

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Ateles geoffroyi* EN EL PAISAJE FRAGMENTADO DE  
LA BAHÍA DE JIQUILISCO

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

GLORIA LUCÍA SÁNCHEZ TREJO

KARLA PATRICIA ZALDAÑA ORANTES

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN:**

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Ateles geoffroyi* EN EL PAISAJE FRAGMENTADO DE  
LA BAHÍA DE JIQUILISCO

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ASESOR:**

LIC. MIGUEL ÁNGEL MORENO

---

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

GLORIA LUCÍA SÁNCHEZ TREJO  
KARLA PATRICIA ZALDAÑA ORANTES

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**TRIBUNAL EVALUADOR:**

LICDA. ÁNGELA GUDELIA PORTILLO DE PÉREZ

---

LIC. JEREMÍAS EZEQUIEL YANES

---

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2017

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR ACADÉMICO**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

DR. MANUEL DE JESÚS JOYA

**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

ING. NELSON BERNABÉ GRANADOS

**SECRETARIO GENERAL**

MAESTRO CRISTOBAL RÍOS

**FISCAL INTERINA**

LICDA. BEATRIZ MÉLENDEZ

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS**

**DECANO**

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO

**VICE DECANO**

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

**SECRETARIO**

LICDA. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS

**DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA**

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2017

## **DEDICATORIA**

A mi trio dinámico y mi razón de ser: Luciana, Vitelio y Vinicio. A todos los deseos de investigar y proteger la biodiversidad de El Salvador. Finalmente, a nuestros bellos parientes lejanos del Orden Primate los monos araña, porque, en nuestra ignorancia, les hemos causado demasiado daño y, aun así, nos siguen maravillando.

Lucía Sánchez

A mis padres Marcia Orantes de Zaldaña y Víctor Zaldaña por ser mi motor y motivación a ser mejor cada día y nunca rendirme, a mi hermana Silvia que cambio mi forma de ver la vida. A la esperanza de que algún día en El Salvador la ciencia a través de la investigación alcance su esplendor y se le dé la importancia que merece para crecer como sociedad en armonía con nuestros recursos naturales; por último, a los monos araña para que las futuras generaciones puedan conocerlos y apreciar su importante rol en el ecosistema.

Karla Zaldaña

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi mamá Luciana Trejo por su amor y dedicación incondicional, a mi papá Vitelio Sánchez por su determinación de darme lo mejor y hasta lo que no tenía, y a mi hermano Vinicio Sánchez, por ser mi compañero en crimen y mi modelo a seguir, aunque a veces no lo acepte. No hay palabras que expresen completamente la gratitud y amor que les tengo, porque sé que, sin sus consejos llenos de sabiduría y apoyo constante, este logro no hubiera sido posible.

A mis amigos que me acompañaron en la licenciatura: Gretel, Andrea, Néstor, Miguel, Marvin, Juan Carlos “John”, Alexia, Carlos “Pache”, César, Diego, Alejandra “Titi”, Kevin y Elena; compartir estrés y risas junto a ellos marcaron momentos inolvidables. Gracias infinitas a Karla por ser mi “alelo” durante la carrera, la tesis y muchísimas aventuras y malandanzas. No en todas las dinastías encuentras a una amiga como ella. También le agradezco a mis amigos de infancia Sharon y Emilio por su amistad sincera a pesar de la distancia y los años.

A Melissa Rodríguez Girón y Luis Girón porque, con su cariño y humor característico, compartieron todos sus conocimientos sin recelo y me ofrecieron múltiples oportunidades de investigación, incluida esta. A Delfina de Benítez (Q.E.P.D.), por sus enseñanzas y carisma, terminó de fundar en mí el amor que le tengo a la biología. A Miguel Moreno por aceptarnos como asesor y acompañarnos a lo largo de esta investigación. Le agradezco a Alexandra Elbakyan y Sci-Hub, por su lucha en el libre acceso de la información científica.

Gracias al MARN y MAG, principalmente a Jeremías Yanes y Marvin Salinas por los permisos pertinentes. A los guardarecursos de Normandía y Chaguantique, en especial a Wilberth Mejía, Ismael Rodríguez e Ismael “Patrón” Lozano, los guardarecursos más divertidos que conozco, y sin sus conocimientos y amor por el bosque, no hubiera datos que analizar. Gracias a Wilberth, Sofí, Taty, Lucy y Herberth por acogernos en su hogar durante la fase de campo. A la familia Zaldaña Orantes, por todo su apoyo a lo largo de esta investigación, incluido Toffy, el mejor compañero de desvelos y meriendas.

A Territorios Vivos y Proyecto Ateles por el financiamiento inicial para este trabajo. Gracias a Gustavo Gutiérrez Espeleta por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su apoyo y esfuerzo para superar contratiempos que surgieron en la fase de laboratorio. A Otto Monge y Sofía Soto por sus enseñanzas y apoyo. Finalmente, un agradecimiento especial a Genuar Nuñez, sus conocimientos y compañía desde el inicio de proyecto fueron una parte esencial en esta investigación.

Lucía Sánchez

Agradezco a Dios por acompañarme en cada etapa de mi vida, A mi papá Víctor Zaldaña por creer siempre en mí y apoyarme para que mi formación como profesional fuera integral pero sobre todo por su amor incondicional y ser un ejemplo de integridad y responsabilidad, a mi madre Marcia de Zaldaña por ser mi apoyo y mi fortaleza, por su sabiduría, amor y optimismo que me sostuvo hasta el final de esta investigación y lo seguiré haciendo en las siguientes etapas de mi vida; A mis hermanas Anita y Susana por su cariño, a Silvia por su apoyo en todo momento pero sobre todo por soportar mis momentos de estrés y decepción y, a Oscar Rayas por sus palabras de aliento a pesar de la distancia, gracias por ser ese positivismo que necesito en mi vida; y por último a Toffy por quererme siempre y acompañarme en mis desvelos.

A mis amigos de carrera, Gretel, Andrea, Néstor, Alejandra (Titi) y Alexia por su amistad durante este tiempo, por todos los trabajos hechos y las horas que compartimos; A Daniela, Nancy, Claudia y Lili por ser mis amigas de toda la vida, gracias por comprender mis ausencias y a pesar de ello siempre estar ahí. Un especial agradecimiento a Lucy por todas las alegrías, momentos de estrés y experiencias que compartimos durante este proceso, sin duda cada una de ellos quedará grabada en mi memoria por siempre. También quiero agradecer a mis amigos Melissa y Luis Girón por iniciar este gran proyecto y en especial por su amistad que me ha dejado mucho crecimiento profesional. A mi segunda familia los Sánchez-Trejo por apoyar esta investigación y recibirme con calidez en su hogar.

A la Universidad de El Salvador por formarme, a la Licda. Delfina de Benítez (Q.E.P.D.) por motivarme a ser una buena bióloga desde el primer día, a Miguél Moreno por apoyar este proyecto y con sus comentarios lograr que le sacáramos el máximo provecho a la información. Agradezco al MARN en especial al Lic. Jeremías Yanes y Marvin Salinas por su apoyo en el trámite de los permisos pertinentes. A Wilberth Mejía, Sofía Gonzáles y familia por aceptarnos en su hogar durante la fase de campo y hacernos sentir en familia; a los guardarecursos del ANP Normandía Ismael Rodríguez e Ismael (el patrón) Lozano por su valiosa ayuda en campo y volver divertida la búsqueda de los monos arañas.

Un especial agradecimiento al Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta por aceptarnos en su laboratorio y a pesar de su apretada agenda estar pendiente del avance de la investigación, a Otto Monge y Sofía Soto por sus consejos y apoyo en la fase de laboratorio; a Genuar Núñez por su apoyo desde el inicio hasta el final de este proyecto sin duda una parte vital sin la cual esta investigación no hubiera visto la luz.

Karla Zaldaña

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADPC: Análisis de Discriminantes de Componentes Principales

AMOVA: Analysis of Molecular Variance (en español, Análisis de Varianza Molecular)

ANP: Área Natural Protegida

APD: Aislamiento por Distancia

Ar: Allelic richness (en español, Riqueza alélica)

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg

F: Índice de Fijación

FIAES: Fondo de la Iniciativa para las Américas

HW: Hardy Weinberg

He: Heterocigosidad esperada

Ho: Heterocigosidad observada

IUCN: International Union for Conservation of Nature (en español, Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)

MARN: Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales

MCMC: Markov Chain Monte Carlo (en español, Cadena de Markov Monte Carlo)

Ne: Población efectiva

Nm: Número de migrantes

PCR: Polymerase Chain Reaction (en español, Reacción en Cadena de la Polimerasa)

STR: Short Tandem Repeat (en español, Repeticiones cortas de Tándem)

SSM: Stepwise Mutational Model (en español, Modelo Gradual de Mutación)

SSR: Simple Sequence Repeats (en español, Secuencias Sencillas Repetidas)

TPM: Two-phase Mutation Model (en español, Modelo de dos fases)

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
OBJETIVOS .....	3
MARCO TEÓRICO .....	4
Antecedentes de la investigación.....	4
Orden Primates .....	7
Primates del nuevo mundo o Platyrrhini .....	7
Familia Atelidae .....	7
Ateles geoffroyi Kuhl, 1820 .....	8
Morfología.....	8
Etología y dieta.....	8
Reproducción.....	9
Distribución y hábitat .....	9
Subespecies.....	10
Ecología y conservación.....	11
Genética de poblaciones .....	12
Variabilidad genética.....	12
Marcadores moleculares .....	13
Microsatélites .....	13
Marcaje fluorescente.....	14
PCR Multiplex .....	14
METODOLOGÍA.....	15
Descripción del sitio de estudio.....	15
Área Natural Protegida Normandía .....	16
Área Natural Protegida Chaguantique .....	17
Hacienda El Tercio .....	17
Hacienda El Nacascolo .....	17
Metodología de campo .....	17
Recolecta de muestras .....	17
Ubicación del laboratorio .....	20
Metodología de Laboratorio .....	20
Extracción de ADN .....	20
Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	20

Genotipificación microsatelital .....	23
Análisis Estadísticos .....	26
Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).....	26
Número efectivo de alelos ( $n_e$ ).....	26
Índice de Fijación .....	27
Prueba exacta de Hardy-Weinberg .....	27
Desequilibrio de ligamiento .....	28
Corrección de Bonferroni .....	28
Riqueza alélica y riqueza de alelos privados con rarefacción .....	28
Estimadores $F$ .....	29
Estimadores $G_{st}$ y $D$ .....	30
Análisis de Discriminantes de Componentes Principales (ADCP) .....	30
Análisis de estructura genética .....	31
Aislamiento por Distancia (APD).....	31
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	32
Flujo genético .....	32
Población Efectiva ( $N_e$ ) .....	33
Endogamia .....	34
Cuello de botella.....	34
RESULTADOS .....	35
Amplificación de loci heterólogos.....	35
Depuración de la base de datos.....	37
Diversidad genética .....	38
Estadísticos $F$ .....	39
Medidas de diferenciación genética .....	40
Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP).....	40
Estructura genética .....	41
Aislamiento por distancia (APD) entre sitios de muestreo.....	43
Aislamiento por distancia (APD) entre Chaguantique, Normandía y El Tercio .....	44
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) General .....	44
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) Anidado.....	44
Número efectivo de población ( $N_e$ ).....	45
Flujo genético .....	45
Endogamia .....	47

Cuello de botella.....	48
DISCUSIÓN.....	50
Amplificación de loci heterólogos.....	50
Diversidad y estructura genética de los monos araña.....	51
Patrones genéticos .....	53
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ANEXOS .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificaciones alternativas para las subespecies de <i>Ateles geoffroyi</i> .....	10
Tabla 2. Mezcla para PCR de las muestras de <i>Ateles geoffroyi</i> de la Bahía de Jiquilisco. ...	22
Tabla. 3. Programación de PCR para los 12 loci heterólogos de <i>Ateles geoffroyi</i> .....	22
Tabla 4. Especificaciones para los 12 loci heterólogos de <i>Ateles geoffroyi</i> utilizados. ....	25
Tabla 5. Alelos de doce loci microsatélites heterólogos para monos araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> ) y frecuencia alélica por sitio muestreado en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.....	35
Tabla 6. Tasa de error y porcentaje de PCR positivos para doce microsatélites heterólogos para monos araña. ....	37
Tabla 7. Diversidad genética de nueve loci heterólogos para monos araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> ) de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador. ....	38
Tabla 8. Diversidad genética por sitio de muestreo de nueve loci heterólogos para monos araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> ) en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.....	39
Tabla 9. Prueba de desequilibrio de ligamiento para cada par de loci heterólogos de monos araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> ) sobre todos los sitios muestreado en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador. ....	39
Tabla 10. Estadísticos F para la población de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	40
Tabla 11. Análisis pareado de estimadores de diferenciación genética $G_{st}$ (Nei 1977) y $D'_{Jost}$ (2008) entre los cuatro sitios de muestreo de mono araña en Bahía de Jiquilisco....	40
Tabla 12. Proporción de pertenencia de cada población pre-establecida en cada grupo inferido ( $K = 2$ ) de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco....	42
Tabla 13. Prueba de Mantel entre los cuatro sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	44
Tabla 14. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los cuatro sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	44
Tabla 15. Análisis de Varianza Molecular anidado entre: Grupo 1: Normandía, Chaguantique y El tercio vrs Grupo 2: Nacascolo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	45

Tabla 16. Número efectivo de población para los cuatro sitios de muestreo de monos araña en la Bahía de Jiquilisco. ....	45
Tabla 17. Número de migrantes ( $N_m$ ) basado en índice de fijación ( $F_{ST}$ ) entre pares de sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	46
Tabla 18. Valores $\Theta$ para los cuatro sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	46
Tabla 19. Tasa de inmigración en escala mutacional ( $M$ ) y número de migrantes ( $N_m$ ) entre pares de sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	47
Tabla 20. Valores $M$ y número de migrante entre grupos genéticos de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	47
Tabla 21. Promedios de coeficientes de endogamia ( $TrioML$ ) y desviación estándar (en paréntesis) para los monos araña de cada sitio de muestreo en la Bahía de Jiquilisco. ....	47
Tabla 22. Análisis de cuello de botella según cada modelo de mutación para cada grupo genético de <i>Ateles geoffroyi</i> .....	48
Tabla 23. Análisis de cuello de botella según cada modelo de mutación para cada sitio de muestreo. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ubicación geográfica de la Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco .....	15
Fig. 2. Ubicación geográfica de las áreas naturales protegidas y ecosistemas en la Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco que son habitadas por <i>Ateles geoffroyi</i> . .....	16
Fig. 3. Recolección de excretas de mono araña.....	18
Fig. 4. Búsqueda de los monos araña.. .....	19
Fig. 5. Extracción de ADN .....	21
Fig. 6. Preparación de PCR .....	23
Fig. 7. Resultados de electroforesis capilar .....	24
Fig. 8. Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) de los individuos de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	41
Fig. 9. $\Delta K$ para la óptima estructuración en los 4 sitios de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.....	42
Fig. 10. Gráfico del coeficiente de pertenencia individual para los monos araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> ) en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.. .....	43
Fig. 11. Gráfico del coeficiente de pertenencia individual para los 2 grupos genéticos de STRUCTURE.....	43
Fig. 12. Distribución de frecuencias alélicas de los grupos genéticos de <i>Ateles geoffroyi</i> . K1 (Normandía, Chaguantique y El Tercio) y K2 (Nacasclo). .....	48
Fig. 13. Distribución de frecuencias alélicas para cada sitio de muestreo de <i>Ateles geoffroyi</i> en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.. .....	49

## RESUMEN

El “mono araña” (*Ateles geoffroyi*) es el único primate no humano presente en El Salvador. Estos primates son particularmente sensibles a amenazas antropogénicas y susceptibles a eventos de aislamiento, debido a que requiere un hábitat amplio y poco perturbado. En el país, su distribución geográfica se ha restringido a remanentes de bosque semidecíduo dentro de áreas agrícolas abiertas en la Bahía de Jiquilisco. Con el objetivo de conocer la diversidad genética de *A. geoffroyi* en El Salvador, se analizaron 73 muestras genéticas no invasivas en los cuatro sitios donde habitan los monos araña, de las cuales, sólo 55 fueron utilizadas para análisis de diversidad, estructura y patrones genéticos; siendo el primer estudio genético con monos araña en vida libre de El Salvador. Se encontró baja diversidad genética ( $H_e = 0.39 - 0.51$ ) y diferenciación entre los sitios de muestreo. El análisis de estructura genética mostró dos grupos, uno conformado por los sitios Normandía, Chaguantique y El Tercio, y el segundo solo incluye Nacascolo. Como resultado de la prueba de aislamiento por distancia, se rechazó la hipótesis para los cuatro sitios ( $P = 0.47$ ) y también para el grupo genético de Normandía, Chaguantique y El Tercio ( $P = 0.33$ ); de igual manera no se encontró cuello de botella. No se logró determinar el flujo genético contemporáneo y los cuatro sitios tienen indicios de endogamia ( $f = 0.096 - 0.27$ ). Todos estos resultados indican que, para recuperar el equilibrio deriva-migración entre los sitios con monos nativos, se deben tomar medidas para restablecer la conectividad a través de pequeños parches de bosque entre los bosques centrales, funcionando como una sola matriz. Estas y otras acciones de manejo son cruciales para afrontar la situación poco alentadora de los monos araña en El Salvador.

## INTRODUCCIÓN

La genética de poblaciones se basa en la teoría y práctica de la genética para la preservación de las especies como entidades dinámicas capaces de evolucionar y enfrentarse a cambios medioambientales, minimizando el riesgo de extinción (Frankham 1995). Las acciones antropogénicas como la fragmentación, deforestación, cacería ilegal y otras, han sido las responsables de la disminución y pérdida de biodiversidad (Turner 1996). Para El Salvador, sólo el 3% del territorio está compuesto por bosque natural y es el país con menor número de áreas naturales protegidas de América Latina; mucho de este 3% se encuentra representado en parches de bosque aislados (Estrada et al. 2006, Romero 2010). Entre estas áreas de bosque remanente se encuentra la Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco, localizada al sureste de El Salvador. Sus principales hábitats son los manglares y parches de bosque semidecíduo dentro de áreas agrícolas abiertas, donde está la última población silvestre de *Ateles geoffroyi* en El Salvador.

*A. geoffroyi*, comúnmente conocido como “mono araña”, es la única especie de primate no humano presente en El Salvador, históricamente registrada en el Parque Nacional Montecristo, Conchagua, Cerro El Mono y Bahía de Jiquilisco. Sin embargo, en los últimos años, han sufrido una reducción de hábitat, así como de individuos, restringiéndolos únicamente para la Bahía de Jiquilisco en las locaciones de Área Natural Protegida Normandía, Chaguantique y Haciendas El tercio y Nacascolo con, aproximadamente, treinta individuos por sitio (Morales-Hernandez 2003; Rodríguez-Menjívar 2007).

En grupos de individuos tan pequeños y con poca conectividad entre sí, las posibilidades de endogamia aumentan; lo que conlleva a una baja variabilidad genética. La capacidad de adaptarse a cambios en el medio ambiente sólo es posible manteniendo una cantidad mínima de variabilidad genética en la población; de lo contrario la población se vuelve más propensa a enfermedades degenerativas y las opciones evolutivas disminuyen hasta el grado de la extinción (Collins and Dubach 2000a).

Para conocer la variabilidad y estructura genética de los monos araña de la Bahía de Jiquilisco, se recolectaron 73 muestras de heces, se extrajo el ADN nuclear a partir de las células epiteliales del colon y se amplificaron con 12 loci heterólogos microsatelitales. Se identificaron 55 individuos diferentes y 9 loci polimórficos; a partir de estos resultados, se realizaron análisis de heterocigosidad, riqueza alélica, diferenciación y estructura genética, migración, endogamia y cuello de botella. Se encontró baja diversidad genética en los individuos de *A. geoffroyi*, así como también diferenciación y estructuración genética en los cuatro sitios de muestreo. La situación actual de *A. geoffroyi* en El Salvador acentúa la necesidad de enfocar mayores esfuerzos de conservación en la zona oriental del país.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la diversidad genética de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.

### Objetivos específicos

- Conocer la estructura genética de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.
- Establecer el grado de endogamia en los grupos de *Ateles geoffroyi* del paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.
- Identificar eventos recientes de cuello de botella en los grupos de *Ateles geoffroyi* del paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

## MARCO TEÓRICO

### Antecedentes de la investigación

El redescubrimiento de las leyes de la herencia mendeliana en el siglo XX provocó un aumento en los estudios genéticos en el mundo anglosajón y germánico (Pinar 1999). La genética puede ser aplicada en diversas áreas como lo afirma Avise (1994), quién explica que las herramientas moleculares han tenido un gran impacto en trabajos de evolución y ecología de las especies. Siguiendo esta línea, se han hecho diversas investigaciones y trabajos de diversidad genética de las especies y sus aplicaciones ecológicas y de conservación, fitogeografía y evolución.

Los primeros esfuerzos realizados en el campo de la genética con el género *Ateles* fueron para conocer sus orígenes evolutivos y filogenética. Collins y Dubach (2000a) trazaron un mapa filogenético con todas las especies y subespecies de *Ateles*, con el objetivo de evidenciar la relación existente entre ellas y verificar el número de subespecies existentes. A través del ADN mitocondrial, concluyeron que existen cuatro especies de *Ateles*: *A. paniscus*, *A. belzebuth*, *A. hybridus* y *A. geoffroyi* y que la mayoría de ellas son monofiléticas, a excepción de la subespecie *A. belzebuth chamek* que es politómica; según sus resultados existen solamente dos subespecies de *A. geoffroyi* en Centroamérica: una en el norte, desde México hasta al norte de Nicaragua, y otra en el sur, desde El norte de Nicaragua hasta Panamá. Además, realizaron más estudios para trazar los orígenes evolutivos y los mecanismos de especiación de los monos del género *Ateles* (Collins and Dubach 2000a, Collins and Dubach 2001), utilizaron ADN mitocondrial y ADN nuclear para conocer su relación filogenética y comprobar si las barreras geográficas y ecológicas fueron las responsables de la especiación. Descubrieron que la especiación de *Ateles* ocurrió durante el periodo plioceno tardío y que es monofilética; es decir que todos los organismos incluidos en este han evolucionado a partir de una población ancestral común. Determinaron que la causa principal de su especiación fueron los cambios geográficos a gran escala asociados al continuo aumento de la cordillera noreste de los Andes y los cambios en el hábitat.

Morales-Jimenez, Disotell, et al. (2015) estudiaron las relaciones filogenéticas del género *Ateles* según la historia biogeográfica. Con ADN mitocondrial recolectado de todas las especies reconocidas del género dentro de su distribución geográfica, evaluaron si la taxonomía actual concuerda con los grupos monofiléticos y estimaron la divergencia entre los diferentes linajes de *Ateles*. Encontraron que, en contraste con estudios previos, *A. marginatus* es un taxón hermano del resto de los monos araña. El ancestro común más reciente de los *Ateles* existentes se remonta a ~ 6.7 millones de años, en el periodo Mioceno tardío, y la mayor divergencia a nivel de especie dentro del género sucedió en el Plioceno

tardío, sugiriendo que la diversidad actual de los monos araña no se explica principalmente por aislamiento y divergencia de las poblaciones en los refugios de bosque durante el Pleistoceno.

A pesar de los esfuerzos realizados por estos autores, aún quedaban algunas preguntas sin respuestas, una de ellas basada en el desconocimiento de las sub-especies presentes en Mesoamérica. Es por ello que Morales-Jimenez, Cortés-Ortiz, et al. (2015) estudiaron las relaciones genéticas entre las supuestas subespecies de *A. geoffroyi* en Mesoamérica. Utilizaron ADN mitocondrial y un total de 50 muestras. Dentro de sus resultados más importantes destacan la existencia de tres clados: en el primero se encuentran las especies *A.g. vellerosus* y *A.g. yucatanensis*, en el clado B las muestras de Nicaragua y Costa Rica que corresponden a la especie *A.g. frontatus* más dos muestras de El Salvador asignadas a la especie *A.g. vellerosus*, por lo cual recomiendan que los especímenes de El Salvador no deben ser considerados como *A.g. vellerosus* hasta realizar estudios más exhaustivos en la zona; por último está el clado C donde se agruparon las muestras de Panamá: *A.g. azuerencis* y *A.g. ornatus*.

Con el surgimiento de los marcadores moleculares, nuevos estudios de genética de poblaciones, evolución y filogenética han sido desarrollados. Dentro de los marcadores moleculares se encuentran los microsatélites que son repeticiones cortas por tándem dentro del genoma, estos se han convertido en los marcadores por elección en el mapeo genómico y en los estudios de genética de poblaciones debido a su hipervariabilidad y su ocurrencia (Ellegren 2004).

Para estudiar la estructura genética y social en poblaciones de primates se necesitan marcadores genéticos altamente variables y, debido al auge de los microsatélites, se pensó en ellos como una opción. Coote y Bruford (1996) aplicaron 11 iniciadores microsatélites de humano en diferentes especies de primates del viejo mundo, concluyendo que bajo las condiciones apropiadas de PCR, los microsatélites humanos son marcadores moleculares informativos en un amplio rango de taxones de primates.

Debido a que los microsatelites habían sido utilizados únicamente en primates del viejo mundo, Di Fiore y Fleischer (2004) amplificaron los microsatélites de “mono lanudo” (*Lagothrix lagotricha*) en otras especies de primates del nuevo mundo. Los loci fueron proyectados en 13 géneros de platirrininos y muchos de ellos fueron variables. Por lo cual resultan valiosos para estudios de genética de poblaciones, no solo para mono lanudo, sino también para otras especies de primates neotropicales, incluidas las del género *Ateles*.

Diversos estudios de genética de poblaciones en primates del nuevo mundo han sido realizados utilizando microsatélites, algunos de ellos con especies del género *Alouatta*. Ruiz-Garcia et al. (2007) determinaron la diversidad de genes en cuatro especies de

*Alouatta* y evidencian si estas especies se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados obtenidos demuestran que *A. caraya* posee el menor número de alelos por locus en los loci estudiados, mientras que *A. seniculus* posee el mayor, indicando una mayor diversidad genética. Con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg encontraron que *A. palliata* y *A. seniculus* no se encuentran en equilibrio.

Conociendo la efectividad de los microsatélites en los estudios de genética de poblaciones con primates del género *Alouatta*, Milton et al. (2009) investigaron la influencia de la fragmentación de hábitat en la variabilidad genética del “mono aullador” en la isla de Barro Colorado. Debido a la separación de la población en 1914, se esperaba un efecto de cuello de botella, pero los resultados indicaron que este no existe y no se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica de los individuos.

Hagell et al. (2013) analizaron la diversidad genética de *A. geoffroyi* en un paisaje fragmentado de Nicaragua, con el fin de comprender la viabilidad de las poblaciones en este tipo de paisaje perturbado. Trabajaron bajo la hipótesis que el mono araña es capaz de mantener su diversidad genética sin importar el aislamiento. Utilizando región control y microsatélites para análisis genéticos, concluyeron que, debido a la dependencia del “mono araña” con el bosque, sí existe una consecuencia genética y se evidencia por la pérdida de diversidad genética, la cual es más baja que la reportada por otros autores. Esta pérdida se explica por el aislamiento de los grupos y el declive de sus poblaciones.

El primer estudio realizado con *A. geoffroyi* en El Salvador es el de Morales-Hernández (2003). Realizó un estudio preliminar de los grupos que se encuentra en el ANP Chaguantique y Hacienda El Tercio. Estimó su densidad poblacional y comparó las densidades de ambos lugares; también identificó las especies arbóreas utilizadas por los monos y registró pautas de conducta. En Chaguantique estimó 29 individuos y en El Tercio 45 con radios sexuales que favorecen por una diferencia muy grande a las hembras. Reconoció como especies vegetales claves para la supervivencia de los monos araña a *Ficus spp.* o “amate”, *Brosimum alicastrum* u “ojushte” y *Castilla elástica* o “palo de hule”.

Argueta-Rivas y Rivera-Hernández (2004) investigaron el uso de hábitat de *A. geoffroyi* en el ANP Normandía. Estimaron una población de 28 individuos, distribuidos en 2 grupos de 14 monos cada uno (Con una proporción sexual de 1: 0.43 para adultos). De los 4 hábitat donde se encontraron, el más usado fue el bosque de galería, seguido por el bosque deamate, perturbado y finalmente jobo. Utilizan los niveles medios y bajos del dosel donde la actividad más frecuente fue el descanso, seguida por desplazamiento, alimentación y otras (Donde hubo diferencias entre sexo y edad). En cuanto a su dieta, encontraron que cuatro especies vegetales representan la mayoría de su dieta: *Ficus pertusa* “amate”, *Spondias mombin* “jobo”, *F. obtusifolia* “amate” y *F. insípida* “amate de río”.

En 2007, Rodríguez-Menjívar realizó un monitoreo poblacional de mono araña en el ANP Normandía. Registró 269 observaciones de monos (incluyendo repeticiones) en un lapso de 20 días, donde distinguió 21 individuos, conformando dos sub-grupos diferentes (11 y 10 individuos respectivamente) y solo en un sub-grupo observó una cría siendo transportada por la madre.

Crespín-Guzmán (2009) realizó una identificación genotípica de *A. geoffroyi* en condiciones de cautiverio, utilizando 3 loci de microsatélites (loci 1118, 311 y 5 o P2BH6). Es un estudio pionero para el país al utilizar herramientas genéticas. Midió la variación genética de los individuos y evaluó el equilibrio Hardy-Weinberg, calculó varias medidas de variación genética como el número de alelos efectivos, heterocigocidad observada, heterocigocidad esperada e índice de fijación. Encontró que la colección de individuos para este estudio no se encuentra en un equilibrio de Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos. Por lo tanto, dicha colección no lograría mantener constantes las frecuencias alélicas y no servirían para una translocación a la población de vida libre.

## **Orden Primates**

El orden primate (del latín “prime” que significa primer rango) fue descrito por Carl von Linné (1766); está distribuido principalmente en los trópicos, donde se incluyen monos, simios y humanos. Se dividen en dos parvordenes: los Catarrhini o primates del viejo mundo que se caracterizan por tener fosas nasales estrechamente espaciadas que apuntan hacia abajo, y los Platyrrhini o primates del nuevo mundo quienes poseen fosas nasales anchamente espaciadas y que apuntan hacia los lados (Wilson and Reeder 2005, Wainwright 2007).

### **Primates del nuevo mundo o Platyrrhini**

Actualmente los Platyrrhini conforman 152 especies (i.e. 204 especies y subespecies) en 20 géneros y 4 o 5 familias (Rylands et al. 2012). Groves (2001) solo cuenta como familias a la Cebidae, Pitheciidae, Aotidae y Atelidae; pero Rylands y Mittermeier (2009) incluyen a los monos comúnmente llamados “marmosetas” y “tamarindos” en una familia aparte llamada Callitrichidae.

### **Familia Atelidae**

En la familia Atelidae se encuentran los primates del nuevo mundo de mayor tamaño, caracterizados en general por dedos y colas prensiles largos (Nowak 1999, Groves 2001,

Wilson and Reeder 2005) . Está compuesta por 5 géneros y 42 especies (subespecies incluidas), distribuidas en México, Centro y Suramérica (Rylands and Mittermeier 2009). La mayoría de las especies están considerada en las categorías de peligro, vulnerable y en peligro crítico, mientras que son pocas las categorizadas como preocupación menor según la lista roja de la IUCN (Cuarón et al. 2008, Takahashi 2008).

### ***Ateles geoffroyi* Kuhl, 1820**

#### **Morfología**

De compleción delgada, extremidades largas y esbeltas con cuatro dedos funcionales y el pulgar ausente; *Ateles* proviene del latín “incompleto”, haciendo referencia a esta característica (Kellogg and Goldman 1944). Posee una larga cola prensil que le sirve para la movilidad a través del dosel del bosque (Mittermeier 1978).

Tienen una altura de 50 cm y 7 kg de peso promedio, siendo los machos de mayor tamaño que las hembras (Wainwright 2007). Las hembras tienen el clítoris alargado que se asemeja al pene de los machos (Kellogg and Goldman 1944). La fórmula dental es I 2/2, C 1/1, P 3/3, M 3/3 x 2 =32 (Burt and Stirton 1961).

El pelaje varía entre tonalidades negras, grises, café y naranja rojiza y la cara comúnmente está marcada por una máscara de piel de color claro (Kellogg and Goldman 1944) (Ver Anexo 1).

#### **Etología y dieta**

Es de actividad diurna y forrajea durante el día en el dosel (Kellogg and Goldman 1944, Cant 1990, González-Zamora et al. 2009). Presenta actividad bimodal y la duración y tiempos de los patrones de actividad-descanso son influenciados significativamente por factores astronómicos y meteorológicos (Muñoz-Delgado et al. 2004).

Adaptan su comportamiento según el hábitat que los rodea para lidiar con la escasez de alimento: los monos que habitan bosques fragmentados pasan más tiempo forrajeando y menos tiempo movilizándose, a diferencia de las poblaciones de un bosque continuo. El tiempo de forrajeo es mayor en época lluviosa que en seca, mientras que el tiempo de reposo o descanso sigue un patrón contrario (Chaves et al. 2011).

Es típicamente frugívoro pero también consume hojas (en especial las jóvenes y los brotes) como complemento para proteína (Hladik 1978). Se alimenta de varias especies de flora,

entre ellas: *Ficus spp* “amate”., *Brosimum spp.* “ojushte”, *Ceiba pentandra* “ceiba”, *Ficus pertusa* “amate”, *Spondias mombin* “jobo”, *F. obtusifolia* “amate” y *F. insípida* “amate de río”. (Argueta-Rivas and Rivera-Hernández 2004). Ocasionalmente forrajea flores, insectos, raíces aéreas, corteza y miel (Cant 1990).

Viven en grupos de 20 a 40 individuos, tienden a separarse en subgrupos durante el día para forrajeo e incluso para dormir; la separación en los subgrupos suele ser sexuada, donde los machos adultos forman grupos cohesivos mientras que las hembras adultas se mueven poco y más individual, acompañadas de su cría (Fedigan and Baxter 1984, Chapman 1990) . Los machos tratan de localizar a las hembras con las que pueden copular, mientras las madres tratan de proteger a sus crías al evitar interacciones o situaciones peligrosas por territorialidad (Chapman 1990). Su sistema social se puede definir como una dinámica de “fisión-fusión” (Kummer 1971), que es particular entre los primates, donde los grupos cambian de tamaño ajustándose a la distribución de los recursos por medio de la fisión y fusión de subunidades llamadas cuadrillas o subgrupos. Cada individuo tiene la opción de asociarse en subgrupos de diferente tamaño y composición (Chapman et al. 1995).

Gritos, ladridos y vocalizaciones roncas son hechas por *A. geoffroyi* para alertar al grupo; y durante interacciones sociales usan chirridos, pequeños gritos y relinchos (Sebeok 1977, Wainwright 2007); gritos de larga distancia son para comunicarse durante el forrajeo (Chapman and Lefebvre 1990).

## **Reproducción**

No tiene una época de apareamiento regular (Klein 1971). La madurez sexual comienza a partir de los 5 años de edad (Eisenberg 1973) y tienen un ciclo estral de 20 a 23 días (Campbell et al. 2001).

El periodo de gestación es de siete meses y medio aproximadamente donde solo nace una cría (Eisenberg 1973). La cría se sostiene del pecho de la madre durante el primer o segundo mes de vida, hasta que puede sujetarse de la espalda. A partir de los tres meses se pueden mover independiente y comer sólidos, pero siguen siendo amamantados hasta un año de edad (Klein 1971). Las hembras tienen crías cada dos a cuatro años (Eisenberg 1973).

## **Distribución y hábitat**

Son considerados especialistas, habitan sólo bosques poco perturbados; arbóreos, encontrados principalmente en el dosel (Estrada and Coates-Estrada 1988). Están ampliamente distribuidos en los bosques tropicales desde el sureste de México, Centroamérica hasta el norte de Bolivia (Takahashi 2008).

En la actualidad no hay un registro de la distribución de *A. geoffroyi* en El Salvador, pero, anteriormente, su distribución comprendía la Laguna de Olomega (San Miguel), Laguna de Alegría, Cerro El Mono, Bahía de Jiquilisco (Usulután) y Parque Nacional Montecristo (Santa Ana) (Kellogg and Goldman 1944, Burt and Stirton 1961, Morales-Hernández 2003) (Ver Anexo 2).

### Subespecies

Kellogg y Goldman (1944) fueron los primeros en reportar la descripción taxonómica completa del género *Ateles*, basándose en diferencias en el pelaje. Para *A. geoffroyi* describen nueve subespecies distintas (Tabla 1), todas distribuidas en Centroamérica (Takahashi 2008).

Debido a que la coloración y forma del pelaje puede variar mucho, ocurriendo en más de una subespecie (Froehlich et al. 1991), la diferenciación taxonómica con base en el pelaje es muy cuestionada. Collins y Dubach (2000), a partir de estudios con ADN mitocondrial, proponen las subespecies para *A. geoffroyi* sugeridas por Kellogg y Goldman (1944) más *A. g. fusciceps* y *A. g. robustus*.

Actualmente la clasificación más aceptada es la de Rylands et al. (2006) (Tabla 1) a la que todavía se recomienda revisión. La confusión sobre las subespecies de *A. geoffroyi* se debe a que algunas clasificaciones reconocidas por investigadores (Collins and Dubach 2000a, Groves 2001, Rylands et al. 2006, Rylands et al. 2012) son cuestionables (Morales-Jimenez, Cortés-Ortiz, et al. 2015).

**Tabla 1.** Clasificaciones alternativas para las subespecies de *Ateles geoffroyi*. Tomado de Morales-Jimenez, Cortés-Ortiz, et al. (2015).

<b>Kellogg y Goldman (1944)</b>	<b>Groves (2001)</b>	<b>Rylands et al. (2006) Cuarón et al. (2008)</b>
<i>A. g. geoffroyi</i>	<i>A. g. geoffroyi</i>	<i>A. g. geoffroyi</i>
<i>A. g. vellerosus</i>	<i>A. g. vellerosus</i>	<i>A. g. vellerosus</i>
<i>A. g. yucatanensis</i>	<i>A. g. yucatanensis</i>	<i>A. g. yucatanensis</i>
<i>A. g. pan</i>		
<i>A. g. frontatus</i>		<i>A. g. frontatus</i>
<i>A. g. ornatus</i>	<i>A. g. ornatus</i>	<i>A. g. ornatus</i>
<i>A. g. panamensis</i>		
<i>A. g. azurensis</i>		<i>A. g. azurensis</i>
<i>A. g. griseescens</i>	<i>A. g. griseescens</i>	<i>A. g. griseescens</i>

Para El Salvador no se tiene seguridad sobre la subespecie a la cual pertenece la población de *A. geoffroyi*. Por pelaje y separación geográfica se han clasificado como *A. g. vellerosus*

(Kellogg and Goldman 1944, Rylands et al. 2006). Morales-Jimenez, Cortés-Ortiz, et al. (2015), a partir de sólo 2 muestras con información incompleta de su procedencia, sugieren que la población del país está más relacionada a *A.g. frontatus* y que deberían de ser considerados distintos de *A.g. vellerosus* y posiblemente como una subespecie distinta.

### **Ecología y conservación**

Tienen múltiples roles ecológicos: son consumidores primarios, amplios dispersores de semillas, influyendo a largo plazo en la disposición de fruta y en la composición del bosque (Link and Di Fiore 2006), contribuyendo así al proceso natural de regeneración del bosque (Estrada and Coates-Estrada 1988).

Los frugívoros de gran tamaño son la clase de primates más vulnerables a las perturbaciones de hábitat (Johns and Skorupa 1987). *A. geoffroyi*, a pesar que tiene un amplio rango geográfico, es altamente cazado y necesita de un hábitat relativamente conservado para sobrevivir (Mittermeier et al. 1989).

Según el listado oficial de especies amenazadas y en peligro de extinción en El Salvador, *A. geoffroyi* se encuentra en peligro de extinción (MARN 2009) al igual que en la lista roja de especies amenazadas de la IUCN (Cuarón et al. 2008).

Se encuentra dentro del apéndice I y II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES 2013). El apéndice I aplica a especies sobre las que se cierne el mayor grado de peligro y se prohíbe el comercio internacional de especímenes de esas especies, salvo cuando la importación se realiza con fines no comerciales; mientras que el apéndice II trata sobre las especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo, a menos que se controle estrictamente su comercio.

Debido a sus necesidades de un amplio hábitat, baja fecundidad y lento ciclo reproductivo (Milton 1981), presiones antropogénicas como caza ilegal y deforestación (Marsh and Chapman 2013), las poblaciones no pueden reponerse a sí mismas, a tal punto que han desaparecido de muchos lugares donde eran comunes, e incluso ahora que estos lugares están protegidos (Wainwright 2007). Esta especie podría ser de los primeros primates de Mesoamérica en extinguirse localmente (DeGama-Blanchet and Fedigan 2006, Ramos-Fernández and Wallace 2008).

## **Genética de poblaciones**

Hoy en día es aceptado entre los biólogos conservacionistas que la genética es una herramienta esencial y eficiente para el manejo de poblaciones (Beardmore and Shami 1976). La genética de poblaciones es aplicada en problemas de conservación, en ella se hacen predicciones basadas en principios mendelianos de la herencia y se obtienen resultados de medidas empíricas de frecuencias de genotipos y alelos (Hartl and Clark 1997). Se crean expectativas de variación genética en poblaciones de organismos individuales, las cuales permiten predecir cuanta variación genética presenta una población y como esta cambia con el paso del tiempo (Hamilton 2011).

Los principios de la genética de poblaciones son los mecanismos de herencia Mendeliana: mutación, apareamiento aleatorio, flujo génico y selección natural y cada uno de ellos puede aumentar y disminuir la variación genética (Edelson 2001, Hamilton 2011).

Si existe apareamiento aleatorio en una población grande y la mutación, migración y selección están ausentes, las proporciones de genotipos no cambian de generación a generación (Crow and Dove 2000).

## **Variabilidad genética**

La variabilidad genética o diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad y se define como todas aquellas variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Piñero et al. 2008). La genética de poblaciones debe lidiar con la diversidad fenotípica, y en especial aquella que es resultado de una diferencia de genotipos (Hartl and Clark 1997).

En una población donde los individuos se entrecruzan, hay una diversidad de genotipos. La variación hereditaria es el resultado de la mutación, del paso de material genético entre poblaciones y de la recombinación de factores genéticos, en conjunto con las fuerzas de selección que moldean el patrón de variación (Mettler and Gregg 1972).

La variación genética es la forma en que los alelos múltiples de muchos genes existen (Hartl and Clark 1997). Para sobrevivir, las poblaciones deben adaptarse por medio de alteraciones en su estructura genética, en respuesta a los cambios del medio, es decir que se deben producir y reproducir nuevos genotipos y fenotipos adaptados a las nuevas condiciones (Mettler and Greeg 1972).

## **Marcadores moleculares**

Los cromosomas contienen las unidades de información que pasan de una generación a otra dentro de una población, pero la identificación y descripción del ADN no se dio sino hasta la primera mitad del siglo XX (Ferreira and Grattapaglia 1998). El ADN se presenta como una estructura de doble cadena donde se encuentran los genes. Las cadenas de ADN están formadas por secuencias de bases nitrogenadas las cuales son Adenina, Timina, Guanina y Citosina. Además de ADN, los cromosomas están compuestos de proteínas que actúan en el empaquetamiento de la molécula (Watson and Crick 1953).

Los marcadores moleculares se definen como todo y cualquier fenotipo molecular originario de la expresión de un gen, o segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada (Ferreira and Grattapaglia 1998, Azofeifa-Delgado 2006). Permiten conocer las propiedades moleculares, modo de transmisión genética y la naturaleza de diferencias mutacionales (Avisé 1994).

Según Ferreira y Grattapaglia (1998) las características más importantes de los marcadores moleculares son:

- Poseen un gran número de loci polimórficos y sus alelos pueden ser estudiados en poblaciones segregantes de cruzamientos específicos, facilitando la construcción de mapas genéticos.
- Son neutros en relación a los marcadores fenotípicos, con efecto epistático o pleitrópico mínimo o nulo.
- Son codominantes y contienen una gran cantidad de información genética por locus.

## **Microsatélites**

Los genomas eucariontes están densamente poblados por diferentes clases de secuencias repetidas, unas más complejas y otras más sencillas. Los microsatélites (Weber 1990, Schlotterer and Tautz 1992), anteriormente llamados secuencias sencillas repetidas (SSR o STR), consisten en pequeñas secuencias de 1 a 4 nucleótidos adyacentes repetidas lado a lado (Ferreira and Grattapaglia 1998, Ellegren 2004).

Los microsatélites son los tipos de secuencias de ADN más variables en el genoma. La variación genética en algunos loci de microsatélites es caracterizada por una alta heterocigosidad y la presencia de alelos múltiples, los cuales se encuentran en contraste con el ADN único (Ellegren 2004).

La detección de microsatélites se da por medio de la amplificación individual de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de las regiones que los contienen. Esta

amplificación se da a partir de un par de iniciadores específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite (Ferreira and Grattapaglia 1998).

### **Marcaje fluorescente**

Los métodos clásicos de tinción traen consigo problemas logísticos asociados al procesamiento de muchos marcadores a la vez; problemas como la medición del rango de alelos y la transcripción manual de los datos (Mansfield et al. 1994). Los métodos automatizados como los basados en fluorescencia, permiten superar muchos de esos problemas debido a que se puede aumentar el número de loci analizados (Ziegle et al. 1992) y, al ser detectados por medio de un láser excitante, brinda alta sensibilidad, seguridad y una digitalización inmediata de las señales detectables (Mansfield et al. 1994). Con la fluorescencia se pueden analizar marcadores simultáneamente a pesar que exista traslape entre ellos, eligiendo tinciones de diferentes colores que permitan identificar el microsatélite (Ziegle et al. 1992).

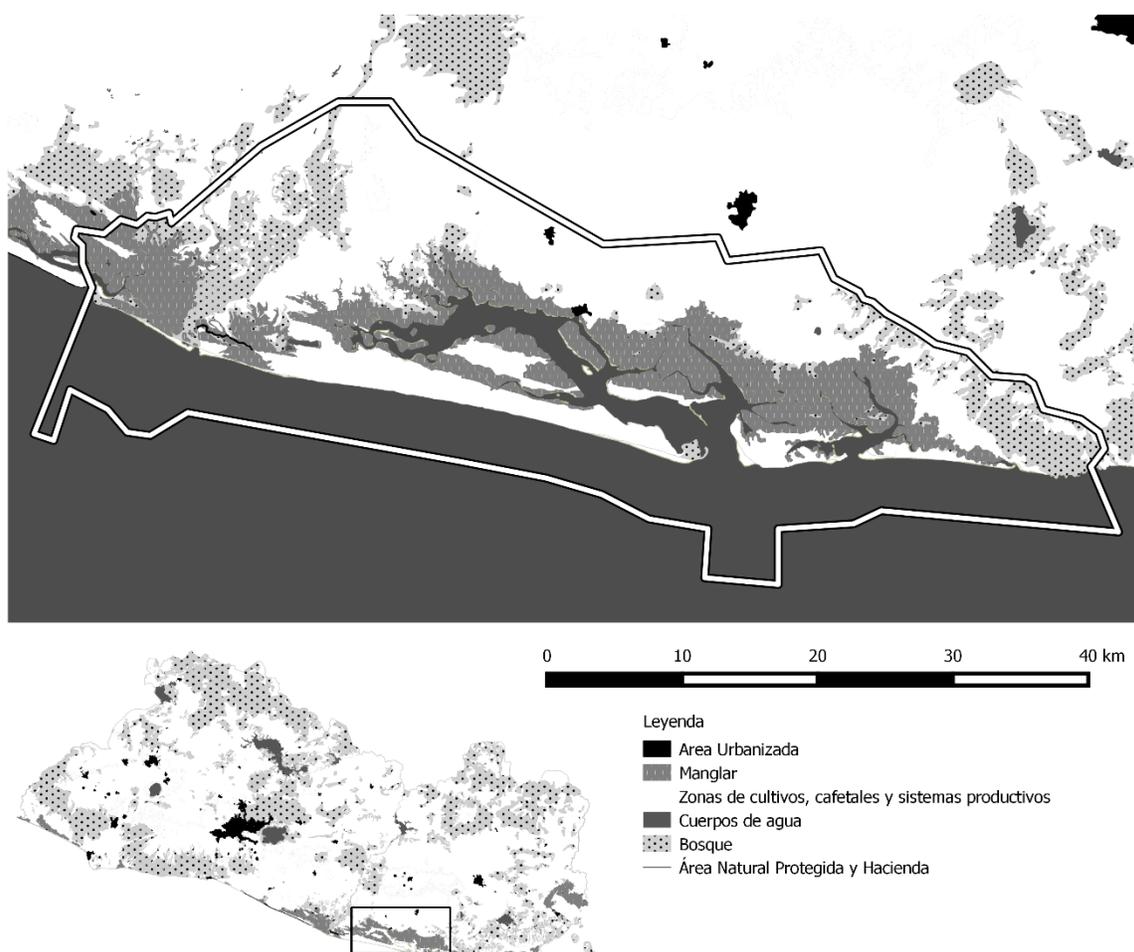
### **PCR Multiplex**

El PCR multiplex es una variante del PCR simple donde dos o más loci son amplificados simultáneamente en la misma reacción (Henegariu et al. 1997). Permite genotipificar microsatélites usando un protocolo estandarizado (Hayden et al. 2008). Previo al uso del PCR multiplex, se deben conocer algunas características de los marcadores seleccionados, debido a que una competencia entre reacciones secundarias con los marcadores disminuye la eficiencia del PCR (Vallone and Butler 2004).

## METODOLOGÍA

### Descripción del sitio de estudio

La Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco, está ubicada al sudeste de El Salvador, en la zona costera del departamento de Usulután (Fig. 1). Tiene una superficie de 101.607 Há y son nueve Áreas Naturales Protegidas las que componen la zona núcleo de la Reserva (36,144 Há). Sus coordenadas centrales son latitud 13.25222 y longitud -88.50416 (MARN 2007).

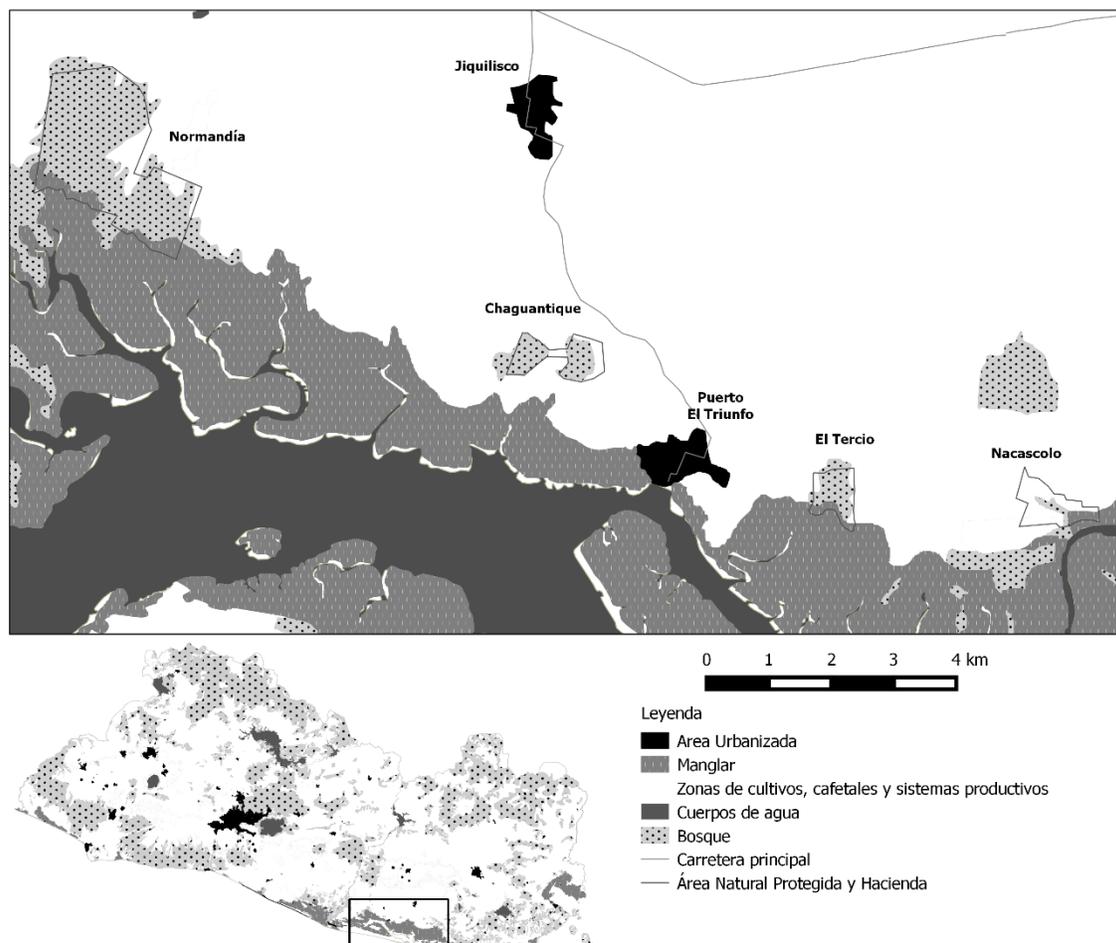


**Fig. 1.** Ubicación geográfica de la Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco

Pertenece a la zona climática de los trópicos semi-húmedo y, según la clasificación climática de Köppen, pertenece a la Sabana Tropical Caliente con una altitud de 0 a 800 msnm y una temperatura anual de 22 a 27 °C. La temperatura media del mes más cálido es 36 °C y la del mes más frío de 20 °C. Presenta época seca y lluviosa bien definida: seca de diciembre a marzo, dos transiciones en el mes de abril y noviembre respectivamente, y la época lluviosa es de mayo a octubre (MARN 2007).

Está conformada por ecosistemas de manglar, zonas ecotonales de manglar, vegetación arbustiva de playa, bosques latifoliados siempre verdes, bosques latifoliados semicaducifolios, bosques latifoliados caducifolios y bosques de galería (MARN 2007).

La investigación se realizó en los cuatro sitios donde se encuentran remanentes de la población de *A. geoffroyi* de El Salvador: Normandía, El Tercio, Chaguantique y Nacascolo (Fig 2). Las Áreas están separadas por tierras agrícolas.



**Fig. 2.** Ubicación geográfica de las áreas naturales protegidas y ecosistemas en la Reserva de Biosfera Bahía de Jiquilisco que son habitadas por *Ateles geoffroyi*.

### Área Natural Protegida Normandía

Se ubica en el Cantón Cruzadilla de San Juan, Municipio de Jiquilisco, departamento de Usulután. Posee una extensión de 495.3 Há compuesta por bosque latifoliado siempre verde, estacionalmente saturado y manglar. Sus coordenadas geográficas son latitud 13.325 y longitud -88.63416. Está dividida en dos sectores: La Cedrera, en el sector norte y el Bosque aluvial que se encuentra en el sector sur.

Existen siete comunidades vegetales dentro del Sector Sur: Bosque de Galería, Bosque Perturbado, Bosque de Jobo, Bosque de Transición 1, Bosque de Transición 2, Bosque inundado y Bosque Perturbado (Rodríguez-Menjívar 2007).

### **Área Natural Protegida Chaguantique**

El ANP Chaguantique está ubicada en el cantón Chaguantique, municipio de Puerto El Triunfo, departamento de Usulután. Con coordenadas latitud 13.28472 y longitud -88.575. El Área tiene una extensión total de 56 Há en dos parches de bosque latifoliado siempre verde, unidos por un pasillo arbolado (MARN 2004).

En el área, el Sistema de Asesoría y Capacitación para el Desarrollo (SACDEL) ha trabajado con fondos FIAES, creando un centro de interpretación y el establecimiento de senderos turísticos señalados (MARN 2004).

### **Hacienda El Tercio**

Bosque latifoliado siempre verde estacionalmente saturado y manglar, con un área de 162.19 Há. (MARN 2004, MARN 2007). Sus coordenadas geográficas son latitud 13.26888 LN y longitud -88.525.

La cooperativa de El Tercio ha trabajado con la Asociación Salvadoreña de Formación y Autodesarrollo para Repatriados de Extrema Pobreza (ASFAREP) (MARN 2004).

### **Hacienda El Nacascolo**

Bosque latifoliado siempre verde, estacionalmente saturado contiguos a Puerto Barillas. Son derechos de reserva que colindan con los manglares, con coordenadas geográficas latitud 13.26777 y longitud -88.49222. Conocida por los lugareños como finca Nacascolo, es utilizada como atractivo turístico para observación de monos araña.

## **Metodología de campo**

### **Recolecta de muestras**

Se utilizó un método no invasivo para la toma de muestras. Esta metodología tiene como principio que el ADN puede ser extraído de cualquier material derivado del animal (Höss et al. 1992). Se recolectaron heces frescas de mono araña para extraer el ADN presente en las células epiteliales del colon (Fig. 3). Un total de 73 muestras fueron recolectadas: 40 del 2013 y 33 recolectadas en el año 2015. Las primeras 40 muestras fueron recolectadas en

2013 durante el “Proyecto Ateles” (Girón et al. 2014); estas muestras fueron transportadas a Costa Rica donde se realizó la extracción de ADN, mas no fueron analizadas, razón por la cual fueron incluidas en esta investigación. A pesar que las muestras fueron recolectadas en años distintos, todas se obtuvieron a partir de la misma metodología.

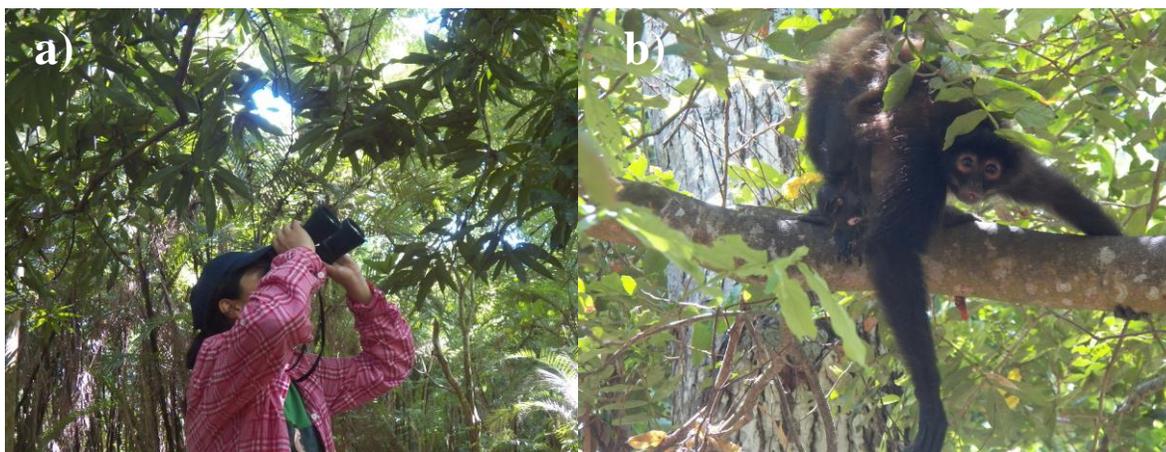


**Fig. 3.** Recolección de excretas de mono araña. a) semilla rodeada de heces, b) excremento de consistencia pastosa, c) tomo de la muestra, d) almacenaje de la muestra.

El muestreo se llevó a cabo durante 5 fechas en los años 2013 y 2015. La información de cada muestra se detalla en el anexo 3. Las fechas de muestreo y el número de muestras recolectadas por fechas son las siguientes:

29/05/2013- 01/06/2013	15 muestras
14/07/2013 - 18/07/2013	25 muestras
09/08/2015 - 15/08/2015	11 muestras
23/08/2015 - 28/08/2015	15 muestras
13/09/2015 - 18/09/2015	7 muestras
Total	73 muestras

La recolecta de las muestras fue diferente para algunos sitios: en Normandía y Chaguantique se realizó una búsqueda intensiva de los individuos de *A. geoffroyi* a partir de las 8:00 A.M hasta 4:00 P.M. Con ayuda de los guardarecursos del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN), se recorrieron los senderos más utilizados por los monos (Fig. 4). Luego de encontrar al grupo de monos, se siguieron hasta que la mayoría defecara, esto con el fin de recolectar sólo heces frescas.



**Fig. 4.** Búsqueda de los monos araña. a) observación de los individuos encontrados, b) hembra de *Ateles geoffroyi* con cría.

El Tercio y Nacascolo no son Áreas Naturales Protegidas, por lo que la búsqueda fue diferente. Ambos sitios tienen un área boscosa reducida y no se dificulta encontrar a las tropas de mono araña. Con ayuda de personas de las comunidades aledañas se buscó el punto donde los monos realizan la actividad de descanso. Al encontrar a los grupos de monos en estos sitios, también se esperó a que la mayoría defecara y se procedió a la recolecta de las heces frescas respectivas.

Las heces frescas fueron recogidas con guantes de látex y colocadas en bolsas de plástico selladas, una bolsa por muestra; inmediatamente, se completaron las fichas de cada recolecta con: número correlativo de la muestra, fecha, lugar, coordenadas geográficas e información del individuo cuando era posible identificarlo.

Las muestras fueron almacenadas en una hielera con refrigerante hasta su traslado a un congelador comercial a  $-2^{\circ}\text{C}$ . Permanecieron a  $-2^{\circ}\text{C}$  hasta ser movilizadas a Costa Rica, para lo cual se tramitaron los permisos CITES y Zoosanitario. Para mantener la cadena de frío durante el transporte, el material biológico se colocó en una hielera con refrigerante. Al llegar a su destino final, se almacenaron en un congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **Ubicación del laboratorio**

Los análisis de las muestras fecales se realizaron en el Laboratorio de Genética y Conservación en el Departamento de Biología de la Universidad de Costa Rica, ubicada en San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

## **Metodología de Laboratorio**

### **Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN de las 73 muestras fecales de *A. geoffroyi* se utilizó el kit de extracción de ADN QIAamp DNA Stool mini kit de QIAGEN® con la modificación al protocolo para muestras fecales de carnívoros hecha por Chavez et al. (2014) (Ver Anexo 4) para asegurar una mayor absorción de inhibidores de PCR (Fig. 5). Dicho protocolo de extracción se realiza en dos días: en el primer día se descongelan las muestras y luego se raspa la parte más externa de la muestra, posteriormente se agrega el Buffer que realiza la lisis celular, esto con el fin de romper las células epiteliales y separar el ADN. Mientras que en el segundo día se agregan las tabletas que absorben los inhibidores de ADN. Para garantizar un ADN más puro y con menos contaminantes, se agregan buffers de lavado y se filtran en tubos con membranas especiales. Al finalizar este proceso se obtienen 2 tubos Eppendorf de 90 µL con ADN por muestra, uno es el STOCK y otro el BACKUP.

### **Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

Previo a la amplificación, se utilizó el programa Autodimer 1.0 (Vallone and Butler 2004) para agrupar los loci que no interaccionan entre sí, obteniendo amplificaciones “primer-dimer” (i.e. cebadores que se adhieren o hibridan entre sí por tener bases complementarias), y asegurar que cada locus no se adhiera consigo mismo, formando estructuras en forma de broche. Se amplificaron las 73 muestras recolectadas para 12 pares de loci microsatelitales (Detallados en la Tabla 4) originalmente diseñados para otras especies de primates (heterólogos). Cada loci estaba marcado con tinte fluorescente en la secuencia “forward”. Cada muestra de ADN se preparó con Taq Multiplex PCR Master Mix 2X de QIAGEN® (Solución que ya incluye ADN Taq polimerasa de inicio rápido, Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>), desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), K<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, diseñada para reacciones de PCR multiplex), los loci (4 por multiplex, ver anexo 4) y agua libre de ribonucleasas (Fig. 6). Las concentraciones para cada muestra se especifican en la tabla 2.



**Fig. 5.** Extracción de ADN. a) kit de extracción, b) muestras de heces, c) toma de células epiteliales del colon de los monos, d) alícuotas de células del colon y buffer de lavado, e) purificación del ADN, f) producto final de la extracción, 2 tubos por muestra de ADN: un “stock” y un “backup”.

**Tabla 2.** Mezcla para PCR de las muestras de *Ateles geoffroyi* de la Bahía de Jiquilisco.

Mezcla de PCR	Concentración (mM)	Vol. para 1 muestra (µL)
PCR Multiplex Master Mix (2X)	3	10
4 loci (Secuencia <i>F + R</i> ) *	2	4 (1 por locus)
H <sub>2</sub> O libre de RNasas		3
ADN		3
Total		20 µL

mM, milimolar; µL, microlitros.

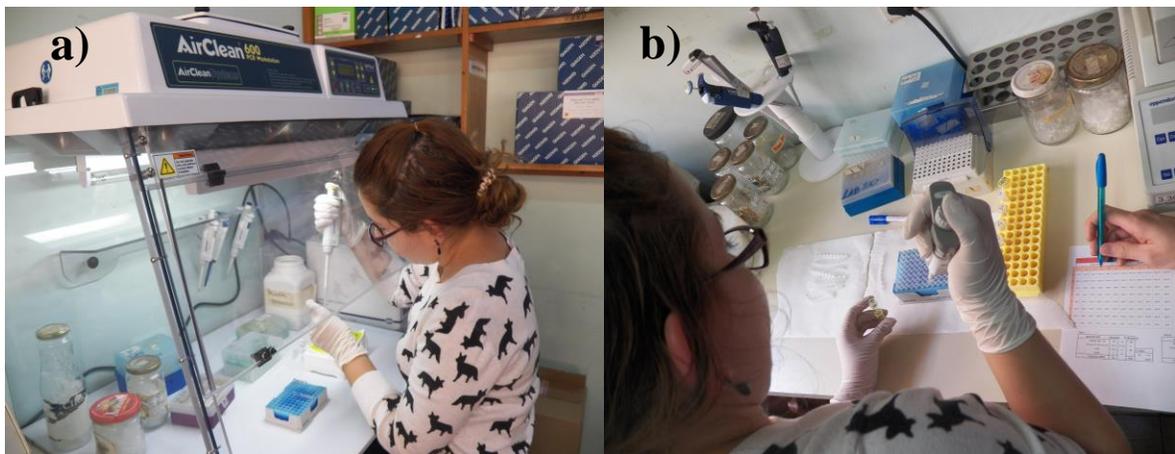
\* *F*, forward; *R*: reverse.

La PCR se realizó en un termociclador PTC-100 (Bio-Rad®) y se programó en base a las especificaciones de Hagell et al. (2013), más un “touchdown”, que consiste en asignar una temperatura igual o mayor que la temperatura de anillamiento esperada más alta y bajar la temperatura cada ciclo deseado hasta llegar a la temperatura de anillamiento esperada más baja (Don et al. 1991, Korbie and Mattick 2008). En la tabla 3 se detalla la programación de la PCR.

**Tabla. 3.** Programación de PCR para los 12 loci heterólogos de *Ateles geoffroyi*. La fase 1 es el “touchdown” que va de 57° a 53°C. La fase 2 es la etapa de amplificación genérica del PCR. Un total de 40 ciclos.

Fase 1	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	95°C	15 min
2	Desnaturalización	95°C	45 sec
3	Anillamiento	57°C - 1°C	45 sec
4	Elongación	72°C	45 sec
Repetir pasos 2 al 4 por 4 ciclos			
<b>Fase 2</b>			
5	Desnaturalización	95°C	45 sec
6	Anillamiento	52°C	45 sec
7	Elongación	72°C	45 sec
Repetir pasos 5 al 7 por 34 ciclos			
<b>Terminación</b>			
8	Elongación	72°C	7 min
9	Reacción detenida	4°C	Hasta sacar los tubos del termociclador

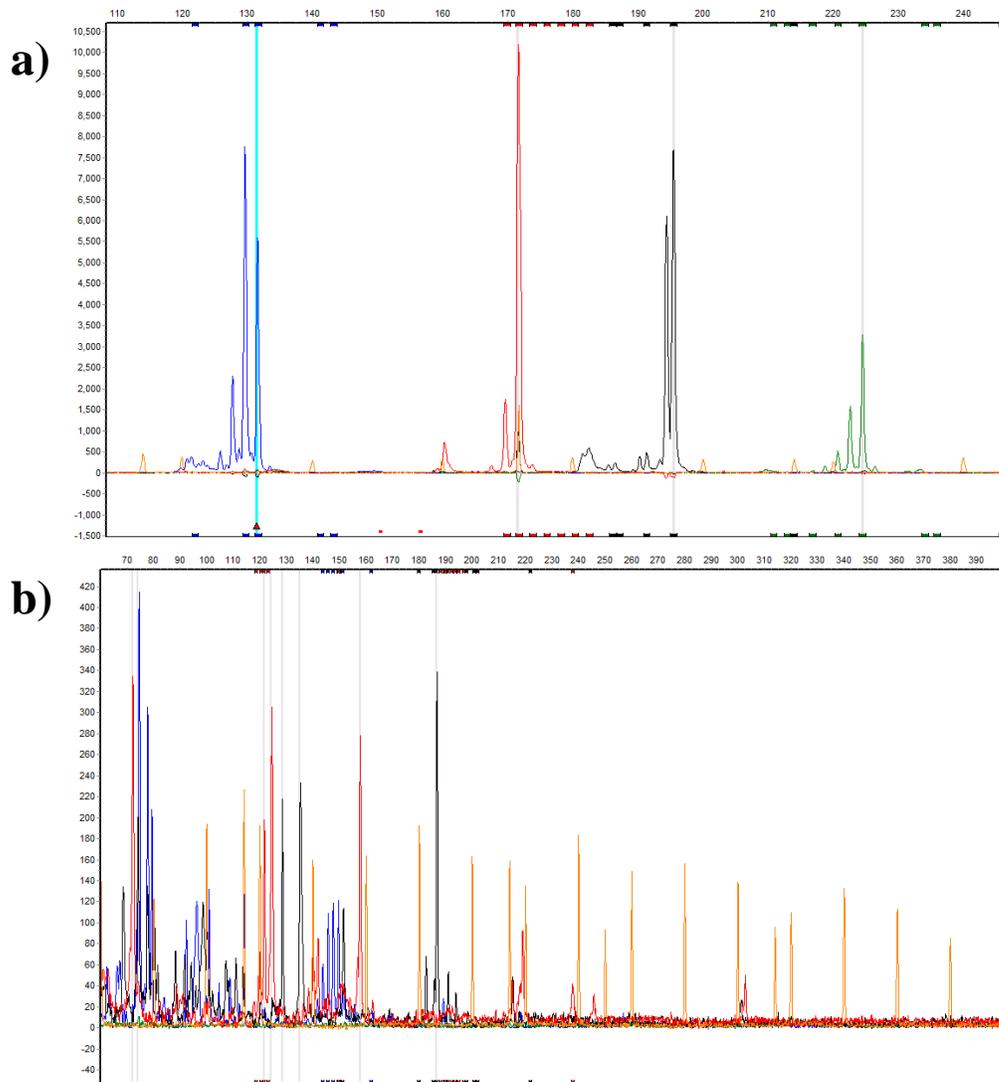
Se tomaron las siguientes precauciones para muestras no invasivas: para cada corrida de PCR, se utilizó como control positivo una muestra de ADN extraída de pelo procedente de un mono araña en cautiverio de un centro de rescate de El Salvador, inicialmente recolectada por Crespín-Guzmán (2009), y un control negativo que consistió en la mezcla de PCR sin ADN. Los productos de PCR amplificados se analizaron por electroforesis capilar en el analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems®).



**Fig. 6.** Preparación de PCR. a) preparación de la mezcla para hacer multiplex, b) adición de ADN a la mezcla.

### **Genotipificación microsatelital**

Los resultados de la electroforesis capilar fueron visualizados en el programa Genemarker (Softgenetics ®) (Fig. 7) y los alelos asignados se validaron con el paquete de R MsatAllele 2.0.1 (Alberto 2009). Todas las reacciones de PCR se replicaron de 3 a 5 veces y se confirmó el genotipo final de cada muestra cuando al menos dos repeticiones mostraron resultados consistentes, similar a la metodología de Frantz et al. (2003). Se buscó la presencia de alelos nulos con el programa MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Con el programa GIMLET 1.3.3 (Valière 2002) se calculó la probabilidad de genotipos idénticos (probabilidad > 90%) y la tasa de error de alelos perdidos y alelos falsos, además del porcentaje de reacción de PCR positivo para cada loci. Se descartaron las muestras con datos faltantes para más de dos loci y las muestras con genotipos repetidos.



**Fig. 7.** Resultados de electroforesis capilar. a) amplificación exitosa de la muestra Ags73 para el Multiplex 2 (AP68 rojo, Ceb120 negro-amarillo, D8S165 verde y D8S260 azul), b) amplificación fallida de la muestra Ags19 para el Multiplex 1 (LL1118 rojo, AP74 azul, LL311 rojo y Ceb121 negro-amarillo).

**Tabla 4.** Especificaciones para los 12 loci heterólogos de *Ateles geoffroyi* utilizados.

Locus	Secuencia (5' – 3')	Motivo de repetición	Temp. anillamiento (°C)	Rango esperado para <i>A. geoffroyi</i>	Tinte	Referencia	
Leon2	F CTGCTTCTTGTCCACTTCTTCTC R GTTTGGGTGGTTGCCAA	[CA]18[CG][CA]3	Dinucleotido	56-59	186-198	ned	Hagell et al. (2013)
LL1118	F TTTCTCCCTCTCAGATTACCAG R CCTTGAGGTTTTTTGGGTCC	[CA]2[TA]1[CA]17	Dinucleotido	53-55	124-148 125-159	pet	Hagell et al. (2013) Crespin (2011) Di Fiore and Fescher (2004)
LL311	F CTCCGAAAGCCATTTCTCC R TTAATGCCAGATGATTTTGG	[GAA]3[GAG]9 [CAAG]6	Trinucleotido	52	190-236	pet	Crespin (2011) Di Fiore and Fescher (2004)
P2BH6	F TCTGTTTGAATCCCCAGTCC R GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	[CA]19	Dinucleotido	55	104-124	vic	Crespin (2011)
LL1110	F TGAATGAGAGAATCAAAG R TATGTTCCACAGTAGAAAGC	[GT]20	Dinucleotido	50-55	203-221	6fam	Grativol et al. (2001) Hagell et al. (2013)
SB38	F CCTCAATGGGTTTTAACC R AGAACGAGTCTGTATCTTGA	[CA]19	Dinucleotido	50-55	127-153	ned	Hagell et al. (2013)
AP68	F TGTTGGTATAATCTTTCCTA R ACATACACCTTTGAGTTTCT	[TG]17	Dinucleotido	54-50	240-242 170 173	pet	Ellsworth and Hoelzer (1998) Hagell et al. (2013) Cortés-Ortiz et al. (2009) Ruíz-García et al. (2007)
AP74	F TGCACCTCATCTCTTTCTCTG R CATCTTTGTTTTCCCTCATAGC	[TG]19	Dinucleotido	52,50*	147-161	6fam	Ellsworth and Hoelzer (1998) Cortés-Ortiz et al. (2009) Ruíz-García et al. (2007)
D8S165	F ACAAGAGCACATTTAGTCAG R AGCTTCATTTTTCCCTCTAG	[AC]16	Dinucleotido	58-48*	135-138 133-143	6fam	Cortés-Ortiz et al. (2009) Ellsworth and Hoelzer (1998) Ruíz-García et al. (2007)
D8S260	F AGGCTTGCCAGATAAGGTTG R GCTGAAGGCTGTTCTATGGA	[CA]25	Dinucleotido	60	194-236	vic	Hagell et al. (2013)
Ceb120	F TTTGGGACTTGGACTGGTTC R CCGGTGTATTAGGGTCCTC	[CTAT]13	Tetranucleotido	50	-	ned	Muniz and Vigilant (2008)
Ceb121	F CCATTTAGGGGAGGAGAAGG R TTGGTTGGTAGGCAGGTAGG	[CTAT]10	Tetranucleotido	60	193 - 221	ned	Muniz and Vigilant (2008) Hagell et al. (2013)

## **Análisis Estadísticos**

### **Heterocigosidad observada (Ho) heterocigosidad esperada (He)**

La diversidad genética, típicamente es descrita a través de la heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y diversidad alélica (Frankham 1995).

Heterocigosidad observada (Ho) es la relación entre el número de los genotipos heterocigotas y el número total de genotipos analizados para cada locus (Nei and Roychoudhury 1974). Se calcula dividiendo el número de heterocigotos entre el tamaño de la población. Se utilizó el complemento para Excel GenAlEx 6.502 (Peakall and Smouse 2012). La fórmula es la siguiente:

$$H_o = \frac{N_o \text{ Hets}}{N}$$

Donde NoHets es el número de heterocigotas.

La heterocigosidad esperada (He) es la heterocigosidad de una población con entrecruzamiento aleatorio dadas las frecuencias alélicas según el equilibrio Hardy-Weinberg (Nei and Roychoudhury 1974). Se registra la He porque es menos sensible al tamaño de la muestra que la Ho y, en una población con entrecruzamiento aleatorio, Ho y He tienen valores similares (Frankham 1995). Se calculó con el complemento para Excel GenAlEx 6.502 (Peakall and Smouse 2012). La fórmula de Ho para loci con cualquier número de alelos es la siguiente:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia de cada alelo y  $n$  es el número de alelos.

### **Número efectivo de alelos (ne)**

El número efectivo de alelos representa un estimado del número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal (Kimura and Crow 1964). Es el número supuesto si las frecuencias alélicas fueran iguales para todos los loci, que resultaría en la misma heterocigosidad observada en la población (Allendorf and Luikart 2009); esta medida nos permite comparar poblaciones donde el número y la distribución de alelos difiere

drásticamente. Se calculó con el complemento para Excel GenAlEx 6.502 (Peakall and Smouse 2012). La fórmula de  $n_e$  es:

$$n_e = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia de cada alelo y los valores son sumados para todos los alelos.

Además, las frecuencias alélicas, conteo de alelos (N) y riqueza alélica (A) se obtuvieron con el complemento para Excel GenAlEx 6.502 (Peakall and Smouse 2012).

### **Índice de Fijación**

El índice de fijación, representado por  $F$ , es la proporción por la cual la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se encuentra reducida en relación a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en una población de apareamiento aleatorio con las mismas frecuencias alélicas (Wright 1931). Se calculó en el programa GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012), utilizando la ecuación:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Los valores que puede tomar  $F$  van de -1 a 1; los valores negativos indican apareamiento aleatorio, mientras que los valores positivos muestran endogamia o alelos nulos; de igual manera, los valores negativos indican un exceso de heterocigosidad (Peakall and Smouse 2012).

### **Prueba exacta de Hardy-Weinberg**

Una de las primeras pruebas que se realizan es la prueba de Hardy-Weinberg (HW). Probar las proporciones de HW es un control de calidad de la genotipificación, ya que la prueba es sensible a una mala asignación de alelos o a alelos nulos (Engels 2009). Es por ello que esta prueba es el primer paso para realizar los análisis genéticos subsiguientes.

Se utiliza una prueba exacta análoga a la prueba exacta de Fisher's (Freeman and Halton 1951); en este caso sólo se consideran las posibles salidas que tienen las mismas frecuencias de alelos como la observada, reduciendo en gran manera el número de salidas que deben ser analizadas. El total de probabilidades de este set de salida, condiciona HW y la frecuencia alélica observada, y el resultado final es el  $P$ -valor de la prueba, por medio del cual se identifican las desviaciones de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) (Engels 2009).

Esta prueba se realizó en el programa GENEPOP 4.0.11 (Raymond and Rousset 1995) con las especificaciones de 10,000 desmemorizaciones 1000 lotes y 10,000 iteraciones por lote y para estimar el  $P$ -valor se utilizó una Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC).

### **Desequilibrio de ligamiento**

El desequilibrio de ligamiento es el término utilizado para describir asociaciones que no han sido al azar entre alelos en dos loci (Lewontin and Kojima 1960). Este se desarrolla gradualmente sobre las generaciones con pequeñas poblaciones, lo que resulta en bloques de loci que contienen alelos deletéreos y pueden reflejar una ventaja de heterocigosis (Frankham et al. 2002). Para realizar la prueba se utilizó el programa GENEPOP 4.0.11 (Raymond and Rousset 1995). Los parámetros bayesianos de MCMC fueron: 10,000 desmemorizaciones, 100 lotes y 10,000 iteraciones por lote.

### **Corrección de Bonferroni**

Para los análisis de EHW y desequilibrio de ligamiento, se ajustó el valor  $\alpha$  (inicialmente  $\alpha = 0.05$ ) con la corrección de Bonferroni (Rice 1989). Cuando múltiples comparaciones o hipótesis son probadas, como es el caso de muchos estudios genéticos, la probabilidad de cometer error de tipo I aumenta; la corrección de Bonferroni compensa este problema mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{\alpha_{des}}{m}$$

Donde  $\alpha_{des}$  es el valor  $\alpha$  al que se quiere probar la significancia de cada hipótesis o prueba individual (comúnmente fijada en 0.05) y  $m$  son en número de pruebas independientes.

### **Riqueza alélica y riqueza de alelos privados con rarefacción**

La riqueza alélica ( $A_r$ ) permite identificar poblaciones que necesitan medidas especiales de conservación (Kalinowski 2004). Las medidas de riqueza alélica y de alelos privados ( $A_{pr}$ ) son muy dependientes del tamaño de la muestra, por esa razón se aplicó una rarefacción para compensar las diferencias en los tamaños de la muestra.

La rarefacción para estimar la riqueza alélica fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$Q_{IJG} = \frac{\left(\frac{N_j - N_{ij}}{g}\right)}{\frac{N_j}{g}} = \prod_{u=0}^{g-1} \frac{N_j - N_{ij} - u}{N_j - u}$$

Donde  $N_j$  representa el número total de genes muestreados,  $N_{ij}$  es el número de copias de los alelos en la muestra,  $g$  son genes seleccionados de manera aleatoria, y  $u$  es la distribución uniforme aleatoria.

Para calcular la riqueza de alelos privados se utilizó la fórmula:

$$\hat{\rho}_{g,r}^{(k)} = \sum_{i=1}^m \left\{ \frac{1}{C_r} \sum_{c_1=1}^{S_1} \sum_{c_2=1}^{S_2} \cdots \sum_{c_R=1}^{S_R} \left[ \left( 1 - \prod_{j \in Y_{kcr}} Q_{ijg} \right) \prod_{\substack{k'=1 \\ k' \neq k}}^R \prod_{j \in X_{k'c_k'r}} Q_{ij'g} \right] \right\}.$$

Donde  $R$  es el número total de regiones,  $C_r$  representa el número total de maneras en las que  $r$  puede ser muestreada,  $Y_{kcr}$  es el set  $c$ th entre las  $C_r$ ,  $k$  es el total de regiones,  $g$  los genes muestreados,  $i$  los alelos y  $r$  las poblaciones.

Se utilizó el programa HP-RARE ver. 1.0 (Kalinowski 2005), para calcular la riqueza alélica y de alelos privados con rarefacción de la población de *A. geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

### Estimadores F

Los estimadores F se calcularon en el programa Arlequín 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) con 16,000 permutaciones para obtener los  $P$ -valores respectivos. Un valor de  $F_{ST} > 0.15$  es considerado como un indicador de diferenciación significativa entre los grupos (Frankham et al. 2002).

$F_{ST}$  es una medida de divergencia en la frecuencia alélica entre las subpoblaciones. Los coeficientes  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son coeficientes de endogamia (Allendorf and Luikart 2009).  $F_{ST}$  Toma valores de 0 – 1, donde 0 es ausencia de diferenciación y 1 total diferenciación. Y se calcula a través de la fórmula:

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

Donde  $H_S$  es la diferencia genética entre poblaciones y  $H_T$  es la variación genética total.

$F_{IS}$  se interpreta como el índice de endogamia donde -1 significa exogamia y 1 endogamia. La fórmula para calcular  $F_{IS}$  es:

$$F_{IS} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_s}\right)$$

Donde  $H_o$  es la proporción de heterocigotas observados y  $H_s$  es la diferencia genética entre poblaciones.

$F_{IT}$  mide la homocigosidad dentro de la población; los valores más cercanos a 1 significan total homocigosidad y 0 ausencia de homocigosidad (exceso de heterocigosidad). Se utilizó la fórmula:

$$F_{IT} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_T}\right)$$

Donde  $H_o$  es la proporción de heterocigotas observados y  $H_T$  es la variación genética total.

### **Estimadores $G_{ST}$ y $D$**

Se utilizó el paquete de R DEMETics 0.8-7 (Gerlach et al. 2010) para calcular los estimadores de diferenciación genética  $G_{ST}$  y  $D$ , con 1000 bootstraps para estimar los  $P$ -valores.

Las fórmulas utilizadas por el programa para ambos estimadores son las siguientes:

$$G_{ST} \equiv \frac{D_{ST}}{H_T} = (H_T - H_S)/H_T$$

Donde  $H_T$  es la heterocigosidad total de la población y  $H_S$  es la heterocigosidad total de la subpoblación.

$$D \equiv \left[ \frac{(H_T - H_S)}{(1 - H_S)} \right] * \left[ \frac{n}{(n - 1)} \right]$$

Donde  $H_T$  es la heterocigosidad total de la población,  $H_S$  es la heterocigosidad total de la subpoblación y  $n$  el número de subpoblaciones.

Se calcularon ambos estimadores para obtener un mejor panorama sobre los procesos evolutivos que influyen la diferenciación poblacional (Leng and Zhang 2011). Ambos toman valores de 0 – 1, donde 0 significa ausencia de diferenciación y 1 total diferenciación entre las poblaciones.

### **Análisis de Discriminantes de Componentes Principales (ADCP)**

El análisis de discriminantes de componentes principales permite observar de manera gráfica la existencia de grupos genéticos dentro de la población. Primero se realiza un

análisis de componentes principales para seleccionar el número óptimo de variables y asegurarse de que no estén correlacionadas (Jombart et al. 2010).

El ADPC se hizo con el paquete de R Adegenet 2.0.1 (Jombart 2008). Primero, se determinaron los grupos genéticos con la función `find.clusters` y se corrió el ADPC con 10 componentes principales.

### **Análisis de estructura genética**

La estructura genética de la muestra se analizó con el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Este programa infiere la estructuración estimando el número más probable de grupos genéticos (K) a partir de logaritmos bayesianos.

Las simulaciones fueron realizadas usando un modelo de mezcla, donde cada individuo posee una fracción de su genoma a partir de cada K población (Pritchard et al. 2000), y el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas que asume que las K poblaciones representadas en la muestra divergieron de una población ancestral común (Falush et al. 2003) y no se incluyó información previa de la ubicación de las recolectas. Se calculó la probabilidad posterior ( $\Pr(X|K)$ ) para el número de sitios de muestreo más 3 (Evanno et al. 2005), o sea, para valores de K de 1 a 7. Se programaron 100,000 quemas iniciales, 100,000 Cadenas de Markov de Monte Carlo y 10 iteraciones por K. Para determinar la K más óptima se implementó el método de *delta K* ( $\Delta K$ , estadístico “ad hoc” que varía según la probabilidad respecto a K y muestra un aumento en su valor para el verdadero valor de K) de Evanno et al. (2005) implementado en el programa de la web STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012). Se promediaron todas las salidas de la K óptima con el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) y se graficaron con el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

Para analizar sub-estructuración, se utilizaron las mismas especificaciones para los cuatro programas y solo se varió el número de posibles K siguiendo las mismas recomendaciones de Evanno et al. (2005).

### **Aislamiento por Distancia (APD)**

Se espera que, en poblaciones con poca distancia geográfica entre ellas y con equilibrio mutación-migración, la diferenciación genética se explique por un modelo de aislamiento por distancia, donde las poblaciones más cercanas entre sí son genéticamente más similares que las que se encuentran alejadas (Meirmans 2012).

La hipótesis de aislamiento por distancia se prueba con Mantel, donde se hace una correlación entre las distancias genéticas y distancias geográficas. Se utilizó el paquete de R Adegnet 2.0.1 (Jombart 2008), para realizar la prueba de Mantel con 999 permutaciones para estimar el  $P$ -valor.

Se utilizaron las distancias genéticas de Nei y  $F_{ST}$  y las distancias geográficas euclidianas entre sitios de muestreo para la prueba. Las distancias de Nei se calcularon en el paquete de R Adegnet ver. 2.0.1 (Jombart 2016) y las distancias  $F_{ST}$  en el paquete de R HIERFSTAT 0.03-22 (Goudet 2005).

### **Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

El Análisis de Varianza Molecular se realizó en el programa Arlequín 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Primero se efectuó un AMOVA general entre todos los sitios de muestreo para determinar la existencia de estructuración. Se confirma la existencia de estructuración si el porcentaje de variación entre poblaciones es mayor que el componente intrapoblacional. Se utilizaron 16,000 permutaciones para estimar los  $P$ -valores.

La fórmula utilizada para calcular AMOVA es:

$$1 - \phi_{ST} = (1 - \phi_{SC})(1 - \phi_{CT})$$

Donde  $\phi_{ST}$  significa la diferencia entre poblaciones,  $\phi_{SC}$  diferencia entre poblaciones dentro de la misma región geográfica y  $\phi_{CT}$  diferenciación entre regiones.

### **Flujo genético**

El mejor acercamiento para conocer el flujo genético dentro de una población es por medio del número de migrantes que pasan de un sitio a otro por generación. El número de migrantes se calculó con el programa Arlequín 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). La fórmula utilizada por el programa es la siguiente:

$$\langle Nm \rangle_F = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

Donde  $N$  es el número de individuos en cada subpoblación,  $m$  es la fracción de migrantes en cada subpoblación por generación y  $F_{ST}$  es el índice de fijación.

Para estimar el número de migrantes se utilizaron los índices de fijación (Wright 1931), donde previamente se estima el número efectivo de población y la tasa de mutación. Una debilidad de este método para calcular el número de migrantes por generación es que asume

un modelo de isla, y por lo general, las poblaciones naturales no están bajo este modelo (Beerli 1998).

Es por esta debilidad del  $Nm$  que se utilizó el programa Migrate-r 3.2.1 (Beerli 2009) para estimar la tasa de migración y el tamaño efectivo de la población de una a muchas poblaciones utilizando los datos genéticos. Los parámetros a estimar son  $\Theta$  y  $M$ , que corresponden al tamaño de la población en escala mutacional y a la tasa de inmigración en escala mutacional respectivamente.

Las especificaciones utilizadas para el modelo de flujo genético entre los cuatro sitios de muestro fue un modelo de migración completa entre ellos. Los parámetros utilizados fueron el modelo Brownian (Tapiero and Toren 1987), estrategia bayesiana, valores iniciales de  $theta$  0, 10, 5 y para  $M$  0, 1000, 500. El número de repeticiones MCMC fue de 10,000.

Para estimar el número de migrantes entre los grupos genéticos, se utilizó Brownian para microsatelites, con estrategia bayesiana y con una tasa de mutación constante para todos los loci; los parámetros de distribución inicial para  $theta$  fueron 0, 25, 5 y para  $M$  0, 500, 1000; el número de repeticiones de MCMC fue de 100,000 y se aplicó un esquema de calor con cuatro cadenas de temperatura 1, 1.5, 3 y 100,000 con intervalo de cambio igual a 1.

Los resultados de migración se utilizaron para estimar el número de migrantes por generación utilizando la ecuación:

$$MN = \frac{\Theta * M}{2}$$

Donde  $\Theta$  corresponden al tamaño de la población en escala mutacional,  $M$  es la tasa de inmigración en escala mutacional y se divide entre 2 por ser organismos diploides.

### **Población Efectiva ( $N_e$ )**

El tamaño efectivo de la población ayuda a explicar los patrones de variación genética en la población, a inferir los mecanismos evolutivos que moldean la variación en las poblaciones naturales y, por último, a comprender la evolución del sexo y la recombinación (Wang 2005). Para estimar la población efectiva de los cuatro sitios de muestreo, se utilizó el programa NeEstimator 2.01 (Do et al. 2014). Se seleccionaron dos métodos de estimación por ser más adecuados para microsatélites: el método de exceso de heterocigosidad (Wang 2005b) y el método de ancestro común (Nomura 2008) bajo el modelo de reproducción aleatoria.

## **Endogamia**

El coeficiente de endogamia ( $f$ ), es la probabilidad de que un individuo reciba en un locus dado, dos alelos idénticos por descendencia. El coeficiente de endogamia de un individuo es igual al coeficiente de parentesco de sus padres, porque en el cigoto que dio origen a dicho individuo hay dos alelos, uno por cada parental (Wright 1922). Se utilizó el programa COANCESTRY 1.0.1.5 (Wang 2011) y el estimador escogido fue el método triádico TrioML (Wang 2007) porque considera errores de genotipificado. Este usa un tercer individuo como referencia para estimar el parentesco entre otros dos individuos, formando tríadas.

## **Cuello de botella**

Un cuello de botella es un caso especial de deriva genética donde una población experimenta una pérdida de variación genética a partir de una reducción drástica del tamaño de la población (Allendorf and Luikart 2009). Cuando el tamaño de una población es reducido de manera repentina, se espera que el porcentaje de heterocigosidad y número de alelos por locus disminuya, pero la diversidad alélica disminuye más rápido que la heterocigosidad ( $H_o > H_e$ ), y se refleja en las frecuencias alélicas después de cierto número de generaciones (Nei et al. 1975, Luikart et al. 1998).

Para este análisis se utilizó el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996) con el Modelo Gradual de Mutación (SMM; Ohta and Kimura 1973) y el Modelo de Dos Fases (TPM) con un 95 % de mutaciones de un paso y 5% de mutaciones de múltiples pasos (Piry et al. 1999), ambos modelos recomendados para loci microsatelitales (Luikart and Cornuet 1998). Además, se realizaron las pruebas de significancia (Cornuet and Luikart 1996) y de Wilcoxon (Luikart et al. 1998). Ambos análisis estadísticos trabajan bajo la hipótesis nula de que los loci están en equilibrio deriva-migración (i.e. el tamaño efectivo de la población se ha mantenido constante a lo largo del tiempo), mientras que la alternativa es un exceso significativo de heterocigosidad, así evidenciando un evento de cuello de botella.

En el programa también se graficó la distribución de las frecuencias alélicas para ver si se aproximaron a la forma de “L” que se espera bajo un equilibrio de deriva mutacional, o una distribución con modelo desplazado, indicando cuello de botella reciente (Luikart et al. 1998).

## RESULTADOS

### Amplificación de loci heterólogos

Se recolectaron 33 muestras durante la fase de campo y se agregaron 40 muestras recolectadas en 2013, sumando un total de 73 muestras entre los cuatro sitios: Normandía 25, Chaguantique 24, El Tercio 13 y Nacascolo 11 (Ver anexo 3).

De los 12 loci que se probaron, solo con LL1118 no se obtuvieron productos de PCR confiables. AP68 fue monomórfico y para LL311 solo se obtuvieron dos alelos. Todos los loci polimórficos mostraron alelos fantasmas o “stutters”, propios de las amplificaciones de microsatélites. La tabla 5 detalla la información alélica de todos los loci.

**Tabla 5.** Alelos de doce loci microsatélites heterólogos para monos araña (*Ateles geoffroyi*) y frecuencia alélica por sitio muestreado en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.

Locus	Alelos (pb)	Chaguantique	Normandía	El Tercio	Nacascolo
AP68	N	24	17	11	7
	172	1.000	1.000	1.000	1.000
AP74	N	24	19	12	11
	143	0.000	0.132	0.000	0.273
	149	0.688	0.605	0.708	0.136
	151	0.250	0.211	0.042	0.227
	155	0.063	0.053	0.250	0.364
Ceb120	N	24	18	12	10
	187	0.125	0.056	0.042	0.700
	191	0.271	0.028	0.083	0.000
	195	0.604	0.917	0.875	0.300
Ceb121	N	24	17	12	11
	182	0.063	0.000	0.000	0.000
	186	0.625	0.588	0.708	0.227
	190	0.146	0.000	0.125	0.136
	194	0.167	0.029	0.083	0.591
	202	0.000	0.118	0.000	0.045
	210	0.000	0.265	0.083	0.000
D8S260	N	23	19	11	10
	212	0.065	0.079	0.136	0.550
	216	0.130	0.026	0.000	0.000
	222	0.000	0.000	0.000	0.050
	224	0.413	0.184	0.364	0.000

	228	0.043	0.132	0.227	0.400
	232	0.000	0.000	0.182	0.000
	234	0.348	0.579	0.091	0.000
Leon2	N	24	19	11	10
	184	0.000	0.000	0.182	0.600
	186	0.000	0.079	0.000	0.000
	192	0.042	0.053	0.000	0.000
	194	0.938	0.816	0.818	0.400
	200	0.000	0.053	0.000	0.000
	294	0.021	0.000	0.000	0.000
LL311	N	14	17	7	2
	191	0.964	0.794	1.000	1.000
	209	0.036	0.206	0.000	0.000
LL1110	N	23	18	11	8
	213	0.652	0.556	0.909	0.000
	215	0.217	0.083	0.000	0.313
	217	0.109	0.250	0.091	0.625
	219	0.022	0.111	0.000	0.000
	221	0.000	0.000	0.000	0.063
LL1118	N	18	16	8	8
	120	0.000	0.000	0.125	0.000
	122	0.889	0.813	0.750	0.875
	126	0.111	0.094	0.063	0.125
	142	0.000	0.094	0.063	0.000
SB38	N	23	19	11	10
	145	0.000	0.000	0.000	0.050
	147	0.283	0.368	0.318	0.850
	157	0.174	0.053	0.591	0.100
	159	0.543	0.579	0.091	0.000
P2BH6	N	15	19	11	8
	105	0.000	0.000	0.000	0.125
	111	0.033	0.000	0.091	0.063
	115	0.667	0.763	0.909	0.125
	117	0.000	0.237	0.000	0.000
	125	0.033	0.000	0.000	0.625
	133	0.067	0.000	0.000	0.000
	135	0.167	0.000	0.000	0.063
	155	0.033	0.000	0.000	0.000
D8S165	N	24	19	12	11

126	0.021	0.000	0.083	0.000
130	0.458	0.368	0.542	0.318
132	0.521	0.632	0.375	0.636
138	0.000	0.000	0.000	0.045

Se obtuvieron bajos porcentajes de error de genotipifiquero para todos los loci (Tabla 6). LL1118 tuvo el porcentaje más alto de alelos perdidos (0.196 %), y Ceb121 el mayor porcentaje de alelos falsos (0.067 %). Únicamente AP68, LL311 y LL1118 tuvieron productos de PCR positivos abajo del 80%. Sólo 9 (AP74, Ceb120, Ceb 121, D8S260, Leon2, LL1110, SB38, P2BH6 y D8S165) de los 12 loci microsatélites fueron escogidos para los análisis posteriores, debido a una fácil asignación de alelos y su polimorfismo. No se encontró evidencia de alelos nulos.

**Tabla 6.** Tasa de error y porcentaje de PCR positivos para doce microsatélites heterólogos para monos araña.

<b>Locus</b>	<b>Alelo perdido</b>	<b>Alelo falso</b>	<b>% de PCR positivo</b>
AP74	0.000	0.015	0.840
Ceb120	0.061	0.008	0.950
Ceb121	0.063	0.067	0.900
D8S260	0.000	0.000	0.780
Leon2	0.000	0.006	0.910
LL1110	0.019	0.000	0.820
SB38	0.000	0.011	0.950
P2BH6	0.107	0.011	0.800
D8S165	0.009	0.020	0.990
AP68	0.000	0.000	0.690
LL311	0.000	0.000	0.490
LL1118	0.196	0.012	0.530
Promedio	0.038	0.013	0.800

### **Depuración de la base de datos**

Después de quitar las muestras con datos perdidos para más de dos loci, 15 muestras de las 73 que se recolectaron coincidieron en genotipos idénticos. Todos los genotipos fueron únicos para cada sitio. Se tuvieron recapturas de individuos en El Tercio y Normandía. Las muestras Ags20 y Ags28 pertenecen a un mismo individuo y se recolectaron con un día de diferencia. En Normandía se tuvieron dos recapturas; la primera con cuatro muestras, dos pares tomados en días diferentes: par 1: Ags42 y Ags43; par 2: Ags52 y Ags54. Al segundo individuo le corresponden las muestras Ags56, Ags44 y Ags49 (las dos últimas recolectadas el mismo día).

Estas recapturas, así como las muestras que tuvieron genotipos iguales, se sacaron de la base de datos inicial, utilizando 55 muestras (i.e. 55 individuos distintos) para los análisis genéticos posteriores.

### Diversidad genética

El promedio de número de alelos observados es 5.111. El locus con más alelos diferentes fue P2BH6 con ocho alelos y el que tuvo menos fue Ceb120 con tres alelos. La heterocigosidad total de los loci es 0.534 para la observada y 0.468 para la esperada. Ningún locus presenta desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg ( $P \leq 0.001$ ). El índice de fijación (F) dio valores negativos para todos los loci menos P2BH6 (Tabla 7); estos valores negativos, junto con los valores de heterocigosidad observada mayores que los de heterocigosidad esperada para la mayoría de los loci, indican un exceso de heterocigotas.

**Tabla 7.** Diversidad genética de nueve loci heterólogos para monos araña (*Ateles geoffroyi*) de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.

Locus	N	Rango alélico	A	ne	Ho	He	EHW(P)	F
AP74	55	134-155	4	2.447	0.552	0.559	0.050	-0.027
Ceb120	53	187-195	3	1.536	0.349	0.301	0.302	-0.103
Ceb121	53	182-210	6	2.236	0.666	0.552	0.842	-0.209
D8S260	53	212-234	7	3.096	0.772	0.662	0.012	-0.178
Leon2	54	184-200	5	1.506	0.365	0.309	1.000	-0.157
LL1110	51	213-221	5	2.000	0.612	0.461	0.230	-0.289
SB38	55	145-159	4	2.077	0.640	0.492	0.374	-0.283
P2BH6	44	105-155	8	1.726	0.231	0.355	0.013	0.397
D8S165	55	126-138	4	2.106	0.619	0.524	0.484	-0.172

A, número de alelos diferentes (riqueza alélica); ne, número efectivo de alelos; Ho/He, heterocigosidad observada/esperada; EHW, prueba exacta de probabilidad de equilibrio Hardy-Weinberg; F, índice de fijación.

Se aplicó la corrección de Bonferroni (Rice 1989) para obtener un nuevo valor  $\alpha = 0.001$ . Se encontró equilibrio Hardy-Weinberg a través de todos los loci y sitios ( $X^2 = 89.456$ ,  $gl = 68$ ,  $P = 0.04$ ).

En cuanto a diversidad por sitio de muestreo (Tabla 8), todos presentan baja riqueza alélica; el valor más alto fue de 3.220 para Normandía y Nacascolo. Nacascolo tiene un alto número de alelos privados (0.610), a diferencia de los otros tres sitios (0.180-0.440). La heterocigosidad observada fue mayor que la esperada para todos los sitios. No se encontró desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg ( $P \leq 0.001$ ). Todos los valores de F son negativos. De los cuatro sitios, resalta El Tercio con la menor diversidad genética por tener los valores más bajos de riqueza alélica, alelos privados y heterocigosidad. Sólo 3 pares de

loci mostraron desequilibrio de ligamiento (Tabla 9): AP74/D8S260 ( $P = 0.000$ ), AP74/Leon2 ( $P = 0.000$ ) y Ceb121/LL1110 ( $P = 0.001$ ).

**Tabla 8.** Diversidad genética por sitio de muestreo de nueve loci heterólogos para monos araña (*Ateles geoffroyi*) en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.

Sitio	N	A	Ar	Apr	ne	Ho	He	EHW (P)	F
Normandía	12	31	3.220	0.440	2.099	0.514	0.482	0.042	-0.043
Chaguantique	23	33	3.120	0.290	2.150	0.554	0.499	0.004	-0.102
El Tercio	10	25	2.710	0.180	1.921	0.502	0.385	0.626	-0.258
Nacascolo	10	30	3.140	0.610	2.153	0.566	0.507	0.575	-0.123

A, número de alelos diferentes (riqueza alélica); Ar, riqueza alélica con rarefacción; Apr, alelos privados con rarefacción; ne, número efectivo de alelos; Ho/He promedios de heterocigosidad observada/esperada; EHW, prueba exacta de probabilidad de equilibrio Hardy-Weinberg; F, índice de fijación.

**Tabla 9.** Prueba de desequilibrio de ligamiento para cada par de loci heterólogos de monos araña (*Ateles geoffroyi*) sobre todos los sitios muestreado en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador.

Par de loci	P-valor	Par de loci	P-valor
AP74/Ceb120	0.727	D8S260/SB38	0.010
AP74/Ceb121	0.035	Leon2/SB38	0.193
Ceb120/Ceb121	0.722	LL1110/SB38	0.053
AP74/D8S260	0.000*	AP74/P2BH6	0.130
Ceb120/D8S260	0.036	Ceb120/P2BH6	0.631
Ceb121/D8S260	0.046	Ceb121/P2BH6	0.047
AP74/Leon2	0.000*	D8S260/P2BH6	0.013
Ceb120/Leon2	0.063	Leon2/P2BH6	0.810
Ceb121/Leon2	0.082	LL1110/P2BH6	0.388
D8S260/Leon2	0.002	SB38/P2BH6	0.085
AP74/LL1110	0.019	AP74/D8S165	0.147
Ceb120/LL1110	0.073	Ceb120/D8S165	0.695
Ceb121/LL1110	0.001*	Ceb121/D8S165	0.075
D8S260/LL1110	0.033	D8S260/D8S165	0.295
Leon2/LL1110	0.498	Leon2/D8S165	0.986
AP74/SB38	0.036	LL1110/D8S165	0.398
Ceb120/SB38	0.021	SB38/D8S165	0.356
Ceb121/SB38	0.088	P2BH6/D8S165	0.229

Corrección de Bonferroni, \* $P \leq 0.001$

## Estadísticos F

El índice de fijación ( $F_{ST}$ ) muestra un valor de 0.200, el cual se considera un valor alto y significa que existe una gran diferenciación genética dentro de la población (Allendorf and Luikart 2009). En la tabla 10, el valor negativo de  $F_{IS}$  de -0.087 indica la ausencia de

endogamia y FIT confirma el exceso de heterocigosidad con un 13% de homocigotos contra 87% de heterocigotos dentro de la población de monos araña (Tabla 10). Los  $P$ -valores para  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  fueron significativos ( $< 0.05$ ) y se niega la hipótesis nula de que los resultados obtenidos no son al azar. Para  $F_{IS}$  el valor no es significativo ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 10.** Estadísticos F para la población de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Estadístico	$\mu$	$P$ -valor
$F_{IS}$	-0.087	0.994
$F_{ST}$	0.200	0.000
$F_{IT}$	0.131	0.005

### Medidas de diferenciación genética

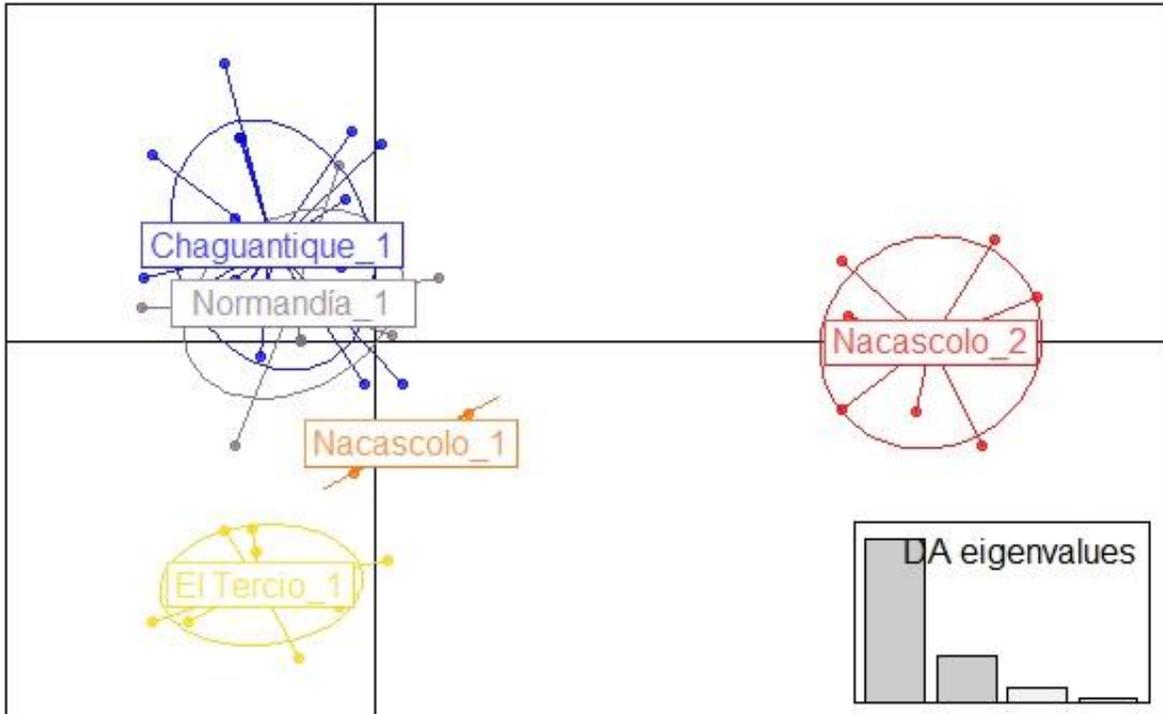
Los análisis pareados entre sitios de muestreo con los estimadores de diferenciación genética  $D$  y  $G_{ST}$  (Tabla 11), presentan valores mayores a 0.150 para todos los sitios comparados con Nacascolo; esto indica una fuerte diferenciación genética entre Nacascolo *vs* Chaguantique, Normandía y El Tercio. Este último sitio muestra un indicio de divergencia con Chaguantique y Normandía, pero con base a los valores ( $< 0.150$ ) no se considera como una fuerte diferenciación genética. Chaguantique y Normandía son genéticamente más homogéneos basado en los dos estimadores utilizados ( $D = 0.026$ ,  $G_{ST} = 0.018$ ). Los  $P$ -valores fueron significativos ( $< 0.05$ ) a excepción del par Chaguantique-Normandía con el estimador  $D$ . Al ser significativos, se acepta que la diferenciación no es producto de valores al azar y que existe una fuerza o barrera que causa esta divergencia.

**Tabla 11.** Análisis pareado de estimadores de diferenciación genética  $G_{st}$  (Nei 1977) y  $D'$ Jost (2008) entre los cuatro sitios de muestreo de mono araña en Bahía de Jiquilisco.

Sitio 1	Sitio 2	$D$ .est	$P$ - valor	$G_{st}$ .est	$P$ -valor
Chaguantique	Normandía	0.026	0.052	0.017	0.018
Chaguantique	El Tercio	0.093	0.001	0.051	0.001
Chaguantique	Nacascolo	0.531	0.001	0.193	0.001
Normandía	El Tercio	0.111	0.001	0.041	0.001
Normandía	Nacascolo	0.503	0.001	0.194	0.001
El Tercio	Nacascolo	0.509	0.001	0.239	0.001

### Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)

El Análisis Discriminante de Componentes Principales muestra dos agrupaciones ( $K=2$ ) para la población de *A. geoffroyi* basada en la variación genética entre grupos y dentro de grupos (Fig. 8).



**Fig. 8.** Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) de los individuos de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco. El número a la par del Sitio indica el grupo al que pertenecen; los individuos son representados por puntos.

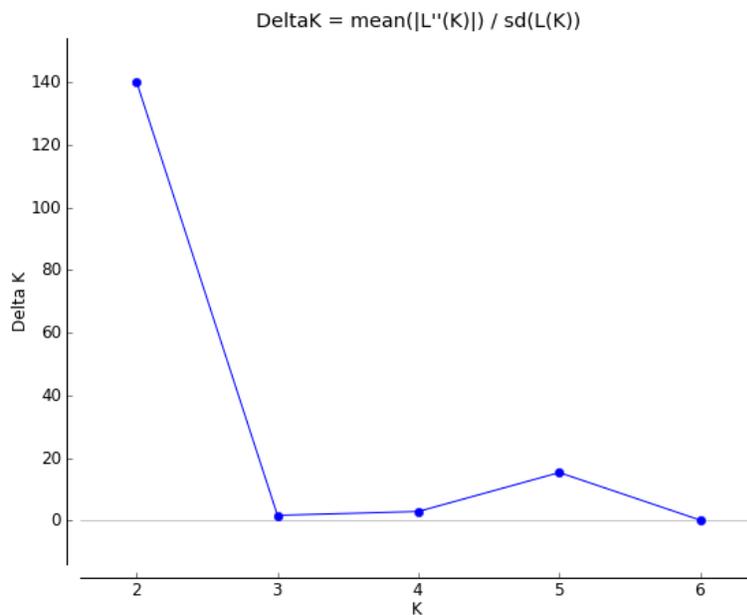
Se observa una clara agrupación de los individuos de Normandía, Chaguantique, El Tercio y dos individuos de Nacascolo (Grupo 1), el resto de individuos de Nacascolo se separan formando el Grupo 2. A pesar que El Tercio se encuentre en el Grupo 1, no se mezcla con los individuos de Chaguantique y Normandía, esto muestra una posible sub-estructuración dentro del grupo. Resaltan dos individuos de Nacascolo genéticamente más similares al Grupo 1 que a su sitio de origen (Grupo 2).

### **Estructura genética**

En el análisis de STRUCTURE, dos grupos genéticos ( $K = 2$ ) fueron la agrupación más probable según los valores de pertenencia (Tabla 12) y el  $\Delta K$  de optima agrupación (Fig. 9). El grupo 1 consiste solamente de los individuos de Normandía, Chaguantique y El Tercio mientras que el grupo 2 contiene a todos los individuos de Nacascolo (Fig. 10). Sobresale un individuo dentro del grupo 2 que tiene más proporción de pertenencia del grupo 1 (0.707 para K1 y 0.293 para K2).

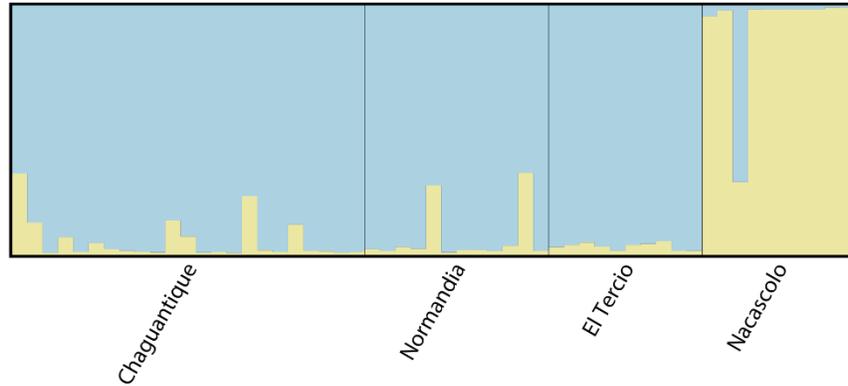
**Tabla 12.** Proporción de pertenencia de cada población pre-establecida en cada grupo inferido ( $K = 2$ ) de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Poblaciones pre establecidas	Grupos inferidos		N
	1	2	
Chaguantique	0.942	0.058	23
Normandía	0.931	0.069	12
El Tercio	0.966	0.034	10
Nacascolo	0.088	0.912	10

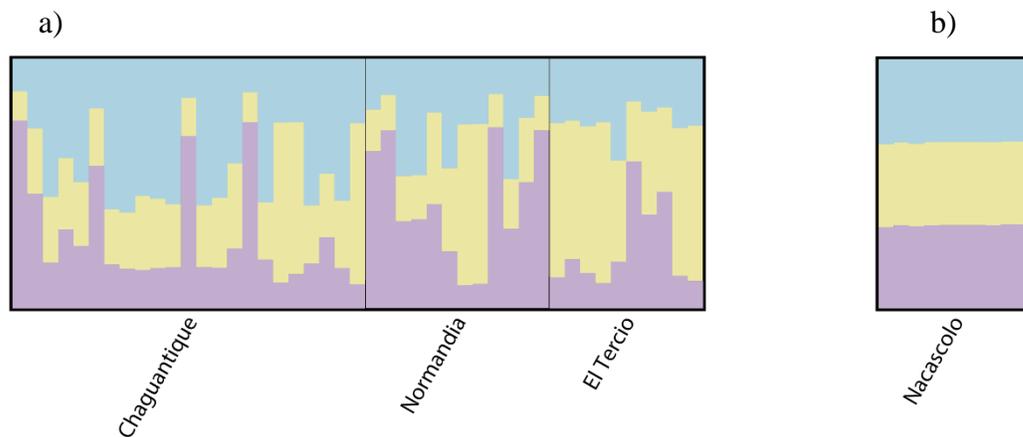


**Fig. 9.**  $\Delta K$  para la óptima estructuración en los 4 sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Al repetir el análisis para cada uno de los dos grupos inferidos, ninguno presentó sub-estructuración. A pesar que para ambos grupos se obtuvo un  $\Delta K$  de 3, las proporciones de pertenencia para  $K = 3$  de cada sub grupo eran homogéneas (Fig. 11) y el máximo valor de probabilidad posterior pertenecía, en ambos casos, a  $K = 1$ .



**Fig. 10.** Gráfico del coeficiente de pertenencia individual para los monos araña (*Ateles geoffroyi*) en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador. Estimado para  $K = 2$ . Cada individuo es representado por una sola línea vertical, dividida por los colores de cada  $K$ .



**Fig. 11.** Gráfico del coeficiente de pertenencia individual para los 2 grupos genéticos de STRUCTURE. a) corrida de grupo 1. b) corrida del grupo 2. Estimados para  $K = 3$ . No existe sub-estructuración.

### Aislamiento por distancia (APD) entre sitios de muestreo

La prueba de Mantel entre la distancia genética de Nei y la distancia geográfica euclidiana fue de 0.470 y resultó no significativa ( $P > 0.05$ ), lo que indica ausencia de correlación entre ambas variables. Cuando los valores de  $r$  son más próximos a 1, los sitios más cercanos geográficamente son más cercanos genéticamente; por el contrario, si los valores se aproximan a 0, no hay relación entre las matriz geográfica y la matriz genética (Diniz-Filho et al. 2013).  $r$  fue más cercano a 0 ( $r = -0.004$ ) y confirma que los pares de sitios de muestreo de *A. geoffroyi* más cercanos no son genéticamente más similares que los más alejados entre sí; los resultados de la prueba con distancias  $F_{ST}$  confirman la ausencia de correlación (Tabla 13). Al no existir correlación entre variables de distancia genética y

geográfica ( $P > 0.05$ ) se rechaza que la diferenciación genética entre poblaciones de *A. geoffroyi* se explique bajo la hipótesis de aislamiento por distancia.

**Tabla 13.** Prueba de Mantel entre los cuatro sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco (999,999 permutaciones).

	Distancia Nei	Distancia $F_{ST}$
$r$	-0.004	-0.053
$P$ -valor	0.470	0.416

### Aislamiento por distancia (APD) entre Chaguantique, Normandía y El Tercio

Como se observó en el ADPC, El Tercio muestra diferenciación genética con los individuos de Normandía y Chaguantique, por ello se realizó un APD entre los tres sitios con el fin de determinar si la diferenciación se comporta bajo un modelo de aislamiento por distancia.

La prueba de Mantel entre los sitios Chaguantique, Normandía y El Tercio se realizó con las distancias genéticas de Nei y distancias geográficas euclidianas. Se obtuvo un valor de  $r = 0.241$  y un  $P$ -valor de 0.33, lo que significa ausencia de aislamiento por distancia entre estos tres sitios.

### Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) General

El AMOVA general explica el mayor porcentaje de variación genética dentro del componente intra-poblacional (91.49 %), esto indica que, para el análisis de AMOVA, no existe estructuración entre los cuatro sitios de muestreo (Tabla 14).

**Tabla 14.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los cuatro sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componente de variación	Porcentaje de variación	$P$ -valor
Entre poblaciones	1	44.219	0.497	19.65	0.000
Entre individuos dentro de la población	2	89.453	-0.282	-11.13	0.999
Dentro de individuos	51	127.5	2.318	91.49	0.209
Total	55	261.173	2.533		

gl, grados de libertad: número total de individuos

### Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) Anidado

Según el análisis de STRUCTURE, existe estructuración dentro de la población de *A. geoffroyi* del paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco, por ello se realizó un AMOVA anidado de los dos grupos genéticos detectados ( $K=2$ ), K1: Chaguantique, Normandía y El

Tercio, K2: Nacascolo. Los resultados indican que la mayor variación se encuentra dentro de los individuos (71.247 %), y el porcentaje de variación entre grupos fue de 28.42%. El AMOVA no confirma la estructuración presente entre los grupos genéticos de mono araña (Tabla 15).

**Tabla 15.** Análisis de Varianza Molecular anidado entre: Grupo 1: Normandía, Chaguantique y El tercio *vs* Grupo 2: Nacascolo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componente de variación	Porcentaje de variación	P-valor
Entre grupos	1	33.089	1.017	28.420	0.253
Entre individuos dentro de poblaciones	2	89.453	0.0	0.0	0.005
Entre poblaciones dentro de grupos	51	11.131	0.143	4.51	0.998
Dentro de individuos	55	127.500	2.402	76.36	0.211
Total	109	261.173	3.036		

gl, grados de libertad: (número total de individuos\*2) – 1

### Número efectivo de población ( $N_e$ )

Para los cuatro sitios de muestreo se encontró un bajo número de individuos reproductivos. El estimador de Exceso de Heterocigotos muestra que para Chaguantique hay 7.7 individuos reproductores y para El Tercio 3.3; para los otros dos sitios no se obtuvieron valores confiables. Con el estimador de Ancestro Común, El Tercio es el sitio con mayor número de individuos reproductores, seguido por Chaguantique y Normandía, y, por último, Nacascolo (Tabla 16).

**Tabla 16.** Número efectivo de población para los cuatro sitios de muestreo de monos araña en la Bahía de Jiquilisco.

Sitio	Exceso de Heterocigotos		Ancestro Común	
		IC 95%	Molecular	IC 95%
Chaguantique	7.7	3.1- ∞	3.8	1.7 - 6.7
Normandía	∞	3.5 - ∞	3.6	2.5 - 4.8
El Tercio	3.3	2.1 - 9.0	8.6	3.3-16.3
Nacascolo	∞	3.3 - ∞	1.9	1.2 - 2.8

IC, intervalos de confianza

### Flujo genético

El número de migrantes calculado a partir del índice de fijación ( $F_{ST}$ ), muestra 6.1 migrantes por generación de Normandía a Chaguantique. Con base al resultado, ambos sitios se consideran como una sola población panmíctica. El Tercio comparte 1.3 migrantes por generación hacia Chaguantique y Normandía; a pesar de ser un valor bajo, se considera suficiente flujo genético ( $N_m > 1$ ) para mantener el equilibrio deriva-mutación. El número

de migrantes de Nacascolo hacía Chaguantique, Normandía y El Tercio ( $N_m < 1$ ) sugiere un flujo genético restringido o ausente (Tabla 17).

**Tabla 17.** Número de migrantes ( $N_m$ ) basado en índice de fijación ( $F_{ST}$ ) entre pares de sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Sitio 1	Sitio 2	$N_m$
Normandía	Chaguantique	6.1
El Tercio	Chaguantique	1.3
El Tercio	Normandía	1.3
Nacascolo	Chaguantique	0.3
Nacascolo	Normandía	0.3
Nacascolo	El Tercio	0.2

Con conocimiento previo de la estructuración en la población de *A. geoffroyi* en la Bahía de Jiquilisco, se estimó el número de migrantes entre K1 (Normandía, Chaguantique y El Tercio) y K2 (Nacascolo). El número total de migrante por generación entre ambos grupos fue de 0.29, lo que evidencia ausencia de migrantes entre los dos grupos genéticos definidos por el análisis de STRUCTURE.

Para el análisis en MIGRATE, la tabla 18 presenta los valores de theta ( $\Theta$ ) que corresponden al tamaño de la población en escala mutacional. Nacascolo es el sitio de muestreo con el valor de theta más bajo y El Tercio presenta el valor más alto de todos los sitios de muestreo. Existe por lo menos un migrante por generación entre los sitios de muestreo, a excepción de Nacascolo (Tabla 19). Los resultados sugieren que Nacascolo no recibe migrantes de ninguno de los otros tres sitios.

El valor de  $\Theta$  para K1 es 2.98 y para K2 de 0.38. En la tabla 20 se presentan los valores de  $M$  y  $N_m$ . El resultado señala que de K1 a K2 hay 8 migrantes por generación y de K2 a K1 0 migrantes por generación.

**Tabla 18.** Valores  $\Theta$  para los cuatro sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Sitios	$\Theta$
Chaguantique	0.86
Normandía	0.52
El Tercio	4.17
Nacascolo	0.03

**Tabla 19.** Tasa de inmigración en escala mutacional ( $M$ ) y número de migrantes ( $Nm$ ) entre pares de sitios de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Sitio 1	Sitio 2	$M$	$Nm$
Normandía	Chaguantique	16.1	5.39
El Tercio	Chaguantique	16.59	5.56
Nacascolo	Chaguantique	40.41	13.54
Chaguantique	Normandía	25.35	11.53
El Tercio	Normandía	24.04	10.94
Nacascolo	Normandía	9.7	4.41
Chaguantique	El Tercio	5.71	2.44
Normandía	El Tercio	41.24	17.63
Nacascolo	El Tercio	17.01	7.27
Chaguantique	Nacascolo	40.98	0.51
Normandía	Nacascolo	51.59	0.64
El Tercio	Nacascolo	12.6	0.16

**Tabla 20.** Valores  $M$  y número de migrante entre grupos genéticos de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Grupo1	Grupo2	$M$	$Nm$
K1	K2	10.71	8.02
K2	K1	5.95	0.56

### Endogamia

Todos los sitios mostraron coeficientes de endogamia relativamente altos. Nacascolo fue el sitio donde se registró el mayor nivel de endogamia; mientras que El Tercio presentó el coeficiente más bajo de todos los sitios (Tabla 21).

**Tabla 21.** Promedios de coeficientes de endogamia (TrioML) y desviación estándar (en paréntesis) para los monos araña de cada sitio de muestreo en la Bahía de Jiquilisco.

Sitio	$f$
Chaguantique	0.098 (0.016)
Normandía	0.170 (0.013)
El Tercio	0.096 (0.020)
Nacascolo	0.273 (0.041)

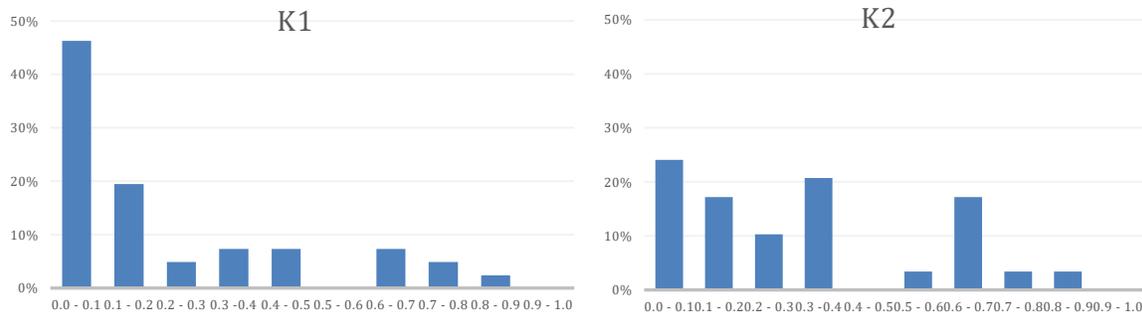
## Cuello de botella

Bajo el Modelo Gradual de Mutación (SMM) y el Modelo de Dos Fases (TPM), todos los  $P$ -valores fueron mayores a 0.05 para ambas pruebas estadísticas (Tabla 22). En cuanto a la distribución de frecuencias alélicas, los gráficos se aproximaron a la forma de “L” (Fig. 12). No se encontró efecto de cuello de botella en ninguno de los dos grupos genéticos identificados anteriormente.

**Tabla 22.** Análisis de cuello de botella según cada modelo de mutación para cada grupo genético de *Ateles geoffroyi*.

Grupos	SMM		TPM	
	Significancia	Wilcoxon	Significancia	Wilcoxon
K1	0.100	0.203	0.120	0.250
K2	0.573	1.000	0.545	1.000

SMM, modelo gradual de mutación; TPM, modelo de dos fases.



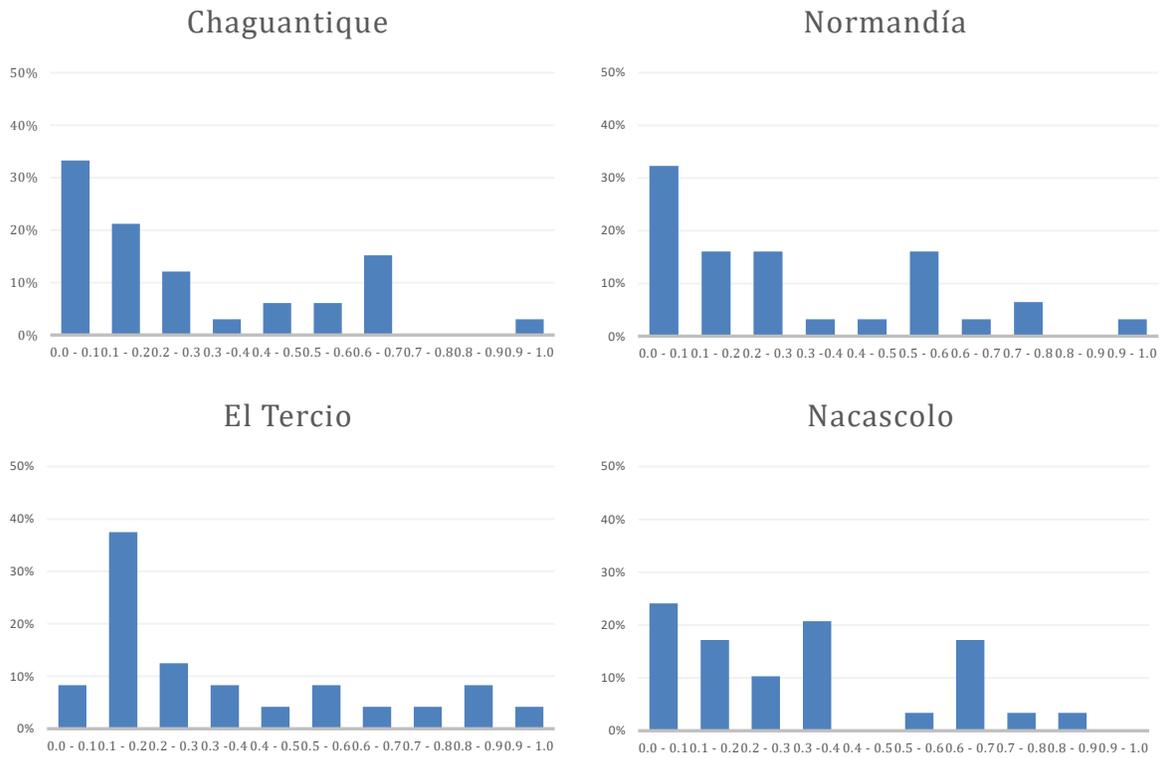
**Fig. 12.** Distribución de frecuencias alélicas de los grupos genéticos de *Ateles geoffroyi*. K1 (Normandía, Chaguantique y El Tercio) y K2 (Nacascolo). El eje X son rangos de frecuencias alélicas (0.1) y el eje Y representa el porcentaje de alelos en cada rango de frecuencias.

El mismo análisis se hizo por sitio de muestreo. En ninguno de ellos, SMM y TPM fueron significativos ( $P > 0.05$ ) para la prueba de significancia y la de Wilcoxon (Tabla 23). A pesar de esto, El Tercio es el único sitio que presentó una distribución alélica con modelo desplazado (Fig. 13), propio de un cuello de botella reciente.

**Tabla 23.** Análisis de cuello de botella según cada modelo de mutación para cada sitio de muestreo.

Sitio	SMM		TPM	
	Significancia	Wilcoxon	Significancia	Wilcoxon
Chaguantique	0.299	0.496	0.287	0.734
Normandía	0.573	0.652	0.585	0.734
El Tercio	0.449	0.546	0.460	0.547
Nacascolo	0.580	1.000	0.437	0.910

SMM, modelo gradual de mutación; TPM, modelo de dos fases.



**Fig. 13.** Distribución de frecuencias alélicas para cada sitio de muestreo de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco. El eje X son rangos de frecuencias alélicas (0.1) y el eje Y representa el porcentaje de alelos en cada rango de frecuencias.

## DISCUSIÓN

### Amplificación de loci heterólogos

La presente investigación forma parte de los pocos estudios genéticos que utilizan marcadores microsatélites en poblaciones silvestres de *A. geoffroyi*. El marcador microsatelital AP68 solo amplificó en el alelo 172; este resultado concuerda con Cortés-Ortiz et al. (2009) y Hagell et al. (2013); a diferencia de lo informado por Ruíz-García et al. (2006), donde obtuvieron tres alelos: 176, 174 y 178. El hecho de que en tres de cuatro estudios (incluido este) AP68 fue monomórfico, podría deberse a que 172 es un alelo fijado en las poblaciones de estos tres estudios.

Los alelos obtenidos para el marcador LL311 fueron 191 y 209, estos dos alelos se encuentran dentro del rango registrado por Crespín-Guzmán (2009) donde informó 4 alelos para este marcador. Similar a la presente investigación, DiFiore (2009) también obtuvo dos alelos para LL311 en *Ateles belzebuth*.

Para el marcador LL1118 se obtuvieron la menor cantidad de alelos (4 alelos: 120, 122, 126 y 142), sin embargo, el rango alélico se traslapa con el de investigaciones anteriores: Hagell et al. (2013) encontraron 9 alelos para LL1118 (134 -148) y Crespín-Guzmán (2009) informó 8 (125 – 159). En el presente estudio, los alelos de LL1118 fueron difíciles de asignar por sus productos de PCR inconsistentes (53% de productos de PCR positivo), por consiguiente, la temperatura de anillamiento utilizada podría no ser la más óptima.

Para AP74, se obtuvieron amplificaciones desde 143 hasta 155, de igual manera Cortés-Ortiz et al. (2009), Ellsworth y Hoelzer (1998) y Ruíz-García et al. (2006) informaron un rango alélico similar al de este trabajo. Hagell et al. (2013) no reportan amplificaciones para este locus. En el presente estudio, se obtuvieron resultados similares a AP74 para Ceb121, D8S260 y Leon2, a excepción del número de alelos, probablemente por la diferencia en el tamaño de la muestra.

El rango alélico que se obtuvo para LL1110 y SB38 se traslapa solo por pocos pares de bases (213 – 221 *vs* 203 – 219; 145 – 159 *vs* 137 – 153 respectivamente) con el rango informado por Hagell et al. (2013) donde ellos obtuvieron más alelos que en esta investigación.

Las amplificaciones de P2BH6 para este trabajo fueron de 105 a 155, con una riqueza alélica de 8. Contrario a este resultado, Crespín-Guzmán (2009), quien es el único que ha registrado amplificaciones para P2BH6 (locus5) en *A. geoffroyi*, informó un rango alélico que va de 104 a 124 y una riqueza de 9 alelos.

El rango obtenido en este trabajo para D8S165 fue de 126 a 138, dicho rango concuerda más con el de Cortés-Ortiz et al. (2009). En cambio, D8S165 fue un locus del cual Hagell et al. (2013) obtuvieron productos de PCR no específicos y Ruiz-García et al. (2012) informan un rango alélico de 143 a 151, rango que no se traslapa con el de esta investigación (126 – 138). El hecho de que en todos los estudios se obtuvieron alelos y rangos diferentes, indica que el locus es muy informativo para la especie, tal como mencionan Hardy et al. (2003) donde, entre mayor es la diferencia en la separación de dos alelos de un mismo locus, mayor es el número de eventos de mutación que han ocurrido desde un ancestro común.

En este estudio se informa por primera vez amplificaciones polimórficas del locus Ceb120 para *A. geoffroyi*. En la investigación de Muniz y Vigilant (2008) con otras especies del género *Ateles*, el rango alélico de *A. belzebuth* fue de 195 a 211 y en *A. fusciceps* solo amplificó en 185. Esta diferencia puede explicarse con lo expuesto por Dettman y Taylor (2004), ellos explican que la variabilidad de los microsatélites difiere entre especies, lo que sugiere diferencias en el tamaño efectivo de la población o rangos de mutación a nivel del genoma.

### **Diversidad y estructura genética de los monos araña**

Se obtuvo la diversidad genética más baja por sitio ( $H_e = 0.39 - 0.51$ ) con respecto a todos los estudios que se han realizado con poblaciones silvestres de *Ateles*. Las condiciones del paisaje de la bahía de Jiquilisco son similares a las del Istmo de Rivas, Nicaragua, donde gran parte del territorio ha sufrido perturbación antropogénica, sitio en el que Hagell et al. (2013) registraron una  $H_e$  para *A. geoffroyi* de 0.63 a 0.74, lo que se considera una diversidad genética moderada. Contrario a DiFiore (2009), cuyo sitio de estudio es un lugar relativamente intacto (Parque Nacional Yasuni, Ecuador) e informa una diversidad genética alta para *A. belzebuth* ( $H_e = 0.79 - 0.86$ ). Las diferencias en la diversidad genética registradas podrían estar relacionadas con el grado de perturbación del paisaje.

Con respecto a la diversidad por loci, en la presente investigación la  $H_e$  promedio es de 0.468, valor que se considera como baja diversidad. Sin embargo, Crespín-Guzmán (2009) encontró una variación genética alta para tres centros de rescate de El Salvador, compuestos por monos en cautiverio (Promedio de  $H_e = 0.717$  para 3 loci). Usualmente, las especies amenazadas tienen menor variación genética en comparación a las especies cercanas que no están amenazadas, aproximadamente menos de la mitad (Frankham 1995, Frankham et al. 2002). Por lo tanto, se esperaría que *A. geoffroyi vellerosus*, dentro de la categoría de conservación de peligro crítico, presente una baja diversidad genética. Comparando los resultados este estudio y los de Crespín-Guzmán (2009), la alta diversidad de los monos en

cautiverio podría deberse a que los individuos provienen de diferentes poblaciones (Crespín 2011).

Los resultados de riqueza de alelos privados ( $A_{pr}$ ) en la presente investigación variaron en todos los sitios de muestreo. En efecto, Szpiech et al. (2008) explican que  $A_{pr}$  es un valor que refleja que tan diferente es una población de otra, tal es el caso de Nacascolo, donde se obtuvo el valor de  $A_{pr}$  más alto con 0.610, mientras que los otros sitios rondan entre 0.180 a 0.440. Si varias poblaciones dentro de la misma muestra están muy relacionadas entre sí, pocos alelos son privados por población individual (Szpiech et al. 2008). Con respecto a los estimadores de diferenciación genética, también se encontró una mayor distinción entre Nacascolo *vs* el resto de los sitios de muestreo (Tabla 11). Podría ser que Nacascolo presenta valores sobresalientes porque este grupo tiene un origen distinto al de los otros tres sitios. En la época de los 60s - 70s, La Hacienda La Carrera, conocida por los lugareños como El Nacascolo, destinó un sector de tierra no cultivada como zoológico. Luego de la Reforma Agraria, a finales de 1979, muchos de estos animales fueron cazados; sin embargo, un grupo de monos araña logró sobrevivir a lo largo de los años. Hoy en día, gran parte de la propiedad de la Hacienda es de uso agrícola, pero aún se mantienen parches de área verde donde habitan aproximadamente 30 monos (Puerto Barillas 2010, Jiménez 2015). En la actualidad, no se tiene certeza del origen de estos individuos; aun así, las dos explicaciones más probables que podría esclarecer los resultados para Nacascolo son (i) los individuos fueron adquiridos por los dueños de la Hacienda, o (ii) entidades gubernamentales u ONGs que trabajan con vida silvestre introdujeron individuos procedentes de decomisos.

Los análisis de estructuración variaron entre sitios; en cuanto a los valores de  $G_{ST}$  y  $D$ , Normandía y Chaguantique parecen una población homogénea, lo cual concuerda con el análisis de STRUCTURE; estos dos sitios, más El Tercio, se juntan en el mismo grupo genético, pero para El Tercio, los  $G_{ST}$  y  $D$  son valores que indican baja diferenciación. Bajo la aseveración que expone Morales-Hernández (2003) de que los monos de El Tercio, Normandía y Chaguantique son nativos, podría ser que la conectividad de El Tercio hacia los demás sitios fue la primera en disminuir en relación a la conectividad entre Chaguantique y Normandía. Para todos los sitios,  $D$  fue mayor que  $G_{ST}$ , relación que para Leng y Zhang (2011) indica que la población tuvo una diversidad genética, previa a la diferenciación, relativamente alta.

El resultado de AMOVA difiere con lo observado en el ADCP, estimadores de diferenciación y STRUCTURE, ya que no muestra diferenciación entre los cuatro sitios de muestreo ni entre los dos grupos genéticos detectados por STRUCTURE. Esta situación es similar a la expuesta por Losilla (2014) en su estudio con “monos capuchino” en Costa Rica; él explica que al no existir un patrón de aislamiento por distancia y ausencia de

estructuración basada en AMOVA, se infiere que la divergencia genética observada en los sitios ha sido independiente una de otra.

Los resultados obtenidos en la prueba de Mantel mostraron que la distancia genética no está correlacionada con la distancia geográfica entre sitios de muestreo, por lo tanto, se rechaza la hipótesis de aislamiento por distancia ( $P$ -valor = 0.470). Caso contrario expuesto por Slatkin (1993) quien establece que si existe una correlación positiva entre la distancia geográfica y genética, hay un equilibrio entre la deriva genética y la tasa de migración; Vekemans y Hardy (2004) agregan que la correlación también será positiva si la distancia de dispersión geográfica es pequeña. Por consiguiente, en el presente estudio la deriva genética y la tasa de migración no están en equilibrio y existe otra razón que explique la diferenciación genética entre sitios, esta puede ser la presencia de barreras geográficas, factores medioambientales o del paisaje (Storfer 1999).

Hagell et al. (2013) informaron que para los monos araña del istmo de Rivas en Nicaragua, el aislamiento por distancia explica una alta proporción de la diferenciación entre sus sitios de muestreo. En dicho estudio, las condiciones del paisaje eran similares a las del presente proyecto, ya que presentan perturbación antropogénica. A pesar de esa similitud, la diferenciación genética en los monos araña de la Bahía de Jiquilisco no se explica bajo la hipótesis de aislamiento por distancia. Una posible razón es la fragmentación en el paisaje y el tiempo en el que este sucedió, ya que, cuando existe fragmentación, hay una alta posibilidad que el APD no sea significativo, sobre todo cuando ha sido un evento reciente (Broquet et al. 2006, Leblois et al. 2004). La fragmentación del paisaje de Bahía de Jiquilisco se remonta al siglo XIX; para el año 1976, la Asamblea Legislativa de El Salvador aprobó un decreto con modificaciones importantes en la tenencia de tierras en la zona oriental del país, incluyendo a Usulután (González and Romano-Martínez 1999); a raíz de esa reforma, la utilización de la tierra cambió sustancialmente en la década de 1980, y para 1990, el área de bosque en este sector disminuyó de 19.79% a 16% (OSPA 1982). Estos porcentajes indican que la degradación del bosque era significativa desde antes de la reforma agraria. A inicios de 1950, aparecieron y se desarrollaron grandes empresas agropecuarias vinculadas a la exportación de banano, algodón, café y el auge de la ganadería (CEPAL 2001). Para 1883, los monos araña eran muy abundantes en los bosques (Guzmán 1883) y se puede deducir que el cambio en las poblaciones inició entre finales del siglo XIX y mediados del siglo XX, agravándose durante el auge de la industria agropecuaria.

### **Patrones genéticos**

El número de monos migrantes en la Bahía de Jiquilisco según  $F_{ST}$  es de 0.2 a 6.1 monos, y según MIGRATE es de 0.16 a 17.63 monos. Debido a que estos valores son discrepantes,

Bossart y Prowell (1998) sugieren que se debe tomar en cuenta las interacciones sociales entre los grupos que forman los monos araña al momento de interpretar datos de migrantes, puesto que sus estructuras sociales se definen en grupos y sub-grupos que funciona en una dinámica de fisión-fusión (Aureli et al. 2008) definidas por el sexo y las edades de los individuos (Ramos-Fernández et al. 2009); por lo tanto, es poco probable que un solo individuo migre de un sitio a otro, debido a sus patrones de asociación; a pesar que los sub-grupos son flexibles, estos no se pierden.

El bajo número de migrantes por generación en este estudio podría estar relacionado con la fragmentación del bosque, porque la conectividad entre parches es limitada o inexistente. A pesar de la confiabilidad que brinda el análisis de migrantes usando MCMC e inferencia bayesiana, se debe tener en cuenta el número de microsatélites y su tasa de mutación, así, Beerli (1998) afirma que un mayor número de loci y conocer su tasa de mutación, brindan una genealogía más confiable a partir de la cual se estima el número de migrantes por generación. El resultado obtenido, más bien, puede estar reflejando el flujo genético que hubo entre los sitios y no el actual. Bossart y Prowell (1998) mencionan que las principales limitantes para interpretar el flujo genético contemporáneo son: (i) los marcadores moleculares poseen un poder limitado para distinguir patrones de flujo genético contemporáneo con los métodos analíticos actuales (ii) limitaciones impuestas por los modelos de genética convencional que conllevan a una baja precisión de los estimados de flujo genético debido a la falta de realismo biológico. Los resultados de migración obtenidos en esta investigación pueden no reflejar un patrón contemporáneo de migración, sino uno histórico previo a la fragmentación del paisaje. En las tablas 17 y 19 se observa que existe más de un migrante por generación entre todos los sitios a excepción del sitio Nacasclo, lo cual es suficiente para mantener el equilibrio deriva-mutación (Wright 1931). Este patrón de movimiento de individuos fue estimado a través de los datos genéticos obtenidos buscando la genealogía más probable y, a partir de ella, estimar el número de migrantes por generación; pero esta metodología no toma en cuenta los cambios en el paisaje u otros eventos naturales que pudieron haber ocurrido en el sitio limitando la conectividad (Beerli 1998). Por lo tanto, basado en los datos de flujo genético obtenidos en este trabajo, se puede aceptar que, históricamente, existió conectividad y el patrón de migración mostrado en el presente estudio era posible; pero no se puede aceptar o negar que actualmente los monos se estén movilizand de un sitio a otro. A pesar de esto, los resultados de diferenciación genética entre sitios sugieren que el flujo genético entre Normandía y Chaguantique con El Tercio es limitado o inexistente, y esto se confirma con el ADCP; por lo que la ausencia de migrantes por generación hacia El Tercio podría ser la principal razón de su divergencia. Los resultados presentes en esta investigación sólo son un acercamiento al flujo genético de la especie y se requieren más estudios específicos con énfasis en el sesgo sexual.

En el presente estudio no fue posible determinar el tamaño de la población de *A. geoffroyi* en la Bahía de Jiquilisco; este dato es importante para tener un mejor estimado del número de migrantes necesarios para mantener el equilibrio genético, ya que Mills y Allendorf (1996) afirman que las poblaciones pequeñas divergen más rápido por la deriva, rompiendo el equilibrio deriva-migración; a lo que Lacy (1987) agrega que las poblaciones pequeñas se ven beneficiadas por un flujo genético débil ya que les ayuda a mantener la variabilidad genética.

No fue posible determinar el número de generaciones durante la observación en campo, ni tampoco a partir de análisis de parentesco, principalmente por las asociaciones en los sub-grupos propias del comportamiento de *A. geoffroyi*. Esto, sumado al bajo número de muestras, estima un tamaño efectivo de población poco confiable. En este estudio se obtuvieron rangos demasiado amplios y poco precisos de  $N_e$ , situación que ilustran Luikart y Cornuet (1999) y Nomura (2008) como una debilidad del estimador de Exceso de Heterocigosidad; este es ideal para muestras pequeñas pero estima rangos demasiado amplios y poco precisos. Para el estimador de Ancestro Común, este subestima el valor real cuando se aplica en poblaciones con endogamia, tal es el caso de la presente investigación.

En todos los sitios de muestreo, el promedio de endogamia fue mayor a 0. Muchos factores favorecen la presencia de endogamia, entre ellos se encuentra la formación de sub-grupos relativamente flexibles propios de la especie, pero más importante aún, la fragmentación del paisaje. El hecho que en todos los sitios de muestro exista algún grado de endogamia se puede explicar con lo descrito por Dudash y Fenster (2000) donde la fragmentación reduce el número de individuos reproductivos dentro de la población, reduciendo en flujo genético entre poblaciones; en consecuencia, es más probable el entrecruzamiento entre individuos emparentados en poblaciones fragmentadas, dando como resultado descendencia por incesto los cuales sufren de depresión endogámica.

En este trabajo, las medidas de  $H_e$  y  $A_r$  presentaron valores bajos; Kalinowski (2004) menciona que, a diferencia de la  $H_e$ , la medida de  $A_r$  es más sensible a la presencia de alelos raros; es por eso que, ante un evento de cuello de botella, la riqueza alélica disminuye más rápido que la heterocigosidad. Por esta razón, más el exceso de heterocigosidad, Kalinowski (2004) y Nei et al. (1975) afirman que se puede inferir un suceso de cuello de botella, evento que ha sido ligado a otras especies de primates (Craul et al. 2009, Goossens et al. 2006). A pesar que los análisis discutidos anteriormente mostraron indicios de cuello de botella reciente, el análisis de cuello de botella dio negativo para ambos modelos de mutación en los sitios de muestreo; sin embargo, El Tercio mostró una distribución alélica con modelo desplazado, lo que podría ser un indicio de que el sitio no está bajo un equilibrio de deriva mutacional (i.e. el tamaño efectivo de la población se ha mantenido constante en el pasado) (Luikart et al. 1998).

## CONCLUSIONES

Las características del paisaje junto con acciones antropogénicas, tales como caza furtiva y cambio de uso de suelo podrían explicar la baja diversidad genética de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco. Asimismo, la diversidad genética registrada en el presente estudio fue la más baja en comparación a todos los estudios realizados con Atelidos en la región.

Los individuos de la Hacienda Nacascolo podrían tener un origen distinto a los otros tres sitios, compuesto en su mayoría por monos no nativos; dicha situación se refleja en la presencia de dos grupos genéticos: uno conformado por las ANPs Normandía y Chaguantique y la Hacienda El Tercio, y el otro grupo formado únicamente por la Hacienda Nacascolo, por lo que ambos grupos deben considerarse dos unidades de conservación diferentes, y es necesario establecer acciones de conservación adecuadas para cada una de ellas.

La fragmentación del paisaje es un factor que limita el flujo genético, sin embargo, los análisis estadísticos utilizados para estimar el número de migrantes no toman en cuenta los cambios en el paisaje ni otros eventos naturales que limitan la conectividad, y es por ello que los resultados en la presente investigación muestran la existencia de migrantes entre los cuatro sitios de muestreo a excepción de Nacascolo. Pero estos resultados pueden no representar la situación actual, ya que existe diferenciación genética entre sitios y fragmentación en el paisaje.

En grupos de individuos tan pequeños y con poca conectividad entre sí, las posibilidades de endogamia aumentan, debido a estas características se encontraron niveles moderados de endogamia en los cuatro grupos de mono araña presentes en la Bahía de Jiquilisco.

A pesar de los valores de exceso de heterocigosidad y baja riqueza alélica encontrados en los monos araña de la Bahía de Jiquilisco, una reducción drástica en el tamaño de las poblaciones todavía no se refleja en la generación actual, es por esto que no se encontró cuello de botella en la presente investigación.

La disminución en la conectividad entre la Hacienda El Tercio con las ANPs Normandía y Chaguantique podría justificar que El Tercio tiene la menor diversidad genética con respecto al resto de los sitios muestreados.

La presente investigación aporta información imprescindible para el cumplimiento de convenios internacionales que El Salvador ha firmado en materia de biodiversidad, como El Convenio Sobre Diversidad Biológica donde el Objetivo 3 especifica promover la

conservación de la diversidad genética, así como también la Meta 12 del Objetivo Estratégico C de las Metas de Biodiversidad de Aichi en los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Actualmente, los progresos para el cumplimiento de estos objetivos y metas han sido insatisfactorios, en especial para fauna silvestre.

## RECOMENDACIONES

Los marcadores microsatelitales P2BH6, D8S260, Ceb121, Leon2 y LL1110 son ideales para futuros estudios de diversidad genética con *Ateles geoffroyi* debido a su alto polimorfismo y productos de PCR confiables.

Con el propósito de confirmar la sub-especie nativa de *Ateles geoffroyi vellerosus*, es necesario un análisis filogenético con marcadores mitocondriales; esto con el fin de crear planes de manejo y proyectos de conservación. Este es un primer paso para una correcta asignación de haplotipos, tanto de las poblaciones silvestres como las de cautiverio, y mientras no se realice, no se deberían de realizar liberaciones debido a que hay un riesgo muy alto de hibridación que no se da de manera natural. Si cumplir con las directrices propuestas por autoridades especialistas (i.e. IUCN) no es una opción real, no se deberían hacer reforzamientos de *A. geoffroyi* a los grupos nativos.

Todas las instituciones involucradas en vida silvestre deben aplicar el mismo protocolo de manejo de vida silvestre, que incluya evaluaciones de carácter veterinario y genético, para evitar la mezcla de genes no favorables a las condiciones medioambientales propias del sitio. Estas evaluaciones deben ser hechas mientras los animales están en cuarentena; mientras que el protocolo debe incluir un monitoreo de las poblaciones donde se hagan los reforzamientos para realizar un proyecto de reforzamiento verdaderamente eficaz.

Realizar una recolecta permanente de muestras no invasivas para facilitar un monitoreo necesario de *A. geoffroyi* de la Bahía de Jiquilisco. Esto no solo aportaría más información genética que la presentada en esta investigación, sino también permitiría estudios epidemiológicos, de dieta y evaluación de patrones de dispersión a través de un análisis con marcadores moleculares sexuales.

Es necesaria una evaluación de la Hacienda El Tercio para que se declare como un ANP y se le asigne una categoría de manejo de Reserva Natural. Además, se recomienda un mejor equipamiento para los guardarecursos de la zona, para enfrentar adecuadamente amenazas como incendios y cacería ilegal. Específicamente, el ANP Normandía se beneficiaría con el empleo de más guarda recursos, ya que es el parche de bosque más grande y mejor conservado donde habitan los monos araña.

Hoy en día la diversidad genética de las especies es un criterio importante para determinar los peligros y vulnerabilidades que enfrentan, sobre todo, aquellas especies de interés económico y en alguna categoría de peligro. Para el caso específico de los monos arañas de la Bahía de Jiquilisco, se encontró baja diversidad lo que, sumado con otras amenazas, ponen en riesgo la supervivencia de la especie; esta situación puede ser similar en otras

especies de fauna y flora local; es por ello que se deben realizar estudios de variabilidad genética en El Salvador, con el fin de idear medidas de conservación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberto F. 2009. MsatAllele\_1.0: An R Package to Visualize the Binning of Microsatellite Alleles. *J Hered* 100:394–397.
- Allendorf FW, Luikart G. 2009. Conservation and the Genetics of Populations. John Wiley & Sons. 663 p.
- Argueta-Rivas NA, Rivera-Hernández GM. 2004. Uso de hábitats del mono araña *Ateles geoffroyi* en el Área Natural Protegida Normandía, Usulután, El Salvador. [San Salvador]: Universidad de El Salvador.
- Avise JC. 1994. Molecular Tools. In: Molecular Markers, Natural History and Evolution. Springer US. p. 44–91.
- Azofeifa-Delgado Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17:221–242.
- Beardmore JA, Shami, SA. 1976. Parental age, genetic variation and selection. In: Karlin S. 2012. Population Genetics and Ecology. Elsevier. 3-22.
- Beerli P. 1998. Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. In: Carvalho GR. Advances in Molecular Ecology. IOS Press. 314 p.
- Beerli P. 2009. How to use Migrate or why are Markov Chain Monte Carlo programs difficult to use?. In: Bertorelle G, Bruford MW, Hauffe HC, Rizzoli H, Vernesi C. 2009. Population Genetics for Animal Conservation. Cambridge University Press. 410 p.
- Bossart JL, Prowell DP. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: Limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution* 13:202–206.
- Broquet T, Ray N, Petit E, Fryxell JM, Burel F. 2006. Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape Ecol* 21:877–889.
- Burt WH, Stirton RA. 1961. The mammals of El Salvador. [accessed 2015 May 10]. <http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/56361>
- Campbell CJ, Shideler SE, Todd HE, Lasley B. 2001. Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Am. J. Primatol.* 54:79–89.
- Cant JGH. 1990. Feeding ecology of spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) at Tikal, Guatemala. *Hum. Evol.* 5:269–281.

- Chapman CA. 1990. Association patterns of spider monkeys: the influence of ecology and sex on social organization. *Behav Ecol Sociobiol* 26:409–414.
- Chapman CA, Chapman LJ, Wrangham RW. 1995. Ecological constraints on group size: an analysis of spider monkey and chimpanzee subgroups. *Behav Ecol Sociobiol* 36:59–70.
- Chapman CA, Lefebvre L. 1990. Manipulating foraging group size: spider monkey food calls at fruiting trees. *Animal Behaviour* 39:891–896.
- Chaves ÓM, Stoner KE, Arroyo-Rodríguez V. 2011. Seasonal Differences in Activity Patterns of Geoffroy's Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*) Living in Continuous and Fragmented Forests in Southern Mexico. *Int J Primatol* 32:960–973.
- Chaves S, Dias I, Pomilla C. 2014. Extraction of genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAamp DNA Stool Mini Kit. American Museum of Natural History, New York. [Accessed 2015 May 15]. <https://research.amnh.org/genomics/Resources/Extraction-genomic-DNA>
- CITES. 2013. Apéndices I, II y III de la CITES. [Accessed 2015 May 15]. <http://www.cites.org/esp/app/index.php>
- Collins AC, Dubach JM. 2000a. Phylogenetic Relationships of Spider Monkeys (*Ateles*) Based on Mitochondrial DNA Variation. *International Journal of Primatology* 21:381–420.
- Collins AC, Dubach JM. 2000b. Biogeographic and Ecological Forces Responsible for Speciation in *Ateles*. *International Journal of Primatology* 21:421–444.
- Collins AC, Dubach JM. 2001. Nuclear DNA Variation in Spider Monkeys (*Ateles*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:67–75.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe - CEPAL. 2001. La Estructura Agraria y el Campesinado en El Salvador, Guatemala y Honduras. p 81.
- Coote T, Bruford MW. 1996. Human Microsatellites Applicable for Analysis of Genetic Variation in Apes and Old World Monkeys. *J Hered* 87:406–410.
- Cortés-Ortiz L, Mondragón E, Cabotage J. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of Mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other Neotropical primates. *Conservation Genet Resour* 2:21–26.
- Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, Petit E, Aulagnier S, Hewison AJM. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* 13:2841–2850.

Craul M, Chikhi L, Sousa V, Olivieri GL, Rabesandratana A, Zimmermann E, Radespiel U. 2009. Influence of forest fragmentation on an endangered large-bodied lemur in northwestern Madagascar. *Biological conservation*. 142(12):2862-2871

Crespín SJ. 2011. Sobre la conservación de *Ateles geoffroyi* (primates, atelidae) en El Salvador: consideraciones genéticas para la formación de poblaciones en cautiverio. *Revista Latinoamericana de Conservación*. 2:1

Crespín-Guzmán SJ. 2009. Aplicación de microsatélites para identificación del genotipo de *Ateles geoffroyi* “mono araña” en condiciones de cautiverio. [San Salvador]: Universidad de El Salvador.

Crow JF, Dove WF. 2000. *Perspectives on Genetics: Anecdotal, Historical, and Critical Commentaries, 1987-1998*. Univ of Wisconsin Press. 748 p.

Cuarón AD, Morales A, Shedden A, Rodriguez-Luna E, de Grammont PC, Cortés-Ortiz L. 2008. *Ateles geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. [Accesed 2015 May 15] <https://iucnredlist.org/>.

DeGama-Blanchet HN, Fedigan LM. 2006. The Effects of Forest Fragment Age, Isolation, Size, Habitat Type, and Water Availability on Monkey Density in a Tropical Dry Forest. In: Estrada A, Garber PA, Pavelka MSM, Luecke L, editors. *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates*. Springer US. (Developments in Primatology: Progress and Prospects). p. 165–188. [accessed 2015 May 3]. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25872-8\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25872-8_8)

Dettman JR, Taylor JW. 2004. Mutation and Evolution of Microsatellite Loci in *Neurospora*. *Genetics* 168:1231–1248.

DiFiore A. 2009. Genetic Approaches to the Study of Dispersal and Kinship in New World Primates. In: Garber PA, Estrada A, Bicca-Marques JC, Heymann EW, Strier KB, editors. *South American Primates*. Springer New York. (Developments in Primatology: Progress and Prospects). p. 211–250.

Di Fiore A, Fleischer RC. 2004. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes* 4:246–249.

Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Landeiro VL, Telles MP de C, Rangel TF, Bini LM. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology* 36:475–485.

Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol Ecol Resour* 14:209–214.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 1991. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19:4008–4008.

Dudash MR, Fenster CB. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: Young A, Clarke G, editors. *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. p. 35 – 53.

Earl DA, vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4:359–361.

Edelson E. 2001. *Gregor Mendel: And the Roots of Genetics*. Oxford University Press, USA. 110 p.

Eisenberg JF. 1973. Reproduction in Two Species of Spider Monkeys, *Ateles fusciceps* and *Ateles geoffroyi*. *Journal of Mammalogy* 54:955–957.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5:435–445.

Ellsworth JA, Hoelzer GA. 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Mol. Ecol.* 7:657–658.

Engels WR. 2009. Exact Tests for Hardy–Weinberg Proportions. *Genetics* 183:1431–1441.

Estrada A, Coates-Estrada R. 1988. Tropical rain forest conversion and perspectives in the conservation of wild primates (*Alouatta* and *Ateles*) in Mexico. *Am. J. Primatol.* 14:315–327.

Estrada A, Garber PA, Pavelka MSM, Luecke L. 2006. Overview of the Mesoamerican Primate Fauna, Primate Studies, and Conservation Concerns. In: Estrada A, Garber PA, Pavelka MSM, Luecke L, editors. *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates*. Springer US. (Developments in Primatology: Progress and Prospects). p. 1–22.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.

- Fedigan LM, Baxter MJ. 1984. Sex differences and social organization in free-ranging spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Primates* 25:279–294.
- Ferreira M, Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA. Brasil. 221 p.
- Frankham R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics* 29:305–327.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Frantz AC, Pope LC, Carpenter PJ, Roper TJ, Wilson GJ, Delahay RJ, Burke T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology* 12:1649–1661.
- Freeman GH, Halton JH. 1951. Note on an Exact Treatment of Contingency, Goodness of Fit and Other Problems of Significance. *Biometrika* 38:141–149.
- Froehlich JW, Supriatna J, Froehlich PH. 1991. Morphometric analyses of *Ateles*: systematic and biogeographic implications. *Am. J. Primatol.* 25:1–22.
- Gerlach G, Jueterbock A, Kraemer P, Deppermann J, Harmand P. 2010. Calculations of population differentiation based on GST and D: forget Gst but not all of statistics! *Molecular Ecology* 19:3845–3852.
- Girón L, Rodríguez M, Reyne M. 2014. Conservación de Mono Araña (*Ateles geoffroyi*) en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador. Informe de resultados. p 14.
- González-Zamora A, Arroyo-Rodríguez V, Chaves ÓM, Sánchez-López S, Stoner KE, Riba-Hernández P. 2009. Diet of spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) in Mesoamerica: current knowledge and future directions. *Am. J. Primatol.* 71:8–20.
- González LA, Romano-Martínez LE. 1999. Reforma agraria y cooperativismo en El Salvador: antecedentes y perspectivas (1970-1996). *Realidad: Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*. 68: 175 – 206.
- Goossens B, Chikhi L, Ancrenaz M, Lackman-Ancrenaz I, Andau P, Bruford MW. 2006. Genetic Signature of Anthropogenic Population Collapse in Orang-utans. *PLOS Biol* 4:e25.
- Goudet J. 2005. hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5:184–186.
- Grativol AD, Ballou JD, Fleischer RC. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetics* 2:1–9.
- Groves C. 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Books. 350 p.

Guzmán DJ. 1883. Apuntamientos sobre la Topografía Física de la Republica de El Salvador, Comprendiendo: su Historia Natural, sus Producciones, Industria, Comercio e Inmigración, Climas, Estadística. El Cometa. p 297 – 357.

Hagell S, Whipple AV, Chambers CL. 2013. Population genetic patterns among social groups of the endangered Central American spider monkey (*Ateles geoffroyi*) in a human-dominated landscape. *Ecol Evol* 3:1388–1399.

Hamilton M. 2011. Population Genetics. John Wiley & Sons. 810 p.

Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H, Heuertz M. 2003. Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics* 163:1467–1482.

Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates. 542 p.

Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, McMichael GL, Chalmers KJ. 2008. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Mol Breeding* 21:271–281.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 23:504-511.

Hladik CM. 1978. Adaptive strategies of primates in relation to leaf eating. In: *The Ecology of arboreal Folivores*. Washington: Smithsonian Institution Press. p. 373–395.

Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359:199–199.

Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.

Jiménez MA. Encargado de los monos araña de Hacienda Nacascolo, Usulután, El Salvador. Comunicación personal.

Johns AD, Skorupa JP. 1987. Responses of rain-forest primates to habitat disturbance: A review. *Int J Primatol* 8:157–191.

Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403–1405.

Jombart T, Devillard S, Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94.

Kalinowski ST. 2004. Counting Alleles with Rarefaction: Private Alleles and Hierarchical Sampling Designs. *Conservation Genetics* 5:539–543.

Kalinowski ST. 2005. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5:187–189.

Kellogg R, Goldman EA. 1944. Review of the spider monkeys. *Proceedings of the United States National Museum* 96:1–45.

Kimura M, Crow JF. 1964. The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics* 49:725–738.

Klein LL. 1971. Observations on Copulation and Seasonal Reproduction of Two Species of Spider Monkeys, *Ateles bezelubuth* and *A. geoffroyi*. *Folia Primatologica* 15:233–248.

Korbie DJ, Mattick JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protocols* 3:1452–1456.

Kummer H. 2006. *Primate Societies: Group Techniques of Ecological Adaptation*. Chicago. Aldine Publishing Company. 160 p.

Lacy RC. 1987. Loss of Genetic Diversity from Managed Populations: Interacting Effects of Drift, Mutation, Immigration, Selection, and Population Subdivision. *Conservation Biology* 1:143–158.

Leblois R, Rousset F, Estoup A. 2004. Influence of Spatial and Temporal Heterogeneities on the Estimation of Demographic Parameters in a Continuous Population Using Individual Microsatellite Data. *Genetics* 166:1081–1092.

Leng L, Zhang D-X. 2011. Measuring population differentiation using  $G_{ST}$  or  $D$ ? A simulation study with microsatellite DNA markers under a finite island model and nonequilibrium conditions. *Molecular Ecology* 20:2494–2509.

Lewontin RC, Kojima K. 1960. The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution* 14:458–472.

Link A, Di Fiore A. 2006. Seed dispersal by spider monkeys and its importance in the maintenance of neotropical rain-forest diversity. *Journal of Tropical Ecology* 22:235–246.

Linné CV. 1766. *Systema naturae per regna tria naturae secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Salvius. 1388 p.

Luikart G, Allendorf FW, Cornuet J-M, Sherwin WB. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247.

Luikart G, Cornuet JM. 1998. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Biology* 12:228–237.

Luikart G, Cornuet JM. 1999. Estimating the Effective Number of Breeders from Heterozygote Excess in Progeny. *Genetics* 151:1211–1216.

Mansfield DC, Brown AF, Green DK, Carothers AD, Morris SW, Evans HJ, Wright AF. 1994. Automation of Genetic Linkage Analysis Using Fluorescent Microsatellite Markers. *Genomics* 24:225–233.

MARN – Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2004. Plan de manejo del área natural y humedal bahía de Jiquilisco. San Salvador, El Salvador. 258 p.

MARN – Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2007. Formulario de propuesta de Reserva de Biosfera Xiriualtique-Jiquilisco. San Salvador, El Salvador. 62 p.

MARN – Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2009. Listado Oficial de Especies de Vida Silvestre Amenazada o En Peligro de Extinción. [accessed 2015 May 12]. <http://www.marn.sv/temas/biodiversidad/vida-silvestre/especies-amenazadas-o-en-peligro-de-extincion.html>

Marsh LK, Chapman C. 2013. *Primates in Fragments: Complexity and Resilience*. Springer Science & Business Media. 540 p.

Meirmans PG. 2012. The trouble with isolation by distance. *Molecular Ecology* 21:2839–2846.

Metler LE, Gregg TG. 1972. *Genética de las poblaciones y evolución*. UTEHA. México. 239 p.

Milton K. 1981. Estimates of reproductive parameters for free-ranging *Ateles geoffroyi*. *Primates* 22:574–579.

Milton K, Lozier JD, Lacey EA. 2009. Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conserv Genet* 10:347.

Mittermeier RA. 1978. Locomotion and Posture in *Ateles geoffroyi* and *Ateles paniscus*. *Folia Primatologica* 30:161–193.

Mittermeier RA, Kinzey WG, Mast RB. 1989. Neotropical primate conservation. *Journal of Human Evolution* 18:597–610.

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

Morales-Hernández VK. 2003. Estudio preliminar de la población de *Ateles geoffroyi* “mono araña” en Chaguantique y el Tercio, Departamento de Usulután, El Salvador. [San Salvador]: Universidad de El Salvador.

Morales-Jimenez AL, Cortés-Ortiz L, Di Fiore A. 2015. Phylogenetic relationships of Mesoamerican spider monkeys (*Ateles geoffroyi*): Molecular evidence suggests the need for a revised taxonomy. *Mol. Phylogenet. Evol.* 82 Pt B:484–494.

Muniz L, Vigilant L. 2008. PERMANENT GENETIC RESOURCES: Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (*Cebus capucinus*) and cross-species amplification in other New World monkeys. *Molecular Ecology Resources* 8:402–405.

Muñoz-Delgado J, Corsi-Cabrera M, Canales-Espinosa D, Santillán-Doherty AM, Erkert HG. 2004. Astronomical and meteorological parameters and rest-activity rhythm in the spider monkey *Ateles geoffroyi*. *Physiol. Behav.* 83:107–117.

Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution* 29:1–10.

Nei M, Tajima F. 1981. Genetic Drift and Estimation of Effective Population Size. *Genetics* 98:625–640.

Nomura T. 2008. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications* 1:462–474.

Nowak RM. 1999. Walker’s Mammals of the World. JHU Press. 1132 p.

OPSA - Oficina Sectorial de Planificación Agropecuaria. 1982. Evaluación del Proceso de Reforma Agraria (marzo de 1980 a abril de 1982). MAG. Anexo II – 3.

Owen J, Girón L. 2012. Revised Checklist and Distributions of Land Mammals of El Salvador. *Museum of Texas Tech University* 310:32.

Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.

Pinar S. 1999. La introducción de la genética en España durante el primer tercio del siglo XX. *Llull: Revista de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas* 22:453–474.

Piñeiro D, Caballero-Mellado J, Cabrera-Toledo D, Canteros CE, Casas A, Castañeda-Sortibrán A, Castillo A, René Cerritos R, Chassin-Noria O, Delgado P, et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In: CONABIO. 2008. Capital Natural de México. México. 621 p.

- Piry S, Luikart G, Cornuet J-M. 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J Hered* 90:502–503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959.
- Puerto Barillas. 2010. Visita al Santuario del mono. [cited 2016 Nov 5]. Available from: <http://puertobarillas.com/es/visita-al-santuario-del-mono/>
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.
- Ramos-Fernández G, Boyer D, Aureli F, Vick LG. 2009. Association networks in spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Behav Ecol Sociobiol* 63:999–1013.
- Ramos-Fernández G, Wallace RB. 2008. Spider monkey conservation in the twenty-first century: recognizing risks and opportunities. In: *Spider Monkeys*. Cambridge University Press. (Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology).
- Romero B. 2010. Uso de suelo de la República de El Salvador, C.A. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 11 p.
- Rodríguez-Menjívar. 2007. Monitoreo poblacional de mono araña (*Ateles geoffroyi*) en el área Natural Protegida Normandía, Usulután. Fondo de la Iniciativa para las Américas - FIAES Sitio Oficial. [accessed 2015 May 12]. <http://www.fiaes.org.sv/main.php?lng=0&id=44&s=7&c=9>
- Rosenberg NA. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137–138.
- Ruiz-García M, Castillo MI, Ledezma A, Leguizamon N, Sánchez R, Chinchilla M, Gutierrez-Espeleta GA. 2012. Molecular systematics and phylogeography of *Cebus capucinus* (Cebidae, Primates) in Colombia and Costa Rica by means of the mitochondrial COII gene. *Am. J. Primatol.* 74:366–380.
- Ruiz-García M, Escobar-Armel P, Alvarez D, Mudry M, Ascunce M, Gutierrez-Espeleta G, Shostell JM. 2007. Genetic Variability in Four *Alouatta* Species Measured by Means of Nine DNA Microsatellite Markers: Genetic Structure and Recent Bottlenecks. *Folia Primatol* 78:73–87.
- Ruiz-García M, Parra A, Romero-Aleán N, Escobar-Armel P, Shostell JM. 2006. Genetic Characterization and phylogenetic relationships between the *Ateles* species (Atelidae, Primates) by means of DNA microsatellite markers and craniometric data. *Primate Report*. 73:3-43.

- Rylands AB, Groves CP, Mittermeier RA, Cortés-Ortiz L, Hines JJH. 2006. Taxonomy and Distributions of Mesoamerican Primates. In: Estrada A, Garber PA, Pavelka MSM, Luecke L, editors. *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates*. Springer US. (Developments in Primatology: Progress and Prospects). p. 29–79. [accessed 2015 May 10]. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25872-8\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-25872-8_3)
- Rylands AB, Mittermeier RA. 2009. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. In: Garber PA, Estrada A, Bicca-Marques JC, Heymann EW, Strier KB, editors. *South American Primates*. Springer New York. (Developments in Primatology: Progress and Prospects). p. 23–54. [accessed 2015 Apr 29]. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-78705-3\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-78705-3_2)
- Rylands AB, Mittermeier RA, Silva JS. 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *Int. Zoo Yb.* 46:11–24.
- Schlötterer C, Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.* 20:211–215.
- Sebeok TA. 1977. *How animals communicate*. Indiana University Press. pp. 519-544.
- Slatkin M. 1993. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution* 47:264–279.
- Storfer A. 1999. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation* 87:173–180.
- Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA. 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24:2498–2504.
- Takahashi J. 2008. A literature review of the spider monkey, *Ateles* sp., with special focus on risk for extinction. [accessed 2015 May 4]. <http://exepsilon.slu.se:8080/archive/00002758/>
- Tapiero CS, Toren N. 1987. A brownian motion model of return migration. *Appl. Stochastic Models Data Anal.* 3:151–160.
- Turner IM. 1996. Species Loss in Fragments of Tropical Rain Forest: A Review of the Evidence. *Journal of Applied Ecology* 33:200–209.
- Valière N. 2002. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377–379.
- Vallone PM, Butler JM. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* 37:226–231.
- Wainwright M. 2007. *The Mammals of Costa Rica: A Natural History and Field Guide*. 1 edition. Ithaca, N.Y: Cornell University Press.

Wang J. 2005. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1395–1409.

Wang J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research* 89:135–153.

Wang J. 2011. Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11:141–145.

Watson JD, Crick FHC. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171:737–738.

Weber JL. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> · (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7:524–530.

Willoughby JR, Sundaram M, Wijayawardena BK, Kimble SJA, Ji Y, Fernandez NB, Antonides JD, Lamb MC, Marra NJ, DeWoody JA. 2015. The reduction of genetic diversity in threatened vertebrates and new recommendations regarding IUCN conservation rankings. *Biological Conservation* 191:495–503.

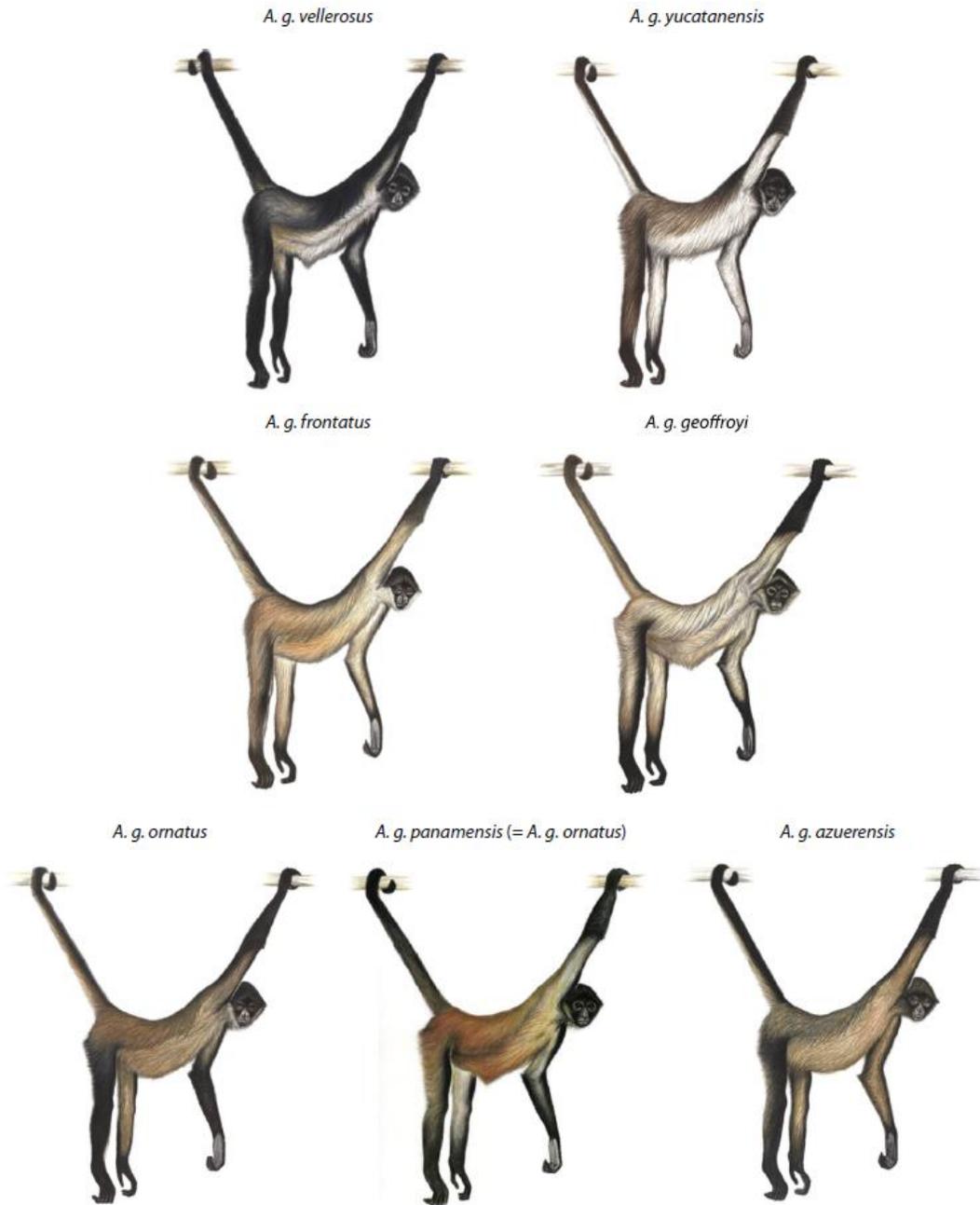
Wilson DE, Reeder DM. 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. JHU Press.

Wright S. 1922. Coefficients of Inbreeding and Relationship. *The American Naturalist* 56:330–338.

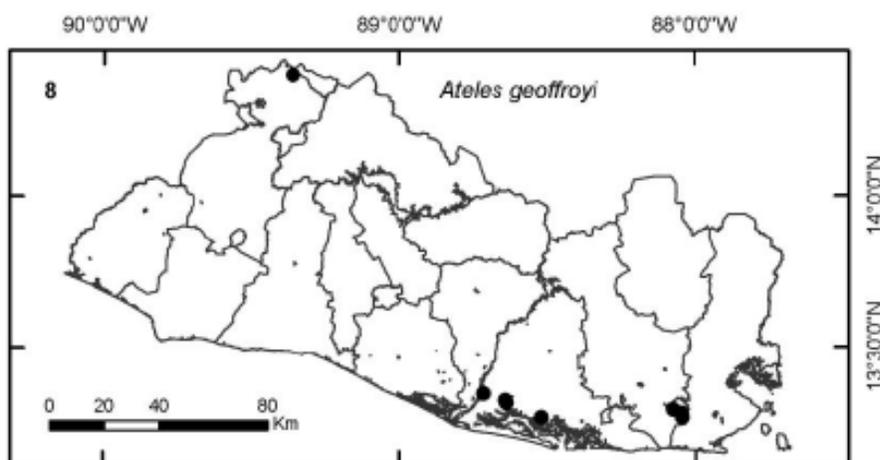
Wright S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97–159.

Ziegle JS, Su Y, Corcoran KP, Nie L, Eric Mayrand P, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR. 1992. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14:1026–1031.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Pelaje característicos de siete de las nueve supuestas subespecies (Kellogg and Goldman 1944) de *Ateles geoffroyi*. Tomado de Morales-Jimenez, Cortés-Ortiz et al. (2015).



**Anexo 2.** Distribución de *Ateles geoffroyi* en El Salvador según registros históricos. Tomado de Owen y Girón (2012).

**Anexo 3.** Especificaciones de las recolectas de excretas de *Ateles geoffroyi* en el paisaje fragmentado de la Bahía de Jiquilisco.

Código de la muestra	Fecha de recolecta	Lugar de recolecta	Latitud	Longitud	Individuo
Ags1	29/5/2013	Chaguantique	13.28909	-88.56998	Macho subadulto
Ags2	30/5/2013	Chaguantique	13.28950	-88.56944	No identificado
Ags3	30/5/2013	Chaguantique	13.28990	-88.57056	Hembra adulta
Ags4	30/5/2013	Chaguantique	13.28990	-88.57056	No identificado
Ags5	30/5/2013	Chaguantique	13.28990	-88.57056	Hembra subadulta
Ags6	30/5/2013	Chaguantique	13.28929	-88.57072	Hembra adulta
Ags7	30/5/2013	Chaguantique	13.28880	-88.56940	Macho adulto
Ags8	30/5/2013	Chaguantique	13.28880	-88.56940	Macho subadulto
Ags9	31/5/2013	Chaguantique	13.28905	-88.57050	Hembra siendo cortejada
Ags10	31/5/2013	Chaguantique	13.28905	-88.57050	Macho en cortejo
Ags11	31/5/2013	Chaguantique	13.28928	-88.57080	Hembra adulta con cría
Ags12	1/6/2013	Chaguantique	13.28905	-88.56966	Macho adulto
Ags13	1/6/2013	Chaguantique	13.28847	-88.56982	Macho adulto
Ags14	1/6/2013	Chaguantique	13.28848	-88.56983	Hembra con cría
Ags15	1/6/2013	Chaguantique	13.28847	-88.56982	Hembra adulta
Ags16	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags17	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags18	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags19	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags20	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags21	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags22	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	No identificado
Ags23	14/7/2013	El Tercio	13.27045	-88.52430	No identificado

Ags24	14/7/2013	El Tercio	13.27159	-88.52393	Hembra adulta
Ags25	15/7/2013	El Tercio	13.27165	-88.52398	No identificado
Ags26	15/7/2013	El Tercio	13.27165	-88.52398	No identificado
Ags27	15/7/2013	El Tercio	13.27165	-88.52398	Hembra adulta grávida
Ags28	15/7/2013	El Tercio	13.27165	-88.52398	Hembra adulta
Ags29	16/7/2013	Chaguantique	13.28871	-88.57141	Macho adulto
Ags30	16/7/2013	Chaguantique	13.28871	-88.57141	Hembra adulta
Ags31	17/072013	Nacascolo	13.27038	-88.49702	No identificado
Ags32	17/7/2013	Nacascolo	13.27380	-88.48706	Indeterminado
Ags33	17/7/2013	Nacascolo	13.27038	-88.49702	No identificado
Ags34	17/7/2013	Nacascolo	13.27038	-88.49702	Macho subadulto
Ags35	17/7/2013	Nacascolo	13.27038	-88.40702	Macho subadulto
Ags36	18/7/2013	Normandía	13.32144	-88.63940	No identificado
Ags37	18/7/2013	Normandía	13.32144	-88.63940	Posible macho adulto
Ags38	18/7/2013	Normandía	13.32144	-88.63940	Posible macho adulto
Ags39	18/7/2013	Normandía	13.32144	-88.63940	Posible macho adulto
Ags40	18/7/2013	Normandía	13.32144	-88.63940	Posible macho adulto
Ags41	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags42	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags43	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags44	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags45	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags46	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags47	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags48	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags49	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags50	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	Hembra grávida
Ags51	14/8/2015	Normandía	13.31920	-88.63698	No identificado
Ags52	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	Macho subadulto
Ags53	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags54	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags55	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags56	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags57	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags58	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags59	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags60	26/8/2015	Normandía	13.32230	-88.64397	No identificado
Ags61	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Macho adulto
Ags62	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Hembra adulta con cría
Ags63	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Hembra adulta
Ags64	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Macho joven
Ags65	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Hembra adulta con cría
Ags66	29/8/2015	Nacascolo	13.27018	-88.49695	Macho joven

Ags67	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags68	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags69	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags70	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags71	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags72	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado
Ags73	15/9/2015	Chaguantique	13.28883	-88.57128	No identificado

**Anexo 4.** Protocolo de kit de extracción QIAamp DNA Stool mini kit de QIAGEN® con modificación de Chaves et al. (2014).

### **Día 1**

Antes de iniciar

- Si se ha formado precipitado en el buffer ASL, disolver incubándolo a 55°C o 70°C.
- Limpiar las pipetas y gradillas con lejía.
- Colocar tubos de 2.0 ml (2 tubos por muestra) en rayos UV.
- Colocar en rayos UV las puntas de pipetas.

### Procedimiento

1. Con un bisturí raspar piezas delgadas (200mg) de materia fecal de la parte externa de la muestra, esterilizar pinzas y la caja de Petri.
2. Si su muestra es sólida, coloque la materia fecal dentro de un tubo y agregue 1.5ml de Buffer ASL a cada tubo.
3. Si su muestra está compuesta en su mayoría por pelos, coloque aproximadamente 4.0ml de Buffer ASL en la caja Petri que contiene la materia fecal. Déjela remojar por un momento para que la materia sólida se disuelva y luego cortar los pelos. Recolecte el líquido y haga alícuotas de 1.5ml en cada uno de los tubos de 2ml.
4. Repetir los pasos 1 y 3 para cada una de las muestras. Limpiar el área de trabajo con lejía y cambie los guantes entre muestras.
5. Agitar los tubos de manera continua por 15 segundos en el vortex.
6. Incubar a 55-65°C en una incubadora con agitación (22rpm) durante toda la noche.
7. Lavar las pinzas con lejía y esterilizarlas antes de colocarlas en la caja de pinzas.

### **Día 2:**

Antes de iniciar

- Asegurarse que el Buffer AW1 y Buffer AW2 hayan sido preparados de acuerdo a las instrucciones en la viñeta.
- Si se ha formado precipitado en el Buffer AL, disolver incubando a 55°C o 70°C.
- Calentar el Buffer AE a 70°C y continuar calentando durante la extracción.
- Colocar el etanol al 100% en el congelador para ser usado en el paso 11.
- Limpiar las pipetas con lejía.
- Colocar los tubos y puntas bajo rayos UV.

- Hacer las viñetas con el número de muestras y colóquelas en los tubos finales.

#### Procedimiento

1. Centrifugar las muestras durante 3 minutos a 13,300 rpm para unificar las partículas. En este paso tendrá 2 tubos por muestra.
2. Transferir 1.5ml del sobrenadante a un tubo de reacción de 2.0ml, si es más, utilizar un segundo tubo. En este punto los sobrenadantes de las muestras de los tubos duplicados se juntan en uno solo.
3. Agregar una tableta de InhibitEX a los tubos que contienen el sobrenadante. Agregue una pieza proporcional de la tableta al segundo tubo. Corte la tableta usando un nuevo bisturí y nueva pinza en la caja Petri, evitando tocar la tableta.

1ml= utilice 2/3 de tableta

750ml= utilice 1/2 de tableta

500ml= utilice 1/3 de tableta

4. Agitar en el vortex continuamente por 1 minutos o hasta que la tableta este completamente suspendida. Incubar la suspensión por 1 minuto a temperatura ambiente para permitir que los inhibidores sean absorbidos por la matriz de la InhibitEX.
5. Centrifugar por 12 minutos a 13,000 rpm con el fin de precipitar la tableta.
6. Mientras se centrifugan, prepare 2 juegos de tubos (2ml) con 25 $\mu$ L de Proteinasa K.
7. Transfiera 600 $\mu$ L del sobrenadante a un tubo de reacción de 2ml con ProtK, y si hay más, utilice un segundo tubo. Generosamente mezcle de manera manual para formar una solución homogénea.
8. Agregue 600 $\mu$ L de Buffer AL a los tubos con 600 $\mu$ L del sobrenadante + ProtK. La cantidad de Buffer AL debe ser la misma que la cantidad de sobrenadante. Por lo tanto, El Buffer AL necesita ser escalado si el sobrenadante en el tubo es menos de 600 $\mu$ L.
9. Agitar en el vortex por 15 segundos.
10. Incubar a 70°C por 15 minutos.
11. Agregar 600 $\mu$ L de etanol al 100% (proporcional a la cantidad de Buffer AL agregada en el paso 8).
12. Agitar en el vortex por 15 segundos.
13. Etiquetar la tapa de una columna QIAmp nueva en un tubo colector de 2ml.
14. Transferir 600 $\mu$ L del lisado del paso 12 de la columna QIAmp colocada en un tubo colector.
15. Centrifugar a 13,300 rpm por 1 minuto y descartar el filtrado después de cada transferencia.
16. Repetir el paso 14 y 15 hasta que todo el lisado de los tubos este filtrado.
17. Transferir la columna QIAamp a un tubo colector fresco y agregar 500 $\mu$ L de Buffer AW1

18. Centrifugar a 13,300 rpm por 1 minuto.
19. Transferir la columna QIAamp a un tubo colector fresco y agregar 500µL de Buffer AW2.
20. Centrifugar a 13,300 rpm por 2 minutos.
21. Transferir la columna QIAamp a tubo colector fresco, centrifugar de nuevo a 13 rpm por 2 minutos en una columna seca.
22. Transferir la columna QIAamp en un nuevo y etiquetado tubo Eppendorf de 1.5ml.
23. Con cuidado abrir la columna QIAamp y pipetear 60µL de Buffer AE (caliente) directamente en la membrana QIAamp. Cerrar la tapa e incubar por 40 minutos en temperatura ambiente.
24. Centrifugar a 8,000 rpm por 3 minutos.
25. En el mismo tubo, pipetear 60µL de Buffer AE directamente en la membrana QIAamp. Cerrar la tapa e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
26. Centrifugar a 8,000 rpm por 3 minutos.
27. Siempre en el mismo tubo, pipetear más de 60µL de Buffer AE directamente en la membrana QIAamp. Cerrar la tapa e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
28. Centrifugar a 8,000 rpm por 3 minutos.
29. En este paso tendrá 180µL de ADN en uno de los tubos con la misma concentración.
30. Transferir 90µL de ADN a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5ml.
31. Ahora que tiene 2 tubos de ADN listos para usar. Etiquete uno como su STOCK y otro como su BACK UP.

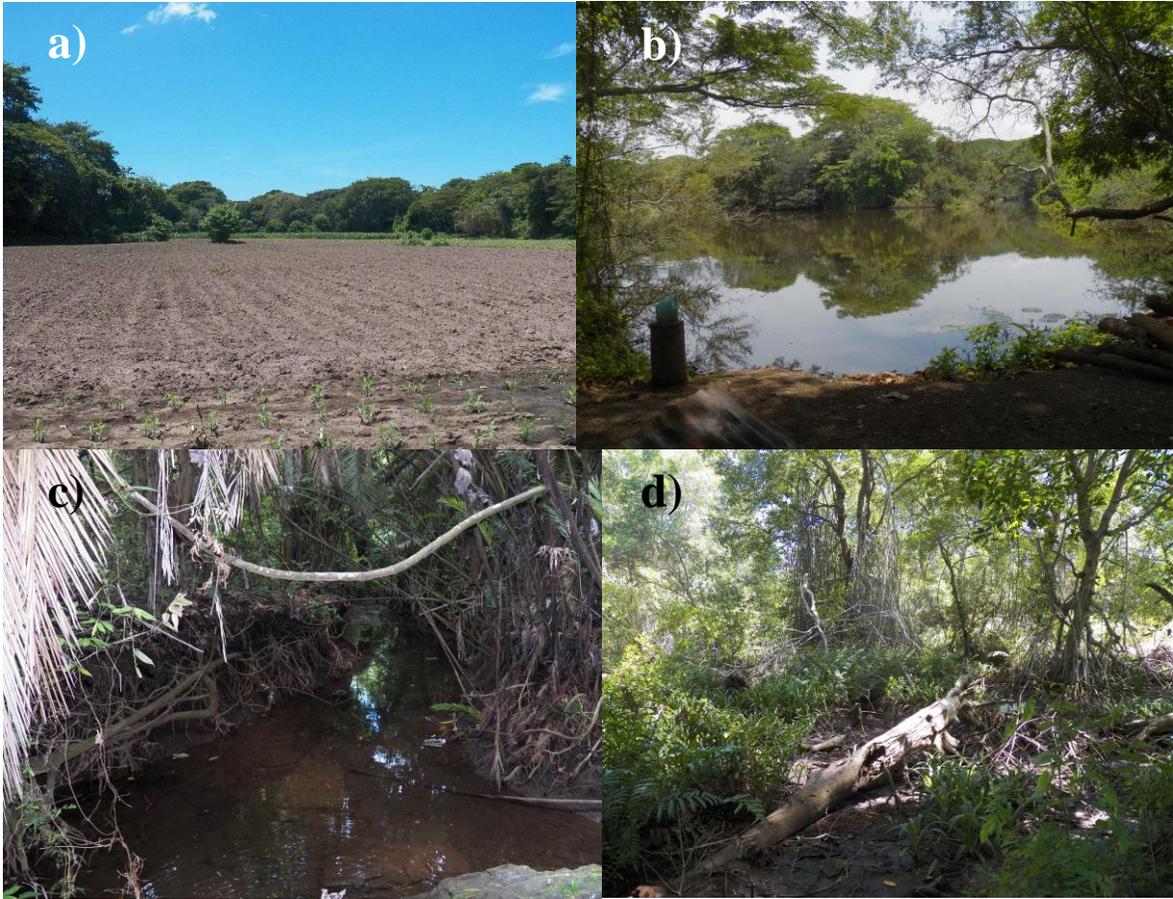
		Multiplex 1 LL1118 AP74 LL311 CEB121						Multiplex 2 AP68 D8S260 D8S165 CEB120					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Ag70	Ags9	Ags18	Ags26	Ags35	Ags44	Ag70	Ags9	Ags18	Ags26	Ags35	Ags44
B		Ags1	Ags10	Ags19	Ags27	Ags36	Ags45	Ags1	Ags10	Ags19	Ags27	Ags36	Ags45
C		Ags2	Ags11	Ags20	Ags28	Ags37	Ags46	Ags2	Ags11	Ags20	Ags28	Ags37	Ags46
D		Ags3	Ags12	Ags21	Ags29	Ags38		Ags3	Ags12	Ags21	Ags29	Ags38	
E		Ags4	Ags13	Ags22	Ags31	Ags39		Ags4	Ags13	Ags22	Ags31	Ags39	
F		Ags5	Ags15	Ags23	Ags32	Ags40		Ags5	Ags15	Ags23	Ags32	Ags40	
G		Ags6	Ags16	Ags24	Ags33	Ags41		Ags6	Ags16	Ags24	Ags33	Ags41	
H		Ags8	Ags17	Ags25	Ags34	Ags43		Ags8	Ags17	Ags25	Ags34	Ags43	

		Multiplex 3 LL1110 SB38						Multiplex 4 P2BH6 Leon 2					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		AG78	Ags58	Ags66	Ags1	Ags10	Ags18	AG78	Ags58	Ags66	Ags1	Ags10	Ags18
B		Ags50	Ags59	Ags67	Ags2	Ags11	Ags19	Ags50	Ags59	Ags67	Ags2	Ags11	Ags19
C		Ags51	Ags60	Ags68	Ags3	Ags12	Ags20	Ags51	Ags60	Ags68	Ags3	Ags12	Ags20
D		Ags53	Ags61	Ags69	Ags4	Ags13	Ags21	Ags53	Ags61	Ags69	Ags4	Ags13	Ags21
E		Ags54	Ags62	Ags70	Ags5	Ags14	Ags22	Ags54	Ags62	Ags70	Ags5	Ags14	Ags22
F		Ags55	Ags63	Ags71	Ags6	Ags15	Ags23	Ags55	Ags63	Ags71	Ags6	Ags15	Ags23
G		Ags56	Ags64	Ags72	Ags8	Ags16	Ags24	Ags56	Ags64	Ags72	Ags8	Ags16	Ags24
H		Ags57	Ags65	Ags73	Ags9	Ags17	Ags26	Ags57	Ags65	Ags73	Ags9	Ags17	Ags26

**Anexo 5.** Ejemplo de planificación de la PCR. La cuadrícula representa cada uno de los 96 pozos del termociclador.



**Anexo 6.** Monos araña de la Bahía de Jiquilisco. a) macho adulto de la Hacienda El Tercio descansando, b) hembra de la Hacienda Nacascolo con cría, c) hembra de la Hacienda Nacascolo lastimada del ojo izquierdo, d) pareja de monos araña en Nacascolo.



**Anexo 7.** Paisaje de la Bahía de Jiquilisco. a) cultivo de maíz contiguo al ANP Normandía, b) manglar contiguo al bosque de la Hacienda Nacascolo, c) afluente en el ANP Chaguantique, d) bosque de la Hacienda El Tercio.