

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y FILOGEOGRAFÍA DEL JAGUAR (*PANTHERA ONCA*) A
PARTIR DEL GEN MITOCONDRIAL NADH5

CATALINA VÁSQUEZ CARRILLO

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

Bióloga

Manuel Ruiz García, Ph.D
Director

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
Diciembre 1 de 2006

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y FILOGEOGRAFÍA DEL JAGUAR (*PANTHERA ONCA*) A
PARTIR DEL GEN MITOCONDRIAL NADH5

CATALINA VÁSQUEZ CARRILLO

APROBADO

Manuel Ruiz García, Ph.D
Director

Diana Álvarez González, Ph.D
Jurado

Victoria Villegas, M.Sc
Jurado

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y FILOGEOGRAFÍA DEL JAGUAR (*PANTHERA ONCA*) A
PARTIR DEL GEN MITOCNDRIAL NADH5

CATALINA VÁSQUEZ CARRILLO

APROBADO

Angela Umaña Muñoz, Mphil
Decana Académica

Andrea Forero Ruiz
Directora de Carrera

la más divergente, y la boliviana la más homogénea, no pudiéndose soportar a nivel genético para el gen y la población objeto de estudio las subdivisiones morfológicas. El r. Amazonas no representa una barrera geográfica al flujo genético. Se encontraron evidencias de expansión poblacional posiblemente asociada a la recolonización del continente. Filogenias tipo estrella a partir de análisis de distancias genéticas como de Máxima Parsimonia fueron encontradas. Tiempos de divergencia entre los 129 000 y 499 000 años menores a los encontrados a nivel paleontológico. El jaguar del nor-occidente sudamericano puede ser tomado como una unidad a nivel de conservación.

Agradecimientos:

A mi director Manuel Ruiz García Ph.D., por su guía y conocimiento durante todo el desarrollo del trabajo, y por la colecta de las muestras. A María Martínez, por su colaboración incondicional en todos los aspectos del desarrollo de este trabajo. A Andrea Murillo, por el acompañamiento y la asesoría. A todas las personas que trabajan en el laboratorio de Genética de Poblaciones molecular y Biología evolutiva de la Pontificia Universidad Javeriana, por la colaboración y asesoría. A la Pontificia Universidad Javeriana por el préstamo del laboratorio y los equipos. A Conservación Internacional por la colaboración en la financiación.

Diciembre 1 de 2006

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN 12
6.3 Desequilibrio de ligamiento.....33

Resumen

El jaguar (*Panthera onca*) es el único representante del género *Panthera* en las Américas. A pesar de su importancia ecológica sus poblaciones se encuentran amenazadas principalmente por la caza directa y la deforestación de su hábitat. Con el propósito de establecer parámetros genético-poblacionales, aspectos de la filogeografía y la historia evolutiva de esta especie, fueron procesadas 37 muestras provenientes de Bolivia, Perú, Colombia, Costa Rica y Guatemala para obtener las secuencias de una región de 506 pb del gen mitocondrial NADH5. Los datos haplotípicos fueron analizados y los resultados muestran una especie con una alta diversidad nucleotídica y muy alta diversidad haplotípica. Con poca estructura poblacional y divergencia entre poblaciones, siendo la población centroamericana la más divergente, y la boliviana la más homogénea, no pudiéndose soportar a nivel genético para el gen y la población objeto de estudio las subdivisiones morfológicas. El r. Amazonas no representa una barrera geográfica al flujo genético. Se encontraron evidencias de expansión poblacional posiblemente asociada a la recolonización del continente. Filogenias tipo estrella a partir de análisis de distancias genéticas como de Máxima Parsimonia fueron encontradas. Tiempos de divergencia entre los 129 000 y 499 000 años menores a los encontrados a nivel paleontológico. El jaguar del nor-occidente sudamericano puede ser tomado como una unidad a nivel de conservación.

Abstract

The jaguar (*Panthera onca*) is the only representative of *Panthera* genus in the Americas. In spite of his ecological value, its populations are threatened mainly by direct hunting and habitat loss. To establish population genetics parameters, phylogeography aspects and evolutionary history of this species, 37 samples taken from Bolivia, Perú, Colombia, Costa Rica and Guatemala were processed to obtain sequences of a 506pb region of NADH5 mitochondrial gene. Haplotipic data were analyzed and results show that the jaguar is a high nucleotide diverse and very high haplotipic diverse species. It has low population structure and between population divergence, with the most divergent Central America population and the most homogeneous Bolivia population, so the morphological subdivisions could not be supported at genetic level for the population and gene under study. The Amazon River does not represent a geographical barrier to gene flow. Population expansion evidences were found, possibly associate to continent re-colonization. Star-phylogenies were found form distance-based analysis as from Maximun Parsimony-based analysis. Divergence times between 129 000 and 499 000 years, less than the one found at paleontological level. The jaguar form South American nor-occident can be taken as unit at conservation level.

1. Introducción

El jaguar (*Panthera onca*, Linné, 1758), yaguara o tigre americano, es el único gran felino representante del género *Panthera* en las Américas. La inspiración que representa para las comunidades indígenas, la robustez de su cuerpo, grandes colmillos, extrema fuerza, hermoso pelaje, gran capacidad de dispersión y de nado, amplio rango de hábitats y de dieta, e importante papel ecológico como carnívoro, lo convierten en una especie muy atractiva para diferentes estudios. Sin embargo, su hábito solitario y el tipo de bosques donde vive dificultan su estudio y conocimiento.

Su rango de distribución actual abarca desde México hasta el Norte de Argentina, más no era así hasta 1900's, habiéndose reducido este en un 46% aproximadamente, aunado a la disminución de su tamaño poblacional. Dentro de este rango de distribución y enmarcados en el concepto de subespecie de Avise & Ball (1980), se reconocen, a partir de datos craneométricos y de coloración del pelaje, y ubican geográficamente en estos momentos ocho subespecies de *P. onca*.

Progresivamente, a partir de principios del siglo XX, con el incremento de las poblaciones humanas y de las actividades comerciales e industriales, las poblaciones de jaguar se han visto sumamente amenazadas, fundamentalmente por la caza de sus pieles (muy alta hasta 1975), la fragmentación y destrucción de su hábitat, que limita el flujo génico y el alimento, y la confrontación con humanos cuando los jaguares se alimentan del ganado. Es por estas amenazas que CITES reporta al jaguar en el Apéndice I desde 1973 y la UICN lo clasifica como especie amenazada.

Cada vez más los estudios genéticos moleculares y poblacionales se hacen necesarios para complementar y brindar otro tipo de datos y aproximaciones indirectas, mediante el empleo de un muestreo no invasivo y que no requiere números elevados de muestras, al conocimiento de la historia evolutiva, la estructura poblacional y la filogeografía de la especie, la resolución de incertidumbre taxonómicas, entre otros aspectos de su biología (Desalle & Amato, 2004).

Con el propósito de desarrollar estrategias adecuadas de conservación y manejo es necesaria la constitución de un marco de referencia sobre el estado de la población total del jaguar y de sus subdivisiones (Sanderson et al., 2002). El trabajo que se plantea aquí intenta aportar datos sobre los parámetros de la estructura poblacional desde los métodos de

coalescencia y sobre la distribución geográfica de los linajes o filogeografía de la especie de estudio, a ese marco de referencia.

A este nivel se han realizado trabajos a amplia escala (Centro y Suramérica) (Eizirik et al., 2001; Ruiz-García, 2001) y a nivel de Colombia (Ruiz-García et al., 2006) a partir de marcadores de DNA microsatélites. A partir de datos de la región control del DNA mitocondrial se conoce el trabajo de Eizirik *et al.* (2001). En todos los casos se encontró para el total de la población alta diversidad genética, y diversidad media a partir de datos de DNA mitocondrial; Desvío del equilibrio Hardy-Weinberg por exceso de homocigotos posiblemente por efecto Whalund. Y alto flujo génico (entre 1 y 12 migrantes por generación).

También se estimaron tiempos de divergencia entre 280 000 y 500 000 años, más recientes que los paleontológicos. Se encontró evidencia de expansión poblacional como mínimo para las poblaciones pertenecientes a la subespecie *P. onca onca* asociada a la recolonización sur-norte del continente (Eizirik et al., 2001). Filogenias tipo estrella, evidencia de una reciente divergencia. No estructuración poblacional ni filogeográfica fuerte, con hasta un máximo de cuatro subdivisiones poblacionales. Y se plantean el Amazonas, el Darién (Eizirik et al., 2001) y la cordillera de los Andes (Ruiz-García et al., 2006) como barreras geográficas delimitantes de estas subdivisiones.

A partir de muestras provenientes de Colombia, Perú, Bolivia, Guatemala y Costa Rica se pretende obtener el DNA mitocondrial, amplificarlo y obtener los datos de 37 secuencias de 506pb de tamaño del gen mitocondrial NADH5, que por ser mitocondrial presenta características deseables para los objetivos de este estudio como la no recombinación, alta tasa de mutación y alto número de copias en la célula. A partir de estos datos y empleando diferentes programas estadísticos para genética de poblaciones y filogenia, se pueden analizar tres aspectos fundamentales de la población.

En primer lugar, la estimación de parámetros genético-poblacionales para dilucidar la estructura poblacional y la divergencia entre las poblaciones, mediante modelos de coalescencia que son de un alta precisión matemática. En segundo lugar, observar si la distribución geográfica de las subespecies morfológicas corresponde con la distribución de los acervos genéticos encontrados. Y tercero, el establecimiento de árboles de filogenia y redes de unión entre haplotipos que permitan observar las relaciones entre individuos, el lugar de origen de la muestra y el lugar de origen genético más probable.

2. Marco teórico y revisión de literatura

2.1 El jaguar

El único gran felino del Nuevo Mundo, el jaguar, *Panthera onca* Linné, 1758 (Mammalia, Felidae), también denominado “yaguara” (palabra utilizada por indígenas suramericanos que significa “comedor de carne que mata de un solo salto”) y “tigre americano” (en español), comparte esta designación de gran felino solo con otras cuatro especies, el tigre (*P. tigris*), el león (*P. leo*), el leopardo (*P. pardus*) y el leopardo de las nieves (*P. uncia*) (Nowak, 1999). La monofilia del género ha sido soportada por diferentes estudios morfológicos y genéticos (Peters & Hast, 1994).

Las evidencias paleontológicas indican que este único representante del género *Panthera* en las Américas, entró desde Eurasia a través del estrecho de Bering durante el Pleistoceno temprano hace aproximadamente 1.5 millones de años, después de separarse de su ancestro común con los otros *Panthera* (Seymour, 1989), por lo que se le considera una especie de origen relativamente reciente. La forma fósil de esta especie se denomina *P. augusta* y era un 15 a 20% más grande. Al jaguar actual se le considera derivado de una población relictiva de esta forma más ampliamente distribuida (Seymour, 1989). Por su parte, los análisis de estimación indirecta del tiempo de divergencia de esta especie, establecen un total de 280 000 a 510 000 años (Eizirik *et al.*, 2001).

Entre las características morfológicas más distintivas de este felino manchado se tienen: un tamaño que difiere ampliamente entre regiones, con un peso variable entre los 56.3 y 158 Kg. y una longitud para las hembras entre los 1.57 y 2.19m y para los machos de 1.72 a 2.41m, siendo un poco más grande que el leopardo (Redford & Eisenberg, 1992; Seymour, 1989). Se cree que esta variación está relacionada con el hábitat y con el tamaño de las presas que cambia con la latitud (Seymour, 1989).

Cuerpo robusto y musculoso, extremidades masivas y cortas, cola corta, cabeza grande y redondeada, pelaje corto y cerdoso de coloración desde el amarillo pálido hasta dorado oscuro, con pequeñas manchas negras en forma de roseta que encierran puntos o formas irregulares (Seymour, 1989). Presenta, como la mayoría de los felinos, 19 pares de cromosomas, 17 metacéntricos y 2 acrocéntricos.

Dentro de sus hábitos se rescatan el ser extremadamente solitario, territorial, ágil escalador, hábil nadador y cazador, presentar una gran capacidad de movimiento, de 2 a 5 Km al día

hasta más de 18 Km y una actividad de 12 a 14 horas durante 24 horas. Sus presas son muy variadas (más de 85 especies reportadas) y su escogencia se relaciona con su abundancia, desde ciervos, pecaríes, capibaras, roedores, armadillos, cuerpo espinos, tapires y monos, hasta animales acuáticos como peces, tortugas, pequeños cocodrilos y ranas, y otros felinos pequeños. En rancherías se alimentan del ganado (Redford & Eisenberg, 1992; Seymour, 1989). La gran variedad de hábitats en los que se pueden encontrar va desde bosques densos y húmedos, pampas, llanos y bosques deciduos, hasta sabanas abiertas, pastizales y desiertos, islas de vegetación flotante, siempre y cuando existan cerca fuentes de agua (Seymour, 1989), lo que ayuda a explicar su amplia distribución geográfica.

Actualmente su rango de distribución (Figura 1) abarca desde México hasta el norte de Argentina con la población más grande localizada en la amazonía brasilera, y un limitado rango en México, Guatemala y Argentina (Emmons, 1990). Sin embargo, esto no era así hasta principios de 1900's cuando el jaguar se encontraba desde la Patagonia argentina hasta el suroeste de los Estados Unidos. La disminución en su rango es aproximadamente a un 46% (Sanderson et al., 2002, Seymour, 1989).

Tomando el concepto de subespecie de Avise & Ball (1980) y O'Brien & Mayr (1991), de poblaciones por debajo del nivel de especie que comparten una distribución geográfica distintiva y una historia natural única con respecto a las otras subdivisiones, y de acuerdo a las características morfológicas: craneométricas, coloración del pelaje, tamaño; y geográficas, actualmente se reconocen 8 subespecies morfológicas de jaguar (Pocock, 1939, Seymour, 1989). Sin embargo el trabajo realizado por Larson (1997), con craneometría en individuos representantes de las 8 subespecies propuestas, mostró una alta variabilidad morfológica entre individuos más no entre subespecies, sugiriendo a toda la especie como una única unidad evolutiva.

La disminución del rango de distribución, junto con la del tamaño de las poblaciones del jaguar, se explica por la creciente amenaza que representaron desde principios del siglo XX las actividades humanas, entre las cuales se tienen: la caza comercial de las pieles (muy fuerte hasta 1975); la deforestación y fragmentación de su hábitat que implica a su vez la disminución del alimento, la interrupción del flujo génico, el aumento de la probabilidad de ser encontrados por los cazadores; la caza para alimentación humana; la muerte por confrontación con humanos por los ataques de los felinos al ganado. Esta última amenaza

fue la que ocasionó la desaparición del jaguar de los Estados Unidos y del norte de México hacia 1950 (Ruiz-García, 2001; Treves and Karanth, 2003).

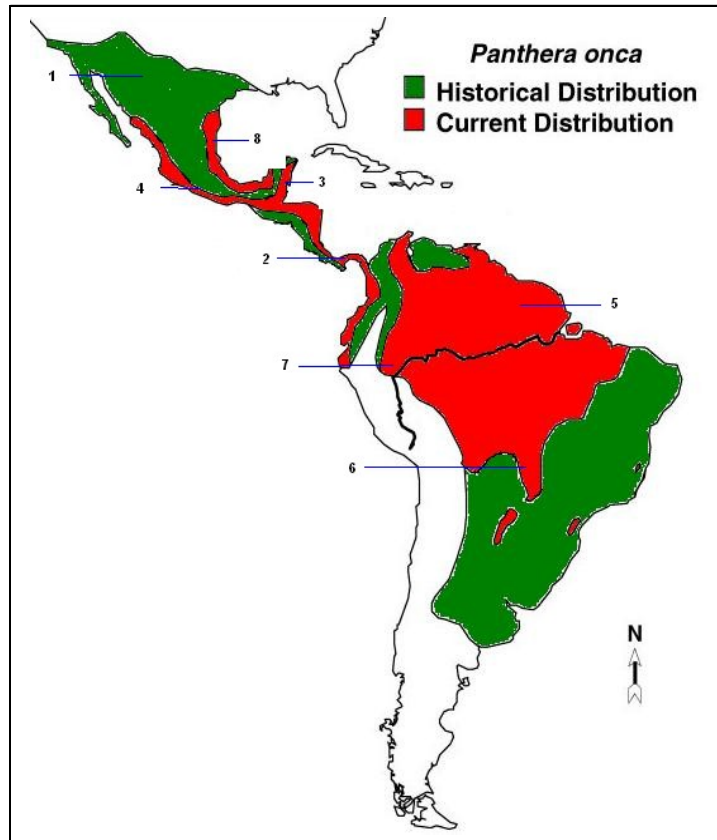


Figura 1: Mapa de la distribución histórica y actual del jaguar (*P. onca*), y de las subespecies morfológicas actualmente reconocidas. 1. *P. onca arizonensis*; 2. *P. onca centralis*; 3. *P. onca goldmani*; 4. *P. onca hernandesii*; 5. *P. onca onca*; 6. *P. onca paraguensis*; 7. *P. onca peruviana*; 8. *P. onca veraecrucis*. (Tomado de <http://www.geocities.com/RainForest/Canopy/8484> y modificado con las localizaciones propuestas para las subespecies de Seymour, 1989).

Por lo anterior, la Convención Internacional de especies de flora y fauna amenazadas, CITES, cita a *P. onca* en su Apéndice I en 1973, y la UICN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) la clasifica como especie vulnerable. Aunque en la actualidad se encuentra legalmente protegida por México, Brasil, Venezuela, Colombia, Perú y Bélize.

2.2 Los análisis poblacionales

Bajo este panorama, es decir la amenaza latente para este grandioso felino, y ante las dificultades que implica su comportamiento (hábitos nocturnos secretos, densos bosques

donde habita) en su estudio (bajo diferentes aproximaciones), la creciente necesidad de desarrollar trabajos que revelen un marco confiable del estado de vulnerabilidad, estructura de la especie y unidades más adecuadas para la consecuente toma de medidas a nivel de conservación, son fundamentales los estudios sistemáticos, a corto y a largo plazo, a diferentes escalas y multidisciplinarios. Como lo indican Sanderson *et al.* (2002), el jaguar requiere una perspectiva internacional (18 naciones), y en todos los escenarios biológicos en los que ocurre.

La aproximación al conocimiento del jaguar desde la genética de poblaciones se hace imprescindible para contribuir a la elaboración de ese marco de referencia con la posibilidad de inferir la variabilidad genética de las poblaciones; la estimación de los tamaños poblacionales y de los tamaños efectivos; de los tiempos de divergencia; la definición de las fuerzas que están incidiendo sobre la estructura poblacional como cuellos de botella o expansiones poblacionales; el número de acervos genéticos más probables de la población, la correspondencia entre las subdivisiones poblacionales taxonómicas establecidas morfológicamente y las encontradas a nivel genético, la distribución de la diversidad y su relación con la distribución geográfica, para el establecimiento de unidades de conservación y la resolución de incertidumbres taxonómicas, entre otros (O'Brien, 1994).

Con el propósito de encontrar los parámetros poblacionales anteriormente mencionados, ya se han realizado varios trabajos para el jaguar a amplia escala (Centro y Sudamérica) (Eizirik *et al.*, 2001; Ruiz-García, 2001) y en Colombia (Ruiz-García *et al.*, 2006). Los anteriores autores encontraron que la diversidad genética para el total de la población de jaguar es elevada, a partir de los resultados arrojados utilizando marcadores microsatélites con valores entre 0.74 (Eizirik *et al.*, 2001) y 0.85 (Ruiz-García *et al.*, 2006), y valores medios de diversidad genética mitocondrial (Eizirik *et al.*, 2001). Por otro lado los valores de heterocigosidad revelan desvío en la gran mayoría de los marcadores del Equilibrio Hardy-Weinberg y un exceso de homocigotos explicado posiblemente por efecto Wahlund o de subdivisión poblacional.

Con respecto al posible tamaño poblacional demográfico se tienen cálculos de 105.000 a 310.000 animales (Ruiz-García, 2001). Un alto flujo génico entre las poblaciones de este felino y la aparición de los linajes mitocondriales hace 280000 a 510000 años (Eizirik *et al.*, 2001), es decir, una reciente divergencia entre poblaciones, menor tiempo que el sugerido por los fósiles.

El análisis de los fenómenos históricos en todos los trabajos evidencia una expansión poblacional asociada con la dispersión por el continente americano. A partir de mtDNA, Eizirik *et al.* (2001), por ejemplo, encuentran un patrón de filogenia tipo estrella (star-phylogeny), con poca estructuración y ramas cortas, evidencia de expansión poblacional reciente. Y lo análisis cladísticos anidados sugieren un escenario de colonización norte-sur, aislamiento por distancia y flujo génico restringido entre las poblaciones del norte y del sur de la distribución del jaguar.

Los estimativos de parámetros poblacionales a través de métodos de coalescencia han demostrado ser altamente precisos. A partir de los trabajos de Griffith & Tavaré (1994), el empleo de éstos se hace común en genética de poblaciones. El modelo coalescente establece que los estados alélicos y las relaciones de todas las copias de los genes en una población están determinadas por su historia mutacional y genealógica, esta última es fácilmente deducible hacia atrás en el tiempo, de manera que teniendo en cuenta el pasado es posible obtener una gran cantidad de parámetros poblacionales de forma precisa, aunque el manejo matemático sea complejo (Balding *et al.*, 2001).

Ahora bien, la filogeografía (Avice, 1987) es una disciplina de la biogeografía de carácter integrador de varias disciplinas biológicas, que intenta develar los aspectos históricos de la distribución geográfica de los linajes genealógicos especialmente a nivel intraespecífico y de especies con subdivisiones taxonómicas (Avice, 1998). Los resultados se reflejan por medio de árboles de relaciones entre los genes y su modelo estadístico de análisis es la teoría de la coalescencia para el caso de taxones con procesos históricos conocidos y los métodos de análisis cladístico anidado (NCA, por sus siglas en inglés) para el caso de procesos históricos complejos (Knowles & Maddison, 2002)

Con respecto a la distribución geográfica de las subespecies y para observar la correspondencia entre ésta y la distribución de los acervos genéticos o de los linajes de la especie (filogeografía), de manera que sea posible asignar cualquiera de los individuos a su población de origen con una alta probabilidad de que ésta sea la correcta, es necesario realizar análisis de asignación poblacional y posteriormente inferir árboles de filogenia con los genotipos y sus lugares de procedencia geográficos. El análisis filogeográfico permite corroborar las divisiones morfológicas geográficas con las divisiones genéticas geográficas dentro de la población de estudio, pudiendo inferir qué tan reales son las primeras al ser comparadas con las segundas.

Eizirik *et al.* (2001) realizan un análisis filogeográfico de las poblaciones de jaguares con fines de conservación y no encuentran una estructuración geográfica fuerte, al igual que Ruiz-García *et al.* (2006). Además, los primeros plantean las barreras geográficas del río Amazonas y el tapón del Darién entre Sudamérica y Centroamérica como posibles barreras al flujo génico (aunque los segundos sólo concuerdan con el Darién), y reconocen a partir de los datos de microsatélites hasta máximo cuatro grupos geográficos incompletamente aislados de reciente origen. A su vez, a partir de los datos de DNA mitocondrial, sólo reconocen dos grupos. De manera que no se pueden apoyar las subdivisiones morfológicas como subespecies o unidades evolutivamente significativas (ESU's) de Moritz (1994). Los resultados son discutidos a la luz de alta capacidad de dispersión del jaguar y la reciente expansión poblacional de la especie.

Por su parte Luo *et al.* (2004) mostraron como a partir de 40Kb de DNA mitocondrial, del gen DRB del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, y 30 loci microsatélites, que de las ocho subespecies tradicionalmente reconocidas para el tigre, especie altamente amenazada de extinción, se proponen seis unidades taxonómicas o subespecies filogeográficamente definidas, y una fuerte subestructura en una de las subpoblaciones.

2.3 El DNA mitocondrial:

Dependiendo de las necesidades y de los resultados esperados, el tipo de marcador molecular a emplear en estudios filogeográficos varía, de manera que el DNA mitocondrial ofrece ventajas necesarias como lo son: su alta tasa de evolución y la ausencia de recombinación, el modo de herencia materna que permite que los polimorfismos que ocurrieron miles de años atrás se presenten todavía en altas frecuencias y, finalmente, el alto número de copias con las que se presenta dentro de la célula, aunque no sea muy variable como otros marcadores (Hwang & Kim, 1999).

Como es conocido para el genoma de los panterinos se presenta una gran traslocación de 12.586 Kb de mtDNA en la región telomérica del brazo Q del autosoma F2 (Kim *et al.*, 2006), al igual que ocurre una translocación de 7.9 Kb y de origen independiente en el linaje del gato doméstico (género *Felis*) (López *et al.*, 1994), estos *Numts* se cree que se dan precombinación no homóloga entre el DNA genómico y el mitocondrial (Roth *et al.*, 1985), y en muchos casos dificulta el trabajo con genes mitocondriales al presentarse coamplificación con los seudogenes nucleares. Sin embargo el diseño de iniciadores específicos para segmentos mitocondriales en el caso del tigre (Luo *et al.*, 2004) ayuda a sobrepasar estos inconvenientes.

3. Formulación del problema y justificación

La disminución del rango de distribución junto con la del tamaño de las poblaciones del jaguar por la creciente amenaza que representaron desde principios del siglo XX las actividades humanas, son un grave problema para esta especie. Entre estas actividades se tienen: la caza comercial de las pieles (muy fuerte hasta 1975), la deforestación y fragmentación de su hábitat, que implica a su vez la disminución del alimento, la interrupción del flujo génico, el aumento de la probabilidad de ser encontrados por los cazadores, la caza para alimentación humana y la muerte por confrontación con humanos por los ataques de los felinos al ganado. Esta última amenaza ocasionó la desaparición del Jaguar de los Estados Unidos y del norte de México hacia 1950 (Ruiz-García, 2001; Treves and Karanth, 2003). Esto motivó su actual clasificación en el apéndice I del CITES y como especie vulnerable para la IUCN. Lo que evidencia el estado de amenaza en el que se encuentra este gran felino.

Bajo este panorama, y ante las dificultades que implica su comportamiento (hábitos nocturnos secretos, densos bosques donde habita) en su estudio (bajo diferentes aproximaciones), se hace necesario desarrollar trabajos que revelen un marco confiable del estado de vulnerabilidad, estructura de la especie y unidades más adecuadas para la consecuente toma de medidas a nivel de conservación; son fundamentales los estudios sistemáticos, a corto y a largo plazo, a diferentes escalas y multidisciplinarios. Como lo indican Sanderson *et al.* (2002), el jaguar requiere una perspectiva internacional (18 naciones), y en todos los escenarios biológicos en los que ocurre.

La aproximación al conocimiento del jaguar desde la genética de poblaciones y la filogeografía se hace imprescindible para contribuir a la elaboración de ese marco de referencia con la posibilidad de inferir la variabilidad genética de las poblaciones, de estimar los tamaños poblacionales, tamaños efectivos y los tiempos de divergencia, de definir las fuerzas que están incidiendo sobre la estructura poblacional como cuellos de botella o expansiones poblacionales, de establecer el número de acervos genéticos más probables de la población y su ubicación geográfica, y la correspondencia entre las subdivisiones poblacionales taxonómicas establecidas morfológicamente y las encontradas a nivel genético, para el establecimiento de unidades de conservación y la resolución de incertidumbres taxonómicas, entre otros (O'Brien, 1994).

El empleo de métodos estadísticos basados en la teoría de coalescencia se han mostrado muy precisos y de amplio uso desde los estudios de Griffith & Tavaré (1994) y su empleo sería eficaz para analizar el estado genético de las poblaciones de *P. onca*. Por su parte los datos arrojados a partir de haplotipos de DNA mitocondrial pueden revelar la historia evolutiva de los linajes matrilineales y arrojar datos sobre los eventos históricos que han moldeado la estructura genética de la especie. Complementariamente los estudios filogeográficos pueden mostrar las relaciones de filogenia desde un marco geográfico, para poder comparar las subdivisiones genéticas con las subespecies morfológicas actuales.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la diversidad y estructura genética de las poblaciones de jaguar en Centroamérica, Colombia, Perú y Bolivia, teniendo en cuenta las secuencias mitocondriales del NDH5?

¿Corresponden las subdivisiones genéticas y su distribución geográfica, con las subespecies morfológicas actuales de *P. onca*?

Hipótesis de investigación

Existe correspondencia entre las subdivisiones genéticas y las subespecies morfológicas actuales de *P. onca*, en la región geográfica estudiada.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Establecer diversos parámetros genético poblacionales y aspectos de la filogeografía a partir de datos de DNA mitocondrial (NDH5) del jaguar (*Panthera onca*) en poblaciones de Colombia, Perú, Bolivia, Guatemala y Costa Rica.

4.2 Objetivos específicos

- Estimar la diversidad genética y la estructura poblacional para una muestra de 37 *P. onca* analizados por diferentes métodos.
- Comparar la estructura poblacional encontrada a partir de los datos del DNA mitocondrial con las subespecies morfológicas.
- Contribuir al marco de referencia sobre el estado de las poblaciones del jaguar para fines de conservación.

5. Materiales y métodos

5.1. Muestras

A partir de un total de 37 muestras de diferentes tipos, sangre, piel, diente, y pelo (tabla 1) provenientes de jaguares con origen geográfico definido en su mayoría y algunos desconocido, y de regiones que abarcan buena parte del rango de distribución de la especie, Amazonía peruana y colombiana, Llanos colombianos, Costa Atlántica colombiana, Costa Rica, Guatemala, Amazonas boliviano (figura 2), fue extraído el DNA mitocondrial a partir de diferentes procedimientos dependiendo del tipo de muestra. Las muestras fueron obtenidas en diferentes salidas de campo realizadas por Manuel Ruiz y colaboradores, procedentes de animales cautivos en diferentes instituciones.

Tabla 1: Descripción de las muestras de *Panthera onca* utilizadas.

Hap.	Grupo	Nº	Tipo de muestra	Región	País
1	Bolivia	201	piel	Mercado de las brujas	Bolivia
2	Amazonas	74	piel	Río Marañón	Perú
3	Indefinido	207	sangre	Zoo. Jaime Duque	Colombia
4	Llanos	8	sangre	Zoo. Santa Cruz	Colombia
4	Llanos	166	DNA	Colección I. Humboldt	Colombia
5	Llanos	1	sangre	Zoo. de Barranquilla	Colombia
6	Indefinido	205	sangre	Zoo. Jaime Duque	Colombia
7	Indefinido	6	sangre	Zoo. Santa Cruz	Colombia
7	Indefinido	3	sangre	Zoo. de Barranquilla	Colombia
7	Indefinido	32	DNA	Jaime Duque (F. Nassar)	Colombia
8	Llanos	4	sangre	Zoo. Santa Cruz	Colombia
9	Amazonas	7	sangre	Zoo. Santa Cruz	Colombia
10	Amazonas	10	sangre	Zoo. Cali	Colombia
11	Amazonas	104	piel	Requena, río Ucayali	Perú
12	Bolivia	143	piel	Río Yatá	Bolivia
13	Bolivia	153	tejido	20 de Enero, río Mamoré	Bolivia
14	Llanos	173	DNA	Guainía, río Isana	Colombia
15	Bolivia	200	piel	La Paz	Bolivia
16	Amazonas	206	sangre	Zoo. Jaime Duque	Colombia
17	C. América	218	piel	Sierra Nevada	Colombia
18	Amazonas	11	sangre	Zoo. de Cali	Colombia
19	Amazonas	12	sangre	Zoo. de Cali	Colombia
20	Amazonas	96	piel	Iquitos	Perú
21	Amazonas	106	piel	Iquitos	Perú
22	Bolivia	113	piel	VillaBella	Bolivia
23	Llanos	187	DNA	Colección I. Humboldt	Colombia
24	Bolivia	195	diente	La Paz	Bolivia
25	Bolivia	203	piel	Mac Breys, La Paz	Bolivia
26	C. América	227	piel	Lago Atitlán	Guatemala
27	Llanos	186	DNA		Colombia
28	Indefinido	208	sangre	Zoo. Jaime Duque	Colombia
29	Amazonas	73	piel	Sta. Clotilde, río Napo	Perú
30	Amazonas	75	piel	Yaguas	Perú
31	Amazonas	95	piel	Boras, Iquitos	Perú
32	C. América	162	pelo	Zoo. San José	Costa Rica
33	Indefinido	184	DNA		
34	Llanos	230	piel	Vichada, río Vila	Colombia

Hap.= Haplotipo; Nº= número que identifica cada muestra

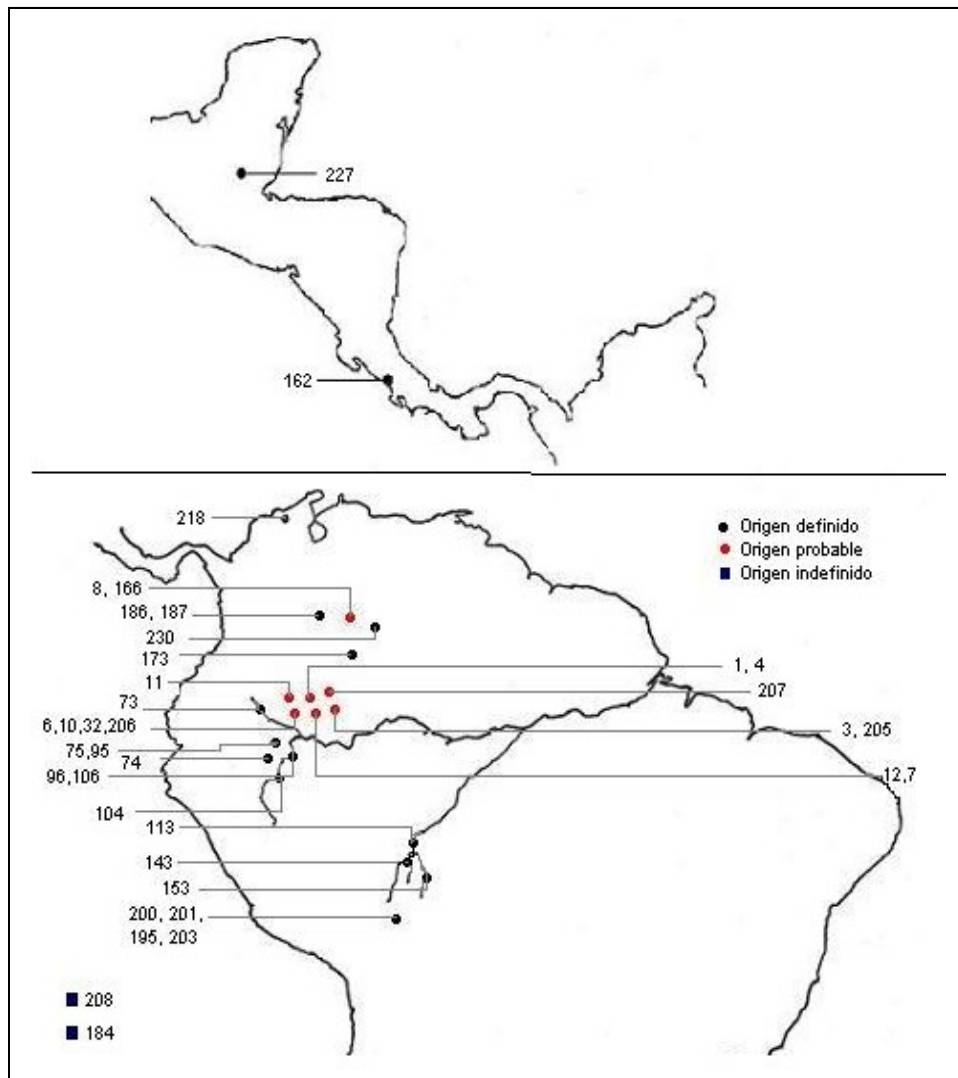


Figura 2: Mapa de la ubicación geográfica de las muestras de jaguar. Los puntos negros son las muestras de las que se conoce con certeza su procedencia geográfica, los rojos son muestras de las que no se tiene certeza de su origen pero se supone a partir de los datos moleculares, los cuadrados representan las muestras de las que definitivamente no se puede establecer su origen. Las líneas unen los puntos con el número de cada muestra.

5.2. Procedimientos de laboratorio

Las muestras de sangre fueron preservadas en EDTA disódico (protocolo en anexos), las de piel adheridas a otros tejidos en Etanol absoluto, y las de animales muertos en bolsas plásticas (protocolo en anexos); las de pelo con bulbo fueron guardadas en bolsas plásticas y las de dientes también; todas fueron mantenidas a -20° C para su posterior extracción. El DNA proveniente de sangre, piel, tejido y médula dental fue extraído por un procedimiento estándar con solventes orgánicos (fenol-cloroformo) (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras de pelo fueron procesadas por el método de extracción con CHELEX® 100 (Sean *et al.*,

1991) (anexos). Posteriormente se verificó la extracción a través de electroforesis en geles de agarosa al 3%.

La amplificación del DNA en una región de 506 pb del gen mitocondrial NADH subunidad 5 (NDH5) se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para DNA genómico en un Termociclador icycler™ Biorad de la siguiente manera: Una denaturación inicial por 10 min a 95° C; seguida de 35 ciclos de tres pasos: denaturación inicial por 35 s a 95° C, seguida de anillamiento por 30 s a 52° C y finalmente, extensión por 45 s a 72° C; y terminando con una extensión por 10 min a 72° C.

Para una reacción de 25 µl de volumen final, fueron agregados 2.0 µl de DNA genómico (proveniente de sangre y piel), 2.0 µl de Buffer, 2.0 µl de MgCl, 2.0 µl de Mix de dNTP's (dNTP Mix Promega 4.0mM), 1.0 µl de cada uno de los iniciadores, especialmente diseñados para la amplificación de segmentos mitocondriales (Luo *et al.*, 2004) y 1.0 µl de Taq polimerasa (Tucantaq, Corpogen Biotecnología de Colombia). Para el caso de muestras de pelo y diente se utilizó un volumen final de reacción de 50 µl con el doble de las cantidades anteriormente mencionadas. La verificación de los productos de PCR fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular. Las secuencias de los iniciadores son: corriente arriba, 5' CCT TGT CTT CCT GCA TAT CTG 3'; y corriente abajo, 5' CCA TTG GAA AGT ACC CGA GGA GGT 3'.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos de la cadena por MACROGEN Inc. Una vez recibidas las secuencias, se llevaron a Blastn para verificar por homología que se trataran del NDH5 mitocondrial, y posteriormente se contrastaron con secuencias mitocondriales referencia de tigre y de león y nuclear de tigre del GenBank, para asegurar que se trataran de secuencias mitocondriales.

Las secuencias fueron editadas manualmente con BioEdit (Hall, 1997) y posteriormente se realizó el alineamiento de todas las secuencias de jaguar y las secuencias homólogas del tigre y el león empleadas para los posteriores análisis como grupos externos en forma manual y empleando Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997), en los sitios de ambigüedad se decidió emplear la versión manual.

5.3. Análisis estadísticos

- Análisis genético-poblacionales

A partir de las 506 pb de las 37 secuencias alienadas fue analizada la composición nucleotídica en % de cada una de las bases A, T, C y G y se encontraron las frecuencias de cada par nucleotídico, ii: pares idénticos, si: pares transicionales, pares transversionales sv, radio transición / transversión R, a través del programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

A partir del software DNAsp4.10.6 (Rozas *et al.*, 1999) fueron encontrados el número de haplotipos h , sitios segregantes o polimórficos S , el número de sitios parsimoniosamente informativos, el número de mutaciones η , y k el número promedio de diferencias nucleotídicas (Tajima, 1983):

$$k = \sum_{ij} k_{ij} / \binom{n}{2}$$

La diversidad haplotípica Hd y su varianza (Nei, 1987):

$$Hd = n \left(1 - \sum x_i^2 \right) / (n-1) : V_{(h)} = \left(\frac{n}{n-1} \right)^2 V \left(\sum \hat{x}_i^2 \right)$$

La diversidad nucleotídica π definida como el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias, y su varianza estan dadas por (Nei 1987):

$$\pi = \sum_{i < j} \pi_{ij} / n_c$$

$$V(\pi) = \frac{4}{n(n-1)} \left[(6-4n) \left\langle \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij} \right\rangle^2 + (n-2) \sum x_i x_j x_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}^2 \right]$$

donde n_c es el total de comparaciones y π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre dos secuencias i y j . También se calculó la diversidad nucleotídica de Jukes–Cantor π_{JC} , igual a la anterior pero con la corrección de Jukes–Cantor en cada comparación descrita por Lynch & Crease (1990, ec. 1-2).

Empleando el mismo software y con el propósito de evaluar qué tan divergentes son las poblaciones entre sí y los valores de flujo génico para el total de la población, se obtuvieron los estadísticos D_a (Nei, 1987 ec. 10.23) que es el número neto de sustituciones por sitio y

D_{xy} , el número promedio (Nei, 1987, ec. 10.20); y los valores de H_s = diferenciación haplotípica entre las poblaciones y H_{st} para el total de la población y que se define así:

$$H_{st} = 1 - \left(\frac{H_s}{H_t} \right)$$

y los valores de K_s = diferenciación asociada a las secuencias:

$$K_s = wk_1 + (1 - w)k_2$$

donde $w = n_1 / n_1 + n_2$ (Hudson y col., 1992). También fueron obtenidos los índices F_{st}

(Hudson *et al.*, 1992) para un modelo isla; la G_{st} de Nei (1973) para datos haplotípicos, la N_{st} de Lynch & Crease (1990), δ_{st} y γ_{st} de Nei (1982) para datos provenientes de secuencias de manera que se pudieran obtener los valores de flujo génico respectivos a cada uno de estos índices. Las poblaciones fueron organizadas por su ubicación geográfica en cinco grupos: 1. Bolivia: conformado por muestras bolivianas; 2. Amazonas: que involucra muestras de la Amazonía colombiana y peruana; 3. Llanos: encierra las muestras provenientes de los Llanos colombianos; 4. C. América: conformados por muestras centramericanas y de la costa Atlántica de Colombia; y 5. Indefinido: en el que se agrupan las muestras de las que no se conoce su origen geográfico con precisión.

Los análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), fueron obtenidos con ARLEQUIN 3.1 (Schneider y *et al.*, 1997) para establecer cómo se encuentra estructurada la población y estimar el porcentaje (%) de variación debido a cada nivel poblacional, y para encontrar los índices de fijación de Weir & Cockerham (1984) F_{ct} (asociada a la variación entre grupos), F_{st} (asociada con la variación dentro de poblaciones), y F_{sc} (asociada a la variación entre poblaciones dentro de grupos) y su significancia estadística con 1000 permutaciones, para cada uno de dos escenarios: 1. con tres grupos que serían primero, el grupo Bolivia, segundo, el grupo C. América y tercero, el grupo conformado Llanos + Amazonas + Indefinido; 2. con dos grupos, C. América y Bolivia + Amazonas + Llanos + indefinido. Los índices están definidos así:

$$F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}; F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} \text{ y } F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

La posible asociación no azarosa entre sitios polimórficos con respecto a la distancia física dentro del gen fue evaluada con dos estadísticos para mirar la asociación genética total entre sitios polimórficos obteniendo el promedio de R^2 sobre todos los pares de comparaciones entre sitios Z_n (Kelly, 1997), y entre sitios polimórficos adyacentes, Z_a (Rozas y col., 2001), que son respectivamente:

$$Z_n = \frac{2}{s(s-1)} \sum_{i=1}^{s-1} \sum_{j=i+1}^s r_{i,j}^2 \text{ y } Z_a = \frac{1}{s-1} \sum r_{i,i+1}^2$$

donde S = número de sitios polimórficos y r_{ij} = entre los sitios i y j . Estos estadísticos son probados con el test exacto de Fisher, el procedimiento de Bonferroni y el test de Chi-cuadrado (Sokal & Rohlf, 1981). Por su parte los determinantes de desequilibrio de ligamiento propiamente dicho D y D' (Lewontin, 1964):

$$D = x_0x_3 - x_1x_2, \text{ donde } x_i \text{ son las frecuencias de cada tipo de alelo, y relativo } D' = \frac{D}{e_{\text{máx}}},$$

donde $e_{\text{máx}}$ es la máxima desviación real de la frecuencia gamética real del equilibrio. Las ecuaciones de regresión fueron obtenidas para los valores absolutos de D y D' y R^2 (Sokal & Rohlf, 1981).

Con el propósito de averiguar si se han presentado cambios en el tamaño poblacional del jaguar, se empleó el software DNAsp4.10. (Rozas *et al.*, 1999) bajo dos hipótesis nulas y dos tipos de datos, el número de comparaciones por pares (pairwise N° of differences) y el número de sitios segregantes S , métodos basados en la teoría de la coalescencia. Bajo la primera hipótesis de tamaño constante, se obtuvo la gráfica de la distribución del número de diferencias (mismatch) por pares k , observados y los valores esperados bajo la hipótesis nula (Watterson, 1975) y el índice r que cuantifica lo llano de la curva. También se graficaron la distribución de la frecuencia de sitios segregantes observada y esperada (Tajima, 1989).

Bajo la segunda hipótesis de cambios en el tamaño poblacional se encontraron también k , r y r^2 y se elaboró la curva de distribución mismatch basándose en tres parámetros de θ que es igual a $2Nu$, el número de diferencias por pares esperado, y N = N° de individuos haploides y u es la tasa de mutación θ inicial (antes del evento de crecimiento o

decrecimiento), θ final (después del evento) que se deja como infinita y $t = 6.136$ que es la fecha en tiempo mutacional (Rogers & Harpending, 1992, ec. 4).

El espectro de la frecuencia de sitios segregantes observados y esperados, $S_{n(t)}$ = número esperado de sitios segregantes entre n secuencias de DNA en la generación t después de un crecimiento o decrecimiento (Tajima, 1989) fue graficado pero contra el tiempo en generaciones, y se encontraron los mismos estadísticos que en el caso anterior.

La presencia de selección natural sobre el gen en estudio fue evaluada mediante el test de Fu & Li (1993), D^* , basado en las diferencias entre η^S (n° total de singletons) y η (n° total de mutaciones) y el test de Fu, F^* , basado en la distribución condicional de la frecuencia haplotípica θ ,

$$D^* = \frac{\left(\frac{n}{n-1}\right)\eta - a_n \eta^S}{\sqrt{u_{D^*} \eta + v_{D^*} \eta^2}} \quad \text{y} \quad F^* = \frac{\prod_n - \frac{n-1}{n} \eta^S}{\sqrt{u_{F^*} \eta + v_{F^*} \eta^2}}$$

ó basados en S (n° de sitios segregantes) (Simonsen y col., 1995, ec. 9-10). También se aplicó el test de Tajima (1983, ec. A3) que tiene los mismos supuestos, también a partir de η y de S .

Las distancias genéticas entre poblaciones y dentro de poblaciones fueron encontradas a partir de varios modelos: número de diferencias, que es el número de diferencias nucleotídicas entre dos individuos de dos poblaciones; la distancia p que se obtiene dividiendo este número de diferencias en el total de sitios comparados (Nei & Kumar, 2000); La distancia Jukes-Cantor (1969) que corrige para múltiples aciertos; La distancia de 2 parámetros de Kimura (1980) que además toma en cuenta las tasas de sustitución transicional y transversional y la diferencia en las frecuencias de los cuatro nucleótidos; La distancia de Tajima-Nei que asume las diferentes frecuencias nucleotídicas alejadas del 0.25; La distancia de 3 parámetros de Tamura que además tiene en cuenta las diferencias en el contenido G+C (Nei & Kumar, 2000); La de Tamura-Nei (1993) que distingue además las tasas transicionales entre purinas y transversional entre pirimidinas; Y la distancia Log Det (Tamura and Kumar, 2002) que asume patrones de sustitución heterogénea entre linajes.

- Análisis de Filogenia

Las relaciones entre las muestras fueron dilucidadas a través de árboles de filogenia empleando dos métodos, el de distancias genéticas implementado en Mega 3.1 (Kumar y col., 2004) y el de parsimonia implementado en PAUP (Swafford, 1999). Bajo los supuestos de Mínima evolución, Neighbor-Joining y UPGMA se obtuvieron los respectivos árboles consenso por la distancia de 2 parámetros de Kimura (1980). Para los métodos de máxima parsimonia se empleó el método heurístico y se obtuvieron fenogramas de dos maneras: Branch Swapping, Tree Bisection-Reconnection y Stepwise Addition-closest, se obtuvieron los árboles consenso de la regla de la mayoría (Majority rule), el soporte de las ramas con 1000 repeticiones bootstrap.

La red de unión entre los haplotipos encontrados fue construida con el programa Network 4.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd. disponible en <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) y la metodología Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999) y los tiempos de divergencia fueron estimados a partir de la opción "time estimates" empleando el estadístico rho (Forster y col., 1996), y escogiendo un haplotipo ancestral y señalando a todos los demás como sus descendientes; Se emplearon dos tasas de mutación. La tasa para el DNA mitocondrial humano en el fragmento np16090-16365, de una mutación cada 20180 años; y una tasa calculada a partir de la tasa de mutación propuesta por Eizirik *et al.*, (2001) para la región control del DNA mitocondrial del jaguar de una mutación cada 5208 años.

6. Resultados

6.1. Diversidad genética

Una vez realizada la edición y el alineamiento de las secuencias del gen NDH5 mitocondrial fueron empleadas 506 pb para su análisis. De 37 secuencias fueron encontrados 34 haplotipos (tabla 1). El haplotipo 7 fue el más común presente en tres individuos de presunto origen amazónico (individuos 3, 6, 32), seguido del haplotipo 4 que define dos individuos de un mismo origen geográfico, los llanos colombianos (166 y 8). Los haplotipos fueron definidos por 278 sitios polimórficos o segregantes (S), 136 sitios parsimoniosamente informativos y 414 mutaciones (η).

La composición nucleotídica para el total de las secuencias es de 30.5% de C, 30.7% de A, 24.5% de T, y 14.2% de G, con un total de 17 transiciones y 25 transversiones para un radio transición / transversión de 0.7 (Tabla 2). Para el total de la muestra se tiene una diversidad nucleotídica de media a alta ($\pi = 0.083$) y una muy alta diversidad haplotípica ($H_d = 0.994$) al tener en cuenta tanto el número total de mutaciones como el número de sitios segregantes.

Los valores de diversidad por grupos se presentan en la tabla 3. Los más altos en cuanto a diversidad nucleotídica los presenta el grupo centroamericano, lo que confirma que es el grupo más heterogéneo (aunque es el de menor tamaño muestral) seguido del grupo de origen geográfico indefinido, lo que es de suponerse si en este se encuentran individuos provenientes de diferentes orígenes geográficos; La diversidad haplotípica más baja se encuentra en el grupo de los llanos y en el de origen indefinido.

Tabla 2. Frecuencias nucleotídicas por pares.

Comp	ii	si	sv	R	TT	AA	CC	GG	TC	TA	TG	CA	CG	AG	Total
									CT	AT	GT	AC	GC	GA	
Prom	464	17	25	0.7	113	146	142	62	7	4	2	3	2	2	506
									3	2	3	4	6	5	

ii: pares idénticos; si: pares transicionales; sv: pares tranversionales; R: si/sv.Comp: comparación;

Prom: promedio

Tabla 3: Estadísticos diversidad genética por poblaciones y para el total de la muestra

Población	S	η	π (var)	π_{JC}	H p	Hd (var)	k
Bolivia	57	65	0.044 (0.0001)	0.045	7	1.000 (0.006)	22.095
Amazonperucol	151	189	0.087 (0.0004)	0.098	12	1.000 (0.001)	44.864
LLanoscol	99	109	0.060 (0.0003)	0.064	7	0.904 (0.006)	30.429
Centralis	110	114	0.148 (0.0031)	0.169	3	1.000 (0.074)	74.667
Otroscol	158	178	0.105 (0.0019)	0.123	5	0.857 (0.001)	53.286
Población total	278	414	0.083 (0.0002)	0.093	34	0.994 (0.001)	42.096

S: número de sitios segregantes; η : número de mutaciones; π : diversidad nucleotídica; π_{JC} : diversidad nucleotídica Jukes-Cantor; Hp: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; k: número promedio de diferencias nucleotídicas; var: varianza.

6.2 Divergencia de DNA entre poblaciones y flujo génico

Bajo la hipótesis nula de que las poblaciones no son diferentes genéticamente, se obtuvieron varios estadísticos (Tabla 4) a nivel de diferenciación genética. Los valores promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio, Dxy, y el número neto de sustituciones por sitio Da, son bajos en todos los casos. Teniéndose que las poblaciones menos diferenciadas o más parecidas son Bolivia y Llanos colombianos, seguidas de Bolivia y Amazonas Perú-Colombia; y las más diferenciadas entre sí son la del Amazonas peruano-colombiano respecto a la de Centroamérica, seguido de la pareja llanos colombianos-Centroamérica.

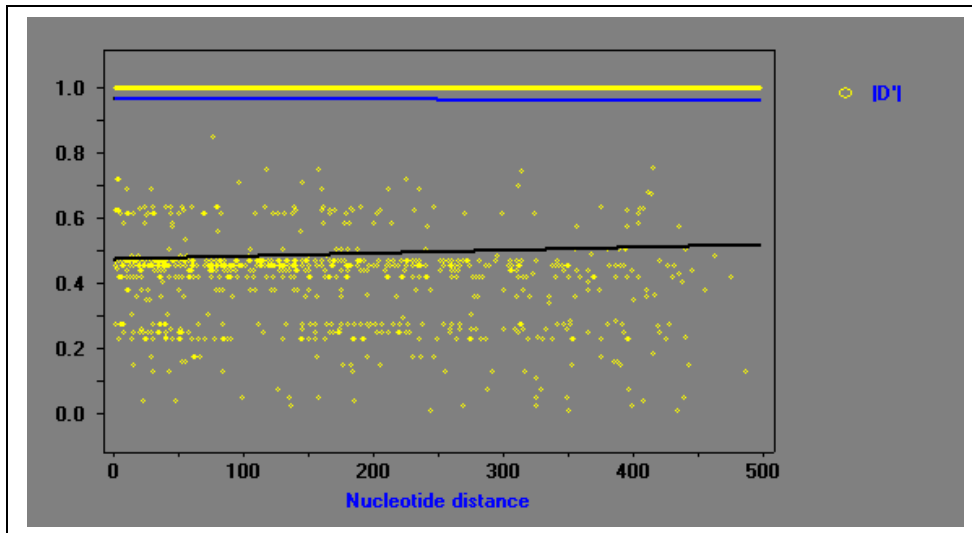
En cuanto a la diferenciación asociada a la variabilidad haplotípica para la población total ($H_{st} = 0.00746$), y a la variabilidad de las secuencias ($K_{st} = 0.105$), se tiene valores bajos y no significativos estadísticamente, que no permiten rechazar la hipótesis nula, por lo que se puede establecer que las poblaciones del jaguar no son diferentes entre sí para el gen estudiado. Por su parte los estadísticos de heterogeneidad a partir de los que se puede establecer el flujo génico entre las poblaciones como la G_{st} de Nei (1973) para datos haplotípicos, los métodos de δ_{St} y γ_{St} (Nei, 1982) para información a partir de las secuencias, la N_{st} de Lynch and Crease (1990) y la F_{st} de Hudson et al (1992) para un modelo isla de estructura poblacional, son congruentes en valores bajos de diferenciación y de flujo génico muy alto, $N_m (G_{st}) = 30$ individuos por generación, $N_m (\delta_{St}) = N_m (\gamma_{St}) = 3.19$ individuos por generación, $N_m (N_{st}) = 21$ individuos por generación y $N_m (F_{st}) = 28$ individuos por generación.

Tabla 4: Diferenciación genética y flujo génico entre todas las poblaciones del jaguar

Población 1	Población 2	Hs	Ks	Gst	δSt	γSt	Nst	Fst	Dxy	Da
Bolivia	Amazonas	1,000	36,475	0,004	0,005	0,07	0,057	0,053	0,07	0,004
Bolivia	Llanos	0,981	26,54	0,009	0,003	0,065	-0,009	-0,009	0,051	-0,001
Bolivia	C. América	1,000	37,867	0,019	0,012	0,178	0,017	0,01	0,097	0,001
Amazonas	Llanos	0,987	39,09	0,011	0,005	0,069	0,050	0,042	0,078	0,003
Amazonas	C. América	1,000	50,824	0,036	0,009	0,094	0,000	-0,008	0,117	-0,001
Llanos	C. América	0,969	42,494	0,03	0,012	0,158	0,031	0,023	0,106	0,003

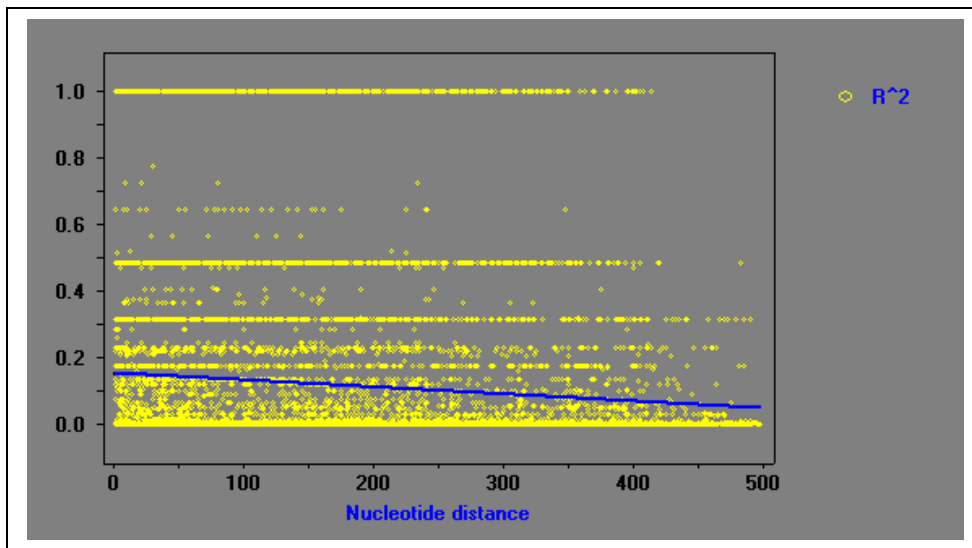
6.3 Desequilibrio de ligamiento

No se evidenció asociación estadísticamente significativa entre sitios polimórficos diferentes significativa, ni con respecto a la distancia física. Únicamente 880 de las 13 041 comparaciones por pares es decir, el 7%, evaluadas con el test de Fisher y el de Chi cuadrado (Sokal & Rohlf, 1981) mostraron ser significativos, pero no existe relación entre estos o con la distancia física (Figura 3). Además los valores de los estadísticos de Kelly (1997) ($ZnS = 0.1198$), y Rozas *et al.* (2001) ($Za = 0.1933$; $ZZ = 0.0734$), que evalúan la asociación genética entre el total de sitios polimórficos, y entre sitios polimórficos adyacentes respectivamente, muestran valores muy bajos, es decir muy poca correlación entre el polimorfismo y la ubicación dentro de la secuencia. Las ecuaciones de regresión lineal entre los estadísticos determinantes del desequilibrio gamético exacto, (D), y relativo (D') (Lewontin, 1964), con respecto al máximo valor posible para la muestra, el coeficiente de correlación r^2 (Sokal & Rohlf, 1981) y la distancia física en Kb, muestran una muy baja correlación entre estas variables (figuras 3 y 4).



Ecuación de regresión: $Y = 0,9693 - 0,0177X$

Figura 3. Gráfica de Regresión entre el desequilibrio de ligamiento relativo ($[D']$) y la distancia física nucleotídica. En azul: $[D']$. En negro: excluyendo los $[D'] = 1$ (+1 y -1). Para las ecuaciones Y es el valor del respectivo estadístico del desequilibrio de ligamiento y X es la distancia nucleotídica.



Ecuación de regresión: $Y = 0,1549 - 0,2127X$

Figura 4. Gráfica de regresión entre los valores del coeficiente de correlación R^2 y la distancia nucleotídica.

6.4. Estructura poblacional:

- Análisis de la variabilidad entre poblaciones

El análisis molecular de la varianza (Excoffier *et al.*, 1992) fue realizado teniendo en cuenta tres grupos (tabla 5) de la población total, el primero comprendido por organismos

pertenecientes a la subespecie *P. onca centralis*, el segundo por individuos de la subespecie *P. onca onca* ubicados en Colombia y Perú y el tercero de esta misma subespecie pero localizados en la amazonía boliviana, de acuerdo con las agrupaciones encontradas con los resultados previos. El mayor porcentaje de variación es responsabilidad de la variación entre individuos dentro de las poblaciones, mientras que no existe prácticamente diferencia entre los grupos asignados, y muy poca entre las poblaciones dentro de los grupos (en el caso del grupo colombo-peruano son tres: llanos, amazonía y otros de origen indeterminado).

Estos mismos análisis fueron realizados pero teniendo en cuenta únicamente dos grupos (tabla 6) correspondientes a cada una de las subespecies estudiadas, y con ubicaciones geográficas bien diferenciadas, el primero es el grupo centroamericano igual al anterior, y el segundo es el grupo, que encierra a los grupos Amazonas, Bolivia y Llanos. En este análisis la mayor variabilidad está dada por las diferencias entre individuos sin importar el grupo o la subpoblación en la que se encuentren, pero aumenta el porcentaje de variación asociado a los grupos, es decir que a este nivel macro se puede observar una mayor diferenciación entre los haplotipos.

Tabla 5: Análisis molecular de la varianza (Amove) con la distancia de Kimura 2-p entre 3 grupos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	58.519	0.20748 Va	0.87
Entre poblaciones dentro de grupos	2	61.024	0.89069 Vb	3.74
Dentro de poblaciones	32	727.251	22.72660 Vc	95.39
Total	36	846.794	2.382.477	

Tabla 6: Análisis molecular de la varianza (Amove) con la distancia de Kimura 2-p entre 2 grupos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	42.302	3.32132 Va	12.58
Entre poblaciones dentro de grupos	3	77.240	0.36242 Vb	1.37
Dentre de poblaciones	32	727.251	22.72660 Vc	86.05
Total	36	846.794	2.641.034	

Los índices de fijación $F's$ de Weir & Cockerham (1984) basados en los componentes de varianza, dan valores bajos y no significativos para el caso con tres grupos (tabla 7), es decir de poca estructuración genética en cada uno de los niveles analizados. Para el caso de dos grupos estos valores aumentan un poco pero ninguno alcanza a ser significativo (Tabla 8).

Tabla 7: Significancia de los índices de fijación $F's$ para tres grupos

Componentes de varianza	F	p-value
Entre pob. dentro de grupos (Fsc)	0.03771	0.11437+-0.00991
Dentro de poblaciones (Fst)	0.04609	0.07331+-0.00864
Entre grupos (Fct)	0.00871	0.50538+-0.01723

Tabla 8: Significancia de los índices de fijación $F's$ para dos grupos

Componentes de varianza	F	p-value
Entre pob. dentro de grupos (Fsc)	0.01570	0.06256+-0.00702
Dentro de poblaciones (Fst)	0.13948	0.07820+-0.00930
Entre grupos (Fct)	0.12576	0.18671+-0.00923

- Detección de cambios en el tamaño poblacional:

Bajo la hipótesis de un tamaño poblacional constante a lo largo del tiempo para el total de la población de jaguares se aplicaron dos análisis. A partir del número de diferencias por pares de comparaciones ($K= 42.096 \pm 1335.2$) (Watterson, 1975) se tiene que la distribución de los valores observados para la muestra tienden a formar la misma curva que los valores esperados, no pudiéndose establecer que la población haya cambiado su tamaño;

igualmente la distribución de la frecuencia de sitios segregantes (sitios polimórficos) (Tajima, 1989a) $S = 278$, se ajusta a la forma esperada para un tamaño constante (Figura 5).

Por otra parte ante una hipótesis de cambios en el tamaño poblacional durante el tiempo, y bajo el análisis de pares de comparaciones (Rogers & Harpending, 1992) las distribuciones de las frecuencias observadas y esperadas son muy similares ajustándose mejor que en el caso anterior en cuanto a su línea de tendencia (Figura 6) y soportándose la hipótesis nula, presentándose un pico inicial bastante pronunciado y la parte derecha de la gráfica con poca pendiente. También existe ajuste entre las distribuciones esperadas y observadas de los sitios segregantes (Tajima, 1989b) en la segunda parte de la figura 7, y no se observa ningún descenso en la distribución de manera que no hay evidencia de cuellos de botella. Por el contrario es posible que se haya presentando una expansión poblacional (valores observados por encima de los esperados) en algún momento al comienzo de la historia del jaguar (mitad izquierda de la figura), en la que se ajustan mejor los valores observados con los esperados.

Por su parte el estadístico r presenta valores muy bajos ($r = 0.0041$) lo que indica que las curvas obtenidas son bastantes puntiagudas, formando picos altos, como se observa en la figura 5 y 6, indicativo de un cambio expansivo en el tamaño poblacional seguido de una tendencia hacia el equilibrio con tamaños poblacionales grandes (línea derecha de la gráfica con poca pendiente).

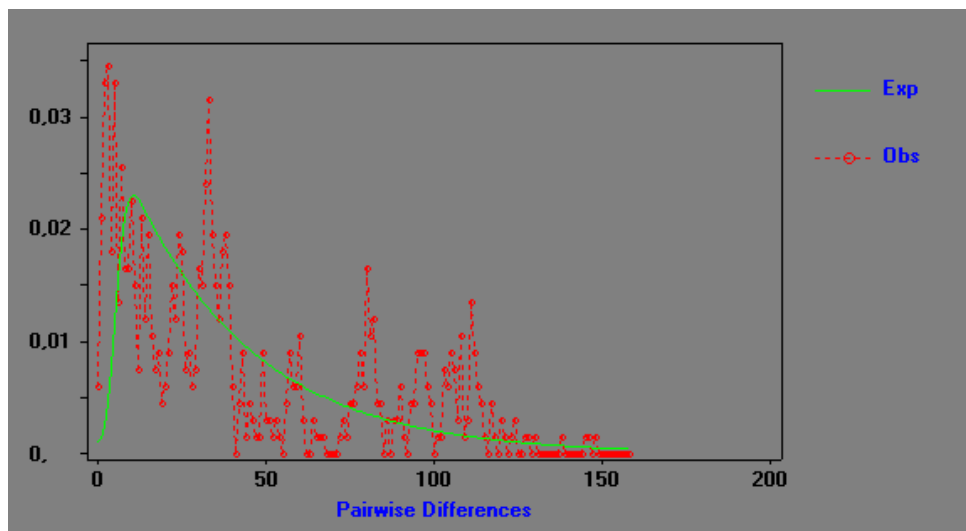


Figura 5: Distribución de las frecuencias observadas (Obs) y esperadas (Esp) del número de diferencias por pares de nucleótidos (pairwise differences), para el total de las muestras, bajo una hipótesis de tamaño poblacional variable. Elaborada con DNAsp.

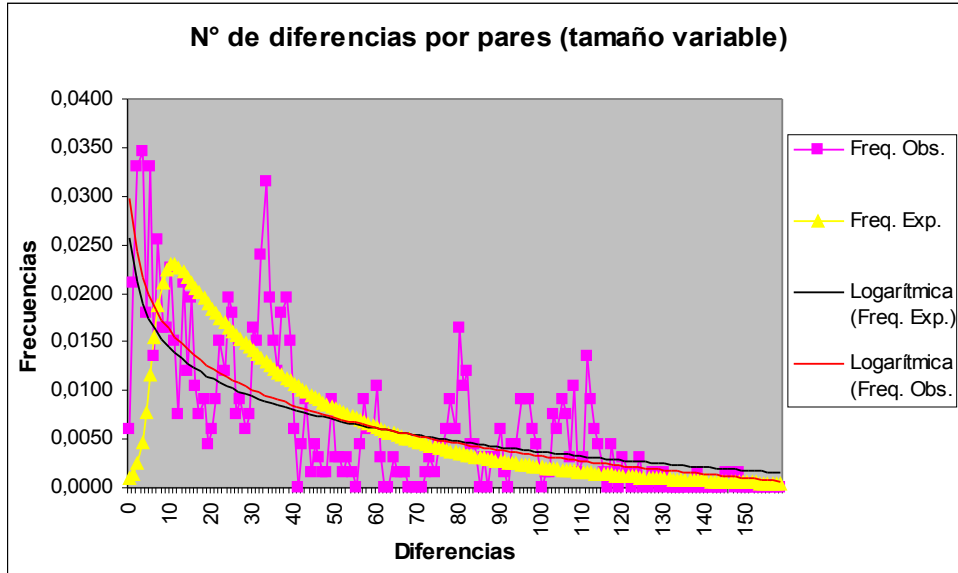


Figura 6: Líneas de tendencia de la distribución de las frecuencias observadas y esperadas de las diferencias por pares de nucleótidos.

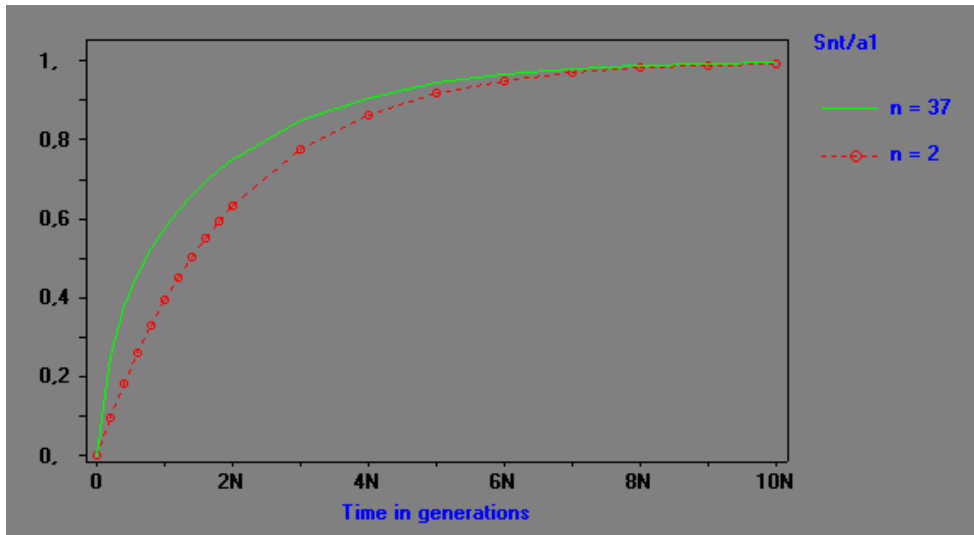


Figura 7: Distribución del número esperado de sitios segregantes esperada y observada entre las 37 secuencias (Snt/a1) observados (n=37) y esperados (n=2) en el tiempo (N= número de generaciones).

6.5. Detección de selección natural

El test de neutralidad de Fu & Li (1993) empleando el número total de mutaciones ($\eta = 414$) da un valor alto y negativo, $D^* = -3.045$, con una significancia de $P < 0.05$ al igual que el estadístico $F^* = -5.979$. Los valores anteriores muestran clara evidencia de selección natural negativa o purificante; Al tener en cuenta el total de sitios segregantes ocurre lo mismo, $D^* = -4.063$ (altamente significativo, $p < 0.02$). Sin embargo los autores establecen que este tipo de valores pueden presentarse cuando existe migración o expansiones en el tamaño poblacional (como se muestra en los resultados anteriores con las figuras 5 y 7), que pueden producir un exceso de alelos raros, lo que acumularía las mutaciones en las ramas externas de una genealogía que es el mismo proceso que ocurre cuando se da selección natural negativa.

Por su parte el test de selección natural de Tajima (1983) para el total de la población en estudio empleando tanto el número total de mutaciones como de sitios segregantes da valores altos y negativos, -2.176 y -1.386 , siendo significativo en un 95% en el primer caso rechazándose así la hipótesis nula de neutralidad, más no en el segundo caso.

6.6. Distancias genéticas entre y dentro de las poblaciones

La diferenciación entre poblaciones medida a través de distancias genéticas como el número de diferencias nucleotídicas, presentó resultados muy similares a los obtenidos anteriormente. En las comparaciones entre poblaciones se encuentran también a la población de Bolivia y de los llanos colombianos como las más cercanas, y las de amazonas y centralis como las más distantes genéticamente, y esto se repite con las diferentes distancias utilizadas, Tamura-Nei (1993) y 2 parámetros de Kimura (1980) (Tablas 9 y 10) y p-distance (Nei & Kumar, 2000), Jukes-Cantor (1969), Tajima-Nei (1984) y 3 parámetros de Tamura (Nei & Kumar, 2000), (datos no mostrados). Los valores sin embargo son bajos en todas las comparaciones, lo que indica que las poblaciones están muy poco diferenciadas entre sí.

Tabla 9: Distancia genética Tamura-Nei entre poblaciones

	1	2	3	4	5
1		[0.007]	[0.006]	[0.005]	[0.010]
2	0.076		[0.008]	[0.007]	[0.011]
3	0.084	0.115		[0.006]	[0.011]
4	0.055	0.086	0.093		[0.011]
5	0.110	0.134	0.149	0.121	

1: Bolivia; 2: Amazonas; 3: Indefinido; 4: Llanos; 5: C. América. [error estándar]

Tabla 10: Distancia genética Kimura 2-p entre poblaciones

	1	2	3	4	5
1		[0.006]	[0.006]	[0.005]	[0.010]
2	0.076		[0.008]	[0.007]	[0.010]
3	0.084	0.114		[0.007]	[0.011]
4	0.054	0.085	0.093		[0.010]
5	0.109	0.134	0.148	0.121	

1: Bolivia; 2: Amazonas; 3: Indefinido; 4: Llanos; 5: Centroamérica. [error estándar]

Por su parte las distancias genéticas dentro de las poblaciones mostraron que la población más heterogénea es la de Centroamérica, seguida de los llanos que es el grupo que presenta 2 individuos con el mismo haplotipo mientras que la más homogénea es la boliviana (tabla 11), evidenciando igual patrón con todas las distancias analizadas (tabla 12), Los valores de las distancias se asemejan al valor de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.083$).

Tabla 11: Distancias genéticas Tamura-Nei y 2 parámetros de Kimura dentro de poblaciones

Población	T-N	S.E	K 2p	S.E
Bolivia	0.047	0.006	0.045	0.006
Amazonas	0.109	0.010	0.098	0.008
Indefinido	0.146	0.014	0.123	0.009
Llanos	0.069	0.008	0.064	0.007
C. América	0.197	0.022	0.170	0.016

Tabla 12: valor promedio de las distancias dentro de todas las poblaciones

Distancia	Valor \pm error
p-distance	0.089 \pm 0.005
Jukes-cantor	0.100 \pm 0.007
Kimura 2-p uniform	0.100 \pm 0.007
Kimura 2-p gamma	0.113 \pm 0.008
Tajima-Nei	0.101 \pm 0.007
Tamura 3-p uniform	0.100 \pm 0.007
Tamura.Nei	0.100 \pm 0.007
Log-Det	0.103 \pm 0.007
Nº diff. nucleotídicas	45.068 \pm 2.801

6.7. Relaciones filogenéticas y tiempos de divergencia

A partir de los datos de cada posición nucleotídica informativa filogenéticamente, fueron elaborados árboles de filogenia basados en diferentes tipos de distancias genéticas entre las secuencias. Independientemente del método empleado, ya fuera Neighbor–Joining (figura 8) o Minimum Evolution (figura 9) o UPGMA (Figura 10), con la distancia de 2 parámetros de Kimura (1980) que es la que coincide mejor en su topología con los árboles obtenidos a partir de las demás distancias como la distancia p o la de Tajima-Nei (resultados no mostrados), los árboles son consistentes en su topología y en el bajo soporte de las ramas, teniéndose pocos clados bien definidos, lo que es un claro resultado de la alta variabilidad de las secuencias y de la baja diferenciación entre las poblaciones

Los clados más altamente soportados son los que conforman dos individuos provenientes de los llanos colombianos y correspondientes a la subespecie *P. onca onca*, y dos individuos provenientes de la amazonía peruana. Existen secuencias ampliamente diferenciadas del resto del grupo (jaguar 184), y en general se tienen entremezcladas ramas que representan secuencias de diferentes orígenes geográficos y por tanto que habían sido asignadas a diferentes grupos y subespecies.

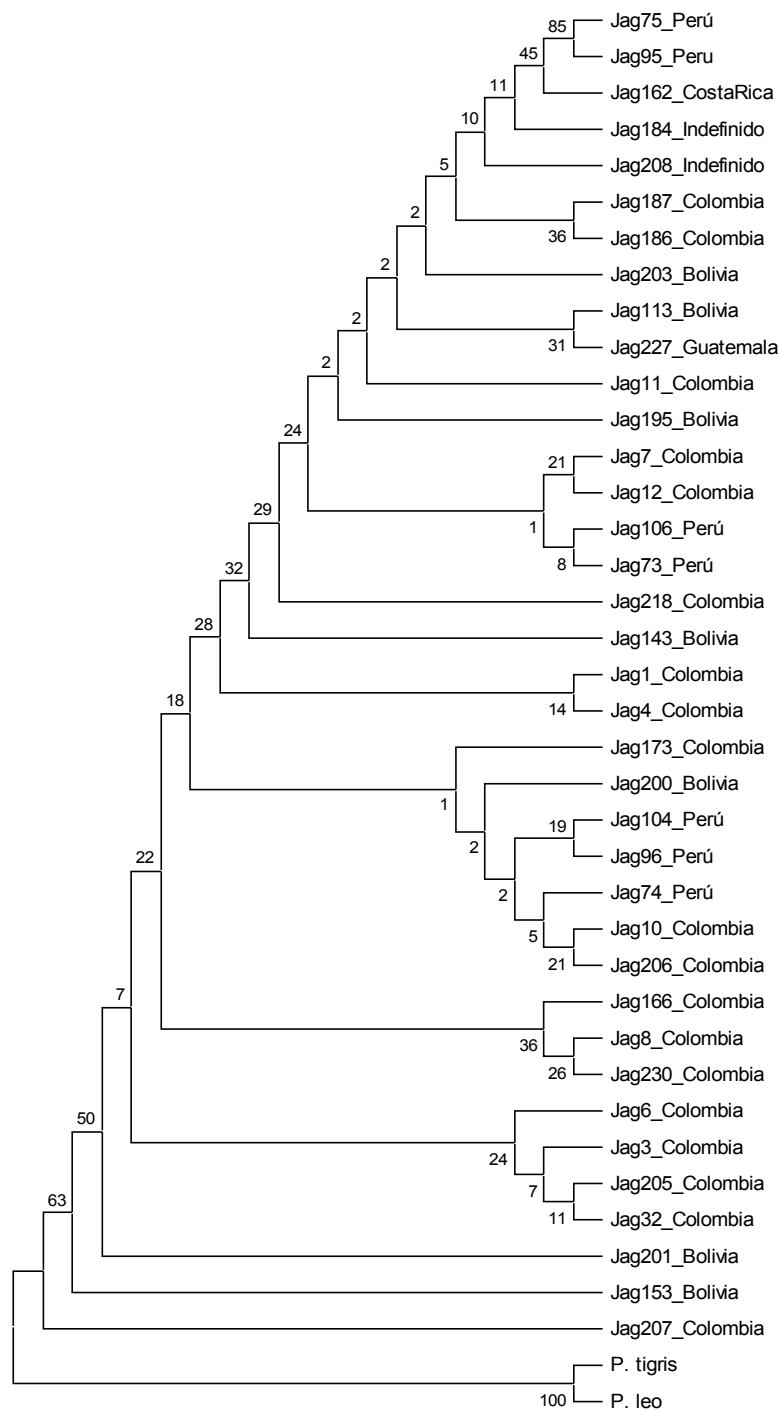


Figura 8: Árbol de relaciones filogenéticas por el método de Neighbor-joining basado en la distancia de 2 parámetros de Kimura. En las ramas los valores de Bootstrap. Los nombres de las ramas están dados así: Jag número de la muestra_país. *P. tigris* (*Panthera tigris*) y *P. leo* (*Panthera leo*) son los grupos externos.

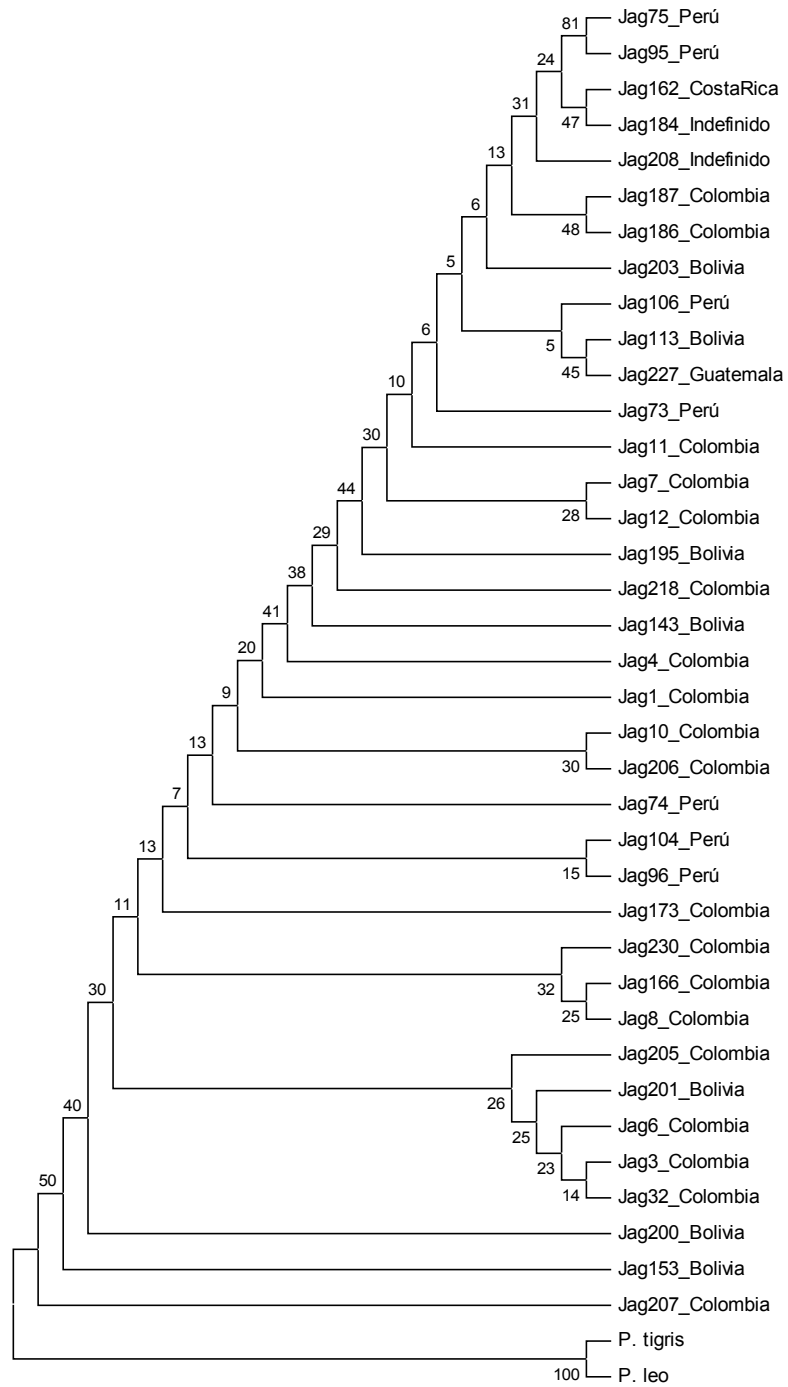


Figura 9: Árbol de relaciones filogenéticas por el método de Minimum Evolution basado en la distancia de 2 parámetros de Kimura. En las ramas los valores de Bootstrap. Los nombres de las ramas están dados así: Jag número de la muestra_país. *P. tigris* (*Panthera tigris*) y *P. leo* (*Panthera leo*) son los grupos externos.

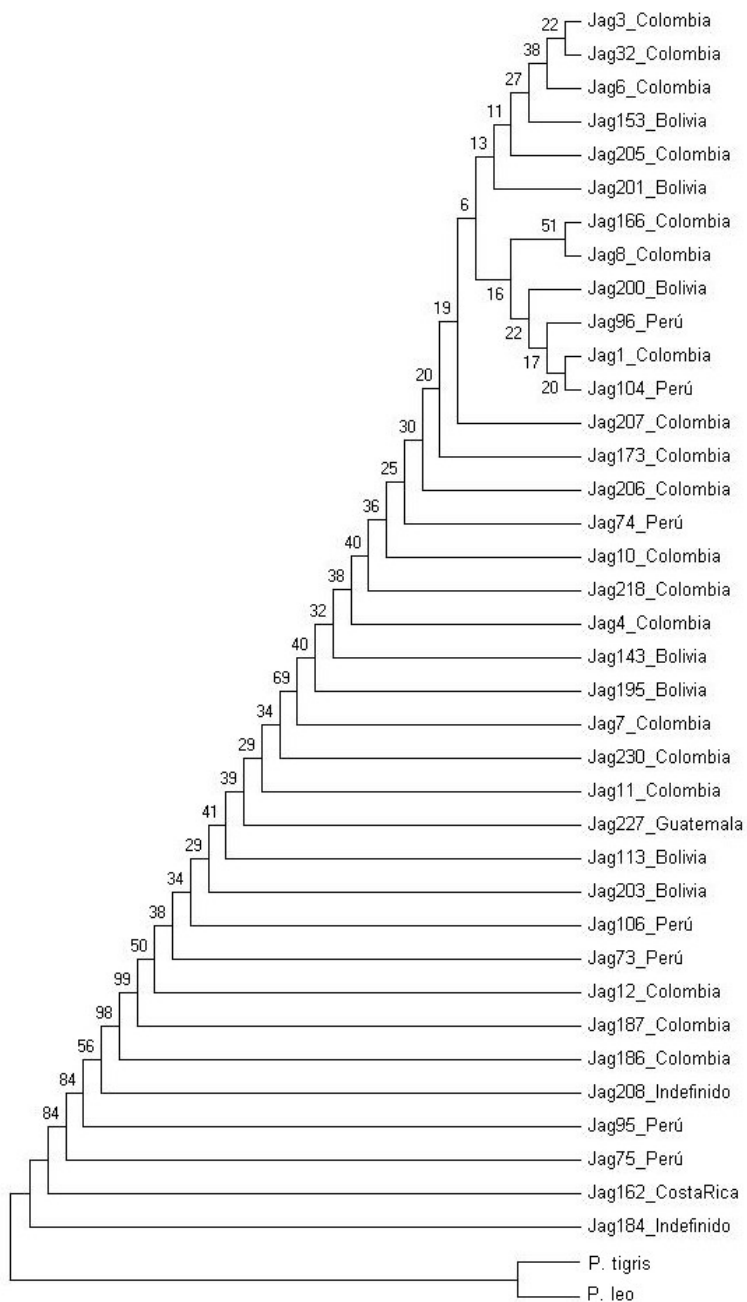


Figura 10: Árbol de relaciones filogenéticas por el método UPGMA basado en la distancia de 2 parámetros de Kimura. En las ramas los valores de Bootstrap. Los nombres de las ramas están dados así: Jag número de la muestra_país. *P. tigris* (*Panthera tigris*) y *P. leo* (*Panthera leo*) son los grupos externos. En la tabla 1 se identifican las muestras

Ahora, empleando métodos de análisis filogenético basados en máxima parsimonia, fueron encontrados fenogramas mejor definidos de relaciones entre los haplotipos, a través del método Heurístico y mediante dos análisis diferentes, stepwise addition, (figura 11) y branch swapping (figura 12). Se encontraron los árboles consenso estricto, semiestricto, de Adams (resultados no mostrados) y de la regla de la mayoría, con un mínimo de 690 pasos. En general para todos los consensos las topologías son muy similares, pero se presentan los representantes de las dos topologías más comunes.

En ambos casos están altamente soportados tres clados. En primer lugar el clado que forman los haplotipos (4 y 34) correspondientes a los individuos de los llanos colombianos, al igual que con los métodos de distancias; en segundo lugar el correspondiente a individuos de orígenes variables de Guatemala y de Costa Rica, la amazonía colombiana, peruana y del norte de Bolivia con 100% de bootstrap (haplotipos 18, 21, 28, 32, 33, 26, y 22); y un tercer grupo conformado por individuos amazónicos del Norte de Perú y el sur de Colombia en su totalidad (100% de bootstrap) (haplotipos 9, 19, 30, 31 y 29), que encierra a los individuos también encontrados como más similares en los árboles de distancia (Figura); sin embargo, en los árboles por el método de closest (figura 12) aparece otro grupo y los haplotipos del segundo grupo se reparten en dos clados distanciados (100% y 94% de soporte), el primero con los haplotipos 21, 28, 32, 33 y 22, y el segundo por los haplotipos 12, 22, 26, 18, 23, 27, 25, y 24 que involucra individuos de orígenes muy diferentes entremezclados.

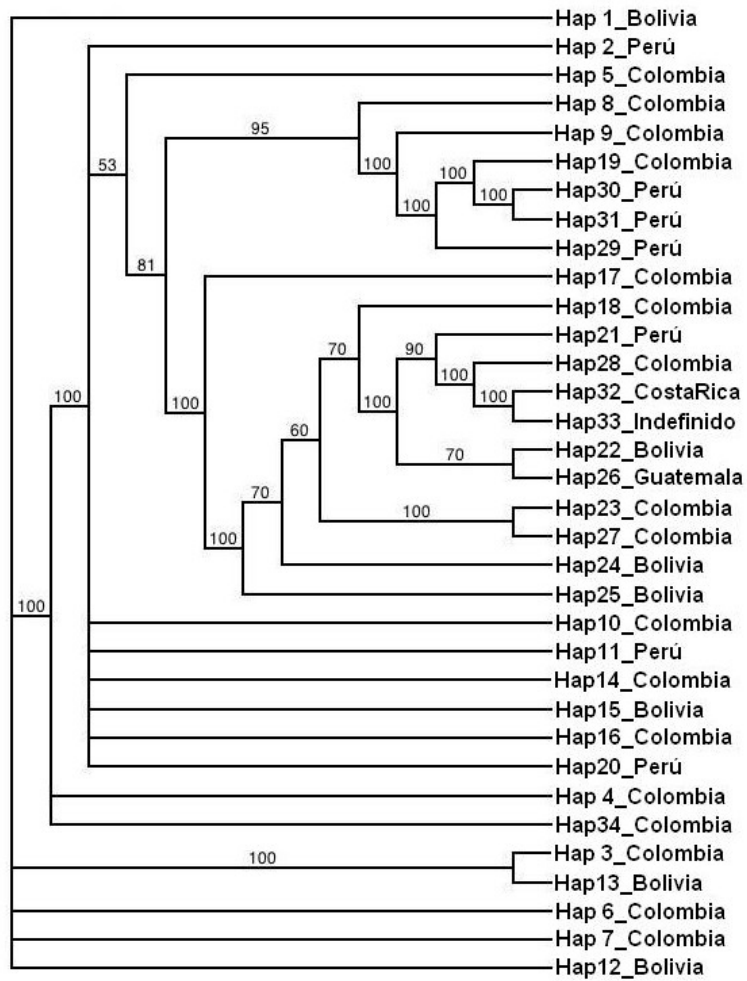


Figura 11: Fenograma Branch Swapping por el método de Majority rule entre los haplotipos con PAUP, sobre las ramas los valores de bootstrap. Los nombres están dados así: Haplotipo número del haplotipo_país. Los haplotipos se identifican en la tabla 1.

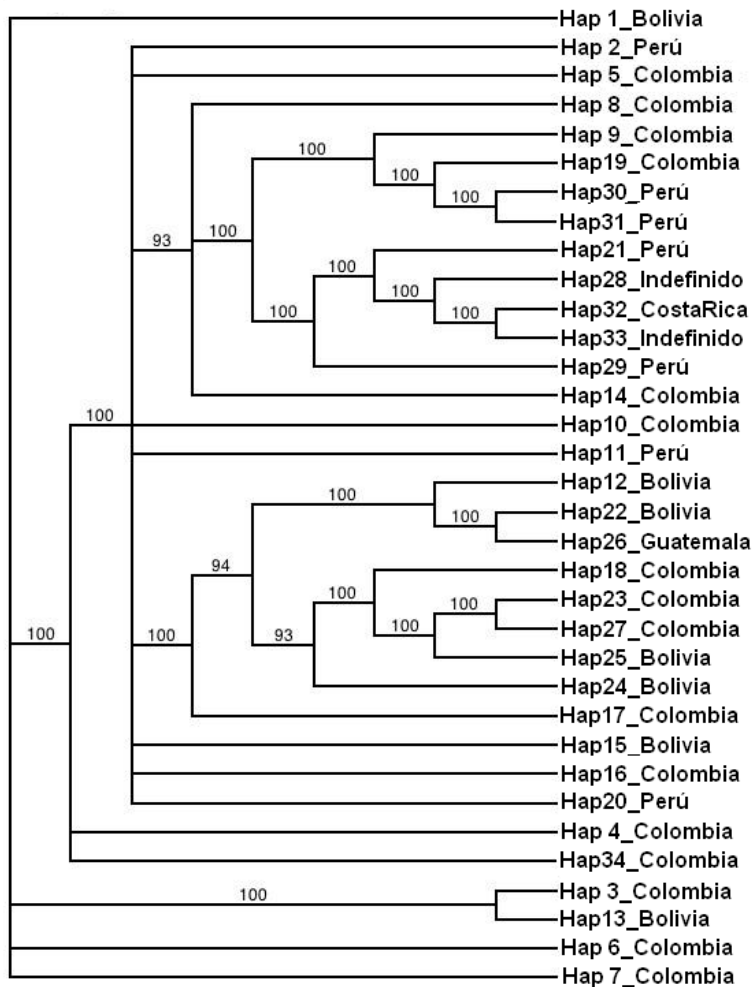


Figura 12: Fenograma Stepwise addition, por el método Closest, consenso Majority rule, entre los haplotipos. Elaborado con PAUP. En las ramas se presentan los valores bootstrap. Los nombres están dados así: Haplotipo número del haplotipo_país. Los haplotipos se identifican en la tabla 1.

Por su parte la red de relaciones entre los haplotipos por el método de Median Joining (Bandelt *et al*, 1999) fue obtenida, de manera que se observan de mayor tamaño los haplotipos 7 y 4 que son los que mayor número de secuencias presentan, y los haplotipos 7 y 11 como centros ancestrales de donde irradian los demás. Un centro de relaciones bien definidas (Figura 13, parte B), varios pasos intermedios necesarios para obtener los descendientes y algunos haplotipos terminales extremos, que han acumulado una gran cantidad de mutaciones que los alejan bastante del centro. En los núcleos de irradiación los haplotipos 7 y 11 provienen de individuos amazónicos, lo que sugiere a esta región como el lugar de diversificación de las poblaciones estudiadas del jaguar, y en los extremos se encuentran individuos amazónicos por una parte y de Costa Rica y Colombia en la parte

inferior. Otro haplotipo que podría ser intermediario para dar origen a los demás es el 5 pero las relaciones a partir de este están poco claras e irradian haplotipos pertenecientes a todos los grupos definidos para este estudio.

Los tiempos de divergencia entre los haplotipos centrales y todos los descendientes fueron calculados, cuando el ancestro original es el haplotipo 7 se obtienen tiempos de 518 680.5 años \pm 34 619.28 con una tasa de 1 mutación cada 20 180 años y de 133 859.68 \pm 9810.66 con una tasa de una mutación cada 5208. Cuando el ancestro es el haplotipo 11 los valores son de 499 045.95 \pm 30 464.69 con una mutación cada 20 180 años, y de 128792.43 \pm 7309.87 con una mutación cada 5208 años.

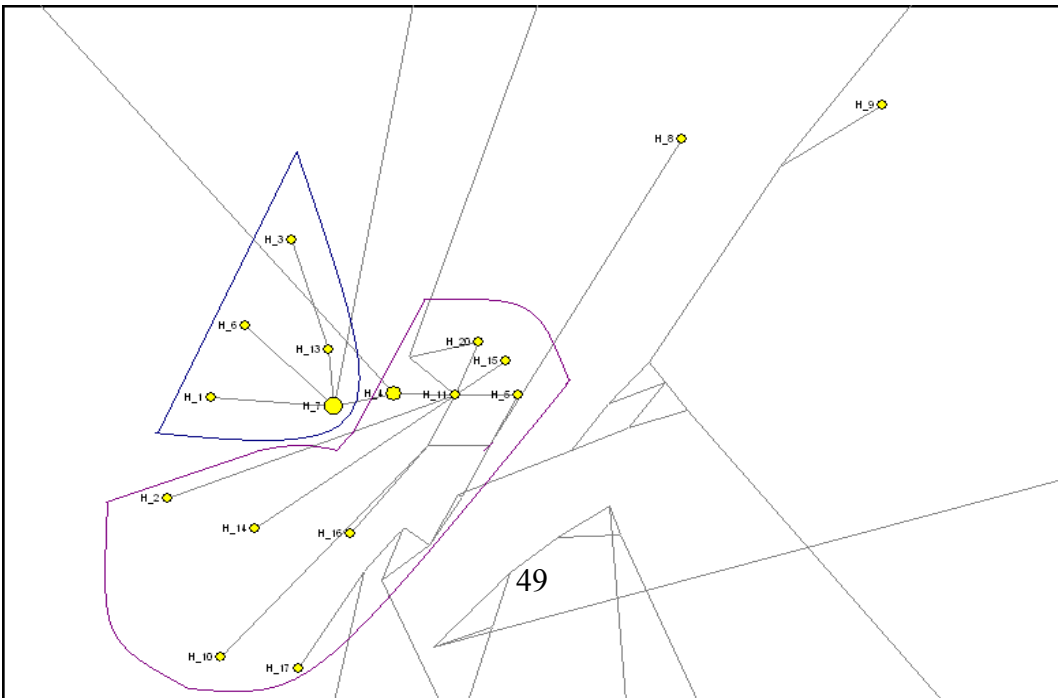
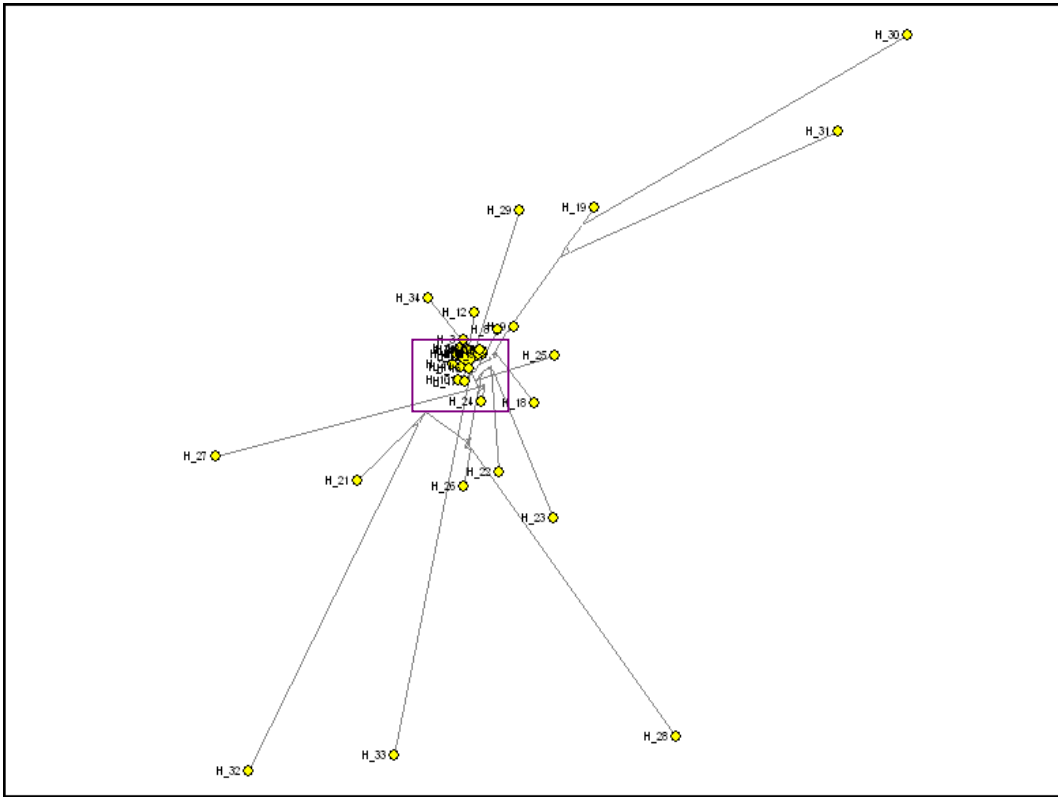


Figura 13: Red de unión entre haplotipos por el método de Median-Joining obtenida con Network. A. Aspecto completo de la red señalándose en el recuadro el centro. B. Ampliación del centro de la red. En azul se encuentran agrupados los haplotipos de origen geográfico amazónico relacionados con el haplotipo 7. En violeta se señala el grupo de origen geográfico amazónico relacionados con el haplotipo 11.

7. Discusión de resultados

7.1 Diversidad genética

Los resultados muestran una especie con una alta variabilidad genética nucleotídica (0.083) y muy alta variabilidad haplotípica (34 haplotipos) tanto para la población total como para cada uno de las subpoblaciones analizadas y mayor que las reportadas por Eizirik *et al.*, (2001) donde encuentran 22 haplotipos y una diversidad nucleotídica entre 0.148 y 0.044 para el mismo número de secuencias pero para la región control del DNA mitocondrial; Los valores de diversidad genética en el jaguar son mucho más elevados que el puma y que otro panterino, el tigre ($\pi=0.0025$) para una muestra de 100 individuos con el mismo gen objeto de estudio, que como Luo *et al.* (2004) reportan que el tigre ha tenido una historia compleja y diferente a la del jaguar, afectada por cuellos de botella que ha motivado a que sus poblaciones se encuentran diezgadas y algunas extintas.

Sin embargo, estos valores de diversidad son mayores en otros felinos neotropicales como el margay (*Leopardus wiedi*) y el ocelote (*Leopardus pardalis*), pudiéndose explicar porque estas especies son mucho más antiguas (3-5 millones de años) respecto al jaguar del que se estima a nivel paleontológico una antigüedad de 1.5 millones de años y unos 500 000 años a partir de métodos moleculares por lo tanto el jaguar ha tenido menos tiempo para divergir y acumular mutaciones. Sin embargo el tamaño muestral es limitado y es posible que al aumentarse este también aumentes los valores de diversidad o que el empleo de otro tipo de marcadores más variables arroje resultados más altos.

De hecho los datos arrojados por marcadores microsatélites de DNA nuclear para el jaguar obtenidos por Eizirik *et al.* (2001) y Ruiz-García *et al.* (2006) muestran efectivamente valores muy altos de diversidad genética ($H= 0.74$ y $H= 0.85$ respectivamente) y comparable con el leopardo ($H= 0.77$). Estos valores tan similares entre jaguar y leopardo son esperados pues presentan hábitos muy similares. Ambos presentan valores superiores al gato doméstico, el puma ($H= 0.52$) y el león (Eizirik *et al.*, 2001).

Esta alta diversidad genética es un indicador del estado saludable de las poblaciones desde esta perspectiva, en la que todavía no han quedado huellas de la actividad humana, especialmente de la caza y la deforestación del siglo anterior, pues una pérdida de

variabilidad traería múltiples consecuencias graves en la eficacia biológica de la especie desde la disminución de la fecundidad, la endogamia, hasta un aumento en la probabilidad de extinción por eventos estocásticos (Lacy, 1997).

7.2. Divergencia de DNA entre poblaciones y flujo génico

Al comparar las poblaciones entre sí, se encuentra que la población centroamericana es la más diferenciada del resto esto es, la más divergente, sin embargo, esta muestra es muy pequeña como para concluir al respecto. Los valores globales de divergencia entre y dentro de las poblaciones son muy bajos, y ninguno de los estadísticos obtenidos muestra una estructura poblacional clara, por lo que se puede establecer que las poblaciones no son diferentes entre sí. Se puede concluir lo mismo a través de los análisis de distancias genéticas que muestran a la población centroamericana como la población más distanciada de las demás y más heterogénea; por otra parte las poblaciones de Bolivia, llanos colombianos y amazonía colombo-peruana muestran conformar un grupo altamente relacionado, siendo los jaguares bolivianos los más homogéneos genéticamente.

Lo encontrado con el jaguar difiere de lo encontrado con otros felinos como en el caso del tigre donde sus poblaciones equivalen a las subespecies (solo una de las 6 no se sostiene a nivel genético) (Luo *et al.* 2004) y se encuentran bien diferenciadas. En el caso del puma sólo seis agrupaciones filogeográficas fueron encontradas en lugar de las 15 subespecies morfológicas tradicionales (Culver *et al.*, 2000).

Los valores de flujo génico (entre 3.19 y 30 migrantes por generación) asociados a los diferentes índices de estructura poblacional muestran una especie con muy alta migración e intercambio génico, como lo reportado por Ruiz-García *et al.* (2006) (3.09 con el modelo de n-dimensiones, 12.13 con el modelo isla) y Eizirik *et al.* (2001) (igual o mayor que 1) a partir de datos microsatélites, comparables con los altos niveles del leopardo (Spong *et al.*, 2000) que presenta dispersión a largas distancias de 3.3 migrantes por generación y tendiendo a infinito a partir de la F_{st} , como en el caso del jaguar. Estos altos valores se pueden explicar por la gran capacidad de dispersión de estos dos felinos (Crawshaw & Quigley, 1991; Bailey, 1993).

Por su parte los análisis moleculares de varianza no consideran la variabilidad entre grupos (3 grupos) como una fuente de variación para el jaguar, sólo empieza a ser importante cuando se tienen dos grupos: C. América y Amazonas+Llanos+Bolivia. Así la F_{ct} crece un poco, se disminuye la importancia de la variabilidad entre poblaciones dentro de grupos y decrece un poco la fuente de variabilidad más importante que es dentro de las poblaciones.

Sin embargo la F_{ct} sigue siendo no significativa. Esto significa que la mayor parte de las diferencias se dan entre los individuos dentro de sus propias poblaciones y que cuando se analiza entre grupos sólo existe una mayor cantidad de varianza genética al comparar los ejemplares centroamericanos respecto a todos los demás.

Eizirik *et al.* (2001) por su parte proponen dos grupos basados en los datos haplotípicos, diferenciados significativamente, el primero que reúne los individuos de la parte norte de la distribución del jaguar (desde México hasta Venezuela y Guyana francesa) y el segundo los de la parte sur (Bolivia, Brasil y Paraguay); a partir de datos microsatélites y de un Análisis Cladístico Anidado ellos proponen 3 ó 4 grupos no completamente aislados; la diferencia entre los datos arrojados por los dos marcadores es discutida a la luz de las diferencias en los patrones de dispersión de machos y hembras. Los primeros se dispersan a grandes distancias y las segundas son ampliamente filopátricas. Los anteriores autores proponen además al río Amazonas y al estrecho del Darién como las barreras geográficas causantes de la diferenciación. El primero en los dos grandes grupos mencionados y el segundo en tres grupos (dividiéndose en dos el grupo de la parte Norte).

Por otra parte Ruiz-García *et al.* (2006) mediante datos microsatélites no aceptan al Amazonas como barrera geográfica al flujo génico entre las poblaciones de jaguares, pues no encuentran diferencias entre las muestras de Brasil y Colombia respecto de las de Perú y Bolivia, y proponen a la cordillera de los Andes como la posible barrera que separa las dos subespecies que habitan en Colombia *P. o. centralis* y *P. o. onca*. Considerando los resultados encontrados en este trabajo a partir de secuencias del gen mitocondrial NADH5 el Amazonas no se constituye como una barrera para las poblaciones suramericanas de jaguares. Luego sólo el Darién y la cordillera de los Andes podrían ser barreras geográficas que separaran la población de jaguares centroamericanos de los restantes jaguares estudiados. Sin embargo el tamaño de la muestra es pequeño y es necesario recopilar más datos de jaguares centroamericanos para confirmar esta hipótesis.

La diferencia entre los resultados aquí mostrados y los de Eizirik *et al.* (2001) pueden relacionarse con la complementariedad en la distribución de las muestras analizadas (Figura 14). No existe superposición prácticamente entre estas. Eizirik *et al.* (2001) no analizaron muestras colombianas ni peruanas, mientras que presentaron un gran número de muestras centroamericanas y de Venezuela. Eso significa que no analizaron muestras de la zona donde precisamente se debería esperar el punto de corte entre la forma centroamericana y la del área nor-occidental de Suramérica.



Figura 14: Mapa de la localización aproximada de los sitios de colecta de las muestras de Eizirik et al., 2001.
Tomado de Eizirik y colaboradores (2001).

Los resultados moleculares aquí obtenidos muestran mucha más concordancia con la sistemática del jaguar propuesta por Pocock (1939) que la propuesta por Nelson & Goldman (1933). Estos últimos autores afirman que los jaguares de la Amazonía peruana, *P. onca ucayalae*, y de la amazonía boliviana, *P. onca boliviensis*, se diferencian de otros jaguares de la Amazonía (*P. onca onca*). El primer autor sin embargo, determinó que todos los jaguares amazónicos pertenecían a una única subespecie, *P. onca onca*. Los resultados aquí expuestos claramente evidencian que todos los jaguares muestreados en la Amazonía boliviana, peruana, colombiana y en los llanos colombianos pertenecen a un mismo acervo genético.

De manera que no se puede validar a nivel genético más de una subespecie de jaguar en el nor-occidente de Sudamérica, por lo menos de las cuatro que se encuentran dentro del rango muestreado, por el contrario sólo una división podría sustentarse, la población correspondiente a las subespecies centroamericanas localizada en América central y hasta la cordillera central de Colombia, y la correspondiente a la subespecie *P. onca onca* localizada desde el resto de Colombia hasta Bolivia;

7.3. Detección de cambios en el tamaño poblacional

Los análisis de sitios segregantes y mismatch indican que el total de la población se ha mantenido constante con grandes tamaños la mayoría del tiempo durante su existencia, sin evidencia alguna de cuellos de botellas más sí de una posible expansión poblacional al inicio de su historia evolutiva que se evidencia con el pico en la distribución mismatch (Rogers & Harpending, 1992) y en el comienzo de la curva de la distribución de los sitios segregantes durante el tiempo generacional (Tajima, 1989). Además, los valores grandes y negativos del test de neutralidad de Fu & Li (1993) son clara evidencia de esta expansión poblacional. Eizirik *et al.*, (2001) también soportan esta hipótesis con un análisis mismatch y de gráficos de linajes contra el tiempo, además de especificar que la filogenia tipo estrella es una evidencia de esta.

Los datos de microsatélites de Eizirik *et al.* (2001) y Ruiz-García *et al.* (2006) también soportan esta hipótesis. Los últimos autores, por lo menos, para la población total y la población correspondiente a la subespecie *P. o. onca*, pues tienen cierta evidencia de un cuello de botella para la población de *P. o. centralis*. Esta expansión exponencial estaría relacionada con la recolonización del continente americano desde el norte de Suramérica como se verá más adelante.

Los test de Fu & Li (1993) y Tajima (1983) muestran valores que se desvían significativamente de la hipótesis nula, lo que evidenciaría selección natural negativa o purificante. No obstante los primeros autores establecen valores altos y negativos pueden presentarse cuando ha habido una expansión poblacional como indican los resultados aquí expuestos, y el trabajo de Eizirik *et al.*, (2001) y de Ruiz-García *et al.*, (2006) pues este evento conduce a un exceso de alelos raros, que acumula mutaciones en las ramas externas de una genealogía, lo mismo que ocurre cuando se da selección natural negativa (Fu & Li, 1993). Entonces no hay evidencia de selección natural en el gen NADH5 del jaguar, sino más bien de expansión poblacional.

Es probable, sin embargo, que la población haya sufrido importantes reducciones en sus tamaños poblacionales asociadas con la caza, la deforestación y las demás amenazas antropogénicas. La caza del jaguar fue muy importante en las décadas del 60 y 70 del siglo XX. En la Amazonía peruana se cazaban 2000 jaguares anualmente durante 1968-1970. Únicamente, en 1968, Estados Unidos importó 13 516 pieles de jaguar y en 1969, 9831 pieles.

Sin embargo, los análisis genéticos con microsatélites y con secuencias de NADH5 no detectan ese hecho. Una posibilidad es que estos eventos son lo suficientemente recientes y cortos en el tiempo para haber dejado huella en el genoma del jaguar. Otra posibilidad es que el potencial reproductivo del jaguar sea grande (como en otros felinos) y después de la caza, las poblaciones volvieran a crecer rápidamente limitando los efectos de la deriva genética (Nei *et al.*, 1975). Es también factible que se necesite ampliar el número muestral e involucrar ejemplares provenientes de lugares donde ya no habita el jaguar de manera que se incluyan poblaciones que tal vez sufrieron estas disminuciones más radicalmente.

A diferencia del jaguar, el leopardo ha mantenido el tamaño efectivo de sus poblaciones constante a lo largo del tiempo (Spong *et al.*, 2000) aunque dos de sus tres subespecies en Asia presentan evidencia de recientes reducciones (Uphyrkina *et al.*, 2001) de acuerdo con los datos de microsatélites. El puma por su parte sí sufrió un cuello de botella seguido de un efecto fundador que recolonizó el continente americano recientemente (10 000 años aprox.) (Culver *et al.*, 2000). El tigre ha tenido una historia mucho más compleja de expansiones y contracciones diferentes en cada subespecie (Luo *et al.*, 2004). En estos animales las actividades humanas han dejado una huella imborrable.

7.4. Relaciones filogenéticas y tiempos de divergencia

Las relaciones filogenéticas fueron deducidas entre muestras y entre haplotipos. En los árboles obtenidos a partir de los modelos de distancias las ramas son cortas y poco soportadas por los bootstrap, asemejando topologías tipo estrella que según Lavery *et al.* (1996) son típicas de cuando se ha presentado una expansión poblacional reciente, tendiéndose poco tiempo para acumular diferencias entre los haplotipos, como ocurre con este gran felino americano.

Por los métodos de Máxima Parsimonia se forman clados más definidos y soportados que, sin embargo, guardan prácticamente las mismas relaciones que los anteriores basados en distancias, y más o menos consistentes con la ubicación geográfica de las muestras. Los haplotipos más basales son bolivianos, junto con algunos de los llanos que están bien soportados. Todos estos haplotipos pertenecerían a la subespecie *P. o. onca* pero de hábitat distintos (llanos y amazónicos).

El segundo clado bien soportado reúne ejemplares amazónicos del sur de Colombia y del norte de Perú, al igual que sucede en la red de unión entre haplotipos, y en los análisis de divergencia entre y dentro de las poblaciones. El tercer grupo, en el caso de Majority Rule-

Closest el tercer y cuarto grupo, son muy heterogéneos en cuanto al origen de las muestras, teniéndose individuos amazónicos peruanos, colombianos, bolivianos, centroamericanos y de origen desconocido. El grupo centroamericano no se establece como un clado sino que se entremezcla con los demás quedando más cerca a los bolivianos que son opuestos en su distribución geográfica; de todas maneras el número muestral centroamericano es bajo y estos resultados pueden refutarse al aumentar el tamaño.

Con la red de unión de los haplotipos se observan resultados parecidos. En ella se muestran dos centros ancestrales desde donde irradian los demás haplotipos, los haplotipos 7 y 11; el 7 que también es el más común por lo que se presupone que puede ser el más ancestral, proviene de la amazonía colombiana. Este haplotipo se relaciona directamente con los bolivianos y del sur de Colombia, lo que conformaría un centro principalmente amazónico colombiano boliviano. Por su parte el haplotipo 11 proviene de la amazonía peruana concretamente de la confluencia de los ríos Ucayalí y Tapiche. De él irradian haplotipos del Norte de Perú y del Sur de Colombia y de los llanos colombianos, aunque estos conforman un grupito más asilado, lo que confirmaría al grupo como de origen netamente amazónico peruano-colombiano. Los animales de los llanos derivarían de los amazónicos.

Estos resultados soportarían la hipótesis del origen de los actuales jaguares en la amazonía (norte de Suramérica) y desde allí la recolonización del continente hacia Centro y Norteamérica después de la extinción de los jaguares de esta parte del continente al final del Pleistoceno (Eizirik *et al.*, 2001).

Los tiempos de divergencia calculados, por su parte, se encuentran dentro del rango planteado por Eizirik *et al.* (2001) entre 137 000 y 830 000 años. Respecto al haplotipo 7, los otros haplotipos habrían divergido entre 134 000 y 519 000 años, mientras que respecto al haplotipo 11, los otros haplotipos habrían divergido entre 129 000 y 499 000 años. Por lo tanto existe amplia concordancia entre los tiempos de divergencia de la región de control del DNA mitocondrial y el gen NADH5. Sin embargo son más recientes de los esperados a partir de los datos fósiles norteamericanos hace más de 850 000 años (Seymour, 1989), luego estos tiempos pueden estar mostrando el origen pero a partir de la población recolonizadora suramericana.

Todo el anterior panorama expone a una especie saludable genéticamente, que parece debe ser vista como una unidad evolutiva pues no existe diferenciación ni interpoblacional ni intrapoblacional clara; de alta capacidad de migración; de reciente origen suramericano y

que posiblemente todavía no ha alcanzado un equilibrio después de una expansión poblacional; pero que aunque no exista huella en su genoma de un cuello de botella genético se encuentra gravemente amenazada por la caza directa y la degradación de su hábitat, y de la que es necesario revisar sus divisiones infraespecíficas tradicionales, pues a nivel del DNA mitocondrial parece que sólo existen dos posibles divisiones, Centroamérica y nor-occidente de Sudamérica.

Se puede concluir que los jaguares de Colombia, Perú, Bolivia y probablemente Ecuador se pueden manejar como una única población por lo que la creación de corredores o pasillos ecológicos para el movimiento de los jaguares es factible en esta zona de Sudamérica. Las translocaciones de animales entre estos países no causarían ningún problema de tipo genético en las poblaciones receptoras.

8. Conclusiones

El análisis filogeográfico y genético-poblacional obtenido a partir del gen mitocondrial NADH5, indica para *P. onca* que:

- ✓ La población en total presenta una alta diversidad nucleotídica y una muy alta diversidad haplotípica. El grupo más heterogéneo y más diferenciado de los demás es el centroamericano aunque es también el de menor tamaño muestral; el más homogéneo es el grupo amazónico boliviano seguido de los animales y posteriormente de la población amazónica.
- ✓ El total de la población presenta valores muy altos de flujo génico, al igual que lo resultados obtenidos por otros autores a partir de datos microsatélites y esto se asocia a la gran capacidad de dispersión de la especie objeto de estudio.
- ✓ No existe desequilibrio de ligamiento en el fragmento del gen mitocondrial estudiado y no existe ligamiento correlacionado con la distancia física dentro del gen.
- ✓ La alta variabilidad genética encontrada para el jaguar se da entre individuos y es independiente de los grupos analizados (2 ó 3), aunque la variabilidad asociada a los grupos aumente un poco al comparar sólo 2 grupos correspondientes a las poblaciones centroamericanas contra las demás, de acuerdo con los análisis AMOVA y la F_{ct} (Weir & Cockerham, 1984). Sólo dos divisiones importantes se pueden sostener al igual que lo plantean Eizirik *et al.*, (2001).
- ✓ La población total se ha mantenido en un tamaño constante excepto por una expansión ocurrida al inicio de su diversificación evidenciada por los análisis mismatch y de sitios segregantes, la filogenia tipo estrella y los valores altos y negativos del test de Fu & Li (1993). Esta expansión está posiblemente asociada a la recolonización de Centro y Norteamérica por fundadores suramericanos, y no existe evidencia de cuellos de botella, posiblemente no detectados por lo reciente y de corto tiempo que duraron, o a la rápida recuperación del potencial reproductivo de la especie.

- ✓ No se puede rechazar la hipótesis de neutralidad para el fragmento del gen en estudio. Los valores negativos y significativos asociados a selección negativa pueden explicarse por la expansión poblacional que parece haber vivido la especie.

- ✓ Las relaciones filogenéticas no están fuertemente estructuradas ni soportadas por los valores de bootstrap y se observan simultáneamente en los dos métodos utilizados. Se conforman tres clados fundamentalmente. El primero de los llanos orientales colombianos, el segundo de individuos amazónicos del norte de Perú y el sur de Colombia, y el tercero un grupo muy heterogéneo de individuos amazónicos, bolivianos y centroamericanos. Estos resultados concuerdan medianamente con la red de unión entre haplotipos que también sugiere un grupo de origen netamente amazónico (colombo-peruano) y relacionado con otro netamente boliviano, y uno más muy heterogéneo.

- ✓ Se calculó un tiempo de divergencia a partir de los haplotipos más ancestrales 7 y 11 entre 128000 y 519000 años para el total de la población bajo dos tasas de mutación que se encuentran dentro del rango propuesto por otros autores, y que es menor al supuesto por los datos fósiles, soportándose la hipótesis que los linajes actuales de jaguares provienen de fundadores suramericanos recientes ya que las poblaciones ancestrales de jaguares en Norteamérica se extinguieron debido a cambios climáticos.

- ✓ Los jaguares del nor-occidente de Sudamérica pueden ser tratados como una unidad siendo factible la creación de corredores ecológicos y la translocación de animales en la zona.

9. Recomendaciones

El aumento del número de muestras hasta incluir poblaciones relictas y la precisión en el origen geográfico de estas. Para la amplificación por PCR se recomienda el diseño de iniciadores específicos para genes mitocondriales en el caso de trabajar con un gen que se encuentre dentro de los 12 Kb del numt de los panterinos.

10. Referencias

- Avise J. 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise J. 1998. The history and purview of Phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Avise J. & Ball R. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 45-67.
- Bailey T. 1993. The African leopard. Ecology and behaviour of a solitary felid. Columbia university press, New York. 429 p.
- Bandelt H., Forster P. & Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48
- Balding P. Bishop M. & Cannings C. 2001. Handbook of statistical Genetics. John Wiley and sons Ltd. England. 863 p.
- Crawshaw P. Jr. & Quigley H. 1991. Jaguar spacing, activity and habitat use in a seasonally hooded environment in Brazil. *Journal of zoological society of London* 223: 357-370.
- Culver M., Johnson W., Slattery P., & O'Brien S. 2000. Genomic ancestry of the american puma (*Puma concolor*). *The journal of heredity* 91(3):186-197.
- Eizirik, E., Kim J., Menotti-Raymond M., Crashaw J., O'Brien S. & Johnson W. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10: 65-79.
- Emmons L. 1990. Neotropical rainforest mammals: A field guide. University of Chicago Press. Chicago. 281p.
- Excoffier L., Smouse P. and Quattro J. 1992. Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H. 1996. Origin and evolution of native american mtDNA variation: A reappraisal. *American Journal of Human Genetics* 59: 935-945.
- Fu Y. & Li W. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Griffith R. & Tavaré S. 1994. Ancestral inference in population genetics. *Statistical Science* 9:307-319.
- Hall T. 2004. Bioedit sequence alignmet editor. Version 7.0.0.
- Hudson R., Boos D. & Kaplan N. 1992. A statistical test for detecting population subdivision. *Molecular Biology Evolution* 9: 138-151.
- Hwang U. & Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mtDNA commonly used in Molecular Systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 215-228.
- Jukes T. & Cantor C. 1969. Evolution of protein molecules. p. 21-132 en: Munro H. (ed.). *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York.
- Kelly J. (1997). A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics* 146: 1197-1206.
- Kim J., Antunes A., Luo S., Menninger J., nNash W., O'Brien S. and Johnson W. 2006. Evolutionary analysis of a large mtDNA traslocation (numt) into the nuclear genome of the Panthera genus species. *Gene* 366:292-302.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Knowles L. & Madison W. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. 2004 MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lacy R. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammology* 78(2): 320-335.
- Larson S. 1997. Taxonomic re-evaluation of the jaguar. *Zoo Biology* 16:107-120.
- Lavery S., Moritz C. & Fielder D. 1996. Genetic patterns suggest exponential population growth in a declining species. *Molecular Biology and evolution* 13: 1106-113.

- Lewontin R. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations: heterotic models. *Genetics* 49: 49-67.
- Lopez J., Yuhki N., Masuda R., Modi W. and O'Brien S. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular evolution* 39(2):174-179.
- Lou S., Kim J., Johnson W., Van der Walt J., Martenson J., Yuhki N., Miquelle D., Uphyrkina O., Goodrich J., Quigley H., Tilson R., Brady G., Martelli P., Subramaniam V., McDougal C., Hean S., Huang S., Pan W., Karanth U., Sunquist M., Smith J., & O'Brien S. 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *Plos Biology* 2(12): 2275-2293.
- Lynch, M. & Crease T., 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
- Moritz C. 1994. Defining Evolutionary Significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 70(12): 3321-3323.
- Nei, M. 1982. Evolution of human races at the gene level. p. 167-181 en: Bonne-Tamir B., Cohen T., & Goodman R. (eds.). *Human genetics part A: The unfolding genome*. Alan R. Liss. New York.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512p.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 336 p.
- Nei M., Maruyama T. and Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Nelson E. & Goldman E., 1933. Revision of the jaguars. *Journal of mammology* 14:221-240.
- Nowak R. 1999. *Walker mammals of the world*. Johns Hopkins University press, London. 1785 p.
- O'Brien S. & Mayr E. 1991. Bureaucratic mischief: Recognizing endangered species and subspecies. *Science* 251: 1187-1188.
- O'Brien S. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91:5748-5755.

- Peters G. & Hast M. 1994. Hyoid structure, laryngeal anatomy, and vocalization in felids (Mammalia: Carnivora: Felidae). *Z. Saugetierkunde* 59: 87-104.
- Pocock R. 1932. The leopards of Africa. *Proceedings of the Zoological Society of London* 543-595, Plates I-IV.
- Redford K. & Eisenberg J. 1992. *Mammals of the Neotropics: The southern cone. Vol.2.* University of Chicago Press. Chicago. 460 p.
- Rogers A. & Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Roth D., Porter T. and Wilson J. 1985. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 5(10):2599-2607
- Rozas J. & Rozas R. 1999. DnaSP versión3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analyses. *Bioinformatics* 15 (2): 174-175.
- Rozas J., Gullaud M., Blandin G. & Aguadé M. 2001. DNA variation at the rp49 gene region of *Drosophila simulans*: Evolutionary inferences from an unusual haplotype structure. *Genetics* 158: 1147-1155.
- Ruiz-García M. 2001. Diversidad génica como herramienta de zonificación ambiental: Estudios moleculares (microsatélites) en el caso de primates y félidos neotropicales comportan una nueva perspectiva. p. 85-108. En: *Zonificación ambiental para el ordenamiento territorial en la Amazonía colombiana.* Primera Edición. Universidad Nacional de Colombia, Sede Leticia; Instituto Amazónico de Investigaciones, Imani.
- Ruiz-García M., Payán E., Murillo A. & Álvarez D. 2006. DNA Microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes & Genetics systems* 81: 115-127.
- Saitou N. & Nei M. 1987. The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd edition. V1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanderson E., Redford K., Chetkiewicz C., Medellín R., Rabinowitz A., Robinson J. & Taber A. 2002. Planning to save a species: The jaguar as a model. *Conservation Biology* 16(1): 58-72.
- Schneider S., Roessli D. and Excoffier I. 1997. *Arlequin: A software for Population Genetics data analysis.* Geneva, Switzerland: University of Geneva, Genetics and Biometry laboratory.

- Sean P., Metzger D. & Higuchi R. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-513.
- Seymour K. 1989. *Panthera onca*. *Mammalian species* 340:1-9.
- Simonsen, K., CHURCHILL G. and AQUADRO C. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics* 141: 413-429.
- Sokal R. & Rohlf F. 1981. *Biometry*. Second Edition. W. H. Freeman and Company. New York. 859 p.
- Spong G., Johansson M. & Björklund M. High genetic variation in leopards indicates large and long-term stable effective population size. *Molecular Ecology* 9:1773-1782.
- Sudhir K., Tamura K., & Nei M. 2004. Mega 3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Swofford D. 1999. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates. Sunderland, M.A.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima F. 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tajima F. 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Tajima F. & Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1: 269-285.
- Tamura K. & Kumar S. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages *Molecular Biology and Evolution* 19:1727-1736.
- Tamura, K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882
- Treves A. & Karanth U. 2003. Human-carnivore conflict and perspective on carnivore management worldwide. *Conservation Biology* 17(6): 1491-1499.

- Uphyrkina O., Johnson W., Quigley H., Miquelle D., Marker L., Bush M. & O'Brien S. 2001. Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. *Molecular Ecology* 10(11): 2617-2633.
- Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7: 256-276.
- Weir B. & Cokerham C. 1984. Estimating F- statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

11. Anexos

Protocolos extracción de DNA

EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE CON FENOL-CLOROFORMO

1. Agregar 1 vol. de Fenol (igual a la cantidad. de muestra), mezclar por inversión.
2. Centrifugar a 13.000 r.p.m. por 10 min y tomar el sobrenadante.
3. Agregar ½ vol. de fenol + ½ vol. de cloroformo y mezclar por inversión.
4. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 10min. tomar sobrenadante.
5. Agregar 1 vol. de Cloroformo Isoamílico. Mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 10 min.
7. Precipitar la fase acuosa con 1 vol. de etanol absoluto frío.
8. Dejar en frío (-20° C) durante la noche
9. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 15 min.
10. Lavar el pellet con Etanol frío 70%.
11. Centrifugar 13000 r.p.m. por 15 min.
12. Eliminar el Etanol y dejar secar muy bien.
13. Resuspender el DNA en H₂O MiliQ (20-200 µl).

EXTRACCION DNA DE PULPA DENTARIA

1. Limpiar la pieza dental para retirar residuos de tejido y otros posibles contaminantes.
2. Hacer un corte transversal a nivel del cuello con herramienta tipo circular o con pinza para cortar hueso.

3. se guarda la corona.
4. Colocar la raíz en una bolsa plástica transparente, dar un golpe seco y fuerte con el martillo de plástico. Entre los fragmentos de diente se encuentra la pulpa, filamentos de color rojo si la muestra es fresca o de color crema si la muestra es antigua.
5. Incubar la pulpa y los fragmentos de raíz en tubos separados a 37° C, durante la noche en 300 µl de buffer de extracción para pulpa dental .
6. Si el buffer no tiene Proteinasa K, adicionar 6 µl e incubar durante 1 hora.
7. Adicional un vol. De fenol-cloroformo; alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando bien por inversión durante 30 min. Vórtex suave.
8. Centrifugar 10 min a 12000 r.p.m.
9. Recuperar la fase acuosa y llevar a un tubo nuevo.
10. Adicionar un vol. de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1). Mezclar por inversión 30 s. Vórtex suave.
11. Centrifugar 10 min a 12000 r.p.m.
12. Recuperar fase acuosa y pasar a un tubo nuevo.
13. Precipitar con un volumen de etanol absoluto frío (-20° C). Mezclar por inversión.
14. Centrifugar por 1 min a 12000 r.p.m; descartar el Etanol sin resuspender el pellet.
15. Adicionar un vol. de Etanol frío y centrifugar.
16. Descartar el alcohol y dejar secar el pellet.
17. Resuspender el pellet en H₂O destilada estéril a 50° C durante la noche
18. Si es posible determinar la concentración para saber cuanto pasar a PCR.

EXTRACCIÓN DNA DE PELO CON BULBO CON CHELEX® 100

1. A una cantidad mínima de 2 pelos agregar 200 µl de Chelex al 5%.
2. Incubar a 56° C por 45 min.
3. Agitar en vórtex por 10 s.
4. Llevar a ebullición por 8 min.
5. Vórtex por 10 s.
6. Centrifugar por 1 min a 13000 r.p.m.
7. Llevar a nevera a 4° C

EXTRACCIÓN DNA DE PIEL CON FENOL-CLOROFORMO

1. En un tubo colocar la mayor cant. de muestra digerida posible.
2. Añadir la solución de fenol-cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1) en el mismo volumen de la muestra (tener cuidado con la interfase).
3. Mezclar suavemente durante 5 min.

4. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 10 min
5. Extraer sobrenadante (lo máximo posible) y colocar en otro tubo limpio. descartar precipitado.
6. Repetir pasos del 2 al 5.
7. Añadir en el sobrenadante del nuevo tubo el mismo vol. (500 μ l) de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1).
8. Mezclar suavemente durante 5 min.
9. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 10 min.
10. Repetir pasos del 7 al 9
11. Separar sobrenadante y descartar precipitado. Al sobrenadante añadir el 10% del vol. de la muestra de Acetato de Amonio.
12. Sobre este vol. agregar 2 veces el vol. de etanol al 100%.

Tabla A : Haplotipos a partir de 506 pb del gen NADH5 mitocondrial y sitios variables para el jaguar (*P. onca*)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Hap_1	AGCATGATACAAACATCACACATACAAAACCCCTCACACCACCCCCACACAGTCTCCATTAACAGGCCAACCTAGCACTGACCTAACTCGA								
Hap_2G.....G.....								
Hap_3								
Hap_4								
Hap_5G.....								
Hap_6T.....								
Hap_7								
Hap_8G.....C.....T...G.....C.....								
Hap_9G.GTT.....T...G.....								
Hap_10T.....								
Hap_11								
Hap_12	...G..G.....T.TG.G.....G..T.....T.....								
Hap_13								
Hap_14								
Hap_15								
Hap_16T.....T.....								
Hap_17	..G.....T.G.....T...G.....								

Hap_18 G GGGGA T . T TT . TG T G .
 Hap_19 . . T . . G G . GGT
 Hap_20
 Hap_21 . . T A GGT . T G . TCT . T T T . A G . G
 Hap_22 G GG T . GGA . A T . TT . . TT . TG C . T G .
 Hap_23 G . TG . . G G . G . . G . GCA G . GG GG . . T . TG T GG . G . . T . AT . G . TT T
 Hap_24 G . T TGG T TT . T . G TA
 Hap_25 GGC G . G . T C TT A TT T
 Hap_26 G . T G T . GGG T TTT . T T T G G
 Hap_27 G CA . . G G . GCG GT . T . GG GG . . T . G . T . TTA . T . T AG . . G TTG . . TT T
 Hap_28 GTG . . T G . . TCAGGG . G G . . TT A GAGT . TCTTT . G . T . TG G A GTAT . T . GC .
 Hap_29 C . G T TTC . . GG . TT . T G T
 Hap_30 . CT . . AGGG . C . . GC . TCGGGT . . T T . T . . AC T . . TTTTTATATT . TCT A TG G . TT . . G . .
 Hap_31 . . GTG . G TTT . . GGGTT . TA T C A . TT . T . T . A T . G T TT . . T . .
 Hap_32 G . TT . . G . CA . . TTCAT . GGTT . TA . . TT GG . G . T . . TTTT . T G . GAG . G . TA . TC . TGGTTTTAA . . A . TT . GA . .
 Hap_33 . . G CAT T . G . T G AAGG . G . T . . T . GTTC . . G . . G . G A T T TG . . G . .
 Hap_34

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Hap_1	ACCCACTCTAACACGCTACCCTATTGGCACTCATCGCTACACTCTCAGCCCTACGTACTCACAACTCGACCCTAACACCCATTA	ACTCCC							
Hap_2								
Hap_3								
Hap_4								
Hap_5								
Hap_6								
Hap_7								
Hap_8					T			
Hap_9		G		A				G
Hap_10								T
Hap_11								
Hap_12				G				
Hap_13								
Hap_14								
Hap_15								
Hap_16								
Hap_17	G						T	

Hap_18G.....G..A.....
 Hap_19G.....A.G..A.T.....A.C.....G...C.....G.C.....G.GG...
 Hap_20A.....
 Hap_21A.T.....G.....T.....A.....T.....
 Hap_22A.....G.A.....T.....G.....TT.....
 Hap_23G..A..G.....T.....G.....G.....G...T.....
 Hap_24T.....
 Hap_25TTGG....G.....G.....T...A...T.....T....GG.A...T.....
 Hap_26G..G.....G.....
 Hap_27 T...G.G...G.....A...C...T...GG...T.T...T..G.G.G.....G.....G.GG.....TG
 Hap_28 C...GG.AA..A...GGG..C.G...G...T..GCA.....T.C...T...GGGG.TT..A.....G.....CA.....
 Hap_29T.....G.....G...A.T.A.....T.....G.....GG.....
 Hap_30G.G...T.G...CT..G..TG.T.....AGCA....G...G..TTC...GG.C...G.G...C..
 Hap_31G.....G.....GA..A.GATA.TAT.C...ACC....G.G.T.GA...CAT.ACG.C.....G.G....
 Hap_32 .G...T.TA...G..A..GG...A.T.CTAT..T.TAT.GT.TG.....G...TC....GC.....GGC..A...G..C..
 Hap_33 .GGA...GGCG.TGC.A.AA.AT.....TCG..G.G..TCTG..T..G.AAA..TCC.AT..T...A.T.AG.G...A...G.A..
 Hap_34C.....

	190	200	210	220	230	240	250	260	270]
	*	*	*	*	*	*	*	*	*]
Hap_1	CTAACCAATGTAACCCACTTATCCTCATAACCTCATTGTGACCCAAAACCTACCACTTCTAGTATTTATACGGCTTCATCTGCAAACCTTATTACCCCAG									
Hap_2	G.....				C.....	A..GG.....			
Hap_3					C..C.....	T.....	T....C		
Hap_4					C..C.....	G.....			
Hap_5					C..C.....	A..G.....			
Hap_6			T.....		C..C.....				
Hap_7					C..C.....				
Hap_8					C..CC.....	AAGG.....			
Hap_9	G.....			T.....		C.G.C.....	AAGGG.....			
Hap_10		G.T.....			C.G.C.....	A..GG.....			
Hap_11					C..C.....	A..G.....			
Hap_12					C..C.....				
Hap_13					C..C.....			T.....	
Hap_14					C..C.....	AAGT.G.....			
Hap_15					C..C.....	A..G.....		T.....	
Hap_16	T.....				C..C.....	A..G.....			
Hap_17					C..C.....	A.....			

Hap_18C.....T..G.....G...C...C.....A.GGG.....
 Hap_19 G.....GG...T..G...GT.....TC...CA..G...C.G.C.....A.GG.....A.....
 Hap_20C...C.....A..G.....
 Hap_21T.....T.T.....C...C.....AAGG.....G.....GG..
 Hap_22C..GC.....AAGGG.....
 Hap_23C...C.....
 Hap_24C...C.....G.....
 Hap_25G...C.....A..G.....C...T...
 Hap_26C...C.....AGGGG.....T.....
 Hap_27 T.....G.....T.....C...C.....A..G.....
 Hap_28 G...A.....G.....A...A.....G.....C...C...T..AGGGG.....
 Hap_29 AGG.....T.....G.T.....G...C...C.....AG.G.G.....
 Hap_30 GG..T...A..T...C.....G.T.....TC..ACAGC...CC.CCC.C..AAGGGGCT...C...A...T..T...
 Hap_31 GG..G...A..T.....A.....TG.T.....GT..T.....A.CA..C.GCCC...AAGGG...G.....
 Hap_32 ..GG...TC.....CG..T...C.....T..C...G.....CT..C.CC..AAGGGG.....G.....
 Hap_33 G....TT...C.G.....G...CG...G...CCA..TT.CTG...AACA..G.CAC..AC...ACAG.GG..CT.TTGG.G..C..G...
 Hap_34AG.CAAGCCGA.CT..T...A.GT.A...A.....C...C.....G.....