



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA DE BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Alouatta* EN PANAMÁ A PARTIR DE
SECUENCIAS DE CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD 1

PRESENTADO POR:

YOHANNY Y. PINEDA-RODRÍGUEZ

Trabajo de graduación presentado a
la Escuela de Biología para optar
por el título de Licenciada en
Biología con orientación en
Genética y Biología Molecular.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ, DICIEMBRE, 2021



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Alouatta* EN PANAMÁ A PARTIR DE
SECUENCIAS DE CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD 1**

Por:

YOHANNY Y. PINEDA-RODRÍGUEZ.
8-936-918

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

Dr. CARLOS RAMOS
Asesor

Dr. PEDRO MÉNDEZ-CARVAJAL
Co-Asesor

Dr. EDGARDO CASTRO-PÉREZ
Co-Asesor

DEDICATORIA

Primero agradecerle a Dios por siempre mantenerme con buena salud y permitirme cumplir mis objetivos.

Gracias MAMÁ por nunca dejarme sola, por siempre confiar en mí. Eres mi persona favorita, te admiro mucho por tu gran fortaleza. Eres mi mayor motivación. Te amo mamá y gracias papá por siempre estar presente.

A mis hermanos, amigos y familia.

Gracias por su apoyo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera especial al Dr. Carlos Ramos, por ser un gran guía durante el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias por todo su conocimiento brindado, por sus palabras de motivación y su apoyo en cada momento. Es usted una persona a la que admiro mucho.

Al Dr. Pedro Méndez Carvajal por facilitarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto de investigación. Por estar disponible en cada momento, por consejos, motivación y por compartir todos sus conocimientos.

Al Dr. Edgardo Castro por ayudarme cuando lo necesitaba, gracias por sus enseñanzas.

A la Fundación Pro-Conservación de los Primates Panameños (FCPP) agradezco su financiamiento para hacer posible este proyecto, por permitirme ser parte de este proyecto y acogerme como parte de su familia.

A la estación científica Coiba AIP por su financiamiento y hacer posible que este proyecto se llevara a cabo.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá por la adjudicación de fondos de investigación en la convocatoria universitaria 2019.

Al laboratorio de Genética y Biología molecular por su espacio brindado para lograr el desarrollo completo de este proyecto.

A mis compañeros Samuel Escudero, Leysa Cortes, Mihail Pérez por esos buenos momentos de estudio y su apoyo incondicional cuando lo necesitaba.

A Karol Gutiérrez por su ayuda y consejos brindados en cada momento.

A todos mis profesores de la orientación de genética y biología molecular por brindarme todos sus conocimientos y tomarse la paciencia de enseñarnos todo lo necesario para ser unos buenos profesionales.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
CAPÍTULO 1.....	10
ANTECEDENTES.....	10
CAPÍTULO II.....	21

METODOLOGÍA.....	21
1. Área de estudio y colecta de muestras.....	21
2.Extracción de ADN y amplificación por PCR	23
2.1Extracción de ADN	23
2.2 Amplificación por PCR y electroforesis en gel de Agarosa	23
2.3 Secuenciación	24
3. Edición e identidad de las secuencias	24
4. Distancia y Diversidad genética.....	25
5. Árbol Filogenético.....	25
6. Red de Haplotipos.....	26
CAPÍTULO III	27
RESULTADOS.....	27
1. Distancias genéticas del género <i>Alouatta</i> en Panamá	27
2. Diversidad genética del género <i>Alouatta</i> en Panamá.....	28
3. Árbol Filogenético.....	29
4. Red de Haplotipos.....	32
CAPÍTULO IV	33
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIÓN.....	41
RECOMEDACIONES	42

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	43
ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las especies y subespecies del género <i>Alouatta</i> (Hill,1962). A) Mesoamérica y b) Suramérica (Groves, 2001). Modificada. Fuente de Cortés-Ortíz <i>et al.</i> , (2003)	2
Figura 2. Hembra de <i>Alouatta coibensis</i> cargando a su cría.....	11
Figura 3. Macho de <i>Alouatta palliata</i> en posición defensiva ante la presencia de otra especie. (fuente Gutiérrez-Pineda-FCPP).	11
Figura. 4. Sitios de colectas de las muestras utilizadas para nuestro estudio. Cada población de monos aulladores tiene un color en específico: El color celeste corresponde a los monos de Isla Coiba (<i>A.c. coibensis</i>), verde monos aulladores de la península de Azuero (<i>A.c. trabeata</i>), Negro, monos de Gamboa y el IFAD(Yaviza) (<i>A.p. aequatorialis</i>) y Azul, monos de Chiriquí (<i>A. p. palliata</i>)	21
Figura 5. Árbol Neighbor-Joining con distancia Kimura 2P, para diferentes poblaciones del género <i>Alouatta</i> presente en Panamá. Con 1000 réplicas.....	29

Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud usando el modelo HKY + G. El endogrupo está constituido por especies y subespecies del género *Alouatta*; el grupo externo está compuesto por dos especies del género *Alouatta*: *A. caraya*, *A. guariba* y Atelidae: *Ateles geoffroyi*.....30

Figura 7. La red mediana de unión (Median Joining Network =MNJ). Red haplotípica que muestra las relaciones genéticas entre los haplotipos detectados a partir de secuencias de un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) de las poblaciones del género *Alouatta* presente en Panamá. Verde representa *A.c. coibensis*, morado *A.c.trabeata*, el celeste *A.p.palliata* y rojo *A.p.aequatorialis*.....31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1

Clasificación de especies y subespecies del género *Alouatta* por diferentes autores.
Ruíz-García *et al* 2017. Modificado.....4

Tabla 2

Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo.....20

Tabla 3

Matriz de distancias genéticas (K2P) entre individuos de la misma “subespecie” y entre
“subespecies”26

Tabla 4

Niveles de diversidad genética del género *Alouatta* basados en las secuencias de un segmento
del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI).....27

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNmt:** ADN mitocondrial
- **RA:** Riqueza alélica
- **COI:** Gen Citocromo oxidasa C subunidad I
- **Fst:** Índice de fijación
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **Na:** Número de haplotipos
- **p:** Diversidad nucleotídica
- **Hd:** Diversidad haplotípica
- **Ho:** heterocigosidad observada
- **He:** heterocigosidad esperada
- **S:** número de sitios polimórficos
- **K2P:** Kimura 2-parámetros
- **NJ:** Método de unión de vecinos
- **ML:** Máxima verosimilitud
- **MNJ:** Red de unión por la mediana
- **Rst:** coeficiente de diferenciación genética

RESUMEN

Los monos aulladores (*Alouatta*) son un género de primates Placotirinos (Neotropical) que habitan desde el sur de México, a través de Centro y Sudamérica hasta el norte de Argentina. Se caracterizan por sus fuertes aullidos que pueden viajar hasta 5 km dentro de la selva. Existe controversia con respecto a la cantidad de especies y subespecie presentes en el Neotrópico. En publicaciones previas, Anthony Rylands reconoce 9 especies, mientras que Groves identifica 10, Mittermeier distingue 12 y Cortés-Ortiz reconoce de 8 a 10 especies, las mismas aceptadas por Groves. En base a Froehlich y Froehlich en Panamá actualmente se considera que existen dos especies de monos aulladores *A. palliata* y *A. coibensis*, sin embargo, otros expertos en primatología no reconocen a *A. coibensis* como una especie, sino que la consideran como una subespecie de *A. palliata*. Con la finalidad de contribuir a esclarecer la controversia en el número de especies de *Alouatta* en el país, se comparan las genéticas estimadas a partir de las secuencias parciales del gen citocromo oxidasa C subunidad I de 51 individuos designados como *A. p. palliata* (Chiriquí), *A. c. coibensis* (Coiba), *A. p. aequatorialis* (Gamboa y Darién) y *A. c. trabeata* (Azüero). Se determinó la diversidad genética en cada grupo. *A. c. coibensis* presentó la mayor diversidad ($Hd= 0.7363$) con 9 haplotipos; *A. c. trabeata* presentó la menor diversidad haplotípica ($Hd=0.1429$) con 2 haplotipos. Las distancias genéticas dentro de grupos presentaron un rango de 0.0 %-1.3% y entre grupos de 0.0%-1.7%. Los árboles filogenéticos y la red de haplotipos muestran que los niveles de divergencia estimados a partir de COI en los grupos estudiados no justifican el reconocimiento de *A. c. coibensis* como subespecie de *A. palliata*. Las secuencias de COI de los monos aulladores de Coiba generadas en este estudio representan las primeras secuencias para este gen depositadas en Genbank de especies de *Alouatta* de Panamá.

ABSTRACT

Howler monkeys (*Alouatta*) are a genus of Platyrrhine (Neotropical) primates that inhabit southern Mexico, through Central and South America to northern Argentina. They are characterized by their loud howls that can travel up to 5 km into the jungle. There is controversy regarding the number of species and subspecies present in the Neotropics. In previous publications, Anthony Rylands recognizes 9 species, while Groves identifies 10, Mittermeier distinguishes 12 and Cortés-Ortiz recognizes 8 to 10 species, the same ones accepted by Groves. Based on Froehlich and Froehlich in Panama, it is currently considered that there are two species of howler monkeys *A. palliata* and *A. coibensis*, however, other experts in primatology do not recognize *A. coibensis* as a species, but rather consider it as a subspecies of *A. palliata*. To help clarify the controversy regarding the number of *Alouatta* species in the country, the genetics estimated from the partial sequences of the cytochrome oxidase C subunit I gene of 51 individuals designated as *A. p. palliata* (Chiriquí), *A. c. coibensis* (Coiba), *A. p. aequatorialis* (Gamboa and Darién) and *A. c. trabeata* (Azüero). Genetic diversity in each group was determined. *A. c. coibensis* presented the highest diversity ($Hd = 0.7363$) with 9 haplotypes; *A. c. trabeata* presented the lowest haplotype diversity ($Hd = 0.1429$) with 2 haplotypes. The genetic distances within groups presented a range of 0.0% -1.3% and between groups of 0.0% -1.7%. The phylogenetic trees and the haplotype network show that the levels of divergence estimated from COI in the groups studied do not justify the recognition of *A. c. coibensis* as a subspecies of *A. palliata*. The COI sequences of the Coiba howler monkeys generated in this study represent the first sequences for this gene deposited in the Genbank of *Alouatta* species from Panamá.

INTRODUCCIÓN

Los monos aulladores son primates del género *Alouatta* cuya distribución se extiende desde el sur de México, a través de Centro y Sudamérica hasta el norte de Argentina (Glander, *et al.*, 2016), habitando una amplia gama de ambientes neotropicales (Rylands *et al.*, 2006). El mapa en la **Figura 1** ilustra la distribución de las especies de *Alouatta* en la región (Cortés-Ortiz, *et al.*, 2003). Los miembros del género *Alouatta* se alimentan de materia vegetal especialmente de hojas y frutos, obteniendo de ellos agua y nutrientes (Milton, 1992). Los árboles de los cuales se alimentan pertenecen mayormente a las familias *Moraceae*, *Fabaceae*, *Cecropiaceae*, *Anaerdiaceae*, *Spotaceae* y *Leguminoseae* que constituyen el 75% de su alimentación, el 25% restante corresponden a flores y frutos (Lira, 2010; Glander *et al.*, 2016).

La taxonomía del género ha sido controversial como puede evidenciarse por las diferencias en la ubicación y reconocimiento de algunos taxa por diferentes autores. El género *Alouatta* según Rylands y colaboradores (1997) está representado por 9 especies: *A. palliata*, *A. coibensis*, *A. maconelli*, *A. pigra*, *A. seniculus*, *A. arctoidea*, *A. sara*, *A. caraya* y *A. belzebul*. En tanto que Groves (2001) reconoce 10 especies; no incluye en el género *A. fusca* y considera que *A. arctoidea* es una subespecie de *A. seniculus*. Además, eleva a nivel de especie a *A. macconnelli* considerada por Rylands *et al.* (1997) como una subespecie (*A. s. macconnelli*) de *A. seniculus* e incluye como nuevas especies a *A. guariba* y *A. nigerrima*. Posteriormente, Mittermeier *et al.*, (2013) reconoce 12 especies: *A. palliata*, *A. coibensis*, *A. macconnelli*, *A. pigra*, *A. seniculus*, *A. arctoidea*, *A. sara*, *A. caraya*, *A. belzebul* y *A. guariba*.

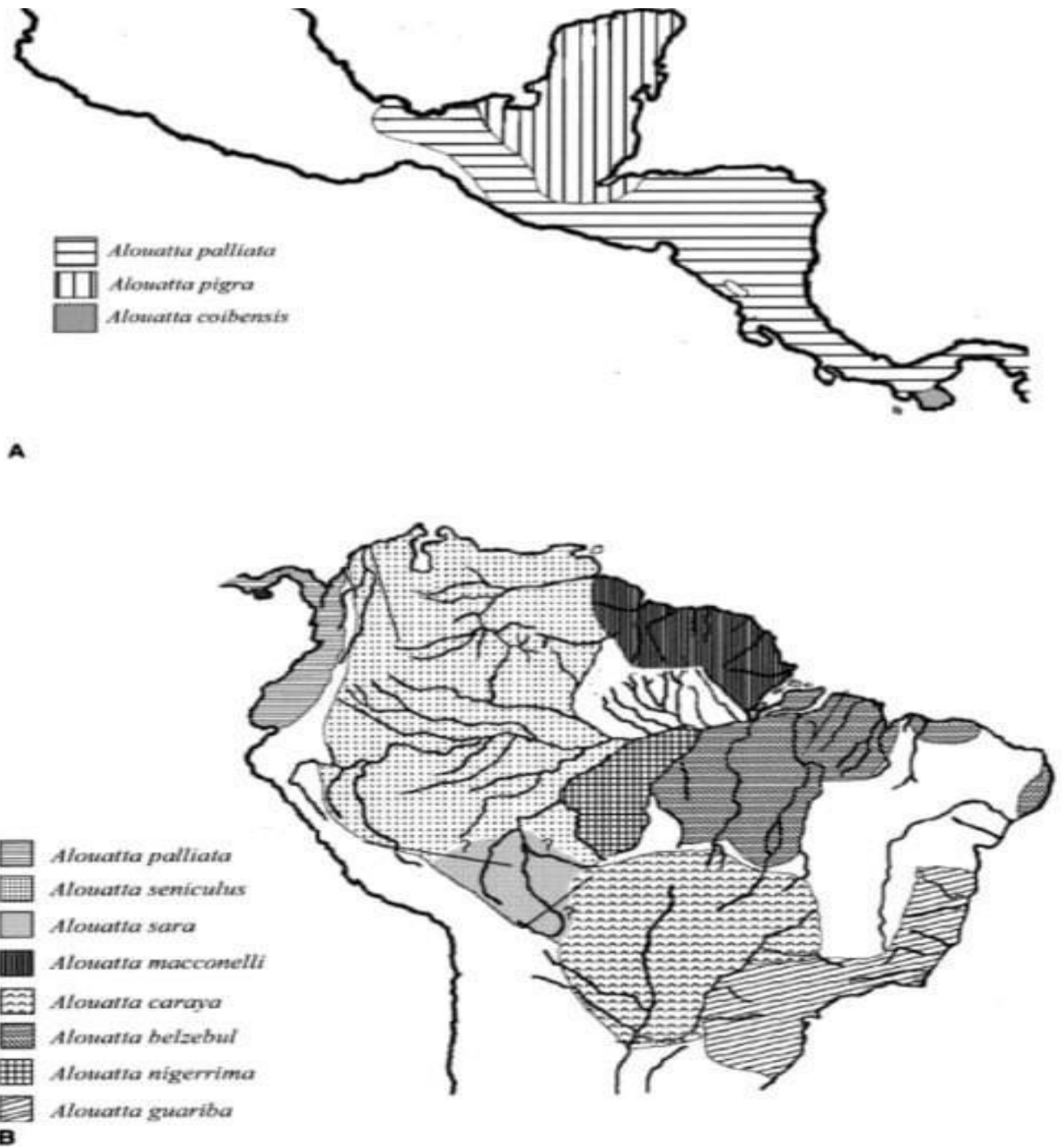


Figura 1. Distribución de las especies y subespecies del género *Alouatta* (Hill, 1962). A) Mesoamérica y b) Suramérica (Groves, 2001). Modificada. Fuente de Cortés-Ortiz *et al.* (2003).

Cortés-Ortíz *et al.* (2015) reconoce 8 de las 10 especies aceptadas por Groves *et al.* (2001). sin embargo, no reconoce como especie a *A. coibensis* y en su lugar propone que es una subespecie de *A. palliata* (*A. p. coibensis*). Por otro lado, reconoce como especie a *A. arctoidea* al igual que Rylands *et al.* (1997) y Mittermeier *et al.* (2013) y difiere de la clasificación propuesta por Groves *et al.* (2001) la cual ubica a *A. arctoidea* como una subespecie de *A. seniculus* (*A. s. arctoidea*). En la **Tabla 1** se resumen las especies de *Alouatta* reconocidas por diferentes autores.

La existencia en Panamá de dos especies; *A. palliata* y *A. coibensis*, es aceptada por varios investigadores (Rylands *et al.*, 1997; Groves, 2001; Méndez-Carvajal, 2013; Glander *et al.*, 2016).

La especie *A. coibensis* está representada por dos subespecies: *A. coibensis coibensis* y *A. coibensis trabeata* (Rylands *et al.*, 1997, Groves 2001, Froehlich & Froehlich, 1987; MéndezCarvajal, 2013). *A. c. coibensis* tiene un velo más restringido a los flancos, un pelaje más opaco que el mono aullador *A. palliata*, y es más pequeño en tamaño que otros monos aulladores de

América Central (Ruiz-García *et al.*, 2017). *A. coibensis trabeata* (Froehlich & Froehlich, 1987; Méndez-Carvajal, 2013) se distingue por sus flancos y lomos dorados (puntas doradas-ocráceas en su pelaje), junto con una apariencia más marrón sobre el resto del cuerpo (Ruiz-García *et al.*, 2017).

Tabla.1 Clasificación de especies y subespecies del género *Alouatta* por diferentes autores.
Fuente Ruíz-García *et al.*, 2017. Modificado

Autores	Especies	Subespecies
Froehlich y Froehlich 1987.	<i>A. coibensis</i>	<i>A. c. coibensis</i> <i>A. c. trabeata</i>
Rylands <i>et al.</i> , 1997.	<i>A. palliata</i> <i>A. pigra</i> <i>A. coibensis</i> <i>A. seniculus</i> <i>A. arctoidea</i> <i>A. sara</i> <i>A. belzebul</i> <i>A. fusca</i> <i>A. caraya</i>	<i>A.p. mexicana</i> <i>A.p. palliata</i> <i>A. p. aequatorialis</i> <i>A. c. coibensis</i> <i>A. c. trabeata</i> <i>A. s. seniculus, A.s. insulanus,</i> <i>A. s stramineus, A. s. macconnelli,</i> <i>A. s amazonica, A. s. juara,</i> <i>A. s. puruensis, A. s. ssp</i> <i>A. b. belzebul, A. b. nigérrima,</i> <i>A. b. discolor, A. b. ululata</i> <i>A. f. fusca, A. f. clamitans</i>
Groves, 2001.	<i>A. palliata</i> <i>A. pigra</i> <i>A. coibensis</i> <i>A. seniculus</i> <i>A. macconnelli</i> <i>A. sara</i> <i>A. belzebul</i> <i>A. nigerrima</i> <i>A. guariba</i> <i>A. caraya</i>	<i>A.p. mexicana, A.p. palliata</i> <i>A. c. coibensis, A. c. trabeata</i> <i>A. s. seniculus, A. s. arctoidea,</i> <i>A. s. juara</i> <i>A. g. guariba, A. g. clamitans</i>
Méndez-Carvajal <i>et al.</i> , 2013.	<i>A. coibensis</i>	<i>A. c. coibensis A. c. trabeata</i>
Cortes-Ortiz <i>et al.</i> , 2015.	<i>A. palliata</i> <i>A. pigra</i> <i>A. seniculus</i> <i>A. arctoidea</i>	<i>A.p. mexicana, A.p. palliata, A. p. aequatorialis, A.p. coibensis A. p. trabeata</i> <i>A. p. pigra, A. p. luctuosa</i> <i>A. s. seniculus, A. s. arctoidea,</i> <i>A. s. puruensis</i>

	<i>A. sara</i> <i>A. macconnelli</i> <i>A. guariba</i> <i>A. belzebul</i> <i>A. caraya</i> Especies posibles de <i>Alouatta</i> <i>A.</i> <i>nigerrina</i> <i>A. ululata</i> <i>A. discolor</i>	<i>A. g. guariba, A. g. clamitans</i>
Ruiz-García <i>et al.</i> , 2017.	<i>A. palliata</i>	<i>A.p. mexicana</i>

A. c. coibensis se encuentra sólo en Isla Coiba y Jicarón, mientras que *A. c. trabeata* se reporta hacia las tierras de la península de Azuero, que incluye la provincia de Herrera, Los Santos y parte sureste de Veraguas (Méndez-Carvajal 2010; 2013; 2014). *A. c. trabeata*, es una especie endémica de Panamá y se encuentra evaluada como una especie en Peligro de Extinción (EN) según el Ministerio de Ambiente (Mi Ambiente), la Fundación Pro-Conservación de los Primates Panameños (FCPP) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Méndez-Carvajal 2006; 2013; *et al.*, 2016; IUCN, 2020; 2021).

La principal amenaza para la supervivencia de los monos es la pérdida de hábitat y la fragmentación de bosques (Cowlshaw & Dunbar, 2000; Rowe & Myers 2016). En algunas zonas muy fragmentadas los monos aulladores de Azuero presentan hacinamiento y terminan tolerando individuos de otros grupos por falta de cobertura boscosa, dándose algunos casos de aumento anormal de promedios en grupos de zonas como las de Ocú, provincia de Herrera (Méndez-Carvajal, 2006; 2013). Los monos aulladores de Azuero han sido marginados a parches de bosques en fincas privadas. La mayoría de estos grupos están limitados en cuanto a movilidad, fuente alimenticia y agua, en su mayoría solo por bosque de galerías y cercas vivas

(Méndez-Carvajal, 2006; 2013).

El aumento de la fragmentación reduce la cantidad de hábitat e incrementa el aislamiento (Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2005). La pérdida y fragmentación del hábitat tiene consecuencias importantes en la diversidad genética de las poblaciones, ya que puede causar reducción de los tamaños poblacionales, aislamiento entre poblaciones y limitar la distribución de los individuos entre parches (Frankham, Ballou & Flecoe, 2010). En general las poblaciones residentes en islas exhiben una menor variación genética que las poblaciones de tierra firme y por lo tanto tienen un mayor riesgo de extinción (Dimons, 1984; Vitousek, 1988; Flesness, 1989; Case *et al.*, 1992; World Conservation Monitoring Center, 1992; Smith *et al.*, 1993). La taxonomía, las relaciones filogenéticas de las especies del género *Alouatta* y sus poblaciones geográficas, sugieren la necesidad de realizar un estudio sistemático del género, ya que no solo el estatus taxonómico de *A. coibensis* está en controversia, sino también *A. p. mexicana* y otras especies de primates neotropicales como las del género *Ateles* (Crockett, 1998; Rylands *et al.*, 1995; 2000; 2006). El estatus taxonómico del mono aullador *A. coibensis* es controversial debido a que es considerado en algunos estudios como una especie endémica de Panamá (Froehlich & Froehlich, 1987; Méndez-Carvajal, 2013) y en otros como subespecie de *A. palliata* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003). En este sentido, *A. coibensis* difiere respecto a otras especies de aulladores del grupo “*palliata*”, por composición de machos, hembras, juveniles e infantes dentro de los grupos (Méndez-Carvajal, 2010; 2013), patrones dérmicos (Froehlich & Froehlich, 1987) y vocalización (Méndez-Carvajal, 2006, 2010;).

En Panamá hasta la fecha sólo se reporta un estudio a nivel molecular en el cual se incluyen muestras de *A. coibensis* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003). Sin embargo, en este se utilizaron cuatro muestras; una de un individuo de Coiba y tres de Azuero. Se secuenciaron 3 genes mitocondriales (Cyt-b, and ATPase 8 and 6) y 2 genes nucleares (RAG1 y Calmodulin), pero

solamente los genes mitocondriales fueron informativos, por lo que los nucleares no fueron considerados en los análisis. Estas secuencias fueron las primeras y únicas secuencias analizadas de Panamá previo a nuestro trabajo.

En esta investigación se utilizó un mayor número de muestras (51) y un gen mitocondrial diferente (COI). Adicionalmente se genera información sobre la distancia y diversidad genética de *A. coibensis* y otros miembros del género *Alouatta* en Panamá.

Las distancias genéticas estimadas a partir de las secuencias parciales de COI dentro y entre grupos fueron utilizadas como criterio para justificar o no la ubicación de los diferentes grupos en determinada unidad taxonómica operacional (OTU). En esta investigación se generan las primeras secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa C subunidad I de miembros del género *Alouatta* de Panamá. Por otro lado, la información sobre la diversidad genética de cada uno de los grupos generada en esta investigación informa sobre la estructura actual de la genética de población y el estado de conservación de cada grupo.

HIPÓTESIS

Ha: Las distancias genéticas con base en COI entre los monos aulladores de Isla Coiba y península de Azuero justifican la separación de estos en dos subespecies de *A. coibensis*.

Ho: Las distancias genéticas con base a COI entre los monos aulladores de Isla Coiba y península de Azuero no justifican la separación de estos en dos subespecies de *A. coibensis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Comparar los niveles de divergencia de COI en miembros del género *Alouatta* en Panamá como criterio de validación de taxones y conocer la diversidad genética de cada uno de los grupos estudiados.

Objetivos específicos

- 1 Obtener la secuencia del gen COI para cada uno de los individuos utilizados en el estudio
- 2 Calcular las distancias genéticas de cada grupo
- 3 Determinar el número de haplotipos, diversidad haplotípica, número de sitios polimórficos y la diversidad nucleotídica.
- 4 Construir un árbol filogenético con base a las secuencias generadas en este estudio
- 5 Construir una red de haplotipos
- 6 Plantear recomendaciones para mejor manejo de la conservación de estas poblaciones de monos aulladores de Panamá.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Con base a Méndez-Carvajal (2002) el mono aullador originalmente fue descrito por primera vez como *Mycetes palliatus*, luego adoptó el nombre de mono aullador del manto dorado “*Alouatta palliata palliata*” (Gray ,1849; Lawrence 1933; Thomas ,1902). En 1902 fue nombrado como *A. palliata coibensis* en la lista de primates del Neotrópico (Milton *et al.*,1977).

La especie *A. p. palliata* fue descrita por primera vez por Gray en 1849. Este taxón tiene un pelaje color negro con pelos amarillentos claros restringidos a los flancos, mientras que otros *A. palliata* tienen el color más claro que se extiende hacia el dorso (Lawrence, 1933).

Alouatta palliata aequatorialis descrita por Festa en 1903, en Vinces, Provincia de Guayas, Ecuador, presenta un pelaje marrón chocolate con pelos de color dorado ocráceo más abundante en el parte posterior y ligeramente más corto (Elliot,1913; Lawrence,1933).

A. p. coibensis descrita por Thomas en 1902, presenta un velo más restringido a los flancos, un pelaje más opaco que el mono aullador *A. palliata*, y es más pequeño que otros monos aulladores de América Central (Ruiz-García *et al.*, 2017).

A. p. trabeata descrita por Lawrence 1903, se distingue principalmente por sus flancos y lomos dorados (puntas de los pelos de oro ocráceo), junto con un aspecto más marrón del resto del cuerpo (Hill,1962). Además, se nota un mayor grado de dimorfismo sexual en las medidas del cráneo que en otras poblaciones de aulladores centroamericanos (Lawrence,1933). En la **figura 2 y 3** se muestran individuos utilizados en este estudio.

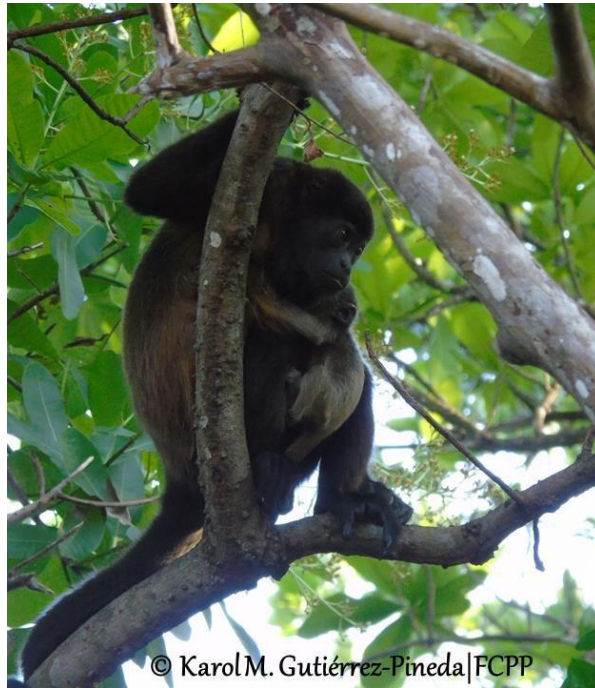


Figura 2. Hembra de *Alouatta coibensis* cargando a su cría.

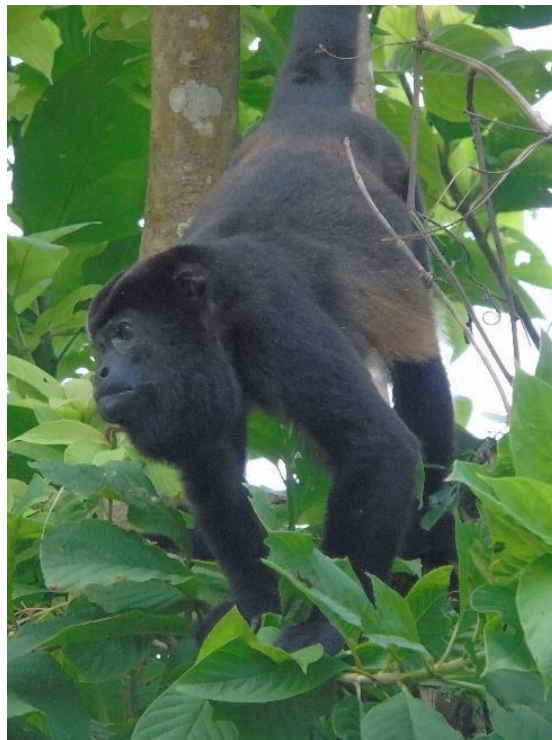


Figura 3. Macho de *Alouatta palliata* en posición defensiva ante la presencia de otra especie. (Fuente Gutiérrez-Pineda-FCPP).

En la actualidad la taxonomía de los monos aulladores de Mesoamérica se basa en estudios fenotípicos, de estructura grupal, vocalización y cariotípicos (Lawrence,1933; Horwich,1983; Cortés-Ortiz *et al.*,2003; Steinberg *et al.*,2008). Diversos autores han propuesto que los datos cromosómicos también se pueden utilizar como marcadores filogenéticos, ya que se heredan como caracteres mendelianos y se conservan dentro de las especies (Sankoff 2003, Dobigny *et al.*,2004, Stanyon *et al.*,2008).

No existe consenso con respecto al número de especies dentro del género, ni sobre las relaciones filogenéticas. El número de especies varía de 9 a 14 (Rylands, 2000; Groves,2001; 2005; Gregorin, 2006; Rylands y Mittermeier, 2009). Esto muestra la complejidad de la taxonomía del género *Alouatta* y destaca la importancia de tomar en cuenta no sólo caracteres morfométricos, si no etológicos, ecológicos y moleculares para una caracterización más precisa de las especies del género.

Pocos son los estudios moleculares que tratan sobre *A. p. palliata*, *A. p. aequatorialis*, *A. c. coibensis* y *A. c. trabeata* (Rylands *et al.*, 2006). La variación genética en poblaciones del género *Alouatta* se ha determinado utilizando diversos marcadores moleculares como aloenzimas, microsátélites y genes mitocondriales (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Jasso-del Toro, 2016). Los genes mitocondriales COI, COII y Cyt-b, han demostrado ser útiles como marcadores para establecer las relaciones filogenéticas en primates neotropicales (Ruiz-García *et al.*, 2017). Los resultados de este estudio muestran ocho clados monofiléticos, que representan ocho especies, seis de estas en América del Sur, *A. seniculus*, *A. sara*, *A. macconelli*, *A. caraya*, *A. belzebul* y *A. guariba*, y dos en Mesoamérica, *A. pigra* y *A. palliata*. Los análisis basados en ADNmt no distinguen *A. coibensis* como una especie diferente de *A. palliata*. Las posibles subespecies

de isla Coiba y península de Azuero poseen haplotipos idénticos a los observados en *A. palliata*, criterio que fue utilizado para considerarlo como parte de un mismo taxón, sin embargo, se utilizaron muy pocas muestras en este estudio (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).

Individuos *A. coibensis*, *A. palliata* y *A. p. mexicana* comparten los mismos haplotipos, mientras que *A. c. trabeata* comparte haplotipos con *A. p. aequatorialis*. Por ejemplo, el haplotipo 9 presente en monos aulladores de Honduras y Costa Rica fue también reportado en *A. c. coibensis* y *A. c. trabeata* en Panamá (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).

Estudios previos reportan que entre *A. p. palliata*, *A. p. aequatorialis*, *A.c. coibensis*, y *A. c. trabeata* no se evidencia diferencias moleculares relevantes que justifique el estatus de subespecies (Ruiz-García, *et al.*, 2017). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con el estudio que realizaron Froehlich y Froehlich (1987) quienes analizaron patrones de las crestas dérmicas de las manos y pies de *A. palliata* y *A. coibensis*, llegando a la conclusión que son especies diferentes.

Los estudios de Cortes-Ortiz *et al.* (2003) representan un buen intento de comprensión de la filogenia del género *Alouatta*, pero muchas especies como *A. coibensis* quedaron representadas con pocas muestras en el estudio, impidiendo así una conclusión certera sobre la validez o no de la especie. La taxonomía de los primates Mesoamericanos es considerado tema de controversia que sugiere ser abordado con un enfoque más holístico (Rylands *et al.*, 2006).

En un estudio sobre la vocalización de dos especies de monos aulladores (*A. p. aequatorialis*, y *A. c. trabeata*), se analizaron los ladridos y coros para comparar las bandas de frecuencias de sus aullidos. Se observaron diferencias significativas en número de bandas y en máximas frecuencias *A. coibensis* produjo series más largas de ladridos y se observó influencia de las hembras en la emisión de los ladridos en comparación con *A. palliata*. Se observaron además

diferencias entre ambas especies en cuanto a la duración, intervalos de tiempo, y número de frecuencias (Méndez-Carvajal, 2010).

A nivel cromosómico, Armada *et al.* (1987) realizaron un análisis sobre la constitución del cariotipo de *A. belzebul* con tinción con banda G, C y plata; utilizadas para teñir estructuras de interés en los cromosomas. Se estudiaron once individuos donde 10 eran de *A. b. belzebul* (tres hembras y siete machos) y uno *A. b. nigerrima* (hembra) capturados en su hábitat natural. Se observó que la constitución cromosómica de los machos ($2n = 49$) difería de las hembras ($2n = 50$) debido a una translocación de un autosoma al cromosoma Y. En *A. b. nigerrima*, el número de cromosomas diploides también era 50, aunque su cariotipo era drásticamente diferente al de *A. b. belzebul*. Los estudios cromosómicos, junto con las observaciones fenotípicas y de campo, sugieren que *A. b. belzebul* presenta variaciones respecto a la coloración del pelaje. Se sugiere que este atributo no es fiable para la identificación precisa a nivel de subespecie debido a que algunos individuos *A. belzebul* tienen un pelaje negro general en la cara y el cuerpo, con característicos pelos rojizos o castaños en manos, pies y tercios terminales de la cola, mientras que otros eran completamente negros. Estudios adicionales con tinción cromosómica multidireccional con 98 caracteres citogenéticos de tres especies de monos aulladores, *A. fusca*, *A. caraya* y *A. seniculus macconnelli* (Atelinae, Platyrrhini) y las especies mencionadas anteriormente, revelaron que los monos aulladores representan el género con la diversidad de cariotipos más extensa, con altos niveles de variabilidad cromosómica intraespecífica dentro de los Platyrrinos. El análisis filogenético de este estudio indicó que *Alouatta* es un clado monofilético que puede derivarse de un cariotipo Atelinae ancestral (Oliveira *et al.*, 2001). Posteriormente, llevaron a cabo un análisis filogenético de siete especies brasileñas de *Alouatta*, basados en datos de secuencia de ADN de citocromo b. El árbol de parsimonia y unión de

vecinos (NJ) agruparon a *A. belzebul* y *A. fusca* como grupos hermanos en un clado; mientras que en otro clado bien separado *A. seniculus* fue el taxón más basal, seguido de *A. nigerrima* como linaje hermano de *A. macconnelli* y *A. stramineus*. Las estimaciones de divergencia de secuencia interespecífica fueron generalmente bajas, y las estimaciones del tiempo de divergencia indicaron que los principales linajes de *Alouatta* surgieron durante un breve intervalo evolutivo. La comparación con datos cariotípicos confirmó la topología molecular en la cual existe una relación más estrecha entre *A. macconnelli* y *A. stramineus* con respecto a *A. nigerrima* (Bonviceno *et al.*, 2001).

Un grupo de investigadores examinaron la diversidad genética y la estructura de la población de los aulladores negros de Belice (*A. pigra*) utilizando loci de aloenzimas y ADN mitocondrial (ADNmt). La heterocigosidad media estimada a partir de las aloenzimas fue sólo de 0.021 y el 5.6 por ciento de los loci fueron polimórficos. Los análisis de ADNmt también revelaron una baja diversidad genética en comparación con otros primates. Las estadísticas F no revelaron heterogeneidad genética significativa entre las tropas dentro de la reserva Bermudian Landing, pero indicaron una deficiencia de heterocigotos en uno de los dos loci (James *et al.*, 1997).

En 2007 se analiza la diversidad genética en 159 individuos de cuatro especies diferentes de monos (*A. seniculus*, *A. palliata*, *A. caraya* y *A. macconnelli*) utilizando microsatélites. Los resultados de este estudio muestran que *A. seniculus* presentó el mayor número promedio de alelos por locus mientras *A. caraya* y *A. palliata* el menor número. *A. seniculus* presentó la mayor heterocigosidad esperada (0.638 ± 0.264) y *A. palliata* la más baja (0.452 ± 0.327). Los microsatélites que introdujeron más variabilidad genética por especie fueron D17S804 y D8S165 en *A. caraya*; AP74 y AP68, en *A. palliata*; D5S117 y D8S165, en *A. seniculus* y

D5S111 y AP68 en *A. macconnelli*. Por tanto, cada especie de aullador tiene microsatélites específicos que aportan grandes contribuciones a la diversidad genética (Ruiz-García, 2007).

Luego, Nasmientos et al. (2008) analizaron muestras de sangre de 66 individuos de *A. belzebul* de los bosques amazónicos y atlánticos de Brasil. Las muestras consistieron en 60 especímenes de la Selva Amazónica (capturados en 1984 y 1998 en el estado de Pará-PA) y seis especímenes de la Selva Atlántica (estado de Paraíba-PB). Se encontraron 32 haplotipos, 23 en PA1984, 11 en PA-1998 y un solo haplotipo en la muestra de PB. Los especímenes de PA-1984 y PA-1998 compartieron tres haplotipos, mientras que los especímenes de Pará y Paraíba no compartieron ningún haplotipo. La distancia genética entre todos los haplotipos varió entre 0 y 1,2%. La diversidad haplotípica fue muy similar ($H_d = 0,96$ y $0,93$) entre PA-1984 y PA-1998, respectivamente. La diversidad nucleotídica en PA-1984 y PA-1998 fueron las mismas ($p = 0,01$). Dos años después también en Brasil se analizaron 15 loci de microsatélites de los monos aulladores de Brasil para evaluar los efectos de la fragmentación del hábitat, el análisis incluyó dos poblaciones muestreadas en 1984, que representan ambos márgenes del río Tocantins, y tres poblaciones muestreadas 18 años después. Se observaron diferencias mínimas en los niveles de diversidad genética entre las poblaciones actuales ($H_o = 0.62-0.69$ y $RA = 6.07-7.21$) y antes de la inundación ($H_o = 0.60-0.62$ y $RA = 6.27-6.77$) indicaron que no hubo pérdida significativa de variabilidad genética. Se observaron diferencias significativas ($p = 0.05$) en los valores de R_{st} (coeficiente de diferenciación genética) en todas las comparaciones entre sitios excepto una. El R_{st} indica si hay diferencia en la estructura genética de la población. Las poblaciones actuales como las originales mostraron un déficit de heterocigotos. Además, los niveles de variabilidad genética observados en este estudio fueron más altos que los reportados para otras especies de primates neotropicales (Bastos *et al.*, 2010).

Por otro lado, Oklander *et al.* (2010) compararon la estructura genética en base a 11 microsatélites y los patrones de dispersión de dos poblaciones de *A. caraya* para comprender cómo la reducción y fragmentación del hábitat afectan el flujo de genes en esta especie. Tomaron muestras de 7 grupos que viven en bosques continuos (BC, n = 46) y 11 grupos que habitan un bosque fragmentado (BF, n = 50). Los valores de F_{st} (Variación genética entre poblaciones) mostraron una diferenciación genética reciente entre los grupos del BF. Por el contrario, el BC no mostró diferenciación entre grupos. En el BC tanto machos y hembras se dispersan, dando lugar a grupos no diferenciados compuestos por adultos que no son parientes cercanos. Por el contrario, en el BF, algunos grupos están diferenciados, los machos se dispersan más que las hembras. Sus resultados sugieren que la fragmentación del hábitat modifica los patrones de dispersión de los aulladores. El índice FIS (Coeficiente de inbreeding/endogamia) estuvo cerca de 0 en todos los grupos (intervalo de confianza 99% bootstrap - 0.050 / 0.021), lo que indica que los grupos no muestran ni deficiencia ni exceso de heterocigosi. Se evidencia por tanto que la fragmentación del hábitat limita severamente la capacidad de dispersión del mono aullador y en consecuencia tiende a reducir el flujo de genes. La diversidad genética de *A. p. mexicana*, especie críticamente amenazada en la Selva Zoque, México fue evaluada a partir de una región de 1100 bp de la región de control mitocondrial en 45 individuos. Los resultados evidenciaron la presencia de 7 haplotipos muy similares. La diversidad haplotípica ($H_d = 0.486$) y diversidad nucleotídica ($p = 0,0007$) fueron extremadamente bajas en comparación con otros primates neotropicales. No obstante, la diversidad genética en este taxón parece ser baja (Dunn *et al.* 2014). Los análisis demográficos históricos fueron consistentes con una reciente y leve expansión de la población. Recientemente en la Reserva Forestal de México Los Tuxtlas se realizó otro estudio en un bosque continuo y uno fragmentado donde se comparaba la afectación

de la diversidad genética, flujo genético y endogamia en siete grupos de *A. p. mexicana* mediante la utilización de 13 loci microsatélites de los cuales ocho fueron polimórficos. Los resultados obtenidos sugieren una baja diversidad genética ($H_o = 0.14$, $H_e=0.23$, $N_a = 2.88$), y una baja diferenciación genética ($F_{st} = 0.043$, $p = 0.01$) entre el hábitat continuo y fragmentado; y un exceso de homocigosis (Jasso-del Toro, 2016).

Con el propósito de aclarar la relación entre *A. ululata* y *A. belzebul* e inferir las relaciones con otras especies del género. Se compararon los cariotipos de *A. belzebul* y *A. ululata* y las relaciones filogenéticas con base a un fragmento de citocromo b de las especies (*A. belzebul*, *A. caraya*, *A. fusca*, *A. nigerrima*, *A. seniculus*, y *A. macconnelli*). El cariotipo de banda G de *A. ululata* (macho) muestra un número diploide de $2n = 49$, similar al de *A. belzebul*, con el mismo patrón de heteromorfismo autosómico, aparentemente como resultado de una translocación entre el cromosoma Y con un autosoma (Y-autosómica). Los análisis bayesianos y de máxima verosimilitud al igual que la red de haplotipos (MJ) muestran la falta de estructura entre *A. belzebul* y *A. ululata*. Por lo tanto, el análisis del Cyt-b no proporcionó evidencia para proponer a *A. ululata* como una especie separada de *A. belzebul*. Los análisis cariotípicos y moleculares no permitieron la separación de *A. ululata* de *A. belzebul* (Viana et al., 2015).

La sistemática de los monos aulladores en Perú fue estudiada utilizando los genes mitocondriales COI, COII y Cyt-b en 138 individuos (*A. pigra*, *A. palliata*, *A. c. trabeata*, *A. seniculus*, *A. sara* y *A. caraya*). (Ruiz-García et al., (2016). Los resultados demostraron que existe un alto grado de heterogeneidad genética entre *A. seniculus* y *A. sara* considerándolas especies diferentes. La diversidad genética fue mayor en *A. sara* con una diversidad nucleotídica (p) y un número promedio de 0.0322 y $k = 23$) que para *A. seniculus* ($p = 0.0057$ y $k = 4.15$)

La relación entre la estructura genética espacial y las características geográficas en *A. macconnelli* y *S. midas*. fue evaluada utilizando 9 loci microsátélites. Se observó una alta diversidad genética y riqueza alélica (RA) tanto en *A. macconnelli* (RA = 8.0) como en *S. midas* (RA = 8.65), No obstante, los patrones de estructura genética diferían entre las dos especies. Las hembras de *A. macconnelli*, se dispersan a un ritmo menor, pero a una distancia mayor que los machos mientras que en *S. midas* no se observó este patrón de dispersión (Lecompte *et al.*, 2016). Con la finalidad de proporcionar datos moleculares que contribuyeran a resolver el número de taxones válidos en miembros del género *Alouatta*, Ruíz-García *et al.* (2017) utilizaron los genes mitocondriales COI, COII, Cyt-b. Los resultados indican que no existen diferencias moleculares relevantes que validen el estatus de, *A. p. aequatorialis*, *A. c. coibensis*, y *A. c. trabeata* como subespecies de *A. palliata* No se encontraron diferencias en la estructura genética de *A. p. palliata* de Costa Rica, Nicaragua y Honduras. *A. p. mexicana* sin embargo registró una distancia genética de 1.6-2.1% considerado, por lo tanto, el taxón más diferenciado dentro *A. palliata*. Con base en estos resultados postularon la existencia de sólo 2 subespecies definidas dentro *A. palliata* (*A. p. palliata* y *A. p. mexicana*).

Recientemente Melo-Carrillo *et al.* (2020) evaluaron la diversidad genética y la estructura de la población de la subespecie *A.p. mexicana* en base a 83 individuos de 31 grupos muestreados en el rango de distribución de la subespecie, utilizando 29 loci de microsátélites. Sus resultados revelaron una diversidad genética extremadamente baja ($H_o = 0.21$, $H_e = 0.29$) en comparación con otros estudios con *A. palliata* y otras especies del género. Los resultados de los análisis de estructura no detectaron ningún patrón de estructura poblacional en los monos aulladores del oeste de Veracruz y Tabasco.

En la actualidad, la taxonomía y las relaciones filogenéticas de algunas de las especies del género *Alouatta* y sus poblaciones, sugieren la necesidad de realizar un estudio sistemático que incorpore diversos criterios, ya que no sólo el estatus taxonómico de *A. coibensis* está en controversia, sino también el de *A. p. mexicana* y otras especies de primates neotropicales como las del género *Ateles* (Crockett, 1998; Rylands *et al.*, 1995; 2000; 2006).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

1. Área de estudio y colecta de muestras

Se colectaron en total 85 muestras (heces, tejido y sangre) de monos aulladores en cinco lugares de Panamá: provincia de Chiriquí, Gamboa, provincia de Darién, Isla Coiba y península de Azuero (**Figura. 4**). Estos sitios fueron escogidos con el objetivo de obtener muestras representativas a lo largo del territorio panameño y analizar la diversidad genética. En la **tabla 2** se muestran las coordenadas de los sitios de colecta.

Tabla 2. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo.

LUGAR	SITIO DE COLECTA	COORDENADA NORTE (N)	COORDENADA OESTE (O)
Provincia de Chiriquí	Punta Burica / Corpachi	7° 6' 12.9"	82° 52' 5.7"
	Meseta de Chorcha	8° 24' 28.6"	82° 13' 17.9"
Gamboa	Camino del Oleoducto / P.N. S	9° 7' 15.5"	79° 42' 45.8"
Provincia de Darién	IFAD/ Yaviza	8° 18' 9.7"	77° 49' 0.2"
	IFAD/ Yaviza	8° 18' 9.5"	77° 49' 0.4"
Isla Coiba	Gambute/Mi Ambiente	7° 37' 34.7"	81° 43' 46.9"
	Los Pozos	7° 26' 25.8"	81° 43' 55.5"
Península de Azuero	La miel, Los Santos	7° 33' 47.0"	80° 19' 32.5"
	Las flores, Los Santos	7° 29' 39.1"	80° 19' 50.0"
	Oria Arriba, Los Santos	7° 34' 55.23"	80° 20' 40.17"

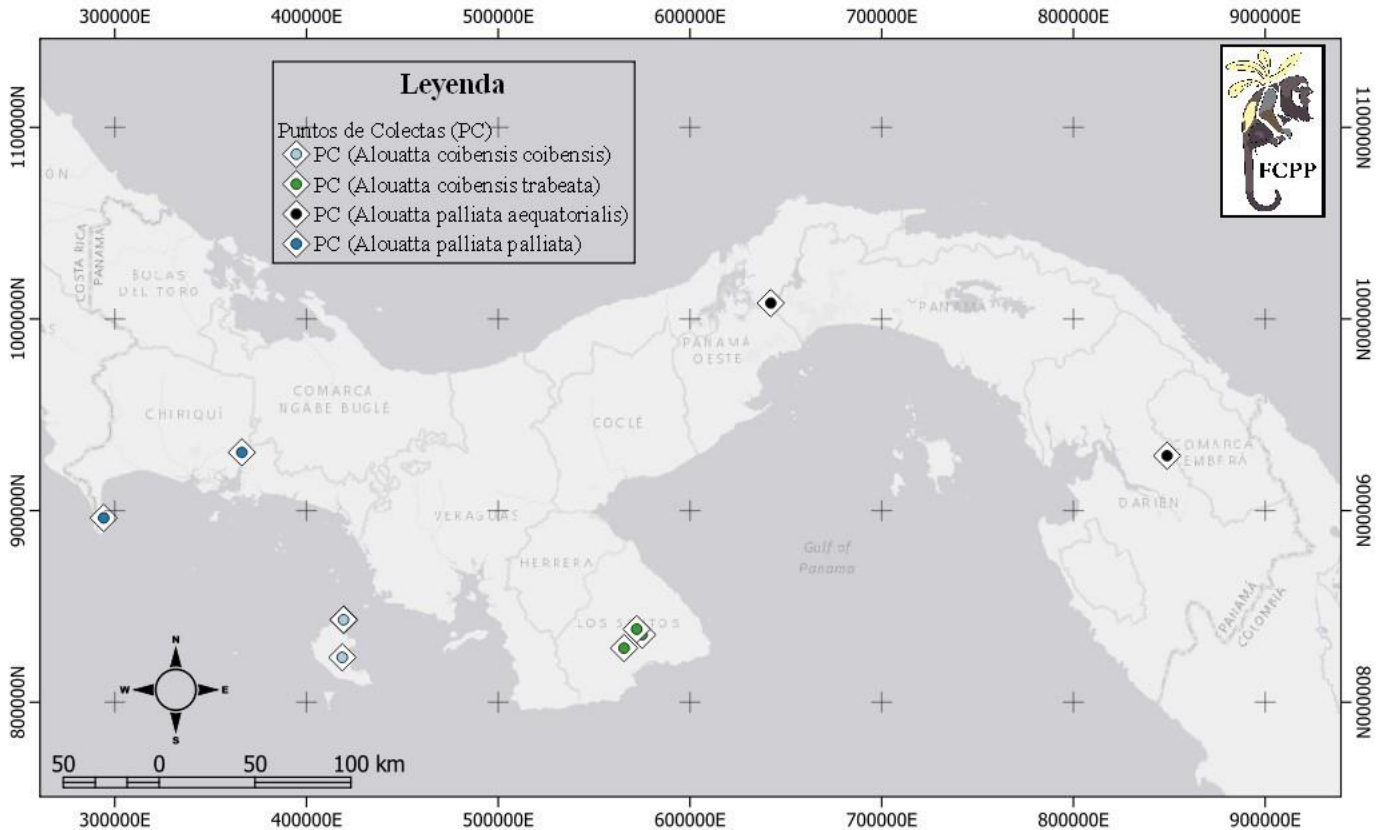


Figura 4. Sitios de colectas de las muestras utilizadas para nuestro estudio. Cada población de monos aulladores tiene un color en específico: El color celeste corresponde a los monos de Isla Coiba (*A. c. coibensis*), verde monos aulladores de la península de Azuero (*A. c. trabeata*), Negro, monos de Gamboa y el IFAD(Yaviza) (*A. p. aequatorialis*) y Azul, monos de Chiriquí (*A. p. palliata*).

Las muestras de heces fueron colectadas con guantes y cucharas desechables para evitar cualquier contaminación, luego fueron depositadas en bolsas Ziplock con alcohol al 95% y colocadas en frío con el fin de evitar la degradación del DNA. Las muestras de piel y sangre se mantuvieron igualmente en frío. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a 4° C para su posterior procesamiento (Goossens *et al.*, 2011).

El ADN se obtuvo mayormente de heces a excepción de cuatro individuos de Azuero que se usó músculo y una de sangre.

Se lograron obtener secuencias de 51 muestras: 14 muestras de Isla Coiba, 14 de la Península de Azuero, 12 de la provincia de Chiriquí, 8 de la provincia de Darién y 3 de Gamboa, Parque Nacional Soberanía, provincia de Panamá.

2.Extracción de ADN y amplificación por PCR

2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó a partir de las muestras de heces utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Stool DNA kit (Omega Bio-tek, Inc. Georgia, USA). El ADN de las muestras de sangre y piel se extrajo utilizando el kit E.Z.N.A.® Tissue DNA kit (Omega Bio-tek, Inc. Georgia, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen total de 50 μ L. Una alícuota de 3 μ L de EL ADN extraído fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con GelRed (Biotium, Inc., Fremont, CA 94538, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular Lambda Hind III (VWR, 50-2000 bp) o PGEM (Promega, catálogo G1471) con el propósito de estimar el tamaño y la integridad del ADN extraído. El resto del ADN fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Jasso-del Toro *et al.*, 2016).

2.2 Amplificación por PCR y electroforesis en gel de Agarosa

El ADN genómico fue utilizado como templado para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 650 pb de la región 5' del gen Citocromo oxidasa c subunidad I (COI) del ADN mitocondrial mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizaron los cebadores universales LCO1490 (5'GGTCAACAAATCATA AAGA TA TTGG-3') y HCO2198 (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') descritos por (Folmer *et al.*, 1994).

La PCR se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y las condiciones utilizadas fueron de: 94°C durante 3 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 52°C por 45 s, 72° C por 45 s y una extensión final de 72°C por 5 minutos (Sousa *et al.*, 2012). Cada reacción contenía 15 µl de mastermix (Omega Bio-tek, Inc. Georgia, USA), 1 µl de DNA genómico, 0.5 µl de cada cebador (10mM) y 13 µl de agua libre de nucleasas en un volumen final de 30 µl. Los productos de la amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE y teñidos con GelRed (Biotium, Inc., Fremont, CA 94538, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular HyperLadder™ 100 bp (BIOLINE) para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados. La electroforesis en gel se realizó a 85 V durante 50 minutos y los resultados de la amplificación fueron fotografiados y guardados en el Gel Doc™ EZ System (BioRad).

2.3 Secuenciación

Los productos de la reacción de amplificación (PCR) fueron enviados a secuenciar a la compañía Psomagen, Inc (Maryland, USA).

3. Edición e identidad de las secuencias

Las secuencias generadas fueron editadas con el programa Sequencher (Gene codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) y cortadas en los extremos con el objetivo de obtener secuencias con la misma cantidad de pares de bases. Las secuencias fueron alineadas utilizando ClustalW (<https://www.genome.jp/24olos-bin/clustalw>).

La identidad de cada secuencia fue verificada contra la base de datos de secuencias depositadas en Genbank (NCBI-NIH) utilizando Blastn (Basic Local Alignment Search Tools) como también en Barcode of Life Data Systems (BOLD) (<http://www.barcodinglife.org/>).

4. Distancia y Diversidad genética

Las distancias (p) entre pares de secuencia fueron calculadas usando el programa MEGA 6, "Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6" (Tamura *et al.*, 2013). Se calculó también la distancia genética K2P (Kimura 2-Parameter) (Kimura, 1980) que fue utilizada para determinar el porcentaje de divergencias genéticas dentro y entre taxones putativos de *A. palliata*.

La diversidad genética fue estimada usando el software DNAsp v 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Se estimó el número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), Sitios polimórficos (S) y diversidad nucleotídica (p) como medidas de la diversidad genética.

5. Árbol Filogenético

Las secuencias alineadas se utilizaron para construir dos árboles de filogenia, con el método de distancia K2P Neighbor-joining y el método de caracteres de Máxima verosimilitud (ML) utilizando el modelo evolutivo HKY+G. El modelo evolutivo fue determinado utilizando el Model test en el programa Mega 6.05 (Tamura *et al.*, 2013) que determina el mejor modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos. El soporte topológico se estimó con 1000 réplicas de Bootstrap.

En la construcción de los árboles de filogenia se utilizaron como grupos externos (outgroups) la secuencia de las especies *Alouatta caraya* (MN046904.1), *Alouatta guariba* (MN235781.1) y *Ateles geoffroyi* (AB016730) obtenidas del Genbank. El grupo externo es el grupo más distante y se utiliza para localizar la raíz del árbol y darle robustez.

6. Red de Haplotipos

Se utilizó el programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009) para construir una matriz de datos para cada haplotipo. La matriz generada fue utilizada para construir la red de haplotipos con el programa PopART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) y el método TCS Network (Clement *et al.*, 2002).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

1. Distancias genéticas del género *Alouatta* en Panamá

Se determinó la distancia genética K2P a partir de las secuencias parciales del gen mitocondrial COI de las subespecies en controversia del género *Alouatta* en Panamá (*A. c. coibensis* de Isla Coiba, *A. c. trabeata* de la península de Azuero, *A. p. palliata* de la provincia de Chiriquí y *A. p. aequatorialis* de las provincias de Panamá (Parque Nacional Soberanía) y de Darién. Las distancias genéticas entre individuos de la misma subespecie putativa fueron mayor en *A. c. coibensis* (0-1.3 %) mientras que en *A. c. trabeata* fue de 0-0.2 %. Las distancias genéticas entre individuos de diferentes supuestas subespecies varió de 0 a 1.7 % entre *A. p. aequatorialis* y *A. p. palliata* mientras que la menor distancia se registró entre *A. c. trabeata* y *A. p. aequatoriales* (0-1%) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas (K2P) entre individuos de la misma supuesta “subespecie” y entre diferentes supuestas subespecies.

	<i>A.c. coibensis</i>	<i>A. c. trabeata</i>	<i>A. p. palliata</i>	<i>A. p. aequatorialis</i>
<i>A. c. coibensis</i>	0.000-0.013			
<i>A. c. trabeata</i>	0.000-0.013	0.000-0.002		
<i>A. p. palliata</i>	0.000-0.013	0.000-0.012	0.000-0.012	
<i>A. p. aequatorialis</i>	0.000-0.015	0.000-0.010	0.000-0.017	0.000-0.008

2. Diversidad genética del género *Alouatta* en Panamá.

De las 85 muestras procesadas, se lograron obtener 51 secuencias con valores de alta calidad ($QV \geq 30$) de COI que fueron utilizadas para estimar diferentes medidas de diversidad genética en cada “subespecie” (**Tabla 4**). *A. c. coibensis* registró los valores más altos de diversidad genética con una diversidad haplotípica (Hd) de 0.7363, una diversidad nucleotídica (p) de 0.0038 y 9 sitios polimórficos (s). Los valores más bajos de diversidad genética se observaron en *A. c. trabeata* con Hd y p de 0.1429 y 0.002 respectivamente y un solo sitio polimórfico.

Tabla 4. Valores de diversidad genética del género *Alouatta* basados en la secuencia de un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa C subunidad I

COI						
ID	N	L	h	Hd	S	P
<i>A. p. coibensis</i>	14	526	6	0.7363	9	0.0038
<i>A. p. trabeata</i>	14	526	2	0.1429	1	0.0002
<i>A. p. palliata</i>	12	526	4	0.6818	6	0.0032
<i>A. p. aequatorialis</i>	11	526	2	0.1818	4	0.0013

N: número de individuos, L: longitud de la secuencia, h: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotípica, S: Sitios polimórficos, p: diversidad nucleotídica.

3. Árbol Filogenético

El criterio de información Bayesiana (BIC) (3644.032) y de información de Akaike (2736.924) obtenidos con el Model Test indican que el modelo evolutivo que mejor se ajusta a nuestras secuencias es el de Hasegawa, Kishino y Yano con distribución Gamma (HKY +G).

Las relaciones filogenéticas de los grupos estudiados fueron establecidas mediante la construcción de dos árboles filogenéticos Neighbor-joining (NJ) (**Figura 5**) basados en distancia y de Máxima Verosimilitud (ML) (**Figura 6**) basado en caracteres.

El modelo evolutivo para estimar las distancias en la construcción del árbol NJ fue Kimura 2 parámetro (Kimura, 1980) y los análisis evolutivos de ML se realizaron implementando el modelo estadístico HKY + G.

Los dos árboles filogenéticos (ML y NJ) mostraron patrones similares con muy pocas diferencias, ya que en ambos árboles las secuencias agruparon en un mismo clado, con excepción de las secuencias utilizadas como grupo externo (*A.caraya* y *A.guariba*). En el árbol NJ el valor de Bootstrap fue de 100 % y en el árbol de ML el Bootstrap fue de 97%.

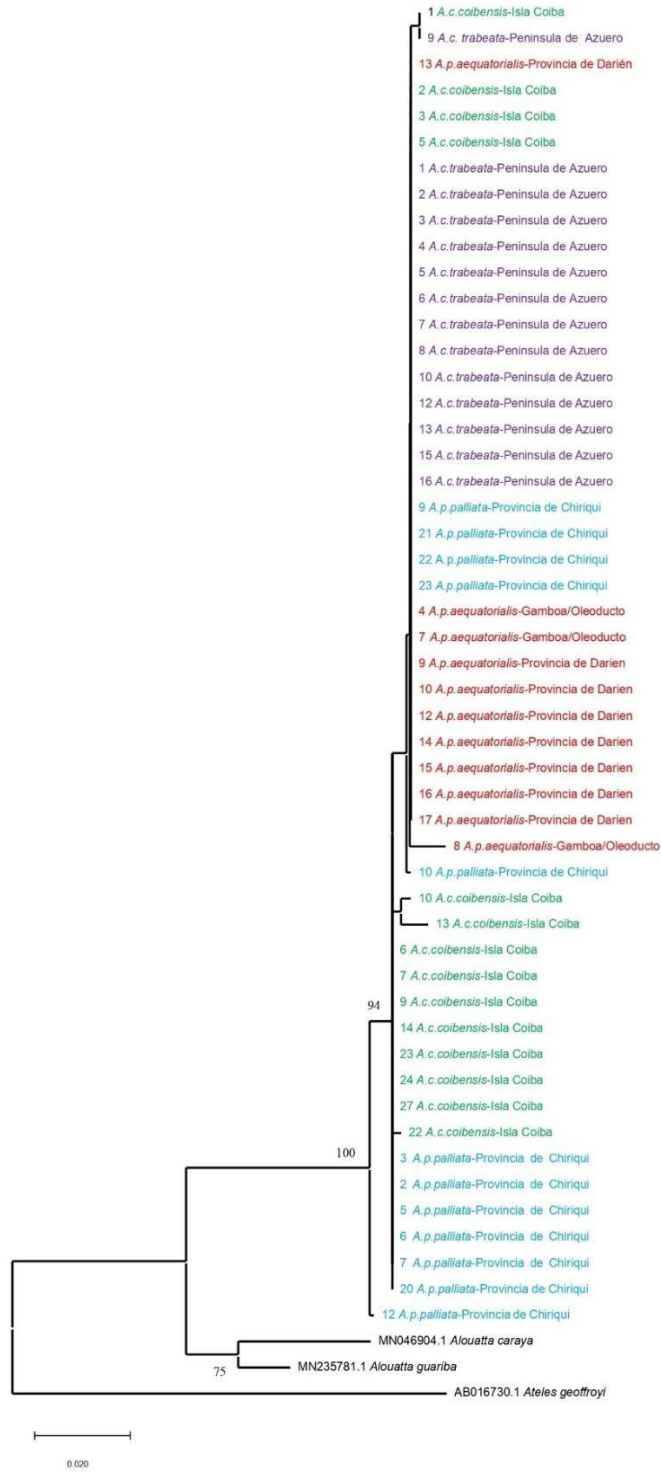


Figura 5. Árbol Neighbor-Joining con distancia Kimura 2P, para diferentes poblaciones del género *Alouatta* presente en Panamá. Con 1000 réplicas.

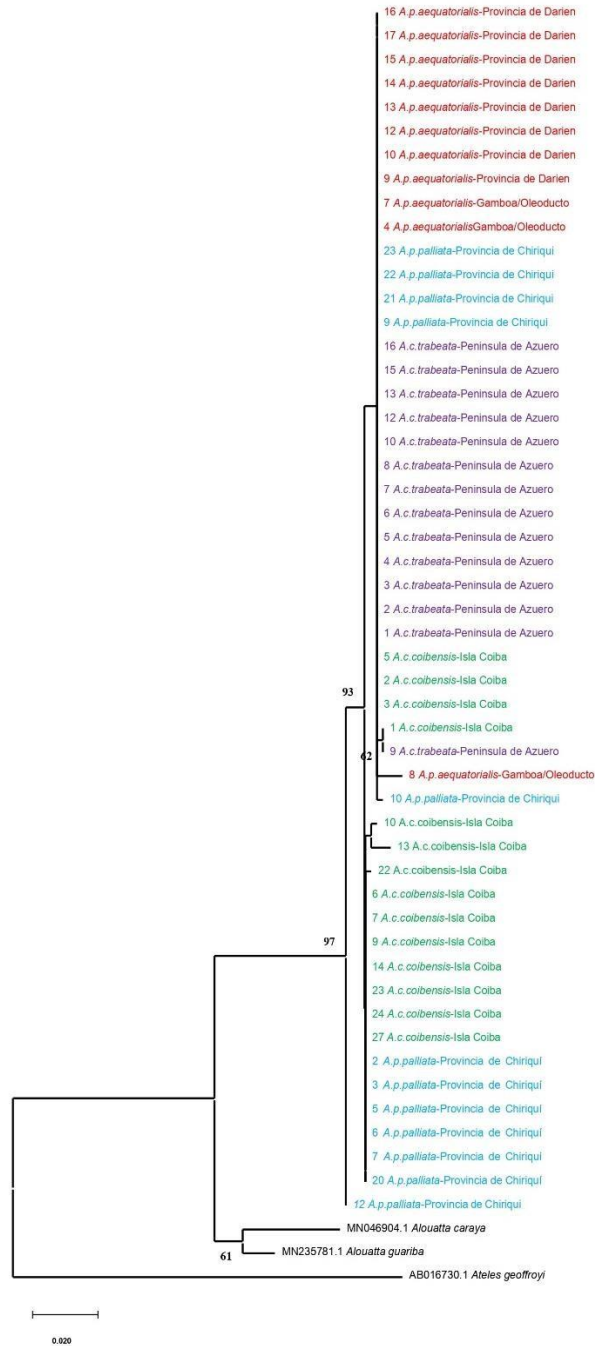


Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud usando el modelo HKY + G. El endogrupo está constituido por especies y subspecies del género *Alouatta*; el grupo externo *A. caraya*, *A. guariba* y atelidae: *Ateles geoffroyi*.

4. Red de Haplotipos

Se observaron en total 9 haplotipos en las 51 secuencias utilizadas (**Figura 7**). El haplotipo 2 es el de mayor frecuencia (Y/X) y está presente en individuos de todas las poblaciones. Los haplotipos presentes en *A. p. palliata*, *A. c. trabeata*, *A. p. aequatorialis* y *A. c. coibensis* se derivan del haplotipo 2. El haplotipo 2 se presenta con mayor frecuencia en individuos *A. c. trabeata* (Azüero). El haplotipo 1, 3, 7 y 9 se derivan de este haplotipo. El haplotipo 3 es el segundo con mayor frecuencia (Y/X) y está presente solamente en individuos designados como *A. c. coibensis* y *A. p. palliata*. Los haplotipos 6 y 8 se derivan del haplotipo 3. El 66.6 % (6/9) de los haplotipos observados son únicos y de éstos el 50 % (3/6) están presentes en *A. c. coibensis*. El círculo negro presente en nuestra red de haplotipos un haplotipo que no fue muestreado.

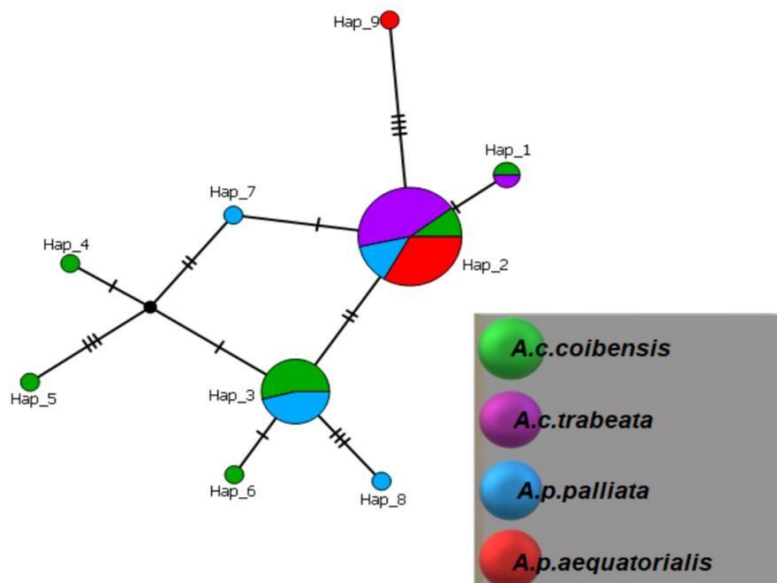


Figura 7. Median Joining Network (MNJ). Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas entre las secuencias (individuos). Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño la frecuencia relativa de cada haplotipo. Los colores representan las supuestas subespecies: verde *A. c. coibensis*, morado *A. c. trabeata*, celeste *A. p. palliata* y rojo *A. p. aequatorialis*.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Diversidad Genética

La variación genética en diferentes poblaciones del género *Alouatta* ha sido analizada utilizando diversos marcadores moleculares tales como isoenzimas, aloenzimas, microsatélites y ADN mitocondrial (ADNmt) (Jasso-del Toro *et al.*, 2016). Los microsatélites han sido los más utilizados principalmente en las especies *A. palliata*, *A. caraya* y *A. pigra*. Las especies *A. belzebul* y *A. seniculus* reportan los más altos niveles de diversidad genética con distintos marcadores moleculares, *A. caraya* tiende a mostrar niveles intermedios de diversidad genética (isoenzimas) aunque existen casos en los que se han obtenidos valores cercanos a los de *A. belzebul* y *A. seniculus*, (microsatélites y ADNmt). Sin embargo *A. pigra* y *A. palliata* son las especies que presentan niveles bajos de diversidad genética (ADNmt, isoenzimas y microsatélites) (Jasso-del Toro *et al.*, 2016).

La diversidad genética estimada a partir de COI en este estudio registró los valores más altos en individuos de isla Coiba designados como *A. c. coibensis*. La diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y sitios polimórficos fue de 0.7363, 0.0038 y 9 respectivamente. Estos valores son relativamente altos comparados los reportados en individuos de *Macaca fuscata yakui* de la Isla Yakushima; una isla con una superficie de 504,9 km² similar a la superficie de Isla Coiba, pero con mayor densidad de individuos que los reportados en Coiba. En el caso de la Isla Yakushima se sugiere que la explosión de la caldera Kikai pudo haber causado la extinción de algunos mamíferos en la isla incluido los macacos, reduciendo la diversidad genética y provocando un cuello de botella poblacional (Hayaishi & Kawamoto ,2006). A pesar de que la superficie de

Isla Coiba (503 km²) es muy similar a la de Yakushima, contrasta el tamaño de la población reportada en isla Coiba y Yakushima (XX). La población estimada de aulladores en Coiba es aproximadamente 472 individuos con promedios de 4.3 individuos/grupo y estimaciones de 109 grupos (Méndez-Carvajal, 2012). Es probable que la cacería de monos aulladores en Isla Coiba, en la época que existía el penal sea la causa del reducido tamaño de la población (Milton & Mittermeier, 1997). Otros factores relacionados con el tamaño poblacional observado en isla pueden ser el endemismo, la alimentación y la biología del aullador de Coiba (MéndezCarvajal, 2012). En general se espera que las poblaciones insulares posean una menor diversidad genética que las poblaciones continentales. sin embargo, en Coiba es relativamente mayor en comparación con las poblaciones continentales en este estudio. Es posible que las condiciones que se presentan en Coiba contribuyan a mantener la diversidad genética observada en la Isla. La Isla está cubierta casi en su totalidad por bosques primarios con abundante vegetación, los pocos depredadores naturales (boas y cocodrilos) no representan una amenaza real para los aulladores y no existen barreras geográficas que impidan el libre movimiento de individuos de un grupo a otro. Resultados similares se reportaron en un estudio de *A. palliata* en Barro Colorado, una Isla con superficie de 15 km² donde observó a partir de aloenzimas una alta diversidad genética ($H_d = 0.584 \pm 0.063$) a pesar de que hubo una disminución de la población en los años 40 por el brote de la fiebre amarilla (Milton *et al.*, 2009).

Los valores más bajos de diversidad genética se observaron en individuos designados como *A. c. trabeata* con $H_d = 0.1429$. Esta baja diversidad genética observada puede ser el resultado de la fragmentación del hábitat en que se encuentran esas poblaciones. La fragmentación del bosque es uno de los principales factores que afecta la reducción de la diversidad biológica

(Lacy ,1988). La fragmentación del hábitat puede aislar poblaciones, limitando la dispersión (Sterck, 1998). La diversidad genética puede afectarse por la fragmentación, ya que tiende a provocar reducción de los tamaños poblacionales, aislamiento entre poblaciones y limitar la distribución de los individuos entre parches (Frankham, Ballou y Briscoe, 2010). Los individuos de la población *A. c. trabeata* habita en la península de Azuero y esta región es actualmente una zona de fragmentación. Los monos aulladores de Azuero han sido fuertemente marginados a parches de bosques que han estado en fincas privadas. La mayoría de estos grupos están limitados en cuanto a movilidad, fuente alimenticia, agua, bosque de galerías y cercas vivas (Méndez-Carvajal, 2006; 2013). Diversos estudios reportan una baja diversidad genética en zonas fragmentadas; Winkler *et al.* (2004) reportaron para poblaciones de *A. pigra* (Belice) una baja heterocigosidad ($H_d=0,43$). Gonçalves *et al.* (2004) determinaron una diversidad genética de $H_o= 0,35$ a $0,93$ para la especie *A. belzebul*. Ruiz-García *et al.* (2007) reportaron para la especie *A. seniculus* (Colombia) una baja diversidad genética ($H_e=0,469$). *A. caraya* del norte de Argentina presento una baja diversidad genética ($H_e=0,50$) (Oklander *et al.*, 2010).

Van Belle *et al.* (2012) realizaron estudios de diversidad genética con *A. pigra* en el Parque Nacional Palenque, México, con marcadores microsátélites. La heterocigosidad observada (H_o) en *A. pigra* fue $H_o = 0.588$, considerada relativamente baja. Posteriormente, Arguello-Sánchez, 2012 estimó la diversidad genética utilizando una región de 331 bp del gen mitocondrial Citocromo b (Cyt-b) en 46 individuos de *A. p. palliata* del estado de Veracruz, México y encontró una $H_d = 0.76$ (moderadamente a alta). Ellos sugieren que la fragmentación del hábitat aun no afectó los niveles de diversidad genética debido a que la fragmentación es relativamente reciente (hace aproximadamente 60 años).

Sin embargo, Dunn *et al.* (2014) estimó a partir de la región del control mitocondrial en poblaciones también de *A. p. mexicana* de la Selva Zoque también en el estado de Veracruz, México una $H_d = 0.49$, considerada baja. Estos resultados son consistentes con los reportados por

Jasso-del Toro *et al.* (2016) quienes determinaron la diversidad genética en la misma especie en 4 grupos en hábitat continuos y 3 en fragmentos de selva, localizados en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. La diversidad genética fue baja ($H_o = 0.14$, $H_e = 0.23$, $N_a = 2.88$), y una baja diferenciación genética ($F_{st} = 0.043$, $p = 0.01$) entre el hábitat continuo y fragmentado. La fragmentación puede afectar la velocidad a la que los individuos se mueven entre estos parches de hábitat fragmentado y por lo tanto afectar el flujo de genes. Si el flujo de genes es alto, entonces la población fragmentada se comporta como una sola unidad y el efecto de la fragmentación es insignificante, pero si el flujo de genes está limitado, es probable que alelos se fijen en poblaciones locales pequeñas (Collevatti *et al.* (2013).

La diversidad genética en *A.p. aequatorialis* fue de $H_d=0.1818$ considerada baja comparada con el estudio de Ruiz-García (2017) que reportó una $H_d=0.912$. Es posible que la baja diversidad genética observada en nuestro estudio sobre *A. p. aequatorialis* tenga relación con el área de muestreo, ya que todas las muestras fueron colectas de un mismo grupo, mientras que la diversidad genética reportada por Ruiz- García fue estimada a partir de individuos de diferentes sitios de colectas en Colombia y Ecuador.

En nuestro estudio *A. p. palliata* registró una diversidad haplotípica de ($H_d= 0.6818$), un poco más alta que la reportada por Ruíz-García *et al.* (2017), para especímenes de Costa Rica, Honduras y Nicaragua la cual fue de $H_d=0.567$. Sin embargo, los valores totales estimados a nivel de especies (*A. palliata*) fueron similares a los nuestros ($H_d=0.674$). La diversidad

nucleotídica determinada en este estudio para los especímenes identificados como *A. palliata* fueron también similares a los registrados por nosotros para *A. p. palliata*.

Se ha reportado que las poblaciones de monos aulladores que se distribuyen en Norteamérica presentan una menor diversidad genética respecto a los de Centroamérica y Suramérica (Ellsworth y Hoelzer, 2006; Solórzano-García, *et al.*, 2021). Estudios reportan una relación negativa entre la diversidad genética y la latitud, es decir que a medida que latitud norte aumenta se observa una disminución en la diversidad genética (número promedio de alelos, heterocigocidad observada y heterocigocidad esperada) (Winkler *et al.*, 2004; Ellsworth & Hoelzer, 2006; Milton *et al.*, 2009; Cortés-Ortiz *et al.*, 2010; Jasso del toro *et al.*, 2016; Solórzano-García, *et al.*, 2021). Además de la historia biogeográfica, otros factores como como el nivel, tiempo de fragmentación, los cuellos de botella debidos a la destrucción del hábitat, las catástrofes y las enfermedades pueden ser responsables de una diversidad genética baja (Pavelka *et al.*, 2003; Oklander *et al.*, 2010).

Distancia Genética

Las distancias genéticas entre individuos de la misma taxa putativa presentó un rango de variación de 0 a 1.3 %. El mayor rango de variación fue observado en individuos designados como *A. c. coibensis* (0-1.3 %). En individuos designados como *A. c. trabeata* se observó una distancia genética de 0 a 0.2 %. Las distancias genéticas entre diferentes taxa putativas varían de 0 a 1.7 %. La mayor distancia se registró entre *A. p. aequatoriales* y *A. p. palliata* (0-1.7 %) mientras que la menor distancia se registró entre *A. c. trabeata* y *A. p. aequatoriales* (0-1%). En general, las distancias intraespecíficas en genes mitocondriales rara vez son superiores al 2% y la mayoría son inferiores al 1% (Avice, 2000).

Las distancias mayores de 2 % comúnmente se observan entre especies diferentes (Hebert *et al.*, 2003). Sin embargo, Agrizzi *et al.* (2012) estimaron con el gen mtCOI, una divergencia genética intraespecífica promedio de 2.0% y 1.9% con el gen Cyt-b en diferentes especies de Didelphidae.

En primates neotropicales se reportan distancias genéticas promedio para el gen mitocondrial COII entre géneros de 15.68% \pm 1.73%; entre especies dentro de un género de 5.82% \pm 1.64% y entre subespecies dentro de especies 2-4% (Collins & Dubach, 2000b; Ascunce *et al.*, 2003).

Collins y Dubach (2000b) determinaron una distancia genética promedio de 4.3% (con un máximo de 4.7%) entre especies del género *Ateles* (monos araña) y una distancia genética promedio de 2.69% (máximo de 3.07%) entre subespecies. Ascunce *et al.*, (2003) también reportaron, con el gen mtCOII, una distancia genética media del 5.76% entre las especies del género *Alouatta* y de 7.4% entre especies del género *Aotus* (monos nocturnos). La distancia genética K2P generadas a partir de secuencias de mtCOII en 5 poblaciones de *A. palliata* (*A. p. aequatorialis* en Ecuador y Colombia, *A. coibensis* en Panamá, *A. p. palliata* en Costa Rica, Honduras y Nicaragua, y *A. p. mexicana* en México) fue de 0.2-0.8% (Ruiz-García *et al.*, 2017).

Las distancias genéticas observadas en nuestro estudio no apoyan la separación de los individuos en taxa diferentes. No se observó una brecha “gap” al comparar las distancias entre supuestas subespecies y las observadas entre individuos de la misma “subespecie”. Se observaron distancias entre individuos de la misma subespecie que se sobreponen con las distancias entre “subespecies”.

Estos resultados se corresponden con los reportados por Ruíz-García *et al.*, (2015) quienes determinaron que la distancia genética entre *A.p. mexicana* y otros miembros de esta especie fue

de 1.6-2.1%. Con base a este resultado proponen que *A. palliata mexicana* debe ser considerada una subespecie de *A. palliata*.

Ruíz-García *et al.*, (2014) determinaron una distancia genética promedio ($2.32\% \pm 0.46\%$) entre los cuatros taxones del género *Lagothrix* (*L. l. cana*, *L. l. lagothricha*, *L. l. lugens* y *L. l. poeppigii*.) con una distancia mayor entre *L. l. poeppigii* y *L. l. cana* (2.87%). Los autores sugieren que no son especies completas y que los valores obtenidos fueron más bajos comparados con los valores obtenidos para otras especies reconocidas de primates neotropicales.

Análisis Filogenético

Los árboles NJ y ML generados a partir de secuencias parciales del gen citocromo oxidasa C subunidad I agruparon en un solo clado los especímenes de Panamá utilizados en este estudio. No se observaron en los monos aulladores en Panamá diferencias relevantes entre los cuatro grupos (*A. p. palliata*, *A. p. aequatorialis*, *A. c. coibensis*, y *A. c. trabeata* que sustente la separación en taxa diferentes. Los resultados de distancia genética generados a partir del gen mitocondrial utilizado apoyan la existencia de una sola una especie de mono aullador en el territorio panameño. Cortes-Ortiz *et al.* (2003) reportan en su análisis basado en ADNmt que no distingue *A. coibensis* como filogenéticamente distinto de *A. palliata*, y las subespecies de la isla Coiba y la península de Azuero presentan haplotipos de ADNmt idénticos a secuencias observadas para individuos *A. palliata*.

Ruíz -García *et al* 2017 no validan *A. coibensis* como una especie separada de *A. palliata*. No detectaron una estructura espacial dentro *A. p. palliata* en Costa Rica, Nicaragua y Honduras. Algunos haplotipos se distribuyeron ampliamente en gran parte del rango de distribución de *A.*

palliata. El haplotipo 9, se observó en especímenes de Honduras, Costa Rica y en especímenes de Panamá nombrados como (*A. c. coibensis* y *A. c. trabeata*).

Red de haplotipos

Las redes de unión medianas (MJN) son una de las herramientas más utilizadas en estudios filogeográficos (Bandelt *et al.*, 1999), para visualizar las relaciones entre taxones (Langford *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013) y la estructura de la población (Campos *et al.*, 2013; Lima & McCartney, 2013).

La red de haplotipos MNJ y el árbol filogenético de ML mostraron en efecto que el nivel de divergencia no sustenta la separación de estos grupos en taxones diferentes. El número de cambios (mutaciones) que separa un haplotipo de otro es en general bajo lo cual aunado al hecho de que individuos designados como *A.p. palliata*, *A.p. aequatorialis* *A.c. coibensis* y *A.c. trabeata* compartan un mismo haplotipo (haplotipo 2) no sustenta la separación en diferentes taxa.

CONCLUSIÓN

Las distancias genéticas inferidas a partir de la secuencia parcial del gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I no justifican la separación de los individuos designados como

A.p. palliata, *A. p. aequatorialis*, *A. c. coibensis* y *A. c. trabeata* en taxa diferentes al igual que los árboles filogenéticos y la red de haplotipos. Con base en estos y otros resultados las diferencias en coloración, estructura grupal, patrones dérmicos y de vocalización parecen no ser suficientes para la identificación a nivel de especie.

La diversidad genética relativamente alta observada en individuos designados como *A. c. coibensis* resulta de interés ya que no se ajusta a la generalidad observada en las poblaciones insulares con un tamaño poblacional bajo. Estos resultados ameritan estudios adicionales con la finalidad de determinar qué factores contribuyen con la diversidad genética observada a pesar del aislamiento y el tamaño poblacional. Por otro lado, la baja diversidad genética observada en *A. c. trabeata* parece ser el resultado de la fragmentación del hábitat de este grupo como ha sido reportado en otros estudios.

RECOMEDACIONES

- Utilizar marcadores mitocondriales adicionales y nucleares que permitan validar los valores diversidad genética reportados.
- Incrementar el número de áreas de colecta y el tamaño de la muestra (número de individuos) para obtener una mejor representación de toda la población de monos aulladores en Panamá.
- Utilizar preferiblemente otro tipo de muestras (pelo, tejido, sangre), a partir de las cuales se obtiene ADN de mejor calidad y en mayor cantidad.
- Realizar estudios sobre la estructura genética y comportamiento de las poblaciones de monos aulladores que habitan en Isla Coiba e Isla Jicarón, debido a que se tiene poca información. Estos estudios contribuirán a entender las diferencias morfológicas que se presentan actualmente entre las poblaciones de isla y tierra firme.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acosta, L. (2007). Macro lepidópteros de hábitos diurnos en la meseta de Chorcha, Chiriquí, Panamá, 2005-2006. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Chiriquí., David.
2. Agrizzi, J., Loss, A. C., Farro, A. P., Duda, R. C., & Leite, Y. L. (2012). Molecular diagnosis of Atlantic Forest mammals using mitochondrial DNA sequences: *didelphid marsupials*. *The Open Zoology Journal*, 5(1): 2-9.
3. Agropecuario, M. D. (1985, 24 de junio). Decreto No. 13 de 27 de mayo de 1980, por el cual se crea el Parque Nacional "Soberanía" en el área del Canal de Panamá. Gaceta Oficial LXXXII (20.333).
4. Argüello-Sánchez, L. E. (2012). Genética de la conservación en *Alouatta palliata mexicana*: evaluación del efecto de la fragmentación del hábitat y sus poblaciones en Veracruz. [Tesis de Maestría]. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa.
5. Armada, J. L., Barroso, C. M., Lima, M., Muniz, J. A., & Seuánez, H. N. (1987). Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. *American Journal of Primatology*, 13(3): 283-296. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350130306> .
6. Arroyo-Rodríguez, V., Mandujano, S., & Cuende-Fanton, C. (2005). Ocupación de parches de selva por monos aulladores *Alouatta palliata mexicana* en tres paisajes con

diferente grado de fragmentación en Los Tuxtlas, México. *Universidad y Ciencia*, II:23-34.

7. Ascunce, M. S., Hasson, E., & Mudry, M. D. (2003). COII: a useful tool for inferring phylogenetic relationships among New World monkeys (Primates, Platyrrhini). *Zoologica Scripta*, 32(5): 397-406.
8. Avise, J. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. London: Harvard University Press.
9. Bastos, H. B., Gonçalves, E. C., Ferrari, S. F., Silva, A., & Schneider, M. P. (2010). Genetic structure of red-handed howler monkey populations in the fragmented landscape of Eastern Brazilian Amazonia. *Genetics and Molecular Biology*, 33(4): 774–780.
10. Bonvicino, C. R., Lemos, B., & Seuánez, H. N. (2001). Filogenética molecular de los monos aulladores (*Alouatta*, Platyrrhini). *Cromosoma*, 110(3): 241–246. DOI 10.1007/s004120000128 .
11. Campos, R., Torres-Pérez, F., Botto-Mahan, C., Coronado, X., & Solari, A. (2013). High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 19: 280-286.

12. Cao, L., Liang, X. F., Tang, W., & Zhao, J. (2013). Phylogeography of *Coreoperca whiteheadi* (Perciformes: Coreoperca) in China based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50: 223-231.
13. Case, T. J., Bolger, D. T., & Richman, A. D. (1992). Reptilian Extinctions: The Last Ten Thousand Years. En P. Fiedler, & S. Jain, *Conservation Biology*. (pp. 91-125.) https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6426-9_5. Boston: Springer.
14. Castro, A. (1986). Análisis fisiográfico de la meseta de Chorchá. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Chiriquí, David.
15. Claudino-Sales, V. (2019). Coiba National Park and Its Special Zone of Marine Protection, Panama. In: Coastal World Heritage Sites. *Coastal Research Library*. Panama: Springer, Dordrecht (vol. 28). https://doi.org/10.1007/978-94-024-1528-5_57.
16. Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Proceedings 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium* (pp. 7) doi: 10.1109/IPDPS.2002.1016585). Miami (FL): Ft. Lauderdale.
17. Collevatti, R., Souza-Neto, A., Silva-Jr, N., & Telles, M. (2013). Kin structure and parallel dispersal in the black-and-gold howler monkey *Alouatta caraya* (Platyrrhini, Atelidae). *Genetics and Molecular Research*, 12 (4): 6018-6031.

18. Collins, A. C., & Dubach, J. M. (2000). Biogeographic and ecological forces responsible for speciation in *Ateles*. *International Journal of Primatology*, 21(3): 421-444
<https://doi.org/10.1023/A:1005487802312>.
19. Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I., & RuizGarcía, M. (2003). Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(1): 64-81.
[https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00308-1).
20. Cowlshaw, G., & Dumar, R. (2000). *Primates Conservation Biology*. Chicago: University of Chicago Press.
21. Crockett, C. M. (1998). Conservation biology of the genus *Alouatta*. *International Journal of Primatology*, 19(3): 549-576. <https://doi.org/10.1023/A1020316607284>.
22. Cuarón, A.D., Palacios, E., Morales-Jiménez, A.L., Shedden, A., Rodriguez-Luna, E., de Grammont, P.C., Méndez-Carvajal, P. & Cortés-Ortiz, L. 2020. *Alouatta palliata* ssp. *trabeata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T43900A17979140. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20202.RLTS.T43900A17979140.en>. Downloaded on 03 December 2021.
23. Diamond, J. (1984). “Normal” extinction in isolated populations. En M. Niteck, *Extinction* (pp. 191-245). New York: University of Chicago.

24. Dobigny, G., Ducroz, J., Robinson, T., & Volobouev, V. (2004). Cytogenetics & Cladistics. *Systematic Biology*, 53(3): 470–484. doi: 10.1080/10635150490445698.
25. Dunn, J. C., Shedden-González, A., Cristóbal-Azkarate, J., Cortés-Ortiz, L., RodríguezLuna, E., & Knapp, L. A. (2014). Limited genetic diversity in the critically endangered Mexican howler monkey (*Alouatta palliata mexicana*) in the Selva Zoque, Mexico. *Primates; Journal of Primatology*, 55(2): 155-160. doi: 10.1007/s10329-013-0399-6.
26. Elliot, D. (1913). *A review of the primates*. New York: U.S.A. :American Museum of Natural History.
27. ETESA [Empresa de Transmisión Eléctrica S.A.]. (2020). Gerencia de Hidrometereológica y Estudios. Obtenido de hidromet.com.pa: <https://www.hidromet.com.pa/es/documentos/hidrologia>.
28. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
29. Flesness, N. R. (1989). *Mammalian extinction rates: background to the black-footed ferret drama*. En T. Thorne, M. A. Bogan, & S. H. Anderson, Conservation Biology of the Black-Footed Ferret (pp. 3-5). New Haven: Yale University Press.

30. Flores, R., & Vergara, R. (2013). Composición Florística y Estructura Arborea de una parcela de bosque en el Parque Nacional Soberanía, Panamá. [Tesis de Licenciatura, Asesor: Jorge Mendieta]. Universidad de Panamá, De Herbario de la Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá.
31. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, W., & Vrijenhoek, R. (1994). Cebadores de DNA para la amplificación de la subunidad I del citocromo c oxidasa mitocondrial de diversos invertebrados de metazoos. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
32. Fontal, F., & Nieves-Aldrey, J. (2004). Estudio comparativo de diversidad de *eucoilidos paleárticos* (El Ventorrillo, España) y neotropicales (PN Coiba, Panamá) (*Hymenoptera, Cynipoidea, Figitidae, Eucoilinae*). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 35: 51-101 .
33. Frankham, R., Ballou, S. E., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
34. Froehlich, J. W., & Froehlich, P. H. (1987). El estado de los monos aulladores endémicos de Panamá. *Conservación de primates*, 8: 58–62.
35. Glander, K. E., Estrada, A., Mandujano, S., & Méndez-Carvajal, P. (2016). *Mantled howler monkey Alouatta palliata*. En N. Rowe, & M. Myers, *All the world primates* (pp.

- 250-254). Charlestown, Rhode Island: Pogonias Press.
36. Gonçalves, E. C., Silva, A., Barbosa, M. S., & Schneider, M. P. (2004). Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 406-408.
37. Goossens, B., Anthony, N., Jeffery, M., Johnson-Bawe, M., & Bruford, M. (2011). Collection, storage and analysis of non-invasive genetic material in primate biology. En J. Setchell, & D. Curtis, *Field and Laboratory Methods in Primatology: A practical guide* (pp. 371-386). Cambridge: Cambridge University Press.
38. Gray, J. E. (1848). Description of two species of Mammalia from Caracas. London: Proceedings of the Zoological Society of London.
39. Gregorin, R. (2006). Taxonomy and geographic variation of species of the genus *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23 (1): 64-144.
40. Groves, C. (2005). *Order Primates*. En D. E. Wilson, & D. Reeder, *Mammal Species of the World* (pp. 111-140). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
41. Groves, C. P. (2001). *Primate Taxonomy*. Washington, DC.: Smithsonian Institution Press.

42. Hayaishi, S., & Kawamoto, Y. (2006). Low genetic diversity and biased distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Japanese macaque (*Macaca fuscata yakui*) on Yakushima Island. *Primates; Journal of Primatology*, 47(2): 158-164.
43. Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Arcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1): S96-S99.
44. Hill, W. (1962). *Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy. Cebidae (part B): a Monograph*. Edimburgo: University Press.
45. Holdridge, L. R. (1967). *Life Zone Ecology*. San José: Tropical Science Center.
46. Horwich, R. H. (1983). Species status of the black howler monkey, *Alouatta pigra*, of Belize. *Primates*, 24(2): 288-289.
47. Ibáñez, A. (2011). *Guía botánica del Parque Nacional Coiba*. Panamá: Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales.
48. Ibáñez, D., Aguilar, S., Sanjur, A., Martínez, R., Condit, R., Stallard, R., . . . Lao, S. (1999). *Proyecto Monitoreo de la Cuenca del Canal: Reporte Anual y Técnico*. Panama: United Agency for Development, Autoridad Nacional del Ambiente (Panamá), Smithsonian Tropical Research Institute.

49. James, R. A., Leberg, P. L., Quattro, J. M., & Vrijenhoek, R. C. (1997). Genetic diversity in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) from Belize. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 102(3): 329-336.
50. Jasso-del Toro, C., Márquez-Valdelamar, L., & Mondragón-Ceballos, R. (2016). Diversidad genética en grupos de monos aulladores de manto (*Alouatta palliata mexicana*) en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Veracruz, México). *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3): 1069-1079. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.07.003>.
51. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2):111–120.
52. Kong, S. (2015). *On the Use of Median-Joining Networks: A Philosophical and Empirical Evaluation of Its Suitability in Evolutionary Biology*. [Master's thesis]. University of Toronto, Toronto.
53. La Estrella de Panamá. (28 de 12 de 2009). La joya ecológica de Punta Burica. La Estrella de Panamá. <https://www.laestrella.com.pa/cafe-estrella/planeta/091228/joyapunta-burica-ecologica>.

54. Lacy, R. C. (1988). A Report on Population Genetics in Conservation. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 2(3): 245–247.
55. Langford S, S. M., Kraitsek, S., Baskerville, B., Ho, S. Y. W., & Gongora, J. (2013). Australian and Pacific contributions to the genetic diversity of Norfolk Island feral chickens. *BMC Genetics*, 14(1), 91.
56. Lawrence, B. (1933). Howler monkeys of the palliata group. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 75: 313-320.
57. Leigh, J. W., & Bryant, D. 2. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.
58. Librado, P., & Rosas, J. (2009). DnaSp v5: Un software para el análisis completo de datos de polimorfismo de ADN. *Bioinformatics*, 25(11):1451–1452.
59. Lima, T. G., & McCartney, M. A. (2013). Adaptive evolution of M3 lysina candidate gamete recognition protein in the *Mytilus edulis* species complex. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2688–2698.
60. Lira, M. A., Calderón, P. C., Watty, A. D., Trocino, M. S., & Olvera, C. G. (2010). Determinación de nutrientes en la dieta ofrecida a monos aulladores (*Alouatta palliata*)

- y *Alouatta pigra.*) en el Zoológico de Chapultepec. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11 (3): 1-10.
61. McGinley, M. (2009). *Parque Nacional Coiba y su Zona Especial de Protección Marina*. Panamá: La Enciclopedia de la Tierra.
62. Melo-Carrillo, A., Dunn, J. C., & Cortés-Ortiz, L. (2020). Low genetic diversity and limited genetic structure across the range of the critically endangered Mexican howler monkey (*Alouatta p. Mexicana*). *American Journal of Primatology*, 82(8): 1-10. <https://doi.org/10.1002/ajp.23160>.
63. Méndez-Carvajal, P. (2006). Estudio poblacional del mono aullador de Azuero (*A. p. trabeata*), Herrera, *República de Panamá. Tecnociencia*, 8(2):23-35.
64. Méndez-Carvajal, P. (2010). Análisis de vocalizaciones de dos especies de monos aulladores panameños (*Alouatta coibensis* y *Alouatta palliata*: Atelidae), *República de Panamá. Tecnociencia*, 12 (2): 89-108.
65. Méndez-Carvajal, P. (2012). Estudio poblacional de monos aulladores de Coiba (*Alouatta coibensis coibensis*) y monos capuchinos de Coiba (*Cebus capucinus imitator*), *Parque Nacional Isla Coiba, República de Panamá. Journal of Primatology*, 1(2): 104. doi:10.4172/2167-6801.1000104.
66. Méndez-Carvajal, P. (2012). Population Study of Coiba Howler Monkeys (*Alouatta coibensis coibensis*). *Journal of Primatology*, 1(2):1-2.

67. Méndez-Carvajal, P. (2013). Tamaño de la población, distribución y estado de conservación de los monos aulladores (*Alouatta coibensis trabeata*) y monos araña (*Ateles geoffroyi azuerensis*) en la Península de Azuero, Panamá. *Primate Conservation*, 26 (1): 3-15. doi: 10.1896 / 052.026.0107 .
68. Méndez-Carvajal, P. (2014). The Orion Camera System, a new method for deploying camera traps in three canopy to study arboreal primates and other mammals: a case study in Panama. *Mesoamérica*, 18(1): 9-23.
69. Méndez-Carvajal, P., Cuarón, A., Shedden, A., Rodríguez-Luna, E., de Grammont, P., & Link, A. (2021). *Alouatta palliata ssp. coibensis* (amended version of 2020 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T43899A195441006, 1-12 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T43899A195441006.en>.
70. Méndez-Carvajal, P., Ruiz-Bernard, I., De León, G., González, Y., Miranda-Jiménez, E., Loría, L., Soto. (2013). Algunas estrategias de conservación para proteger dos subespecies de primates endémicas críticamente amenazadas en Panamá. *Wildlife Biology in Practice*, 9 (2): 91-97.
71. Milton, K. (1992). Calidad Dietética y Regulación Demográfica de una Población de Monos Aulladores *Alouatta palliata*. En E. G. Leigh, *Ecología de un Bosque Tropical* (pp. 25-35). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press.

72. Milton, K., Lozier, J. D., & Lacey, E. A. (2009). Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics*, 10(2):347-358.
73. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (1985, 24 de junio). Decreto No. 13 de 27 de mayo de 1980, por el cual se crea el Parque Nacional "Soberanía" en el área del Canal de Panamá. Gaceta Oficial LXXXII (20.333).
74. Mittermeier, R. R., & Wilson, D. E. (2013). *Handbook of the mammals of the world: Primates* v. 3 (1a ed.). Barcelona: Lynx Edicions.
75. Navas, N., Eyda, V., & Cedeño, B. (2001). Estadística de Panamá, Dirección de Estadística y Meteorológica, 1998-1999. Estadística de Panamá, 57.
76. Nieves-Aldrey, J., Ibáñez, A., & Medianero, E. (2008). Richness and Composition of Gall-inducing Arthropods at Coiba National Park, Panama. *Revista de Biología Tropical*, 56(3):1269-1286.
77. Oklander, L. I., Kowalewski, M. M., & Corach, D. (2010). Genetic consequences of habitat fragmentation in black-and-gold howler (*Alouatta caraya*) populations from northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 31(5):813–832.
78. Pavelka, M. S., Brusselers, O. T., & Behie, A. M. (2003). Reducción de la población y desorganización social en *Alouatta pigra* después de un huracán. *T. J. Primatol*, 24:

1037–1055.

79. Rowe, N., & Myers, M. (2016). *All the world's primates*. Charlestown, RI: Pogonias Press.
80. Ruiz-García, M., Cerón, Á., Sánchez-Castillo, S., Rueda-Zozaya, P., Pinedo-Castro, M. G.-E., & Shostell, J. M. (2017). Phylogeography of the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*; Atelidae, Primates) across its geographical range by means of mitochondrial genetic analyses and new insights about the phylogeny of *Alouatta*. *Folia Primatologica*, 88(5): 421-454. doi: 10.1159/000480502.
81. Ruiz-García, M., Pinedo-Castro, M., & Shostell, J. M. (2014). How many genera and species of woolly monkeys (Atelidae, Platyrrhine, Primates) are there? The first molecular analysis of *Lagothrix flavicauda*, an endemic Peruvian primate species. *Molecular phylogenetics and evolution*, 79:179-198 doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.034.
82. Rylands, A. (2000). An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotropical Primates*, 8(2): 61–93.
83. Rylands, A. B., Groves, C. P., Mittermeier, R. A., Cortéz-Ortiz, L., Hines, J. J., Estrada, E. A., Garber, P., Pavelka, M., Luecke, L., & New. (2006). *Taxonomy and distributions of Mesoamerican primates* (pp. 29–79). Springer.

84. Rylands, A. B., Rodríguez-Luna, E., & Cortés-Ortiz, L. (1997b). Neotropical primate conservation the species and the IUCN/SSC primate specialist group network. *Primate Conservation*, 17: 46–69.
85. Rylands, A., & Mittermeier, R. (2009). *The diversity of the New World primates (Platyrrhini)*. En G. P. A, A. Estrada, J. Bicca-Marques, E. Heymann, & K. B. Strier, South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation (pp. 23-54). New York: Springer.
86. Rylands, A., Mittermeier, R., & Rodríguez-Luna, E. (1995). A species list for the New World primates (*Platyrrhini*): Distribution by country endemism, and conservation status according to the Mace-Land System. *Neotropical Primates*, 3: 113-160.
87. Rylands, A., Schneider, H., Langguth, A., Mittermeier, R., Groves, C., & RodríguezLuna, E. (2000). Una evaluación de la diversidad de los primates del Nuevo Mundo. *Neotropical. Primates*, 8 (2):61–93.
88. Sankoff, D. (2003). Rearrangements and chromosomal evolution. *Current Opinion In Genetics & Development*, 13(6): 583-587. doi: 10.1016/j.gde.2003.10.006.
89. Smith, F. D., May, R. M., Pellew, R., Johnson, T. H., & Walter, K. R. (1993). How much do we know about the current extinction rate?. *Trends in Ecology & Evolution*. 8(10):

375-378 doi: 10.1016 / 0169-5347 (93) 90223-c.

90. Solórzano-García, B., Zubillaga, D., Piñero, D., & Vázquez-Domínguez, E. (2021). Conservation implications of living in forest remnants: Inbreeding and genetic structure of the northernmost mantled howler monkeys. *Biotropica*, 53(4):1163–1177. doi:10.1111/btp.12958.
91. Sousa, P., Froufe, E., Harris, D. J., Alves, P. C., & Van der Meijden, A. (2012). Genetic diversity of *Maghrebian Hottentotta* (Scorpiones: Buthidae) scorpions based on CO1: new insights on the genus phylogeny and distribution. *African Invertebrates*, 52(1): 135-143.
92. Stanyon, R., & Stone, G. (2008). Phylogenomic Analysis by Chromosome Sorting and Painting. En W. Murphy, Phylogenomics. *Methods in Molecular Biology* (pp. 13-29 https://doi.org/10.1007/978-1-59745-581-7_2). Houston: Humana Press.
93. Steinberg, E. R., Cortés-Ortiz, L., Nieves, M., Bolzán, A. D., García-Orduña, F. H.-L., & Mudry, M. D. (2008). The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(2): 103-109.
94. Sterck, E. H. (1998). Female dispersal, social organization, and infanticide in langurs: are they linked to human disturbance? *American Journal of Primatology*, 44(4): 235–254.

95. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12): 2725-2729.
96. Van Belle, S., Estrada, A., Strier, K. B., & Di Fiore, A. (2012). Genetic structure and kinship patterns in a population of black howler monkeys, *Alouatta pigra*, at Palenque National Park, Mexico: Genetic population structure of black howlers. *American Journal of Primatology*, 74(10): 948–957.
97. Vitousek, P. M. (1988). *Diversity and biological invasions of Oceanic Islands* (E. O. Wilson & F. M. Peter, Eds.). Washington, DC: National Academy of Sciences.
98. Winkler, L. A., Zhang, X., Ferrell, R., Wagner, R., Dahl, J., Peter, G., & Sohn, R. (2004). Variabilidad geográfica de microsatélites en monos aulladores centroamericanos. *Revista Internacional de Primatología*, 25(1): 197–210.
99. World Conservation Monitoring Center. (1992). *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. London: Chapman and Hall.

ANEXOS

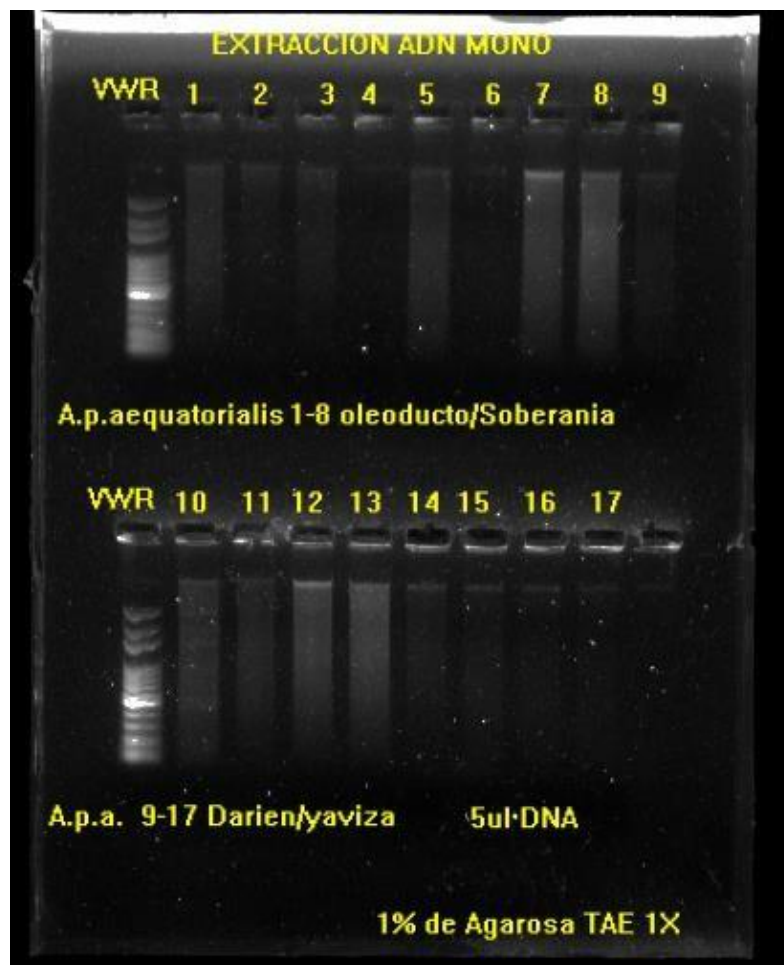


Figura 8. Electroforesis de ADN total de monos aulladores. Marcador molecular VWR (Carril 1 arriba y abajo). Muestras de ADN total de diferentes individuos, carriles 1 -17 muestras de *A. p. aequatorialis* (Agarosa 1%, TAE 1x).

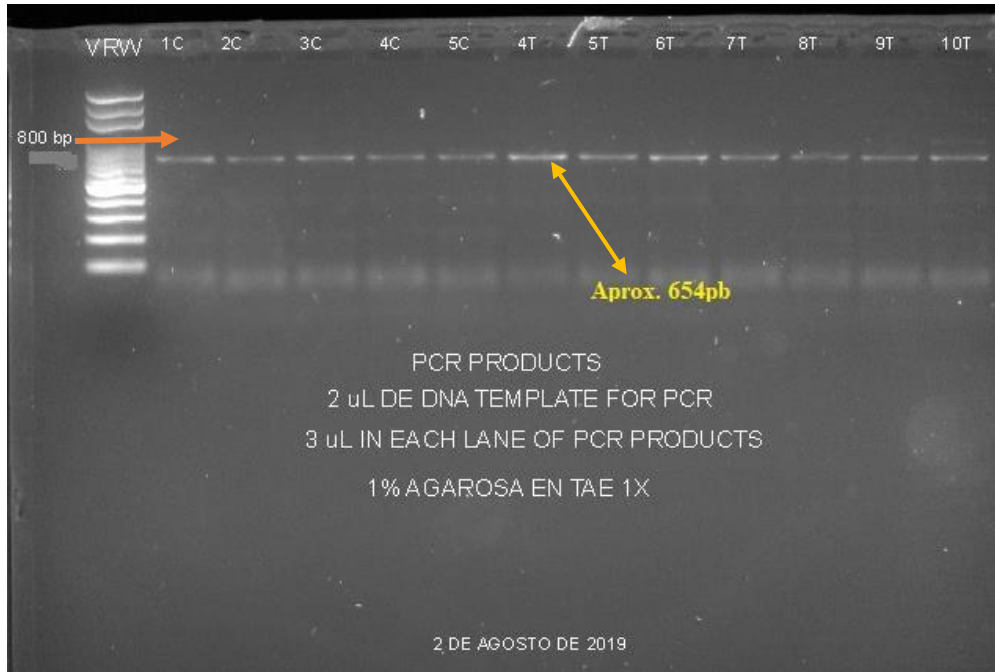


Figura 9. Electroforesis de PCR de COI en muestras de los monos aulladores. Productos de amplificación del gen COI de aproximadamente 654 pb. VWR marcador de peso molecular. Los carriles 1C-5C monos aulladores de Coiba, carriles 4T-10T mono aullador de la península de Azuero. (Agarosa 1%, TAE 1x).

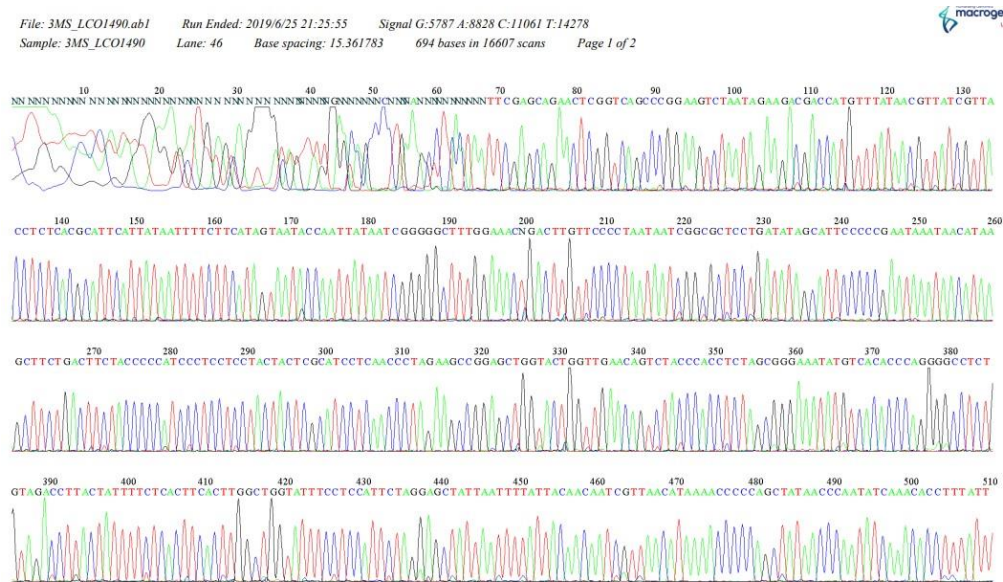


Figura 10. Electroferograma de la secuencia parcial de COI de una muestra de un individuo designado como *A.c. trabeata*. Se observa que a partir del nucleótido 70 hay una clara separación de picos bien definidos de acuerdo al color de cada base nitrogenada.