individuos.

Entre los análisis realizados están: hemograma completo (conteo de glóbulos rojos, conteo de glóbulos blancos, conteo de plaquetas y conteo de células diferenciales), química de sueros, y composición mineral. Una alícuota fue también analizada para observar la exposición a enfermedades.



**FIGURA 7.** Toma de muestras de sangre de la pata delantera.

## **II. Variabilidad genética y estructura poblacional**

Las extracciones de ADN para los estudios de variabilidad genética y endogamia se obtuvieron a partir de muestras de sangre (23 individuos) preservadas a 4° C en Buffer de Lisis 1X (a partir de Solución 10X: 12.1g (Tris 0.1 M), 5.48g (NaCl 0.1M), 200ml de 0.5M EDTA, pH 8.0 (EDTA 0.1M), 800ml ddH<sub>2</sub>O y 100g de n-lauroylsarcosine (sarkosyl-L)) y pelo (1 individuo), utilizando el kit comercial de extracción QIAGEN-DNeasy® Blood and Tissue Kit. Para la extracción a partir de sangre, se utilizaron 180 µl de sangre (diluida en Buffer de Lisis) de cada uno de los individuos para obtener una concentración promedio de 54.4 ng/µl de DNA.

La variabilidad genética y el nivel de endogamia presente entre los individuos y poblaciones se determinaron mediante la técnica de microsatélites que utiliza el método de PCR con cola M13 (Mavárez y González, 2006). Los primers utilizados para los microsatélites, específicos para la especie, fueron previamente desarrollados por Norton y Ashley, 2004 (Tabla 2)

**Tabla 2.** Primers para microsatélites utilizados en este estudio (Norton & Ashley, 2004)

Locus	Motivo	Secuencia
Tte1	(AC)25	Forward ATTAAGCAGATGCCAACCTGAAG
		Reverse CCCTGTGGTGTITTTTGGATC
Tte5	(TC)10(AC)10	Forward TCAACCCCTCCTGTCTCTTC
		Reverse ACTGATGGAACCGAGAAGCCAC
Tte12	(AC)19	Forward TTAGGGAAATAACAGGTCTGG
		Reverse GTTGTTTTGCATCCAAATTGG
Tba15	(AC)19	Forward TTGACCTTTCATAAGCAGCC
		Reverse CCATCTCTCCATTCCAGTTC
Tba20	(AC)15	Forward AACCCAAGTTGTCCGTCAACAG
		Reverse GCAGTTGTCTCTGACCGTGTGTTAG
Tba21	(AC)15	Forward ACCACTGCATATTTCTGCTGCC
		Reverse TCCTTACCTGCCTCCAAGTAAAG
Tba23	(AC)14	Forward ACAGTTTGTCCCTCCAAGGTTG
		Reverse GCAGGTCAAATATACTGTCAGCCTGG

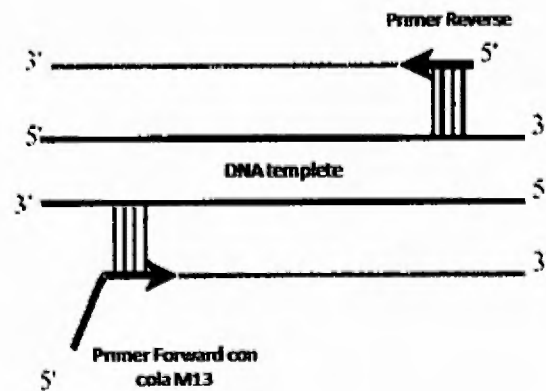
El método M13 utiliza una combinación de 3 primers para lograr la amplificación del locus deseado: un primer forward específico para la secuencia con una cola M13 (-19) en el extremo 5', un primer reverse (sin cola) específico para la

secuencia del primer forward y un primer M13 (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') universal. Solamente uno de los primers utilizados en la reacción de PCR necesita tener la cola. El primer M13 se marca con un fluorocromo específico, por lo que solo el primer forward o solo el primer reverse debe tener la misma secuencia que el primer M13 marcado con el fluorocromo.

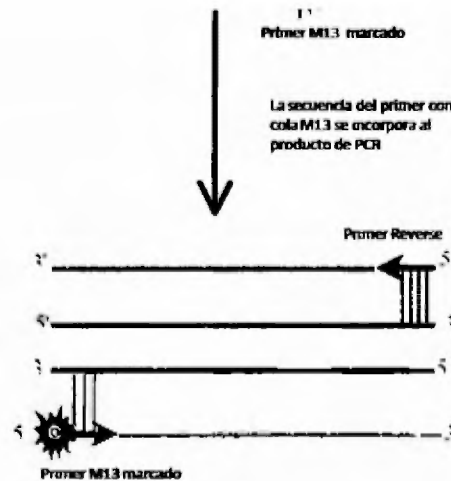
Se utilizaron 5 primers M13 marcados con diferentes fluorocromos:

- 1) M13-FAM, 2) M13-HEX, 3) M13-VIC, 4) M13-PET y 5) M13-NED

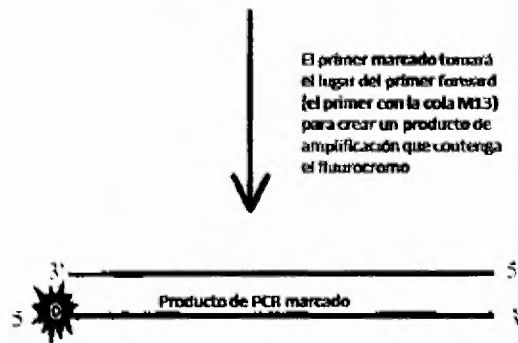
La síntesis inicial del nuevo DNA está liderada por el primer que contiene la cola M13 y el primer reverse sobre la hebra template original de DNA.



El DNA generado en la primera ronda de síntesis se convierte en el template para las amplificaciones subsiguientes, ya sea con el primer forward o reverse. Para la segunda ronda de amplificación, el producto a amplificar tendrá la secuencia de la cola M13 incorporada al producto de PCR.



Para la tercera ronda de amplificación, donde encontramos un exceso de 10 veces, el primer M13 marcado tomará el lugar del primer forward (el que contiene la cola M13) para crear un producto amplificado que contenga el fluorocromo, de esta manera puede ser detectado por el secuenciador (Applied Biosystems 3130x/Genetic Analyzer<sup>®</sup> de 16 capilares).



La reacción de PCR utilizada fue como se describe a continuación: 1.5-2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de Promega PCR Buffer 10X, 0.25 µM dNTP's, 0.5 U Taq Polimerasa Promega, BSA 20X, 0.03 µM Primer F (con Cola M13), 0.3 µM Primer R, 0.5 µl de Primer M13 y 0.2-1.0 µl de DNA genómico, para un volumen final de 10 µl.

Las condiciones del PCR se describen en la tabla a continuación:

**TABLA 5.** Condiciones de las reacciones de PCR para cada locus

Tte1		Tte5		Tte12		Tba15		Tba20		Tba21		Tba23	
T °	Tiempo	T °	Tiempo	T °	Tiempo	T °	Tiempo	T °	Tiempo	T °	Tiempo	T °	Tiempo
94	04:00	94	04:00	94	04:00	94	04:00	94	04:00	94	04:00	94	04:00
94	00:30	94	00:30	94	00:30	94	00:30	94	00:30	94	00:30	94	00:30
61	00:30	61	00:30	54.2	00:30	56.4	00:30	65	00:30	65	00:30	58.9	00:30
72	00:30	72	00:30	72	00:30	72	00:30	72	00:30	72	00:30	72	00:30
72	04:00	72	04:00	72	04:00	72	04:00	72	04:00	72	04:00	72	04:00
4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞

Los datos obtenidos fueron luego analizados en el programa GeneMapper® Software, versión 3.7. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas Genepop, Fstat y GDA.

Los análisis estadísticos aplicados a los datos moleculares consistieron en:

1. Determinación de número de alelos por locus ( $\bar{A}$ )
2. Determinación de riqueza alélica ( $R_S$ )
3. Determinación niveles de heterocigocidad observados ( $H_O$ ) y esperados ( $H_e$ ).
4. Determinación del estadístico  $F(\theta F_{ST})$  (provee los medios para observar diferencias genéticas entre poblaciones).
5. Determinación del coeficiente de endogamia  $f(F_{IS})$
6.  $\chi^2$  para comparar subgrupos y contestar algunas preguntas que surjan de acuerdo al diseño experimental.

### III. Análisis de las características espermáticas

#### a. Obtención de muestras de semen

Las muestras de semen (Figura 9) se obtuvieron mediante la técnica de electroeyaculación, con la ayuda de científicos y veterinarios provenientes del Smithsonian National Zoological Park, Washington, DC. Los 10 machos fueron anestesiados utilizando una combinación de detomidina, ketamina y guaifenesina y fueron sometidos a examinación mediante ultrasonido para determinar el estatus de salud del tracto reproductivo. Para la extracción de semen se aplicó un protocolo estandarizado de electroeyaculación (Howard *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 2006). Se utilizó un electroestimulador de onda sinusoidal (AC, 60-Hz) y una sonda rectal de Teflon® (Figura 8) (de 4.5 cm de diámetro, P.T. Electronics, Boring, OR, USA) que se usó para administrar de 45 a 60 estímulos en lapsos de apagado y prendido de 3 segundos en tres series (Collins *et al.*, 2006). Cada serie se separó de la siguiente por intervalos de descanso de 10 minutos en los cuales las alícuotas de semen fueron analizadas para pH, volumen total, motilidad, osmolaridad y concentración espermática.



FIGURA 8. Inserción de la sonda

Estas alícuotas fueron luego preservadas en una dilución 1:3 en una solución extendedora a base de leche (INRA 96, IMV Technologies, USA) y analizadas



para porcentaje total de motilidad y porcentaje de motilidad progresiva. Luego de mezclar los eyaculados de calidad comparable de cada individuo, las muestras de semen fueron centrifugadas ( $400 \times g$ ; 10 min) para remover el plasma seminal. Los pellets resultantes se resuspendieron en la solución extendedora a base de leche INRA 96 (IMV Technologies) a una concentración promedio de  $200 \times 10^6/ml$ , se cargaron 0.5 ml de esta solución en pajillas de criopreservación de plástico, se enfriaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos, luego se expusieron a vapor de nitrógeno líquido (2 pulgadas sobre el nivel de nitrógeno líquido; 10 minutos), para finalmente ser sumergidas dentro del nitrógeno líquido per se.



**FIGURA 9.** Muestras de semen

### **b. Análisis Morfológico**

Para el análisis morfológico, una alícuota ( $200 \mu\text{l}$ ) de semen se preservó en 2 ml de buffer formol-salina al 2% y se examinó en un microscopio de contraste de fase con objetivo 1000X. Dentro de los factores a considerar dentro del análisis morfológico están: espermia normal, anomalías primarias (macrocefalia, microcefalia, bicefalia, parte media anormal, parte media faltante, cola enrollada, espermia biflagelado), anomalías secundarias (acrosoma anormal, parte media doblada con droplet (gotita citoplasmática), parte media doblada sin droplet (gotita citoplasmática), cola enrollada con droplet (gotita citoplasmática),

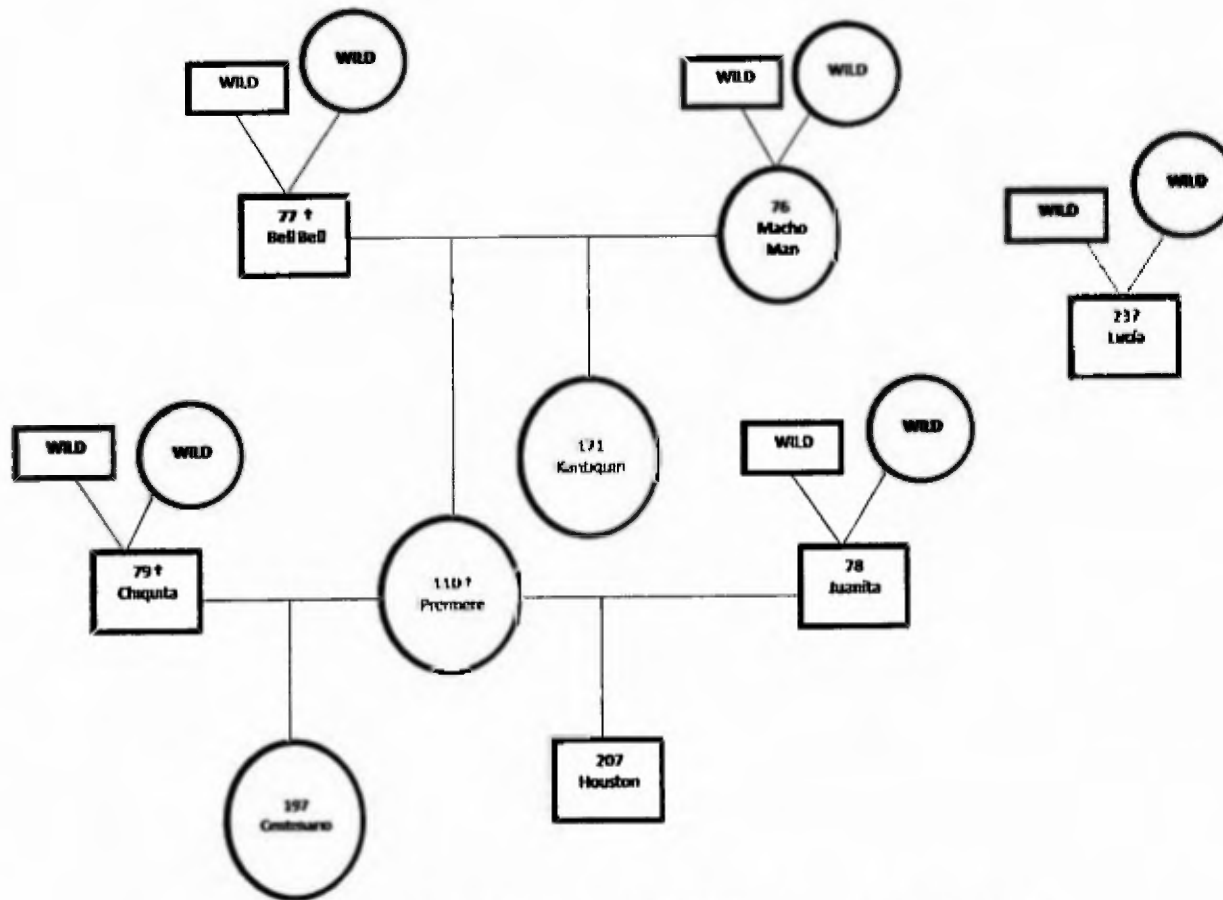
cola enrollada sin droplet (gotita citoplasmática), gotita citoplasmática proximal, gotita citoplasmática distal, cuello doblado y misceláneos ( espermátidas, células y otros) (Pukazhenthil *et al.*, 1999).

Para observar la integridad acrosomal, se tomó un pequeño volumen de esperma sin fijar (dos placas por individuo: esperma fresco recién extraído y esperma descongelado) y se extendió en un porta objetos. Se dejó secar por 15 minutos y se le añadieron 100 µl de FITC-PNA. Se incubó a oscuras a 4° C por 15 minutos. Luego se lavó cuidadosamente con PBS estéril y nuevamente se dejó secar a oscuras. Una vez listas las placas, se leyeron en un microscopio de fluorescencia.

## **RESULTADOS**

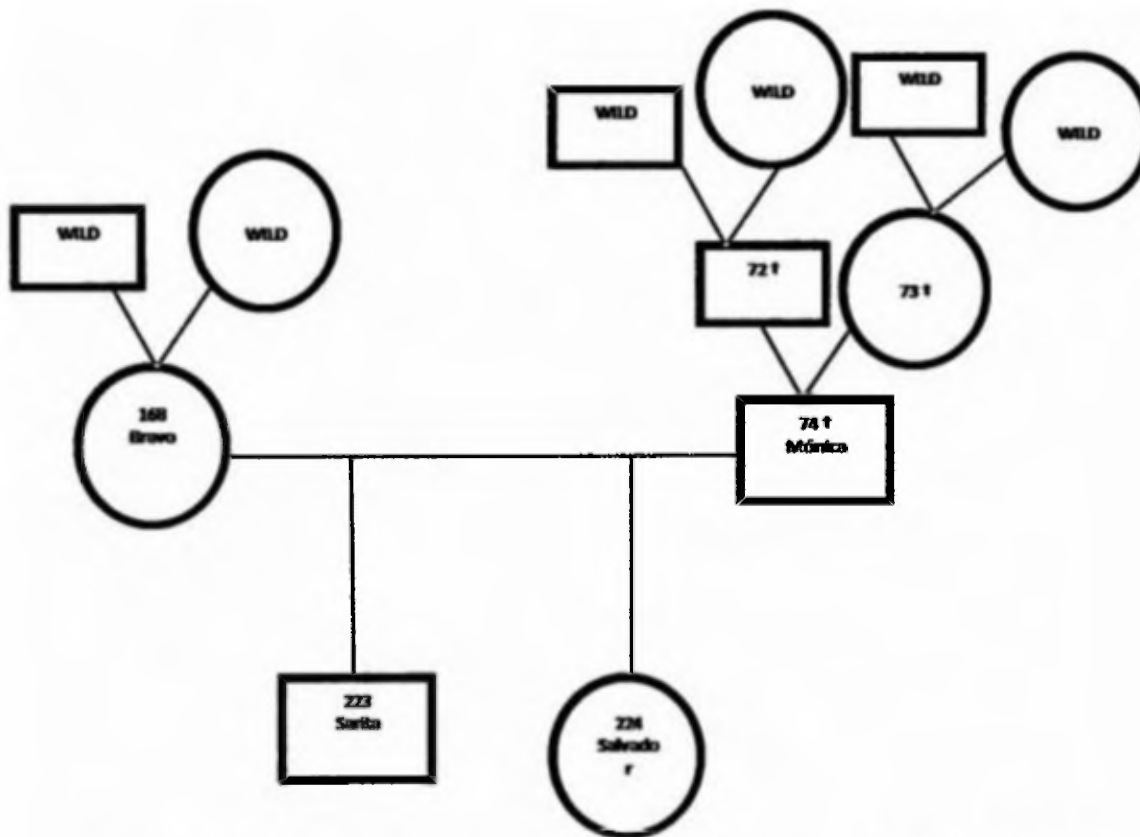
### **I. Pedigrí y Evidencias de Endogamia**

Los siguientes diagramas se confeccionaron para cada una de las poblaciones estudiadas y muestran el nivel de relación existente (Pedigrí) entre los individuos pertenecientes a cada una de ellas, de acuerdo a la información que se encuentra en el International Studbook para el Tapir Centroamericano 2008, y datos recaudados recientemente (Grupo de Especialistas de Tapires, 2008). Los cuadrados representan las hembras, los círculos representan los machos y aquellos marcados con el símbolo “+” son individuos que ya han fallecido.



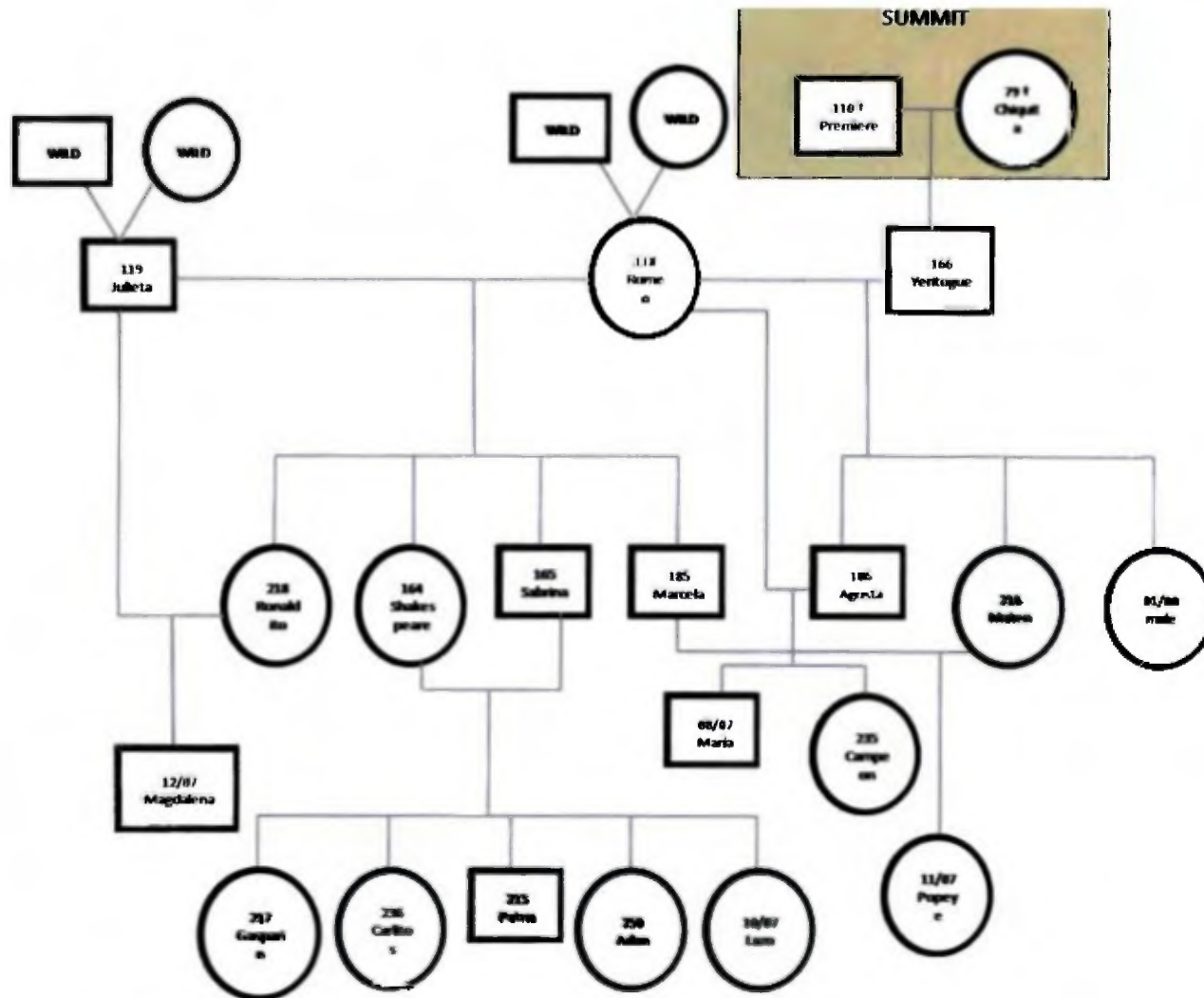
**FIGURA 10.** Pedigrí de los individuos del SUMMIT basado en el Studbook 2008

La población actual del SUMMIT (Figura 10) contiene solamente 6 individuos, la mayoría de los cuales son descendientes de individuos silvestres (WILD). El origen de los progenitores silvestres no ha sido determinado con exactitud. En esta población no se observa evidencia de endogamia. Es necesario mencionar que los datos provienen de records llevados por los cuidadores de cada una de las instituciones y se basan en observaciones y memoria de los mismos.



**FIGURA 11.** Pedigrí de los individuos del Zoológico El Nispero basado en el Studbook 2008

La población del el Zoológico el Nispero (Figura 11) contiene 4 individuos de los cuales, solamente uno es directamente descendiente de progenitores silvestres (WILD), el resto proviene de individuos que se reprodujeron en cautiverio. En esta población tampoco se observan evidencias de endogamia de acuerdo a los records mantenidos por la institución. Al igual que en la población del SUMMIT, la población del Nispero descende de individuos silvestres (WILD) en su mayoría.



**FIGURA 12.** Pedigrí de los individuos de la Reserva Privada Villa Griselda

La población de Villa Griselda (Figura 12) actualmente contiene 19 individuos, de los cuales se muestrearon 14 individuos para este estudio. Los 5 individuos no muestreados representan nacimientos posteriores a la fecha del muestreo. Esta población presenta evidencias de endogamia ya que 16 de los 19 individuos de la población descenden de 3 individuos fundadores. Siete individuos se encuentran emparentados con la población del SUMMIT.

## **II. Estructura Poblacional y Variabilidad Genética**

Los estudios de variabilidad genética en especies que se encuentran en peligro de extinción y en cautiverio representan una herramienta útil para la toma de decisiones en el manejo apropiado de estas poblaciones. El objetivo de nuestro estudio es caracterizar el nivel de variabilidad genética presente en las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá. Nuestros resultados, utilizando datos de microsatélites, indican que las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá no presentan pérdida considerable de variabilidad genética.

La tabla presentada a continuación (Tabla 6) muestra una comparación del número promedio de alelos por locus ( $A$ ), heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y heterocigocidad observada ( $H_o$ ) entre los estudios realizados por Norton and Ashley (2004) y nuestro estudio.

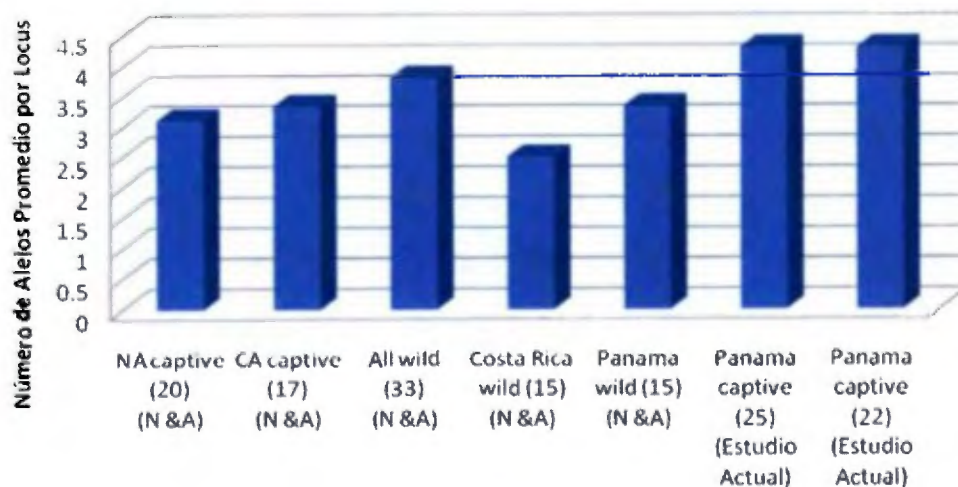
De acuerdo a los estadísticos descriptivos (Tabla 6, Figuras 13 y 14), la población del estudio actual aparentemente muestra valores mayores en el número promedio de alelos por locus que los encontrados por Norton and Ashley, 2004. De la misma manera, los niveles de heterocigocidad esperados y observados, son ligeramente mayores en la población del estudio actual (la población con  $N=25$  incluye a los individuos que fallecieron después del muestreo, mientras que la población con  $N=22$  excluye a estos individuos)

**TABLA 6.** Variabilidad Genética del Tapir Centroamericano (Norton and Ashley 2004 y el estudio actual sombreado de color naranja)

Population (n)	A	He	Ho
NA captive (20) (N &A)	3.1	0.47	0.48
CA captive (17) (N &A)	3.33	0.49	0.39
All wild (33) (N &A)	3.8	0.44	0.39
Costa Rica wild (15) (N &A)	2.5	0.37	0.39
Panama wild (15) (N &A)	3.33	0.43	0.41
Panama captive (25) (Estudio Actual)	4.3	0.52	0.52
Panama captive (22) (Estudio Actual)	4.3	0.52	0.53

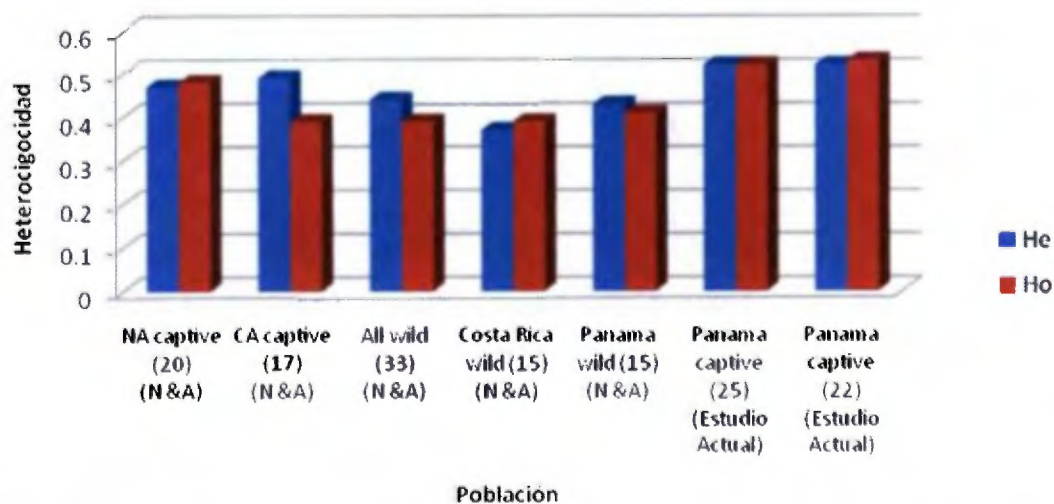
**A**= Numero promedio de alelos por locus  
**He**= Heterocigocidad esperada  
**Ho**= Heterocigocidad observada

**Comparación del Número Promedio de Alelos por Locus entre Norton & Ashley, 2004 y el estudio actual**



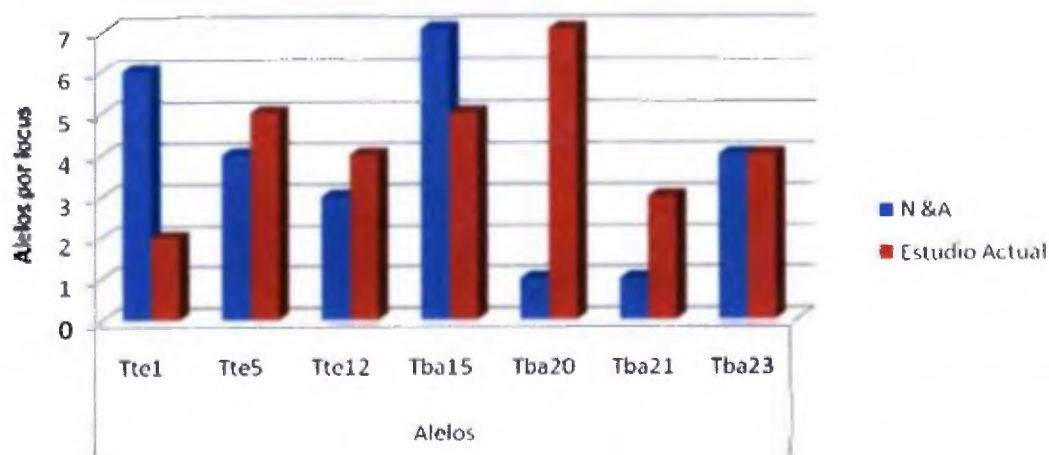
**FIGURA 13.** Comparación del Número de Alelos promedio por Locus entre las poblaciones estudiadas por Norton and Ashley, 2004 y el estudio actual

### Comparación del nivel de heterocigidad entre los resultados de Norton & Ashley y el estudio actual



**FIGURA 14.** Comparación del Nivel de Heterocigidad (esperada y observada) entre las poblaciones estudiadas por Norton and Ashley, 2004 y el estudio actual

### Comparación de Número de Alelos por locus Norton & Ashley, 2004 y Estudio Actual



**FIGURA 15.** Comparación del número de alelos por locus entre los resultados de Norton and Ashley, 2004 y el estudio actual

La figura 15 muestra una comparación en el número de alelos por locus entre los resultados obtenidos por Norton and Ashley (2004) y el estudio actual. Los resultados indican que el estudio actual encontró un mayor número de alelos por

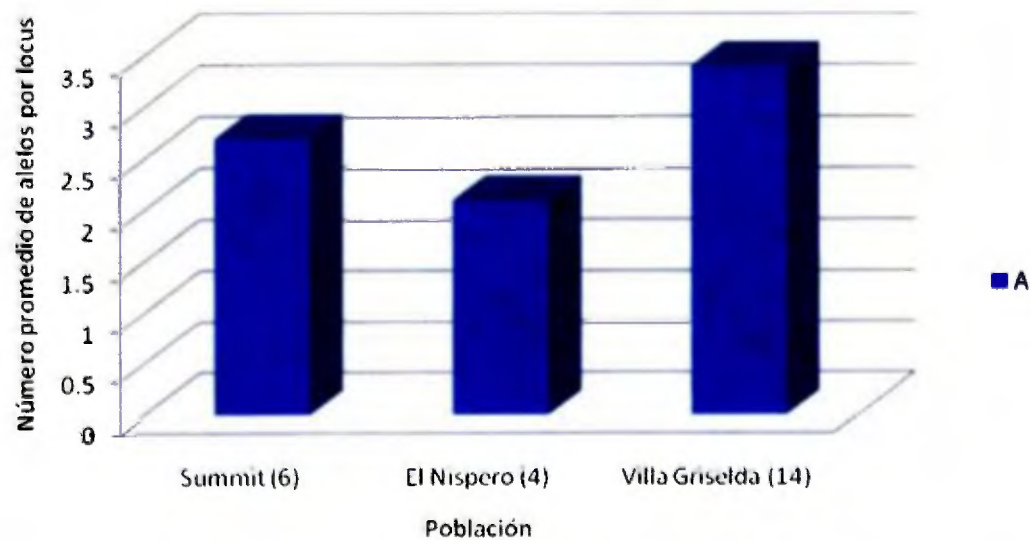


locus en 4 de los 7 loci (Tte5, Tte12, Tba20 y Tba21) que los encontrados por Norton and Ashley, 2004.

**TABLA 7.** Variabilidad Genética de las tres poblaciones estudiadas

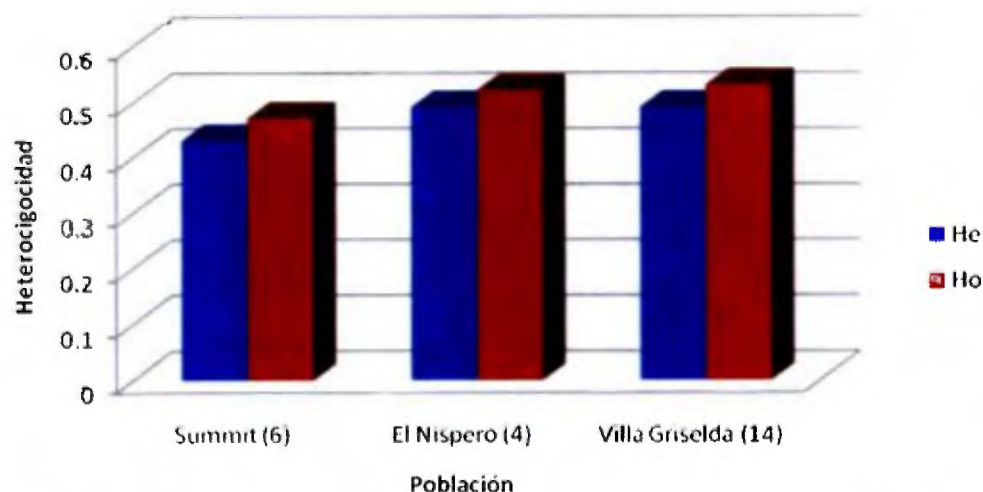
<b>Population (n)</b>	<b>A</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>
Summit (6)	2.7	0.43	0.47
El Nispero (4)	2.1	0.49	0.52
Villa Griselda (14)	3.4	0.49	0.53

**Comparación del número promedio de alelos por locus entre las tres poblaciones estudiadas**



**FIGURA 16.** Número promedio de alelos por locus para las tres poblaciones estudiadas

### Heterocigidad esperada vs observada en las tres poblaciones estudiadas



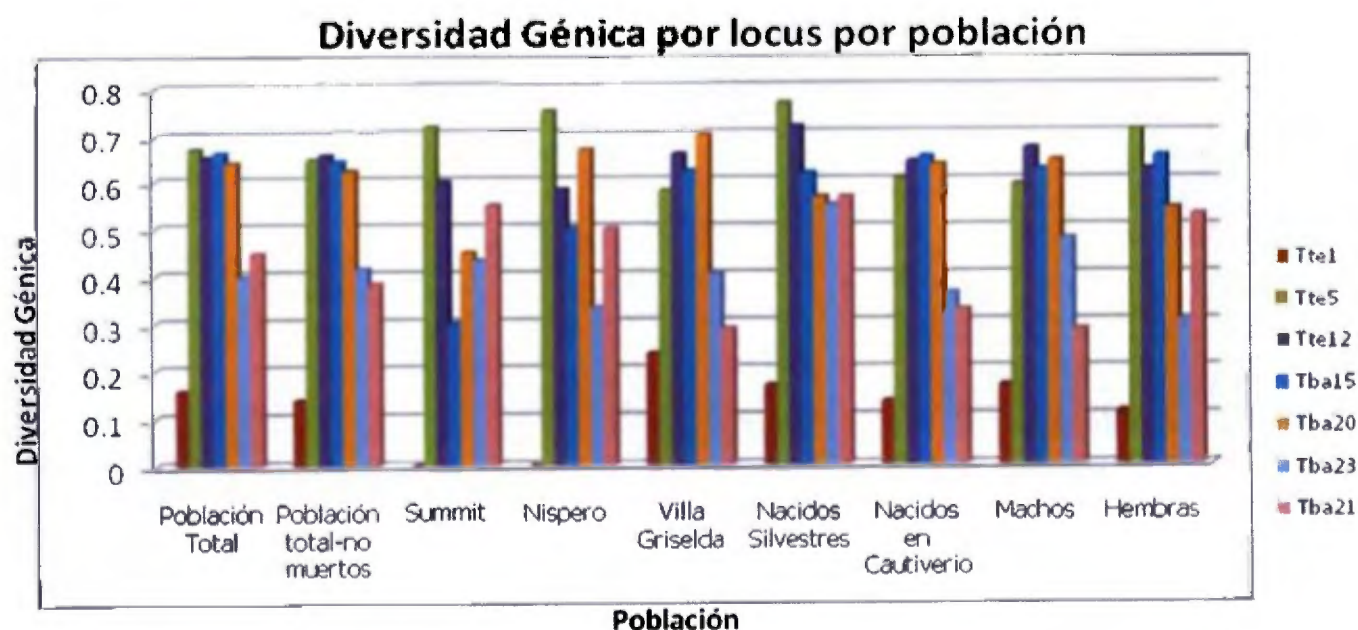
**FIGURA 17.** Niveles de heterocigidad (esperada y observada) de las tres poblaciones estudiadas

De acuerdo con la figura 16, la población de Villa Griselda presenta un mayor número promedio de alelos por locus, seguido por la población del Summit y por último, la población del Nispero.

La figura 17 muestra que, en general, los valores de heterocigidad observados presentes en las tres poblaciones son ligeramente mayores que los valores esperados. La población de Villa Griselda muestra mayores niveles de heterocigidad que el resto de las poblaciones estudiadas.

**TABLA 8.** Comparación de la diversidad génica por locus entre poblaciones

Locus	Población Total	Población total-no muertos	Summit	Nispero	Villa Griselda	Nacidos Silvestres	Nacidos en Cautiverio	Machos	Hembras
Tte1	0.158	0.138	0	0	0.235	0.167	0.133	0.167	0.111
Tte5	0.669	0.646	0.717	0.75	0.58	0.767	0.606	0.593	0.708
Tte12	0.651	0.655	0.6	0.583	0.657	0.717	0.642	0.67	0.625
Tba15	0.661	0.642	0.3	0.5	0.622	0.617	0.652	0.625	0.653
Tba20	0.64	0.623	0.45	0.667	0.699	0.567	0.635	0.644	0.542
Tba23	0.399	0.415	0.433	0.333	0.404	0.55	0.363	0.478	0.306
Tba21	0.448	0.384	0.55	0.5	0.288	0.567	0.327	0.285	0.528



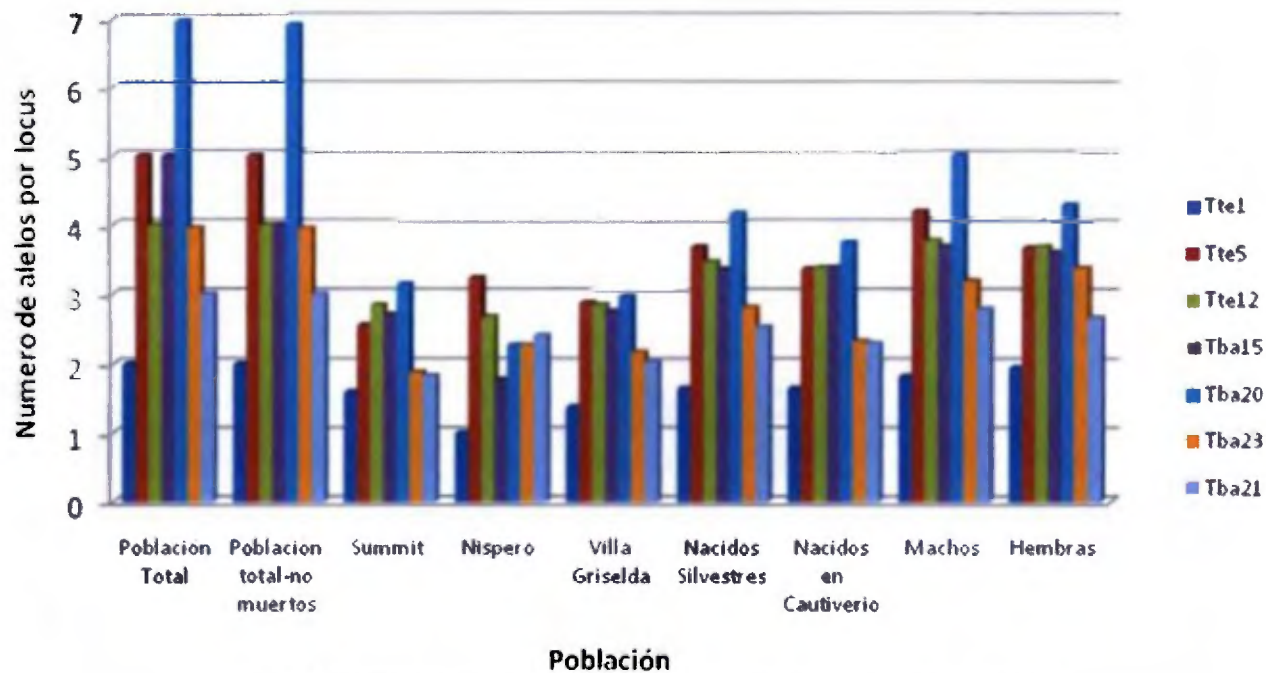
**FIGURA 18.** Comparación de la diversidad génica por locus entre las poblaciones estudiadas

La tabla 8 y la figura 18 muestran una comparación de la diversidad génica en términos de heterocigocidad observada por población. No se observan diferencias entre la población total con la que excluye los individuos fallecidos. La población de Villa Griselda muestra una mayor diversidad génica que las poblaciones de Summit y Nispero. De igual manera, la población de individuos nacidos silvestres muestra una mayor diversidad génica que la población de individuos nacidos en cautiverio. No se observa gran diferencia entre géneros.

**TABLA 9.** Comparación de la riqueza alélica presente entre las poblaciones estudiadas

	Población Total	Población total-no muertos	Summit	Nispero	Villa Griselda	Nacidos Silvestres	Nacidos en Cautiverio	Machos	Hembras
<b>Tte1</b>	2	2	1.597	1	1.378	1.646	1.648	1.824	1.946
<b>Tte5</b>	4.999	4.998	2.564	3.235	2.875	3.682	3.366	4.203	3.671
<b>Tte12</b>	4	4	2.84	2.682	2.84	3.469	3.387	3.78	3.688
<b>Tba15</b>	4.999	4	2.708	1.773	2.752	3.359	3.387	3.694	3.606
<b>Tba20</b>	6.959	6.907	3.146	2.273	2.964	4.173	3.75	5.012	4.298
<b>Tba23</b>	3.96	3.955	1.882	2.273	2.17	2.81	2.332	3.196	3.384
<b>Tba21</b>	3	3	1.831	2.409	2.034	2.538	2.298	2.787	2.671

## Riqueza alélica por locus por población

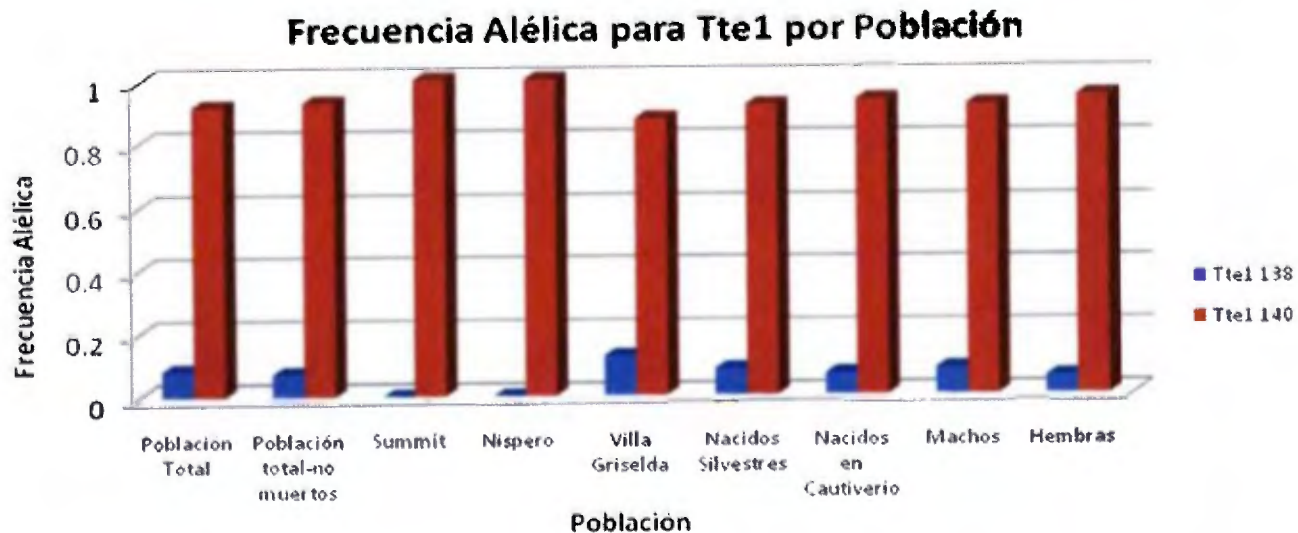


**FIGURA 19.** Comparación de la riqueza alélica presente en las poblaciones estudiadas

De acuerdo la tabla 9 y la figura 19, la riqueza alélica presente en la población total no varía mucho una vez extraídos los individuos fallecidos. La población del Nispero muestra diferencias en comparación con la población del Summit y Villa Griselda: se observan disminuciones en la riqueza alélica del locus Tte1, Tte5, Tba15 y Tba20. La población del Summit muestra una mayor riqueza alélica para el locus Tba20 en comparación con las otras dos poblaciones. Al comparar los individuos nacidos silvestres con los nacidos en cautiverio, se observa que los valores son relativamente parecidos, con pequeñas variaciones en los loci Tte5 y Tba20. Con respecto a la población de machos y hembras, los valores de riqueza alélica no muestran gran diferencia, solo se observan pequeñas variaciones en los loci Tte5, Tba20 y Tba23.

**TABLA 10.** Frecuencia alélica para Tte 1

	Tte1	
	138	140
<b>Población Total</b>	0.083	0.917
<b>Población total-no muertos</b>	0.071	0.929
<b>Summit</b>	0	1
<b>Nispero</b>	0	1
<b>Villa Griselda</b>	0.125	0.875
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.083	0.917
<b>Nacidos en cautiverio</b>	0.067	0.933
<b>Machos</b>	0.083	0.917
<b>Hembras</b>	0.056	0.944



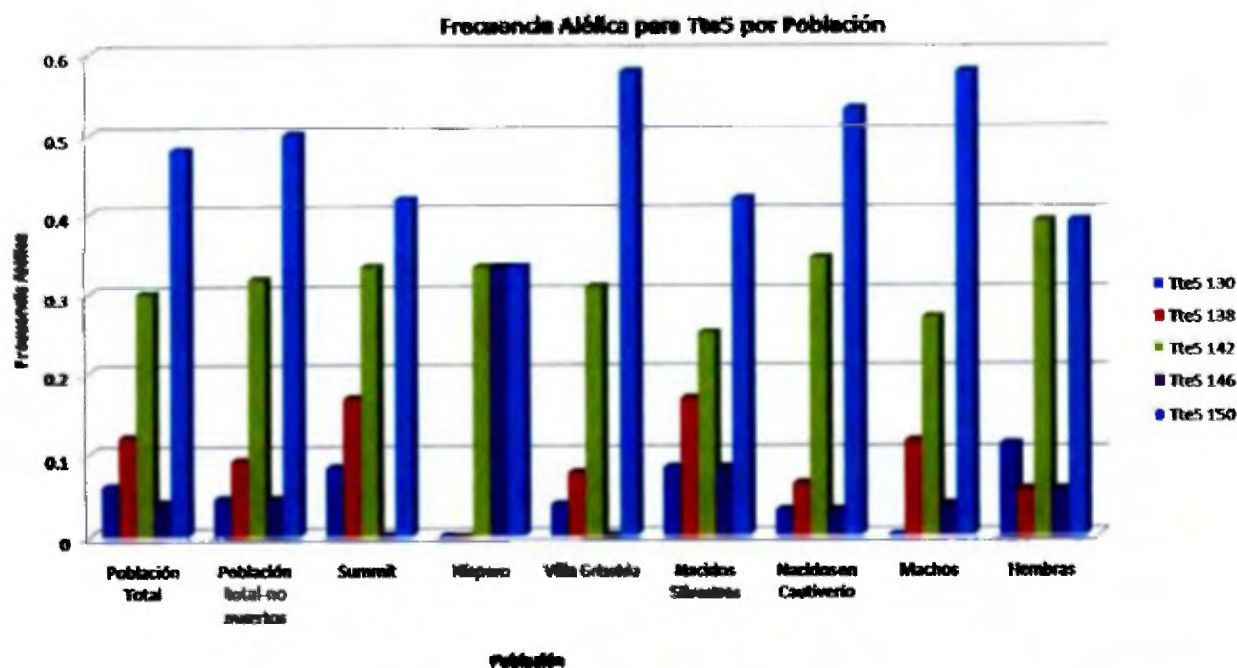
**FIGURA 20.** Frecuencia alélica para el locus Tte1

La tabla 10 y la figura 20 muestran la frecuencia de los alelos 138 y 140 del locus Tte1. Según los resultados, el alelo 138 es un alelo raro y además privado para la población de Villa Griselda, presente tanto en los individuos de esta

población nacidos silvestres, en cautiverio, machos y hembras. El alelo 140 es un alelo común presente en todas las poblaciones.

**TABLA 11.** Frecuencia alélica para Tte5

	<b>Tte5</b>				
	<b>130</b>	<b>138</b>	<b>142</b>	<b>146</b>	<b>150</b>
<b>Población Total</b>	0.06	0.12	0.3	0.04	0.48
<b>Población total-no muertos</b>	0.045	0.091	0.318	0.045	0.5
<b>Summit</b>	0.083	0.167	0.333	0	0.417
<b>Nispero</b>	0	0	0.333	0.333	0.333
<b>Villa Griselda</b>	0.038	0.077	0.308	0	0.577
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.083	0.167	0.25	0.083	0.417
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.031	0.063	0.344	0.031	0.531
<b>Machos</b>	0	0.115	0.269	0.038	0.577
<b>Hembras</b>	0.111	0.056	0.389	0.056	0.389

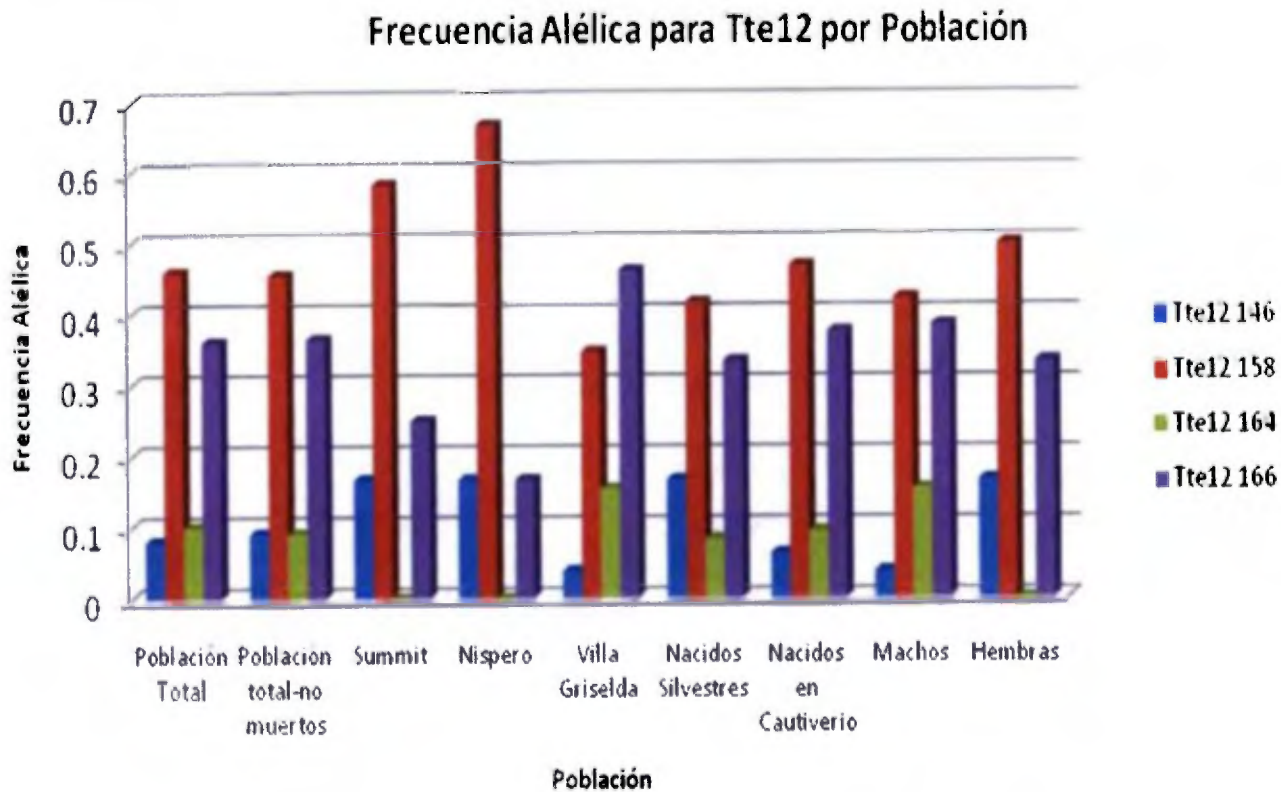


**FIGURA 21.** Frecuencia alélica para Tte5

De acuerdo con la tabla 11 y la figura 21, los alelos 130, 138 y 146 son alelos raros en la mayoría de las poblaciones. No se observa gran diferencia en las frecuencias alélicas para Tte5 entre la población total y la población en la que los individuos fallecidos se han eliminado. Al comparar las tres poblaciones estudiadas, se puede observar que el alelo 146 es un alelo privado para la población del Nispero que está presente tanto en individuos hembras, machos, nacidos silvestres y en cautiverio y que se encuentra en alta frecuencia. La población del Nispero también carece de los alelos 130 y 138. De igual manera, el alelo 130 se encuentra en las hembras presentes en el Summit y Villa Griselda algunas de las cuales pueden ser nacidas silvestres y en cautiverio. Los alelos 142 y 150 son alelos comunes presentes en altas frecuencias para todas las poblaciones.

**TABLA12.** Frecuencia alélica para Tte12

	<b>Tte12</b>			
	<b>146</b>	<b>158</b>	<b>164</b>	<b>166</b>
<b>Población Total</b>	0.08	0.46	0.1	0.36
<b>Población total-no muertos</b>	0.091	0.455	0.091	0.364
<b>Summit</b>	0.167	0.583	0	0.25
<b>Nispero</b>	0.167	0.667	0	0.167
<b>Villa Griselda</b>	0.038	0.346	0.154	0.462
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.167	0.417	0.083	0.333
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.063	0.469	0.094	0.375
<b>Machos</b>	0.038	0.423	0.154	0.385
<b>Hembras</b>	0.167	0.5	0	0.333



**FIGURA 22.** Frecuencia alélica para Tte12 por población

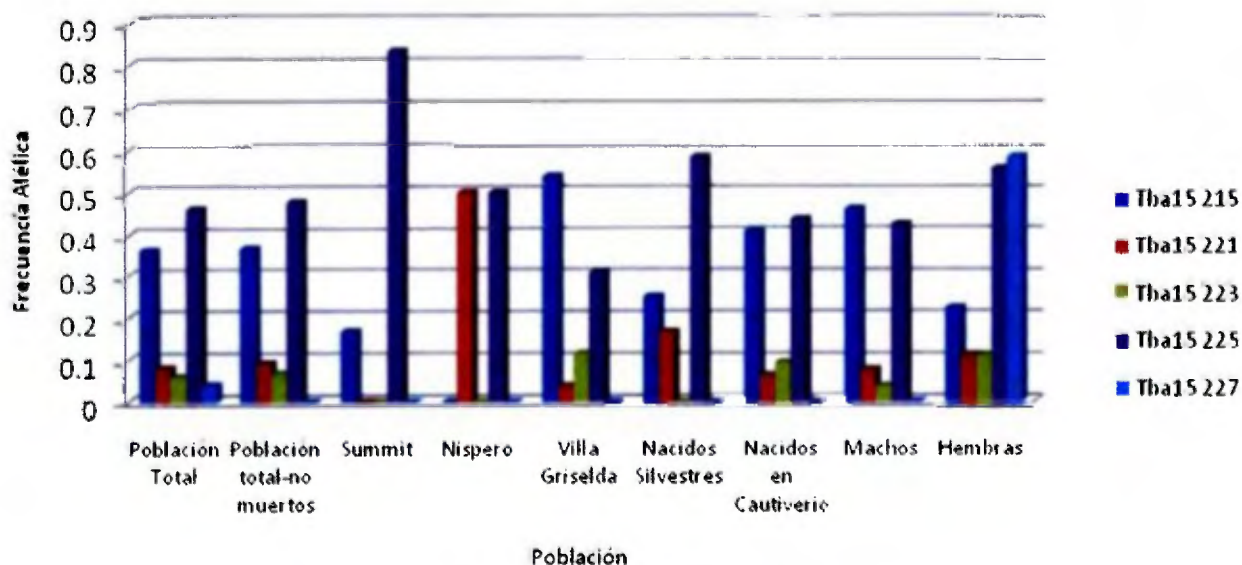
La frecuencia alélica de Tte12 (tabla 12 y figura 22) no varía considerablemente entre la población total y la población total donde se eliminaron los individuos fallecidos. Los alelos 158 y 166 son alelos comunes en todas las poblaciones ya que se encuentran en altas frecuencias. Los alelos 146 y 164 son alelos raros ya que se encuentran en muy baja frecuencia en todas las poblaciones. El alelo 164 es un alelo privado para la población de Villa Griselda y está ausente en la población de las hembras.



**TABLA 13.** Frecuencia alélica para Tba15

	<b>Tba15</b>				
	<b>215</b>	<b>221</b>	<b>223</b>	<b>225</b>	<b>227</b>
<b>Población Total</b>	0.36	0.08	0.06	0.46	0.04
<b>Población total-no muertos</b>	0.364	0.091	0.068	0.477	0
<b>Summit</b>	0.167	0	0	0.833	0
<b>Nispero</b>	0	0.5	0	0.5	0
<b>Villa Griselda</b>	0.538	0.038	0.115	0.308	0
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.25	0.167	0	0.583	0
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.406	0.063	0.094	0.438	0
<b>Machos</b>	0.462	0.077	0.038	0.423	0
<b>Hembras</b>	0.222	0.111	0.111	0.556	0.583

**Frecuencia Alélica para Tba15 por Población**



**FIGURA 23.** Frecuencia alélica para Tba15 por población

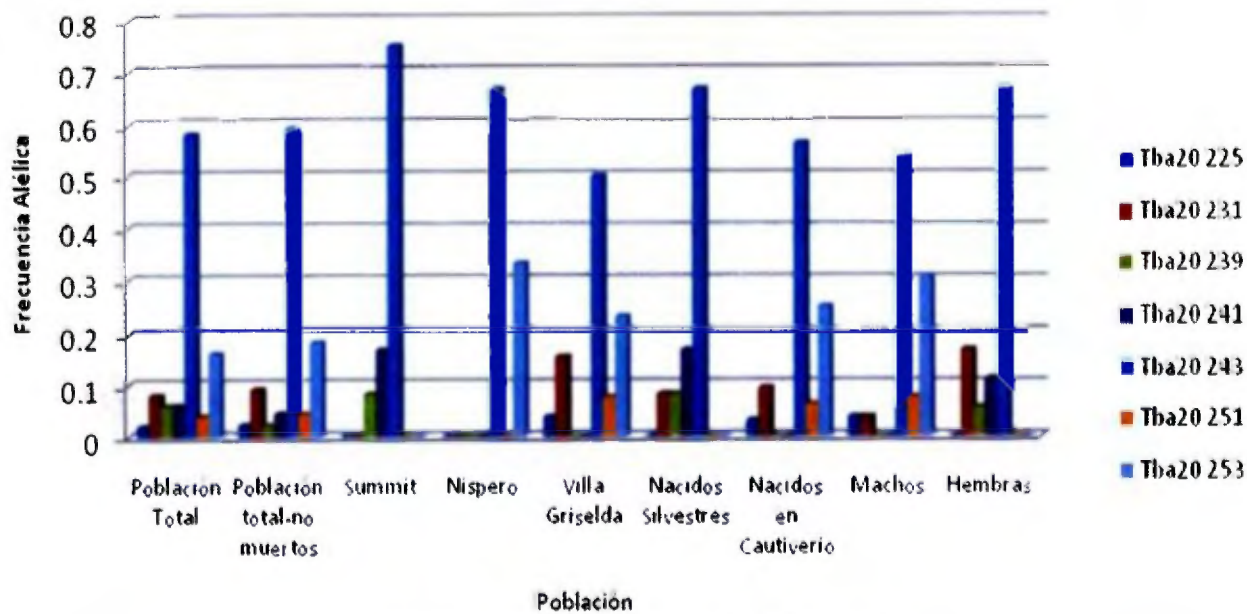
Según la tabla 13 y la figura 23, los alelos 215 y 225 son alelos comunes para la mayoría de las poblaciones. Se observan diferencias entre la frecuencia alélica de

Tba15 entre la población total y la población total en la que se han eliminado los individuos fallecidos. El alelo 227 parece haber estado presente solamente en las hembras que fallecieron después del muestreo. Los demás alelos presentan frecuencias muy parecidas para estas dos poblaciones. El alelo 221 es un alelo raro para todas las poblaciones, a excepción de la población del Nispero, para la cual es un alelo que se encuentra en alta frecuencia comparado con el resto de las poblaciones. El alelo 223 es un alelo raro para todas las poblaciones y privado para la población de Villa Griselda, donde individuos machos y hembras nacidos en cautiverio de esta población lo poseen.

**TABLA 14.** Frecuencia alélica para Tba20

	<b>Tba20</b>						
	<b>225</b>	<b>231</b>	<b>239</b>	<b>241</b>	<b>243</b>	<b>251</b>	<b>253</b>
<b>Población Total</b>	0.02	0.08	0.06	0.06	0.58	0.04	0.16
<b>Población total-no muertos</b>	0.023	0.091	0.023	0.045	0.591	0.045	0.182
<b>Summit</b>	0	0	0.083	0.167	0.75	0	0
<b>Nispero</b>	0	0	0	0	0.667	0	0.333
<b>Villa Griselda</b>	0.038	0.154	0	0	0.5	0.077	0.231
<b>Nacidos Silvestres</b>	0	0.083	0.083	0.167	0.667	0	0
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.031	0.094	0	0	0.563	0.063	0.25
<b>Machos</b>	0.038	0.038	0	0	0.538	0.077	0.308
<b>Hembras</b>	0	0.167	0.056	0.111	0.667	0	0

### Frecuencia Alélica para Tba20 por Población



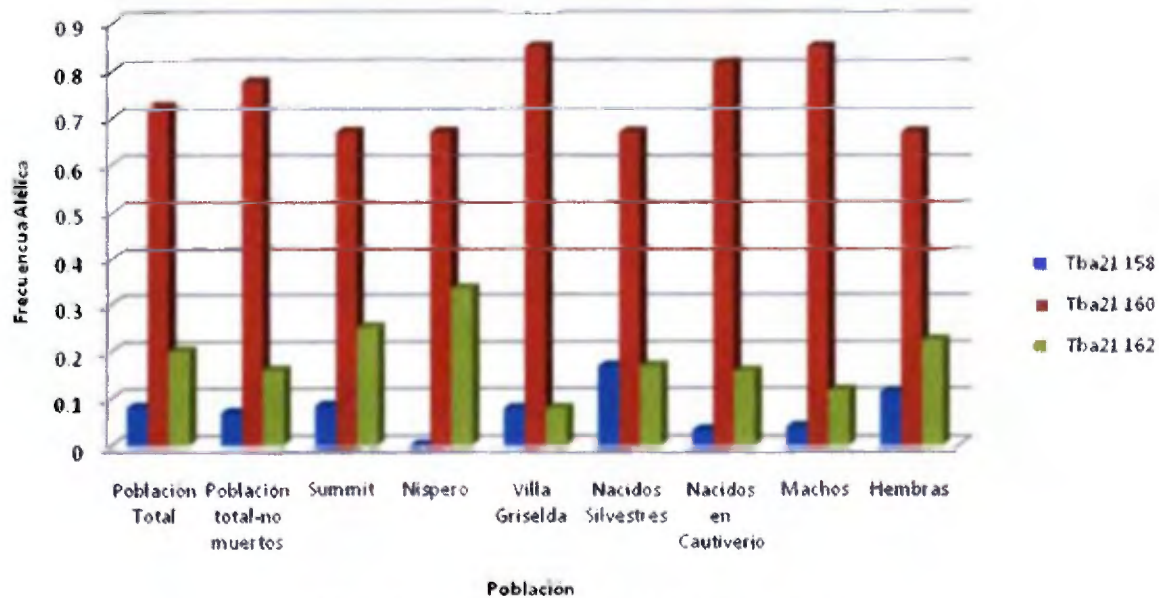
**FIGURA 24.** Frecuencia alélica para Tba20 por población

El locus Tba20 es el que más alelos contiene comparado con los demás loci. De acuerdo a la tabla 14 y figura 24, el alelo 243 es el único alelo que se encuentra en altas frecuencias en todas las poblaciones, seguido por el alelo 253 para la mayoría de las poblaciones. No se observan diferencias en la frecuencia alélica para la población total y la población total donde se eliminaron los individuos fallecidos. El alelo 239 es un alelo raro y privado para la población del Summit, que se encuentra en hembras nacidas silvestres. De igual manera, el alelo 241 es un alelo privado para la población del Summit, presente solo en individuos hembras nacidas silvestres. Los alelos 225, 231 y 251 son alelos privados para la población de Villa Griselda. Los alelos 225 y 251 están presentes solo en individuos machos nacidos en cautiverio, mientras que el alelo 231, en individuos hembras y machos, tanto nacidos silvestres como en cautiverio.

**TABLA 15.** Frecuencia alélica para Tba21

	<b>Tba21</b>		
	<b>158</b>	<b>160</b>	<b>162</b>
<b>Población Total</b>	0.08	0.72	0.2
<b>Población total-no muertos</b>	0.068	0.773	0.159
<b>Summit</b>	0.083	0.667	0.25
<b>Nispero</b>	0	0.667	0.333
<b>Villa Griselda</b>	0.077	0.846	0.077
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.167	0.667	0.167
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.031	0.813	0.156
<b>Machos</b>	0.038	0.846	0.115
<b>Hembras</b>	0.111	0.667	0.222

**Frecuencia Alélica para Tba21 por Población**



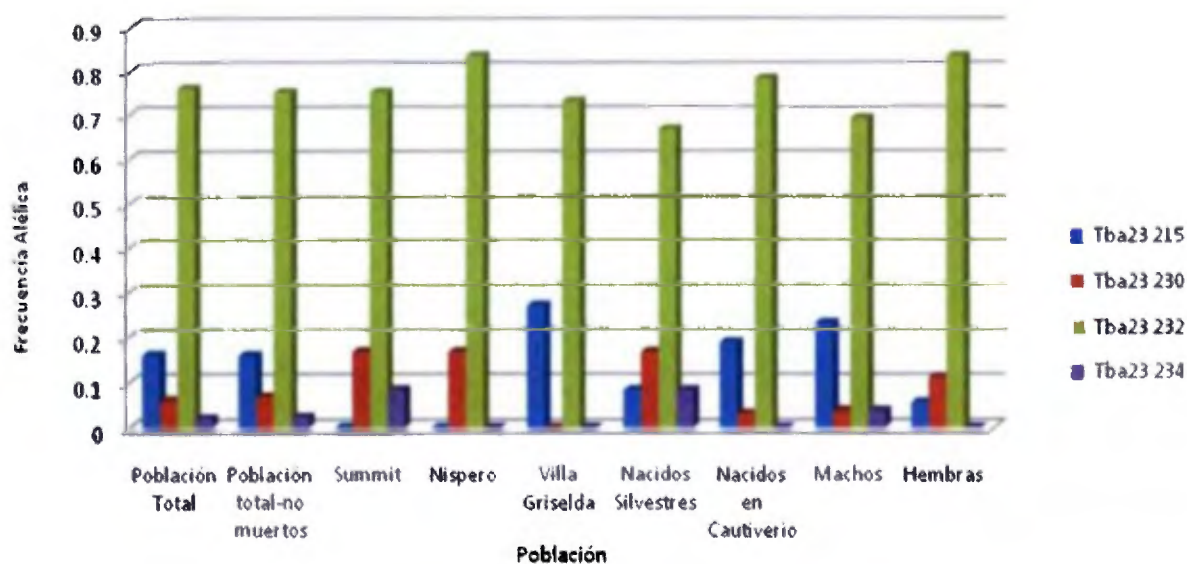
**FIGURA 25.** Frecuencia alélica para Tba21 por población

El locus Tba21 (tabla 15 y figura 25) contiene solo tres alelos diferentes, de los cuales, el alelo 160 es un alelo común (alta frecuencia) para todas las poblaciones. Los alelos 158 y 162 son alelos raros, siendo el 158 el más raro de los dos y se encuentra ausente en la población del Níspero.

**TABLA 16.** Frecuencia alélica para Tba23

	<b>Tba23</b>			
	<b>215</b>	<b>230</b>	<b>232</b>	<b>234</b>
<b>Población Total</b>	0.16	0.06	0.76	0.02
<b>Población total-no muertos</b>	0.159	0.068	0.75	0.023
<b>Summit</b>	0	0.167	0.75	0.083
<b>Níspero</b>	0	0.167	0.833	0
<b>Villa Griselda</b>	0.269	0	0.731	0
<b>Nacidos Silvestres</b>	0.083	0.167	0.667	0.083
<b>Nacidos en Cautiverio</b>	0.188	0.031	0.781	0
<b>Machos</b>	0.231	0.038	0.692	0.038
<b>Hembras</b>	0.056	0.111	0.833	0

Frecuencia Alélica para Tba23 por Población



**FIGURA 26.** Frecuencia alélica para Tba23 por población

De acuerdo con la tabla 16 y la figura 26, la frecuencia alélica del locus Tba23 no varía considerablemente entre la población total y aquella en la que se han removido los individuos fallecidos. El alelo 232 es un alelo común que se encuentra en altas frecuencias en todas las poblaciones. El alelo 234 es un alelo raro y privado para la población del Summit, presente en individuos machos nacidos silvestres. El alelo 215 es privado para la población de Villa Griselda, presente tanto en individuos hembras y machos, nacidos silvestres o en cautiverio.

**TABLA 17.** Estadístico F para la comparación de las tres poblaciones estudiadas

<b>Estadístico F para las tres poblaciones</b>		
<b>Fst</b>	<b>Fit</b>	<b>Fis</b>
0.006	-0.198	-0.286
0.162	0.239	0.2

La tabla 17 muestra los resultados para los estadísticos F para la comparación de las tres poblaciones estudiadas. Estos conforman un método para describir la estructura poblacional de organismos diploides. Fst mide el grado de diferenciación genética entre poblaciones. Este estadístico se utiliza para medir subdivisión entre poblaciones y provee, a su vez, información para estimar el flujo genético entre las poblaciones estudiadas en modelos que asumen selectividad neutral. Los valores de Fst son significativos (95% intervalos de confianza) ya que no sobrelapan en valor 0. Fis mide la proporción de loci que contienen alelos que son idénticos por descendencia a los de los ancestros comunes, es también llamado índice de endogamia. Los valores de Fis para las poblaciones estudiadas no muestran significancia.

**TABLA 18.** Estadístico F para la comparación de las poblaciones de machos y hembras

<b>Estadístico F para machos vs hembras</b>		
<b>Fst</b>	<b>Fit</b>	<b>Fis</b>
0	-0.222	-0.237
0.037	0.229	0.207

La tabla 18 muestra los valores del estadístico F para la comparación de la población de machos y hembras. De acuerdo a los resultados, los valores de Fst son significativos (95% intervalos de confianza) ya que no sobrelapan el valor 0.

**TABLA 19.** Estadístico F para la comparación de las poblaciones de individuos nacidos silvestres y nacidos en cautiverio

<b>Estadístico F para individuos nacidos silvestres vs nacidos en cautiverio</b>		
<b>Fst</b>	<b>Fit</b>	<b>Fis</b>
-0.028	-0.245	-0.222
0.003	0.214	0.22

La tabla 19 muestra los resultados para el estadístico F comparando las poblaciones de individuos nacidos silvestres y los nacidos en cautiverio. No se observa diferencia significativa para estos valores (95% intervalos de confianza).

### III. Características espermáticas

TABLA 20. Medidas estándar promedio de los testículos

	Derecho	Izquierdo
<b>Longitud (mm)</b>	103.01 ± 5.9	106.91 ± 7.4
<b>Ancho (mm)</b>	47.49 ± 6.9	47.81 ± 5.2
<b>Altura (mm)</b>	49.97 ± 5.4	47.10 ± 5.6

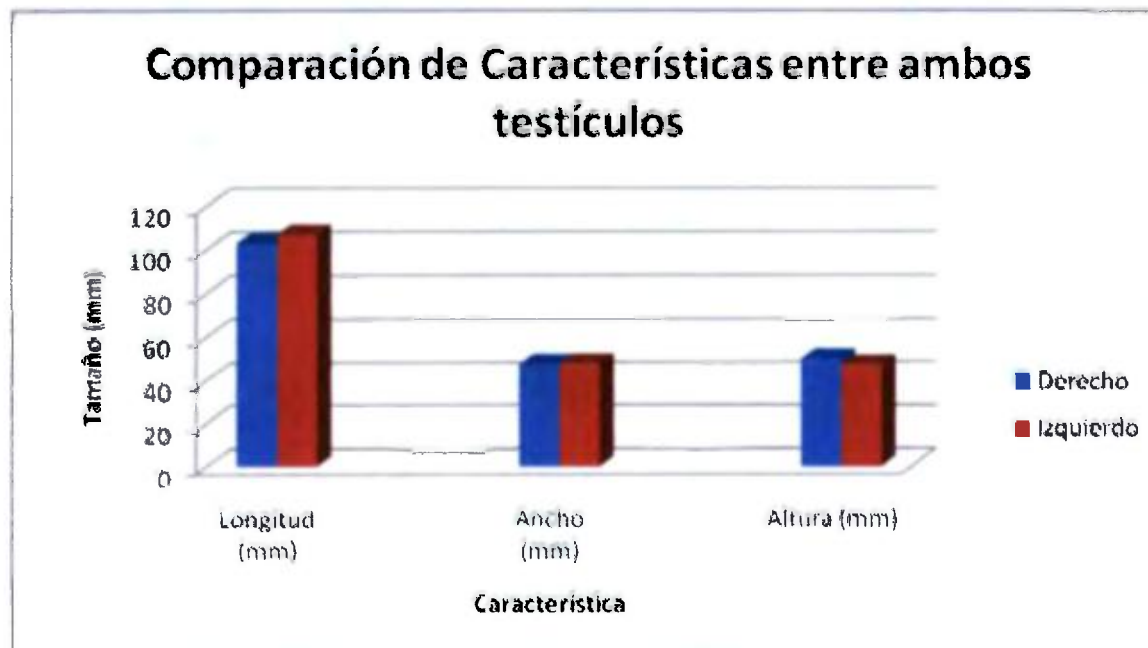


FIGURA 27. Medidas estándar promedio de los testículos

De acuerdo a la tabla 20 y la figura 27, no existe diferencia significativa entre las medidas promedio de los testículos para los machos de las poblaciones estudiadas.



**TABLA 21.** Caracterización espermática de la población estudiada

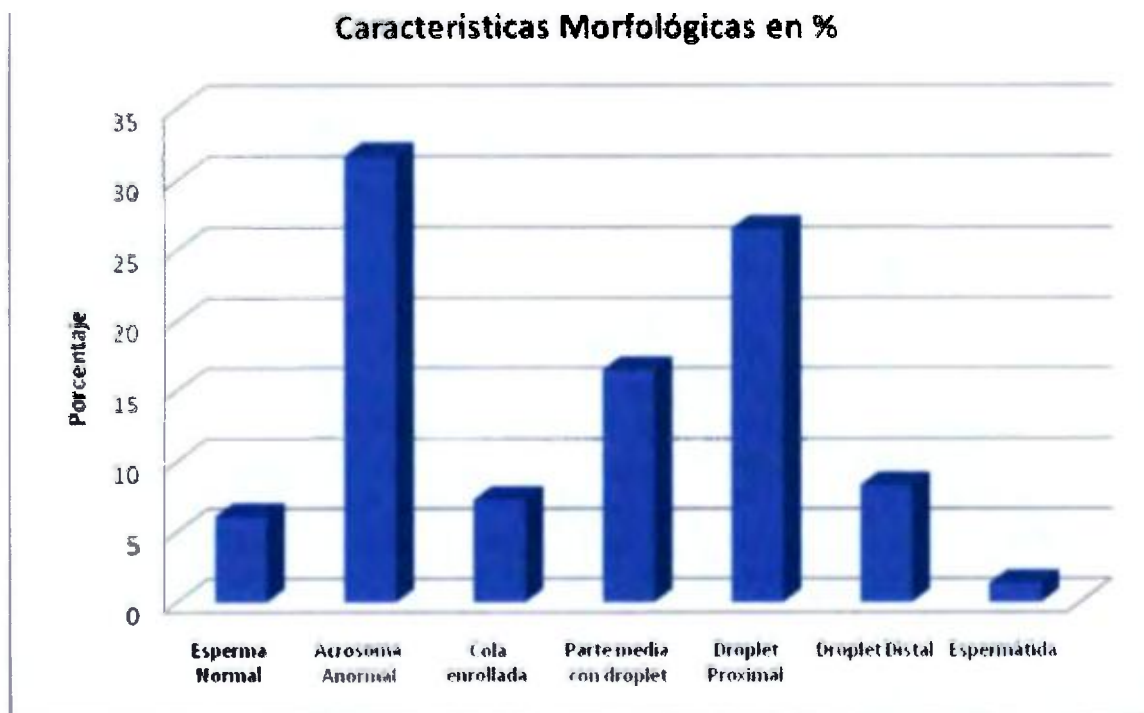
Colección de Semen
Tasa de éxito: 90% (10/11)

	Media $\pm$ DS	Rango
<b>Volumen (ml)</b>	19.81 $\pm$ 6.3	2-65
<b>pH</b>	7.36 $\pm$ 0.2	6.5-8.0
<b>Concentración de esperma/ml (<math>\times 10^6</math>)</b>	100.8 $\pm$ 41.9	1.5-430
<b>Esperma Total (<math>\times 10^9</math>)</b>	1.23 $\pm$ 0.4	0.003-3.9
<b>Motilidad (%)</b>	43.0 $\pm$ 7.9	10-70
<b>Osmolaridad (mOsm)</b>	340.6 $\pm$ 8.6	279-413

La tabla 21 muestra las características del semen colectado, desde la tasa total de éxito en la colecta hasta las mediciones estándar que se llevaron a cabo en las muestras colectadas.

**TABLA 22.** Características morfológicas del esperma medidas en porcentaje

<b>Características Morfológicas en %</b>	
Esperma Normal	6.11 $\pm$ 1.5
Acrosoma Anormal	31.66 $\pm$ 5.3
Cola enrollada	7.28 $\pm$ 3.4
Parte media con droplet	16.50 $\pm$ 3.5
Droplet Proximal	26.55 $\pm$ 7.3
Droplet Distal	8.33 $\pm$ 3.1
Espermátida	1.33 $\pm$ 0.3



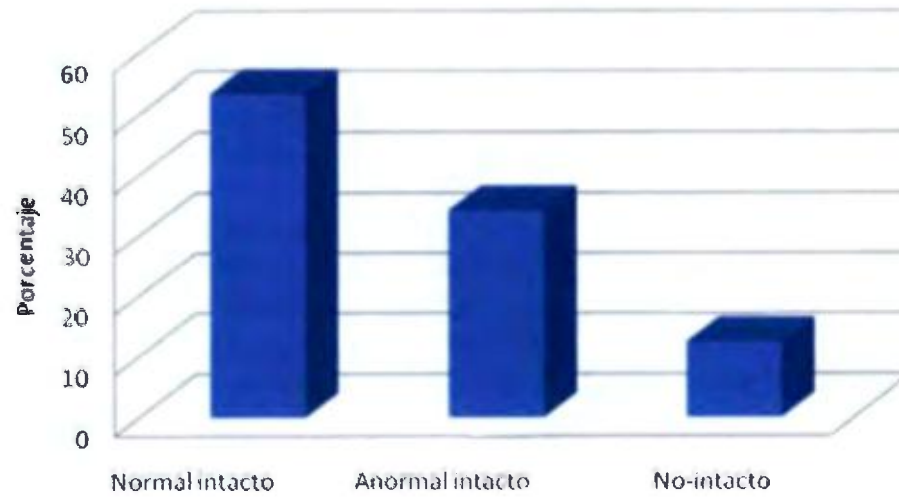
**FIGURA 28.** Características morfológicas del espermatozoide medidas en porcentaje

De acuerdo a la tabla 22 y la figura 28, el acrosoma anormal es la anomalía espermática que se presenta en mayor porcentaje, seguida por la presencia del droplet proximal y la parte media con droplet. El porcentaje de espermatozoide normal es bajo (6.1%), comparado al porcentaje de espermatozoide anormal que se encuentra en la población.

**TABLA 23.** Porcentaje de integridad acrosomal

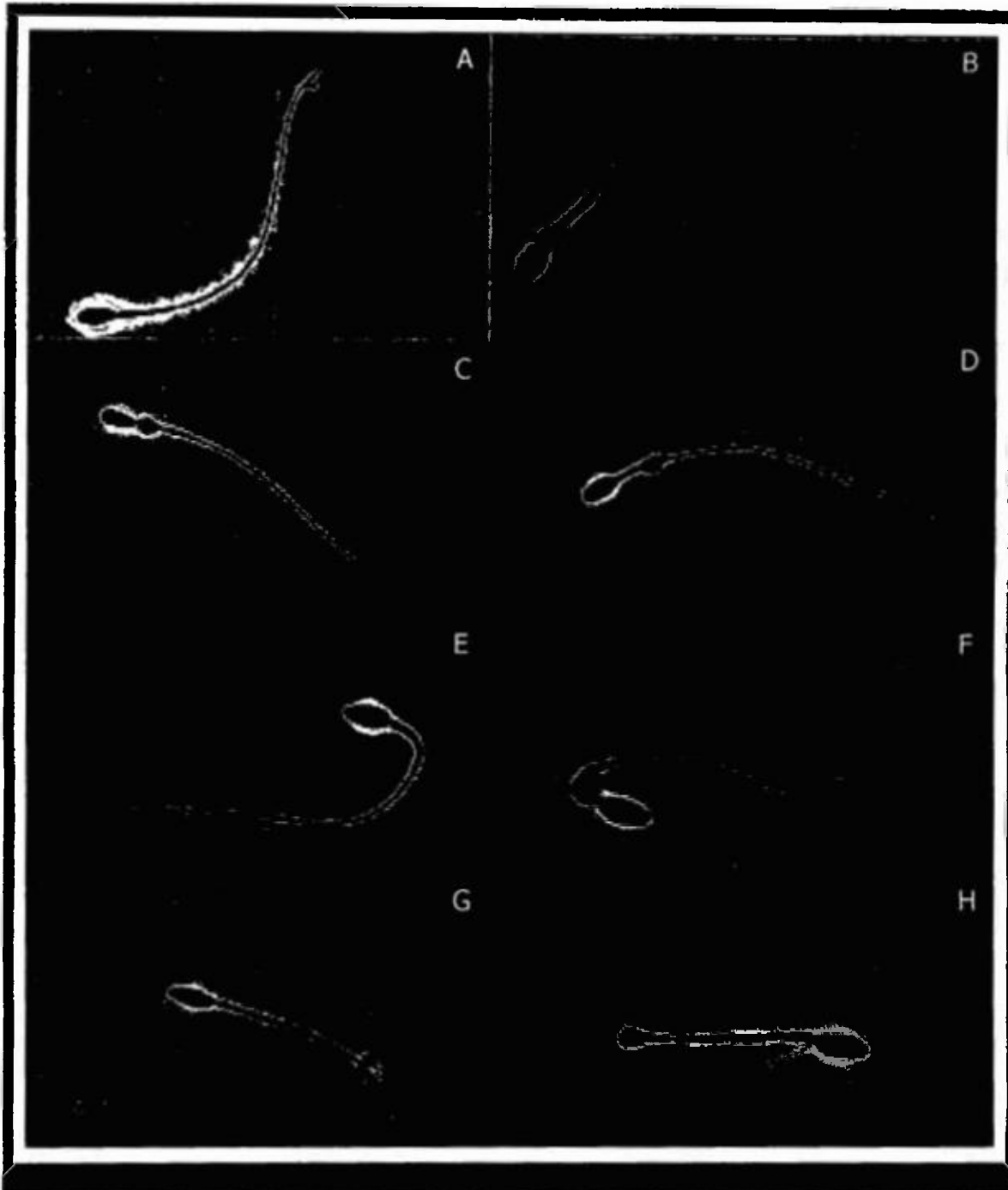
<b>Integridad Acrosomal (%)</b>	
Normal Intacto	53.39 ± 1.5
Anormal Intacto	34.22 ± 6.5
No Intacto	12.39 ± 2.9

## Integridad Acrosomal (%)



**FIGURA 29.** Porcentaje de integridad acrosomal

En la tabla 23 y la figura 29, se observa que el mayor porcentaje de esperma contiene acrosoma normal, seguido por acrosoma anormal intacto y no intacto.



**FIGURA 30.** Algunas anomalías encontradas en el esperma de las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá: A) espermia normal, B) Acrosoma anormal no intacto y droplet proximal, C) droplet proximal, D) droplet distal, E) parte intermedia doblada y acrosoma anormal intacto, F) parte intermedia doblada con droplet, G) acrosoma anormal intacto y cola enrollada, y H) cola enrollada con droplet.

La figura 30 muestra algunos ejemplos de anomalías espermáticas más comunes encontradas en los machos de las poblaciones estudiadas.

## **DISCUSION**

El tapir es el mamífero terrestre más grande presente en Centro y Sur América. Es una especie importantísima que ayuda a mantener el funcionamiento de los ecosistemas donde habita. Funciona como especie paraguas, dispersador de semillas a largas distancias, favorece la sobrevivencia de las semillas que dispersa y desempeña un papel importante en la cadena alimenticia de estos ecosistemas. De igual manera, su presencia tiene un gran impacto en la fisionomía y funcionamiento del hábitat (Fragoso *et al.*, 2003).

La especie se encuentra en peligro de extinción (IUCN, 2006). Es poco lo que se conoce sobre los tapires para poder idear planes de manejo que ayuden a salvaguardar tanto a las poblaciones silvestres como las que se encuentran en cautiverio. Aspectos como la ecología y biología general del tapir han sido estudiados hasta el momento (Baird's Tapir PHVA Report, TSG, 2006). Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre la variabilidad genética de estas poblaciones. En el caso de las poblaciones panameñas, solamente un estudio ha incluido algunos de los individuos presentes en el país (Norton y Ashley, 2004). El presente estudio es el primero en incluir todas las poblaciones en cautiverio que se encuentran en Panamá. Los resultados encontrados aquí nos dan una idea general del nivel de variabilidad genética de estas poblaciones y un pantallazo de la variabilidad presente en las poblaciones silvestres de nuestro país. Además, podrán ser utilizados como base para iniciar el desarrollo de planes de manejo para la especie.

Los estudios llevados a cabo por Norton y Ashley (2004) para individuos silvestres encontraron que la especie muestra bajos niveles de variabilidad genética (contenido alélico y heterocigocidad), más no muestran evidencias de un cuello de botella reciente. Los resultados de estos mismos autores para los individuos en cautiverio indican que las poblaciones de Centroamérica se encuentran en riesgo de perder variabilidad genética debido a la presencia de

endogamia, probablemente por mal manejo. Sin embargo, no observaron grandes diferencias entre las poblaciones silvestres y las que se encuentran en cautiverio.

Es importante notar que el tamaño de la muestra del estudio actual es pequeño y esto puede, de alguna manera, crear un sesgo en los resultados obtenidos. Sin embargo, a pesar de esta limitante, esta información es de suma importancia para conocer la variabilidad genética de la especie en nuestro país.

Los resultados obtenidos a través de este estudio indican que la variabilidad genética de la población de tapires en cautiverio de Panamá es ligeramente mayor que la encontrada por Norton & Ashley (2004) en diferentes poblaciones de Centro y Norteamérica.

Las poblaciones estudiadas muestran considerables niveles de variabilidad genética (heterocigocidad observada), siendo la población de Villa Griselda la que presenta mayor variabilidad. Se observa que la riqueza alélica es alta y que existen alelos frecuentes, raros y privados para las tres poblaciones, algunos difiriendo entre ellas considerablemente.

Nuestros resultados muestran que las poblaciones que se encuentran en cautiverio son el producto del cruce de aproximadamente 8 individuos silvestres fundadores (según el pedigrí). Si observamos, directa o indirectamente, la riqueza alélica presente en estos 8 individuos (2 de los cuales fallecieron antes de iniciar este estudio), es alta. Los alelos privados de las poblaciones fueron mapeados para corroborar que la información obtenida es verídica y se observó que tienen su origen en las poblaciones silvestres. Esto nos permite inferir que las poblaciones silvestres, que potencialmente fueron la fuente de estos individuos, contienen una gran diversidad genética. De esta manera, este estudio proporciona una medida indirecta de la variabilidad genética en las poblaciones silvestres de tapires de nuestro país.

De acuerdo al Studbook para el Tapir Centroamericano 2008, las poblaciones del Summit y el Níspero tienen un mayor aporte genético silvestre que la población de Villa Griselda. Esta última proviene de 3 individuos fundadores, dos de los cuales provienen de poblaciones silvestres y un tercero, que a pesar de provenir de individuos silvestres en cautiverio, representa la variabilidad presente en las poblaciones silvestres. A pesar de la presencia de endogamia en la población de Villa Griselda, ésta presenta un mayor nivel de variabilidad genética en comparación con las demás poblaciones estudiadas. Esto puede deberse a que la población de Villa Griselda presenta la mayor proporción de alelos privados, provenientes de individuos silvestres y que su contribución es suficientemente fuerte para evitar los efectos de la depresión por endogamia dentro de esta población. Es importante mencionar que estas poblaciones tienen poco tiempo de haberse establecido, razón por la cual no se observan efectos de la depresión por endogamia. Otro factor que puede estar "retardando" la aparición de este acontecimiento es que los ungulados presentan mayor resistencia a los efectos de la endogamia que otros mamíferos (Budhan Pukazhenth, comunicación personal). Es necesario entonces el desarrollo, lo antes posible, de planes de manejo basados en la información generada por este estudio, para evitar que estas poblaciones lleguen a este punto.

Los resultados indican que existen diferencias entre las poblaciones estudiadas. La población de Villa Griselda y la población del Summit contienen individuos relacionados entre sí, mientras que la población del Níspero, aunque es pequeña, sus individuos no se encuentran emparentados con los de las otras poblaciones. A pesar de esto, existe diferenciación entre la población de Villa Griselda y las otras dos poblaciones. Una de las razones de esta diferenciación es que la población de Villa Griselda presenta 7 de los 10 alelos privados encontrados en este estudio.

También se observa diferenciación entre la población de machos y hembras. Esto se debe a que dentro de los 8 fundadores, los machos poseen mayor proporción de alelos privados que las hembras, probablemente por azar, ya que no existe indicación de que haya algún tipo de sesgo con respecto a la variabilidad genética relacionada al género. Es probable que esta diferenciación tenga relación con la(s) población(es) que dio origen a estos individuos.

Conocer la diversidad genética presente en las poblaciones en cautiverio de Panamá proporciona información de gran valor para elaborar planes de manejo que permitan preservar la variabilidad genética en estas poblaciones, evitando de esta manera la endogamia y sus efectos detrimentales. Así mismo, las poblaciones que se encuentran en cautiverio funcionan a manera de "seguro de vida" para las poblaciones silvestres amenazadas, por lo que es de suma importancia mantener la variabilidad genética de las mismas.

Los análisis de las características espermáticas coinciden con resultados de estudios llevados a cabo en otras especies (Wildt *et al.*, 1987; Barone *et al.*, 1994). En estos estudios se observan los efectos de la endogamia en aspectos fisiológicos como la alta producción de espermia anormal. Sin embargo, al observar que los resultados no reflejan altos índices de endogamia, otros factores presentes en poblaciones mantenidas en cautiverio como la mala nutrición, la edad y los niveles de estrés, pueden estar causando la producción de espermia anormal (Deichsel *et al.*, 2008). Según nuestras observaciones, el manejo nutricional de estas poblaciones presenta algunas fallas, factor que puede estar relacionado con la alta producción de espermia anormal.

Se observa que la población de tapires en cautiverio de Panamá presenta teratospermia (60% o más del espermia total con anormalidades), sin embargo, aunque presentan un alto porcentaje de anormalidades continúan reproduciéndose. Esto puede deberse a que aunque la mayor parte del espermia



es anormal, éste presenta el acrosoma intacto, estructura crítica para el proceso de la fecundación.

Este es el primer estudio sobre las características espermáticas para esta especie. No hay otros estudios que indiquen las características espermáticas para la especie. Estudios posteriores a realizar por nuestro grupo de investigación en poblaciones silvestres pueden revelar si la producción de esperma anormal es característica de la especie o si es resultados de condiciones de manejo en cautividad.

## **Conclusiones**

A partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio, concluimos que:

1. A pesar del pequeño tamaño de las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá, éstas presentan alta variabilidad genética.
2. La variabilidad genética encontrada en las poblaciones **estudiadas refleja la** variabilidad genética presente en las **poblaciones de tapires silvestres de** Panamá.
3. La técnica de microsatélites utilizada (mediante PCR con cola M13) funciona perfectamente en la especie *Tapirus bairdii*.
4. La técnica de microsatélites utilizada (mediante PCR con cola M13) es reproducible y confiable.
5. Dentro de las poblaciones estudiadas, la población de Villa Griselda mostró la mayor variabilidad genética.
6. Dentro de las poblaciones estudiadas, la población del Summit mostró la menor variabilidad genética.
7. La población de Villa Griselda presenta endogamia.
8. Las poblaciones de tapires en cautiverio de Panamá presentan la condición de teratospermia.

9. Las condiciones de endogamia y teratospermia presentes en las poblaciones no han afectado la capacidad reproductiva de sus individuos.
10. Aspectos externos de manejo, como la dieta, pueden estar causando la teratospermia en estas poblaciones.

## LITERATURA CONSULTADA Y CITADA

**Alais, M., Lloyd, P. & Taylor, A.** 2002. *Tapirus bairdii*. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened.

**Asa, C., Miller, P., Agnew, M., Rebolledo, J., Lindseys, S., Callahans, M. & Bauman, K.** 2007. Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. *Animal Conservation* 10: 326–331

**Barone, M.A., Roelke, M.E., Howard, J.G., Brown, J.L., Anderson, A.E. & Wildt, D.E.** 1994. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America and North American zoos. *J. Mammal.* 75, 150–162.

**Barongi, R.** 1992. Panama's Macho de Monte. *ZooNooz* LXV:6-11

**CITES**, 2006, Listed Species

**Collins, C. W., Songsasen, N., Monfort, S.L., Bush, M., Wolfe, B., James, S.B., Wildt, D.E. & Pukazhenth, B.S.** 2006. Seminal traits of the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalski*) following electroejaculation. *Animal Reproductive Science* 94, 46–49.

**Cseh S, Solti L.** 2000. Importance of assisted reproductive technologies in the conservation of wild, rare or indigenous ungulates: review article. *Acta Vet Hung.*;48(3):313-23.

**Deichsel, K., Palm, F., Koblichke, P., Budik, S., Aurich, C.** 2008. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology.* 69(8):940-5

**Fragoso, J. M. V., Silvius, K. M., Correa, L. A.** 2003. Long-distance seed dispersal by tapirs increases seed survival and aggregates tropical trees : Long-distance dispersal. *Ecology.* 84 (8): 1998-2006

**Fredrickson, R. & Hedrick, P.** 2002. Body size in endangered Mexican wolves: effects of inbreeding and crosslineage matings. *Anim. Conserv.* 5, 39–43.

**Gage, M.J.G., Surridge, A.K., Tomkins, J.L., Green, E., Wiskin, L., Bell, D.J. & Hewitt, G.M.** 2006. Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Curr. Biol.* 16, 612–617.

**Goldstein, D. B. y Schlötterer, Ch (ed).** 2001. *Microsatellites: Evolution and Applications.* Oxford University Press. 368 p.

**Goodman, S. J., Tamate, H. B., Wilson, R., Nagata, J., Tatsuzawa, S., Swanson, G. M., Pemberton, J. M. & McCullough, D. R.** 2001. Bottlenecks,

drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Mol. Ecol.* **10**: 1357–1370.

**Heckadon-Moreno, S. (ed).** 1998. Panamá: puente biológico. Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Panamá, pp 104-111

**Houlden, B. A., England, P. R., Taylor, A. C., Greville, W. D. & Sherwin, W. B.** 1996. Low genetic variability of the koala *Phascolarctos cinereus* in south-eastern Australia following a severe population bottleneck. *Mol. Ecol.* **5**: 269–281.

**Howard, J. G.** 1993. Semen collection and analysis in carnivores. En: Fowler, M. E., ed. *Zoo & Wildlife Medicine, Current Therapy 3*. Philadelphia: WB Saunders Co. p 390-399.

**Hedrick, P.W. & Kalinowski, S.T.** 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **31**, 139–162.

**Hedrick, P.W. & Miller, P.S.** 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. Appl.* **2**, 30–46.

**Howard, J.G., Brown, J.L., Bush, M. and Wildt, D.E.,** 1990. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary–gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *Journal of Andrology* **11**, pp. 204–215.

**Howard, J.G.** 1993. En: *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy* (3rd edn). Fowler RC (ed), Philadelphia: WB Saunders, pp. 390–399.

**IUCN 2006.** *2006 IUCN Red List of Threatened Species.*

**Jiménez, J.A., Hughes, K.A., Alaks, G., Graham, L. & Lacy, R.C.** 1994. An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* **266**, 271–273.

**Kalinowski, S.T., Hedrick, P.W. & Miller, P.S.** 1999. No inbreeding depression observed in Mexican and red wolf captive breeding programs. *Conserv. Biol.* **13**, 1371–1377.

**Keller, L.F., Arecese, P., Smith, S.J.M.N., Hochachka, W.M. & Stearns, S.C.** 1994. Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* **372**, 356–357.

**Lacy, R.C., Alak, G. & Walsh, A.** 1996. Hierarchical analysis of Inbreeding depression in *Peromyscus polionotus*. *Evolution* **50**, 2187–2200.

**Leibo SP, Songsasen N.** Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002 Jan 1;57(1):303-26.

**Leibo, S.P., Songsasen, N.** 2002 Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. Jan 1;57(1):303-26.

**LePage, S. L., Livermore, R. A., Cooper, D. W. & Taylor, A. C.** 2000. Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennet's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Mol. Ecol.* **9**: 753-763.

**Luvoni, G. C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., Ruggiero, C.** 2003. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg*. Aug;5(4):203-8.

**Matola, S., Cuarón, A.D. and Rubio-Torgler, H.** 1997. Status and Action Plan of Baird's Tapir (*Tapirus bairdii*). In: D.M. Brooks, R.E. Bodmer and S. Matola (eds). *Tapirs - Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. pp: 29-45.

**Mavárez, J. y González, M.** 2006. A set of microsatellite markers for *Heliconius melpomene* and closely related species. *Molecular Ecology Notes* 6, 20-23

**Morgante, M., Olivieri, A.M.** 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.

**Norton, J. y Ashley, M.** 2004. Genetic Variability and Population Differentiation in Captive Baird's Tapirs (*Tapirus bairdii*). *Zoo Biology* 23:521-531

**IUCN 2000.** *2000 IUCN Red List of Threatened Species*

**IUCN 2006.** *2006 IUCN Red List of Threatened Species*

**Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B.** 2001. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome* 44: 773-782.

**Pope, C. E.** 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*. Jan 1;53(1):163-74.

**Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A.** 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR(microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.

**Primack, R., Bray, D., Galletti, H. and Ponciano, I.** (eds). 1998. *Timber, Tourists and Temples. Conservation and Development in the Maya Forest of Belize, Guatemala and Mexico*. Island Press, Washington, D.C. 426 pp.

**Pukazhenth, B., Pelican, K., Wildt, D.E. and Howard, J.G.** 1999. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biology of Reproduction* **61**, pp. 135–141.

**Pukazhenth, B.S., Wildt, D.E. & Howard, J.G.** 2001. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J. Reprod. Fert.* 57 (Suppl.): 423–433.

**Roldan, E.R.S., Cassinello, J., Abaigar, T. & Gomendio, M.** 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 265, 243–248.

**Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W., Waugh, R.** 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical Applied Genetics* 95: 714–722.

**Samudio, Jr., R.** 2002. Mamíferos de Panamá. In *Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neotropicales* (G. Ceballos y J. Simonetti, Eds.). CONABIO-Instituto de Ecología, UNAM. México, 582 pp. Pages 415–452

**Samudio, R, Jr. y J. Pino.** 2004. Estado de las poblaciones y de conservación del tapir centroamericano *Tapirus bairdii* en Panamá. Informe técnico. Sociedad Mastozoológica de Panamá.

**Solti L, Crichton EG, Loskutoff NM, Cseh S.** Economical and ecological importance of indigenous livestock and the application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology*. 2000 Jan 1;53(1):149–62.

**Spindler, R. E., Huang, Y., Howard, J. G., Wang, P., Zhang, H., y Wildt, D. E.** 2004. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. *Reproduction* 127 547–556

**Tapir Specialist Group.** 2006. Population and Habitat Viability Assessment (PHVA) for Baird's Tapir in Panama. IUCN/SSC.

**Terwilliger, V. J.** 1978. Natural history of Baird's tapir in Barro Colorado Island, Panama Canal Zone. *Biotropica*:10:211–220

**Thurston, L., Siggins, K., Mileham, A., Watson, P. and Holt, W.** 2002. Identification of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Markers Linked to Genes Controlling Boar Sperm Viability Following Cryopreservation. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 66, 545–554

**Tsien, R. Y.** 1989 En: *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part B. Quantitative Fluorescence Microscopy—Imaging and Spectroscopy* Vol. 30. Taylor, DL, Wang YL (eds), New York: Academic Press, pp. 127–156.

**UNEP-WCMC.** 29 August, 2006. *UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed Species*

**Whitehouse, A. M. & Harley, E. H.** 2001. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* **10**: 2139–2149.

**Wildt, D.E., B.S. Pukazhenti, J.L. Brown, S.L. Monfort, J.G. Howard and T.L. Roth.** 1995. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**: 811-824.

**Wildt, D. E., Ellis, S., Howard, J. G.** 2001 Linkage of reproductive sciences: from 'quick fix' to 'integrated' conservation. *J Reprod Fertil Suppl.* **57**:295-307.

**Wildt, D. E., William, F. R., John, K. C. , Steven, L. M. and Ulysses, S. S.** 1997. Genome Resource Banks: Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience.* Nov 47(10): 689-698.

**Wildt, D.E., Bush, M., Goodrowe, K.L., Packer, C., Pusey, A.E., Brown, J.L., Joslin, P. & O'Brien, S.J.** 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* **329**, 328–331.

**Williams, C. L., Serfass, T. L., Cogan, R. & Rhodes, O. E.** 2002. Microsatellite variation in the reintroduced Pennsylvania elk herd. *Mol. Ecol.* **11**: 1299–1310.

**Weising, K., Winter, P., Hüttel, B., Kahl, G.** 1998. Microsatellites markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production* **1**: 113-143.

# ANEXOS

## **Anexo 1. Lista de la ANAM de los vertebrados en peligro de extinción de Panamá.**

### ***Aves:***

Perdiz de Arca (*Tinamus major*)  
Perdiz de Rastrojo (*Crypturellus soui*)  
Pavón y Pava Rubia (*Crax rubra*)  
Pava Cimba o Roja (*Penelope purpurascens*)  
Perdiz Serrana (*Nothocercus bonapartei*)  
Paisana (*Ortalis cinereiceps*)  
Pava Negra o Norteña (*Chamaepetes unicolor*)  
Guichichi (*Dendrocygna autumnalis*)  
Pato Real (*Cairina moschata*)  
Quetzal (*Pharomachrus mocinno*)  
Aguila Harpía (*Harpia harpyja*)  
Guacamaya Azul (*Ara ararauna*)  
Guacamaya Verde (*Ara ambigua*)  
Guacamaya Bandera (*Ara macao*)  
Guacamaya Roja (*Ara chloroptera*)  
Loro Moña Amarilla (*Amazona ochrocephala*)  
Guaquita (*Ara severa*)  
Gallito de Monte (*Odontophorus gujanensis*)  
Anade Real (*Anas platyrhynchos*)  
Pato Crestudo (*Sarkidiornis melanotos*)  
Pato Rabudo (*Anas acuta*)  
Pato Cuchara (*Anas clypeata*)  
Pato Calvo (*Anas americana*)



Pato Pechiblanco (*Aythya affinis*)  
Pato Collar (*Aythya collaris*)  
Pato Tigre (*Oxyura dominica*)  
Torcaza o Paloma Coroniblanca (*Columba leucocephala*)  
Torcaza Común (*Columba cayennensis*)  
Paloma Escamosa (*Columba speciosa*)  
Tres-Peso-Son (*Columba nigrirostris*)  
Paloma Rojiza (*Columba subvinacea*)  
Paloma Aliblanca (*Zenaida asiatica*)  
Paloma Rabiaguda (*Zenaida macroura*)  
Paloma Morena (*Geotrygon lawrencii*)  
Paloma Costarriqueña (*Geotrygon costaricensis*)  
Paloma Violácea (*Geotrygon violacea*)  
Gorra Azul (*Geotrygon chiriquensis*)  
Halcón Peregrino (*Falco peregrinus*)

**Mamíferos:**

Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*)  
Venado Corzo (*Mazama americana*)  
Venado Corzo-Chocolate (*Mazama gouazoubira*)  
Macho de Monte - Tapir (*Tapirus bairdii*)  
Puerco de Monte (*Tayassu pecari*)  
Saíno (*Tayassu tajacu*)  
Conejo Pintado (*Agouti paca*)  
Manatí (*Trichechus manatus*)  
León o Puma Americano (*Felis concolor*)  
Tigre o Jaguar (*Panthera onca*)  
Manigordo u Ocelote (*Felis pardalis*)  
Tigrillo o Margay (*Leopardus wiedii*)  
Tigrillo Congo (*Felis yagouaroundi*)  
Poncho o Capibara (*Hydrochaeris hydrochaeris*)  
Perro de monte (*Speothos venaticus*)  
Jujuná o Mono Nocturno (*Aotus lemurinus*)  
Mono Araña Negro (*Ateles fusciceps*)  
Mono Tití (*Saguinus oedipus*)  
Mono Colorado (*Ateles geoffroyi*)  
Mono Ardilla (*Saimiri oerstedii*)  
Mono Aullador (*Alouatta palliata*)  
Mono Cariblanco (*Cebus capucinus*)  
Ñeque (*Dasyprocta punctata*)  
Oso Caballo (*Myrmecophaga tridactyla*)  
Oso Hormiguero (*Tamandua mexicana*)  
Tapacara o Gato Balsa (*Cyclopes didactylus*)  
Armadillo (*Dasypus novemcinctus*)  
Armadillo Rabo de Puerco (*Cabassous centralis*)

Gato de Monte (*Urocyon cinereoargenteus*)  
 Gato Manglatero (*Procyon cancrivorus*)  
 Gato Manglatero (*Procyon lotor*)  
 Nutria o Gato de Agua (*Lutra longicaudis*)  
 Gato Solo (*Nasua narica*)

**Reptiles:**

Tortuga Cahuama (*Caretta caretta*)  
 Tortuga Verde o Blanca (*Chelonia mydas*)  
 Tortuga Mulato (*Lepidochelys olivacea*)  
 Tortuga Canal (*Dermochelys coriacea*)  
 Tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*)  
 Tortuga Terrestre (*Geochelone carbonaria*)  
 Babillo o Caimán (*Caiman crocodilus fuscus*)  
 Lagarto Aguja (*Crocodylus acutus*)  
 Boa (*Boa constrictor*)  
 Iguana (*Iguana iguana*)

**Anfibios:**

Rana Dorada (*Atelopus zeteki*)

**Anexo 2. Tabla donde se muestran los alelos encontrados en cada uno de los loci estudiados**

Locus	Alelos						
Tte1	138	140	***	***	***	***	***
Tte 5	130	138	142	146	150	***	***
Tte12	146	158	164	166	***	***	***
Tte15	215	221	223	225	227	***	***
Tba20	225	231	239	241	243	251	253
Tba21	158	160	162	***	***	***	***
Tba23	215	230	232	234	***	***	***