Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Variabilidad nucletídica en el ADN mitocondrial de Alouatta Caraya del NE de Argentina

Ascunce, Marina Sofía

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ascunce, Marina Sofía. (2002). Variabilidad nucletídica en el ADN mitocondrial de Alouatta Caraya del NE de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3478_Ascunce.pdf

Cita tipo Chicago:
Ascunce, Marina Sofía. "Variabilidad nucletídica en el ADN mitocondrial de Alouatta Caraya del NE de Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3478_Ascunce.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA EN EL ADN MITOCONDRIAL DE *ALOUATTA CARAYA* DEL NE DE ARGENTINA

Por

MARINA SOFÍA ASCUNCE

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

DIRECTORA y CONSEJERA DE ESTUDIO: DRA. MARTA D. MUDRY

DIRECTOR ASISTENTE: DR. ESTEBAN HASSON

LUGAR DE TRABAJO: Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología y Genética Evolutiva

№ 3478

Buenos Aires
2002

MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE VARIATION IN *ALOUATTA CARAYA* FROM THE NE OF ARGENTINA

By

MARINA SOFÍA ASCUNCE

Thesis presented to obtain the degree of Doctor of the University of Buenos Aires

Advisor: MARTA D. MUDRY, PH. D.

Co-advisor: ESTEBAN HASSON, PH. D.

Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología y Genética Evolutiva

Buenos Aires
2002

A mis padres Joaquín y Ercilia

A mis hermanas Ángeles y Paula

A mi sobrina María Cristina

A mi familia

Este trabajo ha sido publicado parcialmente en los siguientes artículos:

Ascunce MS, Hasson ER, & MD Mudry. 2002. Description of the *Cytochrome Oxidase* subunit II gene in some genera of New World Monkeys (Primates, Platyrrhini). *GENETICA*, *114*, 253-267

Ascunce MS, Hasson ER, & MD Mudry. COII as a useful tool for phylogenetic studies in some genera of New World monkeys (Primates, Platyrrhini). *Zoologica Scripta*. En prensa.

Martinez R, Giudice A, SzapkievichV, **Ascunce M**, Nieves M, Zunino G, & MD Mudry. Phenotypic, Behavioral and Genetic Parameters Modeling Speciation in *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini). *Mastozoologia Neotropical*. En consideración.

Nieves M, **Ascunce M**, Rahn M, & MD Mudry. Genetic variability among *Ateles paniscus*, *Ateles chamek*, *Ateles belzebuth*, *Ateles geoffroyi* and *Alouatta caraya*: A new contribution to the Controversial Atelids Systematic. Chromosoma. En consideración.

Ascunce MS, Cortés-Ortiz L, & MD Mudry. Description of the mitochondrial control region in *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini) and the development of new primers. En preparación para ser enviado a *American Journal of Primatology*.

Ascunce MS, Oklander, L, & MD Mudry. Different sources of mitochondrial DNA for phylogenetics studies in New World Monkeys. En preparación para ser enviado a *Basic and Applied genetics* (ex *Mendeliana*).

A su vez, la autora participó de las siguientes publicaciones:

Giudice AM, & **MS Ascunce**. 1998. Presencia de *Alouatta caraya* fuera de su área de distribución natural, *Neotropical Primates* 6(3):82-86. (Brasil)

Ascunce MS, Martinez R, Ávila I, & MD Mudry. 1999. New World Primates of the Argentinean Museum of Natural Sciences "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires, *Neotropical Primates* 7(1):28. (Brasil)

Ascunce MS, Zunino GE, & MD Mudry. The primatology in Argentina during the recently past years. *Neotropical Primates*. En consideración.

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, numerosas personas han colaborado y deseo expresarles mi más grato agradecimiento a todos ellos. Agradezco a CONICET (Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica) por haberme becado para realizar este trabajo contando con Beca de Iniciación, Perfeccionamiento y Prórroga, y a la educación pública y gratuita de nuestro país en la cual me formé a lo largo de mi vida.

Agradezco a mis Directores la Dra. Marta D. Mudry y el Dr. Esteban Hasson, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi Tesis Doctoral en el GIBE (Grupo de Investigación en Biología Evolutiva), por haberme apoyado en mis proyectos laborales y por su lectura crítica del presente trabajo que lo ha enriquecido mucho.

Deseo agradecer especialmente al Dr. Gabriel Zunino y a su grupo del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN) por su labor en el estudio de la ecología del mono aullador negro *Alouatta caraya*. El Dr. Gabriel Zunino es un colaborador clave en la concreción de este trabajo pues fue quien capturó los animales, los marcó y le extrajo las muestras empleadas en este estudio. Así, que te estoy muy agradecida por eso y por haberme permitido participar de algunas campañas, la pasé muy bien y aprendí eso que no aparece en los libros y sólo estando allí en la selva con los monos uno termina de entender. De su clan, le agradezco al Negro (Martín Kowalewski) gracias por la bibliografía que me mandastes, a Susana Bravo, a Luciana Oklander, a Pablo Salomón, a Ana Sallenave y a todos los colaboradores de su grupo. A la gente del GIBE gracias por la buena compañía en especial a Mariela, Ariel y Alicia.

Agradezco a los directores de Zoológicos y Centros de Cría por haber facilitado muestras de animales en cautiverio para este trabajo, las personas responsables de dichas instituciones son C. Galliari (Jardín Zoológico y Botánico de la Ciudad de La Plata, Argentina), J. García (CEM, Complejo Ecológico Municipal de la Ciudad de Roque Saenz Peña, Chaco, Argentina), B. Carpinetti (ECAS, Estación de Cría de Animales Silvestres, La Plata, Argentina), M. Azcurra (IICS, Instituto de Investigaciones de la Ciencia y de la Salud, Asunción, Paraguay), M. Mas (Zoo Buenos Aires, Argentina) y L. Chiesa (Ezeiza Flora y Fauna S. A., Argentina), les hago extensivo mi agradecimiento a los veterinarios y cuidadores por su colaboración.

El trabajo de laboratorio y de muestreo de animales contó con fondos aportados por varios subsidios a su cargo otorgados por el CONICET (subsidios MDM-PIP 4431/97-2000, EH-PEI 012/97-2000) y por UBACyT (Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Ciencia y Técnica, MDM-EX 020/97-2000 / X031-2001 y EH-TX067/97-2000).

Para el trabajo experimental, deseo agradecer al laboratorio de Genética por haberme permitido el uso de las PCRs, y en especial a las chicas que con tan buena onda compartían los escasos turnos conmigo, a CeciB, a Amalia, a Vero, a Paula, a Paola, a todas. A la Dra. Beatriz Saidman, por la confianza de permitirme la libre entrada a su laboratorio.

También agradezco a la Dra. Ranalli, el permitirme el uso de su PCR.

Para el trabajo de secuenciación manual, agradezco al Dr. Alberto Kornblihtt (LFBM) por haberme permitido el uso de facilidades de su laboratorio en especial la secadora de geles. De su laboratorio me ayudaron en la puesta a punto de la secuenciación Gustavito Melen y Claudio Slamovit. Daniela Tosto (INTA, Castelar) también me ayudó en esto, gracias. A la Dra. Silvia Moreno le agradezco el permitirme el uso de la secadora de geles. Al laboratorio de Neurofisiología dirigido por el Dr. Maldonado, le agradezco haberme prestado su secadora de geles, lo cual quito una importante cuota de stress a mi trabajo de secuenciación, muchas gracias.

Numerosos investigadores extranjeros han respondido mis pedidos de separatas muy generosamente y de manera diligente, les hago formal mi agradecimiento pues han contribuido enormemente. En este punto debo agradecer especialmente al Dr. Rozas quien por intermedio del Dr. Hasson me permitió acceder a un artículo inédito de su autoría.

Quiero agradecer a mis amigos biólogos: Lorena Longhi, Daniela Cánepa, Daniela Celestino, Alejandra Rodriguez y Leandro Papinutti de quienes siempre recibí palabras de aliento, contención, afecto y sobretodo entendimiento, les pasaba lo mismo que a mí. A mis amigas no biólogas: Marta y Silvia, gracias por todo.

Durante el tramo final de este trabajo, tuve la oportunidad de realizar una estadía en Smithsonian Tropical Research Institute (STRI) de la ciudad de Panamá, donde pude además de terminar el experimental usando un secuenciador automático, conocer gente muy buena que hicieron aún mas enriquecedora esa experiencia. De ellos agradezco especialmente a la Dra. Liliana Cortés-Ortiz por su generosidad en compartir conmigo sus conocimiento de aulladores. Al Dr. Biff Bermingham, por estar en todo y siempre. A Ely, Mely, Jenny, Steve, y a Karl que a pesar de la distancia siempre me envían sus mails de aliento y amistad.

Un agradecimiento especial para Cachirula y Pintitas por su fiel compañía durante tantos años.

Finalmente, el agradecimiento mas importante es a mi familia, a quien le dedico esta Tesis, simplemente por todo lo que significa e implica ser una familia.

Marina Sofía Ascunce

Buenos Aires, 19 de septiembre 2002.

RESUMEN

Los primates como mamíferos de vida larga y socialmente complejos, constituyen modelos óptimos para observar los efectos del comportamiento y la demografía sobre la evolución de los grupos. Los Monos del Nuevo Mundo (Primates, Platyrrhini) presentan una gran diversidad taxonómica con 16 géneros, 110 especies y 205 especies y subespecies. Su gran radiación adaptativa permite observar una amplia variación en cuanto a parámetros de historias de vida, demografía y estructura social, entre otros. La diferenciación genética entre las poblaciones está determinada por la interacción de factores ecológicos y los procesos evolutivos tales como la selección natural, el flujo génico y la deriva génica. En este trabajo se han analizado los efectos de la organización social y los eventos históricos sobre la variabilidad nucleotídica mitocondrial en algunos platirrinos y particularmente en *Alouatta caraya*. Se analizaron los efectos de linaje sobre las tasas de evolución molecular mediante comparaciones entre dos familias de monos platirrinos: Atelidae (*Ateles*, *Brachyteles Lagothrix* y *Alouatta*) como representante de platirrinos de cuerpo grande y Cebidae (*Cebus*, *Saimiri* y *Aotus*) representativa de monos platirrinos de menor porte. Se empleó la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial correspondiente a la subunidad II de la citocromo oxidasa *c*, de un total de 29 ejemplares de platirrinos, 11 de estas secuencias fueron obtenidas en el presente trabajo. Los resultados mostraron que el gen COII es un marcador útil para resolver relaciones filogenéticas intragenéricas en este grupo. A su vez, en oposición a lo esperado en base a los efectos de linaje, *Saimiri* con un menor tamaño corporal mostró la menor tasa de sustitución nucleotídica a nivel del ADN mitocondrial, probablemente reflejando la retención de polimorfismos ancestrales, debido probablemente a tamaños poblacionales grandes asociados a características particulares de su organización social.

En la segunda parte de la Tesis, se analizó la variabilidad en la secuencia nucleotídica del ADN mitocondrial observada en *Alouatta caraya* abarcando el área correspondiente a la porción marginal sur de su distribución, con el objetivo de establecer si ciertas características de su organización social afectan la estructura genética de sus poblaciones. Se obtuvo la secuencia de un fragmento de la región control mitocondrial (RC) para un total de 70 ejemplares de 7 localidades. La distribución de la variabilidad nucleotídica caracterizada por la presencia de dos linajes mitocondriales divergentes (clados A y B), se ajusta a un patrón filogeográfico de clase II. Para explicar este patrón se consideró a las selvas asociadas a los ríos Paraná y Paraguay como rutas de migración de la especie a través de las cuales *A. caraya*

habría colonizado la región sur de la distribución. Los datos obtenidos indicarían que ambos linajes habrían sufrido un cuello de botella hace aproximadamente 10.000 años que coincide con un período de extrema aridez, que se conoce como Younger Dryas, considerado de transición entre el fin de las glaciaciones y el comienzo del calentamiento global.

El estudio de la variación nucleotídica a nivel de la región control del mtADN en una población de 'carayás' de un ambiente de selva de inundación (Isla Brasilera, Chaco) permitió observar una estructuración de la variabilidad mitocondrial coincidente con los grupos sociales (tropas) los cuales presentaron casi exclusivamente haplotipos asignables a uno de los dos linajes A ó B. Este patrón de variabilidad mitocondrial sugiere que en el albardón principal de Isla Brasilera (una zona rica en recursos), las tropas se habrían formado principalmente por eventos de fisión de matrilíneas, mientras que en la zona más periférica de la isla (más pobre en recursos), la formación de nuevos grupos se daría por dispersión de individuos desde el albardón o bien por nuevos eventos de colonización. Esto junto con el patrón de divergencia genética sexo específico sugeriría que las hembras presentan comportamiento filopátrico.

En los platirrinos, si bien las características poblacionales y de estructuración social determinarían la probabilidad de fijación de los cambios genéticos, los eventos vicariantes parecen haber sido importantes en la especiación del grupo. A su vez, en este trabajo se observó que a nivel poblacional *Alouatta caraya* en su distribución marginal sur presentaría en la actualidad un patrón de variabilidad mitocondrial determinado no sólo por factores intrínsecos sino también signado por eventos demográficos históricos.

ABSTRACT

Primates as long-lived and socially complex mammals, offer the opportunity to assess the effects of behavior and demography on the evolution of the groups. New World Monkeys (Primates, Platyrrhini) show a great taxonomic diversity represented by 16 genera, 110 species and 205 species and subspecies. Its great adaptive radiation is reflected by an extensive diversification of life histories, demography and social structure. Genetic differentiation among populations is determinated between ecological factors and evolutionary processes such as natural selection, gene flow and genetic drift. In this work, the effects of social organization and historic events on the nucleotide variability at the mtADN including some platyrrhine genera and particularly *Alouatta caraya* were analyzed. Lineage effects on the rates of molecular evolution were analyzed by means of comparisons between genera of two platyrrhine families Atelidae (*Ateles*, *Brachyteles* *Lagothrix* and *Alouatta*) as representative of large-size genera and Cebidae (*Cebus*, *Saimiri* and *Aotus*) which are considered as medium-size genera among platyrrhines. Nucleotide sequence variation at the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene (COII) was analyzed in 29 New World monkey specimens, 11 obtained in this work. The results suggested that the main utility of COII in platyrrhine systematics lies at the intrageneric level. Contrary to the expectation considering the lineage effects, *Saimiri*, which is among the smallest size genera analyzed, showed low numbers of unique substitutions suggesting the maintenance of ancestral or plesiomorphic states of platyrrhine mt DNA nucleotide characters probably due to its large population sizes as compared to other platyrrhines, along with particularities in its social organization.

In the second part of the Thesis, the nucleotide sequence variation at the mitochondrial DNA was analyzed considering the south marginal distribution area of *Alouatta caraya*, aiming to study the relationship between the pattern of genetic variation and features of its social organization. A fragment of the mitochondrial control region (CR) was sequenced in 70 specimens of 7 localities. The analysis of sequence variation revealed the presence of two divergent clades A and B which is concordant with a phylogeographic pattern type II. To explain this pattern, it was considered that the forest associated to the Paraná and Paraguay river margins have been used as migration routes by *A. caraya*. Sequence data suggested that both mitochondrial clades have passed through population bottlenecks about 10,000 years ago, in coincidence with a period of extreme dryness, known as Younger Dryas, during the transition between the end of the glaciations and the beginning of the global warming.

The large sample size obtained for the 'carayá' population of Isla Brasilera characterized as flooded forest, allowed a detailed study of microgeographic population structure. The analysis of genetic variability at the mitocondrial CR sequences showed that within the troops only haplotypes of clade A or B are mainly represented. This pattern of genetic variation suggested that at the main hillock (a zone rich in resources), the troops might be mainly form through the matrilineal fission, while in the peripheral area of the island (which is poorer in resources), the origin of new groups might be related to dispersion of individuals from the main hillock, or by means of new immigration events by new colonizers in the island. This observation together with a sex-specific pattern of genetic differentiation gives support to the hypothesis that females are phylopatric.

In platyrrhines, although population and social organization traits may be important determinants of the probability of fixation of genetic changes, vicariant events seem to have played a central role in the diversification of the group. In addition, the present pattern of mitochondrial variability in *A. caraya*, in its south marginal distribution, appears to be the result of historical demographic events coupled with intrinsic factors such as social organization.

INDICE

Resumen.....

Abstract..... iii

Índice..... v

Lista de Tablas..... x

Lista de Figuras..... xii

Capítulos

I Introducción 1

1. Los primates 1

1.1. Generalidades 1

1.2. Los primates neotropicales y su gran diversificación 3

1.3. Reseña de los recientes estudios sistemáticos en platirrinos 4

2. Algunos aspectos de la genética poblacional 12

2.1. La evolución 12

2.2. La variabilidad genética 13

2.3. Estructura poblacional 15

2.4. Modelos genético-poblacionales de estructura poblacional 17

2.5. Efecto fundador y cuello de botella 20

2.6. La coalescencia genética 21

2.7. Teoría Neutralista 25

2.8. La hipótesis de reloj molecular 28

3. El ADN mitocondrial 30

3.1. Características generales 30

3.2. El ADN mitocondrial y su uso en estudios evolutivos en primates 33

3.3. La región control o `D-loop 34

3.4. La subunidad II de la citocromo oxidasa *c* mitocondrial (COII) 35

4. La estructura social y la dinámica genética de las poblaciones 37

4.1. Aspectos generales de la organización social en primates 37

4.2. Estructura social *vs.* estructuración genética 40

4.3. Estudios genéticos poblacionales en primates 41

5. El modelo 44

5.1. El genero *Alouatta* 44

5.2. *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) 47

5.2.1. Generalidades de la especie 47

5.2.2. *Alouatta caraya* en la Argentina 51

II Materiales y Métodos 54

1. Muestras 54

1.1. Obtención y conservación de las muestras 54

1.2. Muestras de *Alouatta caraya* 55

1.2.1. Localidades de muestreo 55

1.2.2. Análisis de región control mitocondrial 58

1.2.3. Análisis de microsatélites 59

1.3. Muestras de monos platirrinos 60

2. Materiales y Métodos de laboratorio 61

2.1. Análisis poblacional en *Alouatta caraya* 61

2.1.1. Extracción de ADN 61

2.1.2. Amplificación por PCR de la región control mitocondrial 62

2.1.3. Diseño de iniciadores 63

2.1.4. Visualización de los productos de amplificación 64

2.1.5. Nueva ronda de amplificación empleando iniciadores internos 65

2.1.6. Purificación de fragmentos de ADN amplificados 65

2.1.7. Cuantificación de ADN 67

2.1.8. Secuenciación manual 67

2.1.9. Secuenciación automática 68

2.1.10. Análisis de Citocromo *b* 70

2.1.11. Análisis de microsatélites 71

2.2. Análisis filogenético 75

2.2.1. Extracción de ADN 75

2.2.2. Amplificación por PCR del gen COII 75

2.2.3. Purificación en un gel de baja T° de fusión 76

2.2.4. Nueva ronda de amplificación empleando iniciadores internos 77

2.2.5. Purificación de fragmentos y secuenciación manual 78

3. Métodos generales de análisis 79

3.1. Alineamiento 79

3.2. Señal filogenética 79

3.3. Estimación de la distancia genética 81

3.4. Métodos de reconstrucción filogenética 83

4. Análisis a nivel de especie en *Alouatta caraya* 86

4.1. Construcción de redes 86
4.2. Cuantificación de la variabilidad a nivel nucleotídico 87
4.3. Prueba de neutralidad de Tajima (1989) 89
4.4. Diferencias nucleotídicas entre poblaciones 90
4.5. Estructuración genética 91
4.6. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) 93
4.7. Características demográficas 95
4.7.1. Flujo génico 95
4.7.2. Tamaño efectivo y tiempo de divergencia poblacional 96
4.7.3. Patrón demográfico 97
5. Análisis filogenético 99
5.1. Caracterización general del marcador 99
5.2. Análisis de parsimonia 100
5.3. Análisis de tasas relativas 100

III Tasas de evolución molecular en platirrinos 102

I. Introducción 102
II. Objetivos 106
III. Resultados 107
1. Descripción del gen COII en algunos géneros de platirrinos 107
1.1. Características general del marcador 109
1.2. Uso del codón 110
1.3. Análisis de saturación 111
2. Distancias genéticas 113
3. Señal filogenética 115
4. Análisis filogenético 117
5. Tasas evolutivas 119
IV. Discusión 126
1. Utilidad sistemática del gen COII 126
2. Aportes sistemáticos en *Alouatta*, *Saimiri* y *Cebus* 128
3. Tasas de evolución molecular en atélidos y cébidos 133
3.1. Platirrinos vs catarrinos 135
3.2. Platirrinos 136
3.3. *Alouatta caraya* como especie monotípica 140

IV **Variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya*** 142

I. Introducción 142

II. Objetivos 146

III. Resultados-Nivel regional 147

1. Características generales de la región control (RC) en *Alouatta caraya* 147

1.1. Descripción general 147

1.2. Descripción de los haplotipos 151

1.3. Distancias genéticas absolutas 153

2. Reconstrucción filogénetica de las relaciones entre los haplotipos 154

2.1. Análisis de redes 154

2.2. Análisis de la distribución geográfica de los haplotipos 160

2.3. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias 162

3. Inferencias filogeográficas 163

4. Diversidad haplotípica 165

5. Estructuración genética 171

5.1. Divergencia nucleotídica entre las poblaciones 171

5.2. Divergencia genética vs. distancia geográfica 173

5.3. Divergencia genética vs. distancia geográfica según el sexo 174

5.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) 176

5.5. Índices de fijación 180

5.6. Estimación del flujo génico entre las poblaciones 181

5.7. Flujo génico y distancia geográfica 182

6. Patrón demográfico y tamaño efectivo poblacional 183

6.1. Índices de fijación (F_{ST}) transformados 183

6.2. Estimación de los tamaños poblacionales y tiempo de divergencia 185

6.3. Análisis de microsatélites 191

IV. Resultados-Isla Brasilera 193

1. Diversidad mitocondrial en *Alouatta caraya* de Isla Brasilera 193

1.1. Descripción general de los haplotipos 193

1.2. Diversidad molecular en Isla Brasilera 196

1.3. Divergencia nucleotídica entre las tropas 196

1.4. Estructuración genética 198

1.5. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) 199

2. Diversidad mitocondrial según el sexo 201

2.1. Divergencia nucleotídica entre las tropas 201

2.2. Distribución de los haplotipos dentro de las tropas 203

V Discusión y conclusiones 206

Efecto de los eventos históricos y la organización social sobre la variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya*

1. Eventos históricos 206

1.1. Patrón filogeográfico en *A. caraya* en relación a cambios climáticos 206

1.2. Hipótesis de rutas de colonización de la distribución marginal sur 209

2. Consecuencia genética de la estructura social en primates 212

2.1. Diversidad mitocondrial en *A. caraya* en su distribución marginal sur 212

2.2. Diversidad mitocondrial en Isla Brasilera 220

2.3. Estructuración de la variabilidad mitocondrial en IB 221

2.4. Distribución de los haplotipos dentro de las tropas 227

3. Barreras sociales y eventos históricos 229

VI Bibliografía B-1

Anexo I A-1

Lista de Tablas

Capítulos

I Introducción

Tabla 1. Diversidad, características biológicas y distribución de platirrinos 6

Tabla 2. Clasificación de los Monos del Nuevo Mundo 10

Tabla 3. Densidad y organización social en poblaciones de *A. caraya* 53

II Materiales y Métodos

Tabla 4. Procedencia de las muestras 58

Tabla 5. Individuos de Isla Brasilera discriminados por tropas y su localización 58

Tabla 6. Localidades de procedencia de los ejemplares de A. *caraya* 59

Tabla 7. Individuos de IB genotipificados discriminados por tropas 59

Tabla 8. Ejemplares de monos platirrinos según su clasificación taxonómica 60

Tabla 9. Iniciadores para región control 64

Tabla 10. Iniciadores para microsatélites 72

III Tasas de evolución molecular en platirrinos

Tabla 11. Monos platirrinos incluidos en el análisis filogenético 108

Tabla 12. Valores promedio de composición nucleotídica en antropoideos 109

Tabla 13. Uso del codón[a] en el gen COII en platirrinos 110

Tabla 14. Matriz de distancias genéticas 114

Tabla 15. Características filogenéticas del gen COII 116

Tabla 16. Valores de 'bootstrap' en los análisis de parsimonia y NJ 119

Tabla 17. Análisis de tasas relativas en platirrinos y antropoideos en general 120

Tabla 18. Detalle del análisis de tasas relativas del género *Alouatta* 122

Tabla 19. Detalle del análisis de tasas relativas dentro del género *Alouatta* 123

Tabla 20. Detalle del análisis de tasas relativas del género *Saimiri* 125

IV Variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya* 142

II. Resultados-Nivel regional 147

Tabla 21. Descripción de los haplotipo 151

Tabla 22. Matriz de distancia 153

Tabla 23. Ejemplares de *A. caraya* empleados 163

Tabla 24. Frecuencias relativas de los haplotipos 166

Tabla 25. Variabilidad nucleotídica en *Alouatta caraya* de distribución sur 167

Tabla 26. Distancias D_a y D_{xy} entre las localidades 171

Tabla 27. AMOVA 1 177

Tabla 28. AMOVA 2 178

Tabla 29. AMOVA 3 178

Tabla 30. AMOVA 4 179

Tabla 31. Valores de F_{ST} 180

Tabla 32. Matriz M´ 182

Tabla 33. Matriz de valores de D (τ / N) 184

Tabla 34. Valores estimados de N*m* y D (τ / N) 184

Tabla 35. Parámetros poblacionales e índices de neutralidad 188

Tabla 36. Parámetros poblacionales 189

Tabla 37. Tamaño (pb) de los alelos de microsatélites 191

Tabla 38. Variación en el tamaño de los alelos (pb) para microsatélites en atélidos 191

III. Resultados-Isla Brasilera 193

Tabla 39. Tropas muestreadas 193

Tabla 40. Frecuencias relativas de los haplotipos analizados en cada tropa de IB 194

Tabla 41. Divergencia nucleotídica entre y dentro de las tropas de IB 197

Tabla 42. Análisis de F_{ST} entre las tropas de Isla Brasilera 199

Tabla 43. AMOVA 5 202

V Discusión y conclusiones 206

Tabla 44. Efectos de la competencia por recursos entre hembras y dispersión 227

Lista de Figuras

Capítulos

I Introducción

Figura 1. Filogenia del orden Primates 2

Figura 2. Distribución geográfica de las especies de primates 3

Figura 3. Filogenia del infraorden Platyrrhini 9

Figura 4. Representación esquemática de distintos modelos de migración 19

Figura 5. Árbol genealógico mostrando el fenómeno de coalescencia 22

Figura 6. Topologías de árboles de genes y tiempos de coalescencia 24

Figura 7. Mapa del genoma mitocondrial de mamíferos 30

Figura 8. Distribución geográfica de *Alouatta caraya* 47

Figura 9. *Alouatta caraya* macho y hembra 49

Figura 10. Selva de inundación en Isla Brasilera (Chaco, Argentina) 51

Figura 11. Parches de bosque 52

II Materiales y Métodos 54

Figura 12. Localidades de muestreo para *Aloutta caraya* 55

Figura 13. Mapa de Isla Brasilera indicando la distribución de las tropas 57

Figura 14. Electroforesis de los productos de amplificación de la RC 66

Figura 15. Productos de amplificación de la RC 66

Figura 16. Técnicas de secuenciación 70

Figura 17. Electroforesis de microsatélites en geles de agarosa 73

III Tasas de evolución molecular en algunos géneros de platirrinos

Figura 18 Análisis de saturación 112

Figura 19. Árboles consenso para cada posición del codón. 117

Figura 20. Reconstrucciones filogenéticas 118

Figura 21. Límites de las distribuciones de las especies del género *Alouatta* 129

Figura 22. Mapa de distribución del género *Saimiri* 132

Figura 23. Mapa de distribución de 2 subespecies del género *Cebus* 132

IV Variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya* 142

III. Resultados-Nivel regional 147

Figura 24. Alineamiento de la región control obtenida para *Alouatta caraya* 148

Figura 25. Secuencia correspondiente al Haplotipo H033 150

Figura 26a. Red obtenida a partir del análisis de todos los haplotipos 155

Figura 26b. Red obtenida a partir del análisis de todos los haplotipos 157

Figura 27. Red obtenida a partir de los haplotipos hallados en Isla Brasilera 158

Figura 28. Redes 159

Figura 29. Árbol de Neighbor-Joining de los haplotipos 161

Figura 30. Distribución de frecuencias 162

Figura 31. Cladograma en base a las secuencias nucleotídicas del cyt *b* en *A. caraya* 164

Figura 32. Fenograma en base a las distancias promedio (D_{xy}) entre las localidades 172

Figura 33. Fenograma en base a D_{xy} entre los linajes mitocondriales 172

Figura 34. Relación entre la divergencia genética (D_{xy}) y la distancia geográfica 173

Figura 35. Relación según los sexos entre divergencia genética 175

IV. Resultados-Isla Brasilera 193

Figura 36. Árbol de Neighbor-Joining de los haplotipos en IB 196

Figura 37. Fenograma obtenido en base a D_{XY} entre las tropas en Isla Brasilera 197

Figura 38. Fenograma obtenido según D_{XY} entre las tropas en IB sólo hembras 203

Figura 39. Distribución de los haplotipos mitocondriales en tropas de IB 204

Figura 40. Individuos no adultos según los haplotipos 205

V Discusión y conclusiones 206

Figura 41. Hipótesis de rutas de dispersión hacia el sur en *Alouatta caraya* 210

Capítulo I

Introducción

1. Los primates

1.1. Generalidades

Las especies de primates actuales presentan una amplia variación morfológica, comportamental, en patrones de organización social, entre otros. Así, podemos observar que el tamaño de los primates adultos varía desde el pequeño lemur ratón (*Microcebus*) con menos de 100 gr., hasta el gorila macho (*Gorilla*) con un peso mayor a 200 kg. Si bien la mayoría de los primates son diurnos, cerca de las tres cuartas partes de las especies de prosimios (lemures, lorisidos y társidos) y un único género de antropoide, *Aotus*, tienen hábitos nocturnos. Asimismo, entre los mamíferos, el orden Primates presenta el mayor rango de variación en cuanto a la forma de locomoción, incluyendo el salto, el cuadrupedalismo arborícola y terrestre, la suspensión, y el bipedalismo (Fleagle, 1998).

Entre las características generales de los Primates, podemos mencionar: 1) retención de la clavícula, 2) una articulación del hombro que permite una gran movilidad, 3) un aumento en la movilidad de los dedos, especialmente los pulgares que usualmente son oponibles, 4) las uñas en vez de garras, 5) la reducción del hocico y el aparato olfatorio, 6) un aparato visual complejo con percepción de color y órbitas frontales, 7) un cerebro grande en relación al tamaño corporal, 8) sólo dos glándulas mamarias en general, y 9) ciertas características particulares de la anatomía craneal (*e.g.*, Szalay & Delson, 1979; Fleage, 2000). Muchas de estas características han sido asociadas a un estilo de vida arborícola y si bien son generales, puede ocurrir que formas primitivas no las presenten, o bien que otros organismos no primates presenten algunas de las particularidades mencionadas, como por ejemplo la retención de la clavícula en las ardillas (Pough *et al.*, 1999).

Los primeros primates evolucionaron a partir de un mamífero insectívoro, a fines del período Cretácico o durante el Paleoceno temprano, hace aproximadamente 65 millones de años (MA a.p.). Si bien, tanto los humanos, simios antropomorfos, monos, lorísidos, lemures y társidos han sido agrupados dentro del orden Primates desde tiempos de Linneo (1758), las relaciones con los otros órdenes de mamíferos han sido un tema de debate. Tradicionalmente, los órdenes Scadentia (musarañas), Dermoptera (lemures voladores), Chiroptera (murciélagos) y Plesiadapiformes conforman un grupo monofilético denominado Archonta Gregory, 1910 (*e.g.*, Kay *et al.*, 1990; Martín, 1993; Fleagle, 2000). Sin embargo recientes evidencias moleculares cuestionan la monofilia de este superorden proponiendo la hipótesis de que Scadentia tendría una relación filogenética más cercana a las especies del orden Lagomorpha (Schmitz *et al.*, 2000).

En la actualidad, el orden Primates incluye 13 familias, 63 géneros, 273 especies y aproximadamente 620 especies y subespecies (Mittermeier & Konstant, 1996). Se lo considera formado por dos subórdenes: Strepsirrhini (Lemuriformes), caracterizados por la presencia de rinario y Haplorhini (*Tarsius* y Antropoidea) que poseen una nariz simple (Pocock, 1918; Kay *et al.*, 1997) (Figura 1).

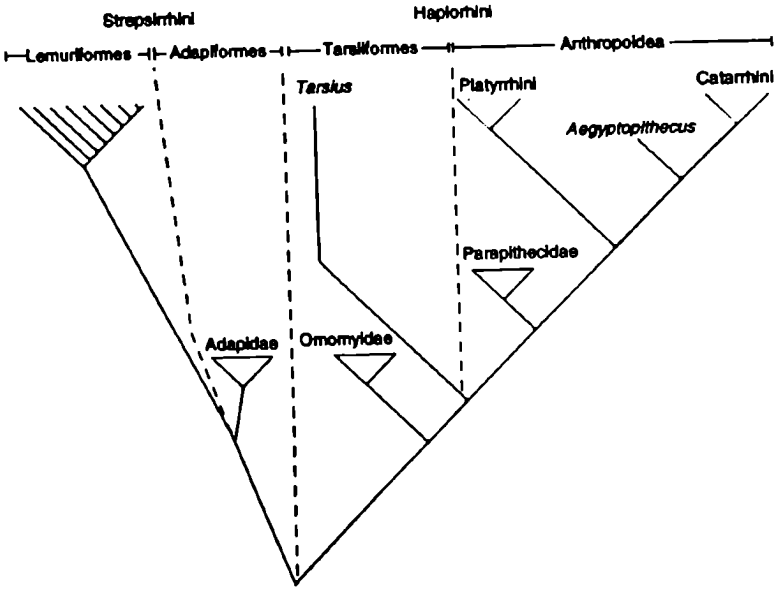


Figura 1. Filogenia del orden Primates, incluyendo grupos fósiles según Kay *et al.* (1997)

En la actualidad, los primates no humanos se distribuyen en todos los continentes excepto Australia y Antártida. Las distintas especies de primates ocupan casi todos los tipos de ambientes tropicales -desde la selva tropical húmeda hasta la sabana y el desierto- si bien el 80% vive en selvas tropicales. En la Figura 2 se puede observar un detalle de la distribución de los grupos actuales.

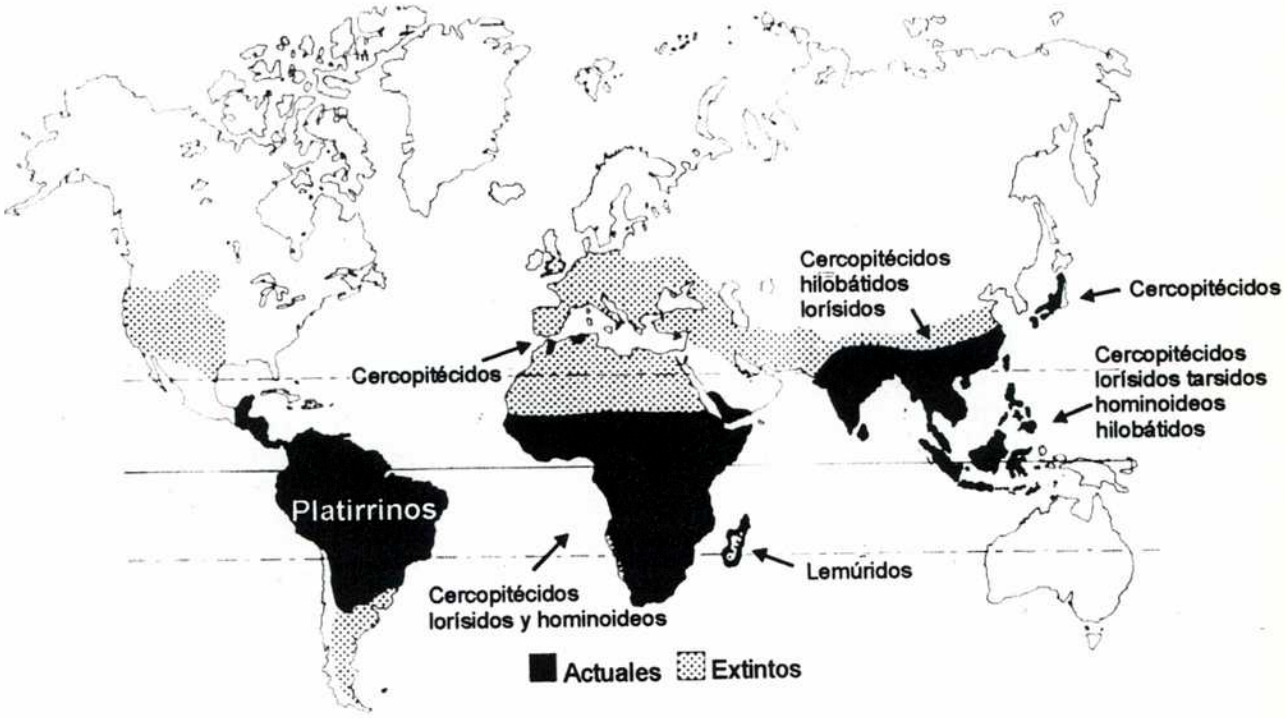


Figura 2. Distribución geográfica de las especies de primates no humanos actuales y extintas según Fleagle (1998).

1.2. Los primates neotropicales y su gran diversificación

Dentro de los haplorrinos, en los primates antropoides, hubo tres radiaciones principales: los Platyrrhini o Monos del Nuevo Mundo, y dos grupos de catarrinos de África, Europa y Asia, los cercopitécidos o Monos del Viejo Mundo y los hominoideos -Grandes Monos y el humano- (Fleagle, 1998). La monofilia de los antropoideos está apoyada tanto por evidencias moleculares (*e.g.*, Goodman *et al.*, 1996) como fósiles que incluyen formas

ancestrales de estos grupos en África (Cartmill, 1980; Fleagle, *op. cit.*). Si consideramos el origen africano de los antropoideos, cabe preguntar cómo los platirrinos colonizaron el continente Americano. Dado que el registro fósil de platirrinos en América es escaso, las evidencias aportadas por la paleontología no permite aún responder completamente esta pregunta, manteniendo abierto el debate. Cabe mencionar que el fósil de platirrino más antiguo encontrado hasta el presente es *Branisella boliviana*, del Oligoceno tardío (35 MA a.p.) (Bolivia). Fósiles más recientes se ha hallado en la Patagonia argentina y en otros yacimientos de América y el Caribe (*e.g.*, Tejedor, 1998; Takay *et al.*, 2000). Retomando la pregunta planteada, acerca de cómo los platirrinos colonizaron América, una de las hipótesis más aceptadas entre los primatólogos dedicados a la paleontología, considera la dispersión de platirrinos ancestrales desde África hacia América del Sur por una cadena de islas y /o mediante balsas naturales constituidas por masas vegetales (*e.g.*, Fleagle & Kay, 1997). A su vez, el hecho de que también para los roedores caviomorfos se considere un origen africano y hayan colonizado América del Sur en el mismo intervalo temporal que los platirrinos, constituiría una evidencia en favor de esta hipótesis biogeográfica de dispersión (*e.g.*, Hoffstetter, 1977; Tonni & Pasquali, 2002).

El término adaptación ha sido definido de diversas maneras. Considerando su etimología la palabra proviene del latín *ad aptus*, cuyo significado general sería adecuado para un rol particular. En biología evolutiva, podemos definir adaptación de dos maneras: por su génesis histórica, considerando una adaptación como aquella característica cuyo origen puede ser explicado por Selección Natural, o bien por su utilidad actual es decir aquellas características que se mantienen por Selección Natural, sin un interés particular en cómo haya surgido (*e.g.*, Gould & Vrba, 1982).

El término radiación adaptativa, a su vez, podemos definirlo como el proceso por el cual un grupo de organismos filogenéticamente emparentados han desarrollado características

morfológicas, comportamentales y ecológicas que permiten la explotación de nichos ecológicos diferentes (Fleagle, 1998). Alternativamente, considerando al organismo como constructor de su propio nicho, la radiación adaptativa puede entenderse como la evolución de una gran diversidad de roles ecológicos y sus concomitantes adaptaciones en diferentes especies de un linaje (Givnish & Kenneth, 1997). El estudio de las radiaciones adaptativas es un tema central de la biología evolutiva iniciándose con las observaciones de Darwin (1859) de los pinzones de las islas Galápagos. Este concepto tiene importantes implicancias para el estudio del origen de las adaptaciones y el surgimiento de la diversidad biológica, así como para analizar la filogenia de los organismos y sus relaciones ecológicas, morfológicas, fisiológicas, comportamentales y biogeográficas.

A partir de su aparición en América del Sur, los platirrinos han sufrido una importante radiación adaptativa que incluye una extensiva diversificación en dieta, tamaño corporal, estrategia de alimentación, modo de locomoción, patrones de actividad y estructura social, que le ha permitido a cada grupo explotar nichos ecológicos diferentes (Fleagle, 1998) (Tabla 1). La presencia de hasta 13 especies simpátricas en algunas zonas del Amazonas ilustra su diversidad adaptativa (Fleagle, 1998). La distribución de los platirrinos se extiende desde los bosques y selvas Neotropicales del el sur de México hasta el norte de Argentina, habitando desde bosques deciduos húmedos hasta regiones semi-áridas (Fleagle, *op. cit.*) (Tabla 1).

Tabla 1. Diversidad, algunas características biológicas y distribución geográfica de los géneros de Monos del Nuevo Mundo (Primates, Platyrrhini) [1]

Ubicación sistemática	Género	Nombre común	Número spp. (subspp.)	Peso (gr.)	Dieta	Hábitats	Distribución geográfica
Atelidae							
Alouattinae	*Alouatta*	Mono aullador	7 (14)	4.550 - 11.350	Hojas y frutos	Amplio rango de ambientes	Sur de México hasta el norte de Argentina
Atelinae	*Ateles*	Mono araña	4 (16)	7.500 - 9.000	Frutos y hojas	Selva madura, estrato alto	Sur de México hasta centro de Brasil y Bolivia
	Brachyteles	Mono araña lanudo	1 (1)	9.400- 12.200	Frutos y hojas	Selva costera	Sólo en la selva costera del Atlántico en el SE de Brasil
	Lagothrix	Mono lanudo barrigudo	2 (5)	5.700 - 10.000	Frutos y hojas, excepcionalmente insectos	Selva madura	Centro de Colombia, una pequeña área en Venezuela, a través de la macizo amazónico
Pitheciidae							
	Callicebus	Tití	10 (16)	800 - 1.300	Frutos, hojas o insectos como complementario	Selva primaria	Centro de Colombia y Venezuela hasta Paraguay
	Pithecia	Saki	5 (8)	1.500 - 2.700	Frutos	Selva primaria alta de tierra firme	Amazonas occidental y Guianas
	Cacajao	Uakari	2 (6)	2.700 - 3.400	Frutos	Selva de inundación	Región occidental del macizo amazónico
	Chiropotes	Saki barbudo	2 (4)	2.500 - 3.100	Frutos	Selva primaria alta de tierra firme	Región este del macizo amazónico
Cebidae							
Cebinae	*Cebus*	Caí, capuchino	5 (21)	2.200 - 3.800	Frutos y animales	Selva primaria y secundaria	Belice hasta norte de Argentina
Saimirinae	*Saimiri*	Mono ardilla	6 (12)	695 - 932	Frutos y animales	Selva primaria y secundaria	Sur de Costa Rica y Panamá, centro de Colombia hasta Bolivia y NE de Brasil
Aotinae	*Aotus*[2]	Mono lechuza mirikiná	9 (11)	690 - 1.232	Frutos, insectos y hojas	Áreas de selva y marginales	Panamá hasta norte de Argentina, no se encuentra en la selva atlántica
Callithrichidae							
	Saguinus	Tamarino	12 (33)	403 - 740	Insectos, frutos, néctar y exudados de plantas	Tierra firme, selva secundaria y primaria	Macizo amazónico, Panamá, y NO de Colombia
	Leontopithecus	Tití león	3 (4)	535 - 615	Frutos, insectos y exudados de plantas	Tierras bajas costeras, selva de inundación	SE de Brasil en la costa atlántica y en la región del río Paraná
	Callimico	Mono Goeldi	1 (1)	483 - 502	?, incluye insectos	Arbustos bajos y cañas de bambu	Distribución en parches, Amazonas, sur de Colombia y norte de Bolivia
	Callithrix	Tití pincel, de cara blanca	15 (19)	182 - 429	Frutos, insectos y exudados de plantas	Tierra firme, selva secundaria	Este de Bolivia y Brasil, sur del Amazonas
	Cebuella	Tití enano	1 (1)	126 - 130	Insectos y exudados de plantas, frutos	Selva de inundación	Región superior del macizo amazónico, sur de Colombia hasta NO de Bolivia

[1] Fuentes: Mittermeier *et al.* (1988); Fleagle (1998); Ford & Davis (1992); Wolfheim (1981); Rylands *et al.* (1993, 2000); Horovitz & Meyer (1997).
[2] Único género de monos platirrinos de hábitos nocturnos con una tendencia a la catemeralidad en su distribución marginal sur (Fernández-Duque *et al.*, 2001).

1.3. Breve reseña de los recientes estudios sistemáticos en platirrinos

La historia evolutiva del grupo -compuesto por 16 géneros, 110 especies y 205 especies y subespecies - ha sido objeto de numerosos estudios sistemáticos (Rylands *et al.*, 2000). Por un lado, los análisis cladísticos basados en datos morfológicos muestran que los 16 géneros pueden agruparse en 7 grupos monofiléticos, con diferencias en las relaciones dentro de cada grupo (Rosenberger, 1979, 1981, 1984; Ford, 1986; Kay, 1990). Estos autores consideran diversos caracteres morfológicos, por ejemplo Rosenberger (1979, 1981, 1984) usó principalmente caracteres craneales y dentarios, mientras que Ford (1986) analizó particularmente la morfología del esqueleto apendicular. Por otro lado, Kay (1990) incluyó caracteres dentarios de especímenes fósiles y analizó datos previos de los autores mencionados anteriormente como por ejemplo datos de caracteres postcraneales de Ford (1986), y de caracteres craneales y dentarios de Rosenberger (1979). Algunos autores consideran que las diferencias en las reconstrucciones filogenéticas obtenidas a partir de los datos morfológicos pueden deberse a que por un lado el registro fósil de los platirrinos es escaso por lo cual los datos disponibles constituirían una evidencia muy parcial (Rosenberger, 1981; Fleagle, 2000). Además, dado que los caracteres morfológicos pueden enfrentarse al límite impuesto por la gran radiación adaptativa de los platirrinos que podría conducir a la inclusión de convergencias y paralelismos es importante evaluar en forma crítica la evidencia aportada. En este sentido el uso de marcadores moleculares podría ser muy útil e incluso complementar los estudios morfológicos para lograr un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas entre los platirrinos (Rosenberger, 1981; Fleagle, 2000).

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios filogenéticos basados en la secuencia de ADN de genes nucleares: ϵ-globina (Schneider *et al.*, 1993), la ϵ-globin y el IRBP ('interstitial retinol-binding protein') intron 1 (Harada *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1996), γ-globin (Meireles *et al.*, 1995, 1999), β_2-microglobulin (Canavez *et al.*, 1999); y dos

introns de la glucosa-6 fosfatodehidrogenasa (G6PD) (von Dornum & Ruvolo, 1999). Otros estudios se han centrado en el análisis de secuencias de genes mitocondriales como los que codifican para las subunidades ribosomales 12S y 16S (Horovitz *et al.*, 1998), la subunidad 4 de la NADH dehidrogenasa (ND4) y para los ARNs de transferencia para histidina, serina y leucina (Pastorini *et al.*, 1998), y también la región control mitocondrial (Tagliaro *et al.*, 1997) que es una secuencia no codificante.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas a partir de los datos moleculares muestran en general dos clados principales. El primero incluye al grupo formado por *Callicebus* y los pitecinos (*Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*) y a *Alouatta* junto con los atelinos (*Ateles*, *Lagothrix*, *Brachyteles*). El segundo, incluye al grupo hermano formado por los géneros *Cebus-Saimiri*, los callitricinos (*Callithrix*, *Cebuella*, *Leontopithecus*, *Saguinus*, *Callimico*) y *Aotus* (*e.g.*, Schneider *et al.*, 1993, 1996; Harada *et al.*, 1995; Canavez *et al.*, 1999) (Figura 3). Si bien se ha llegado a un cierto consenso respecto a las relaciones filogenéticas entre la mayoría de los géneros, aún siguen en discusión algunos aspectos de la filogenia tales como el patrón exacto de ramificación de ciertos géneros cercanos como los calitrícidos y la posición exacta de *Aotus* (*e.g.*, von Dornum & Ruvolo, 1999). A su vez, Horovitz (1999) obtuvo una reconstrucción filogenética basada en un estudio de "evidencia total" considerando los datos morfológicos tanto de taxa actuales como fósiles junto a datos moleculares de taxa actuales, que si bien ha enriqueciendo el conocimiento acerca de la historia evolutiva de los MNM no alcanzó a resolver completamente los puntos de discusión mencionados anteriormente.

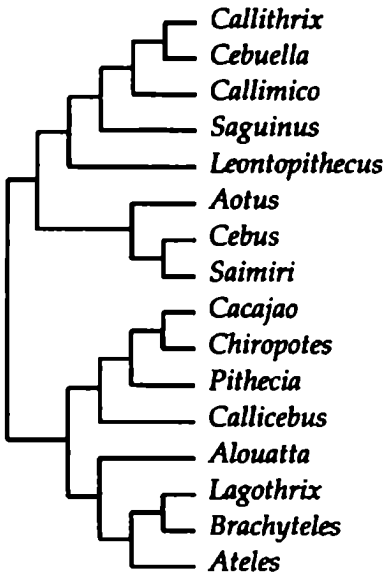


Figura 3. Cladograma obtenido con las secuencias nucleares correspondientes a la ∈-globina (Schneider *et al.*, 1996) y al IRBP (Harada *et al.*, 1995) por Horovitz y Meyer (1997).

En trabajo se consideró la clasificación para los MNM propuesta por Schneider *et al.* (1993), con modificaciones (Tabla 2), que se basa en el árbol consenso obtenido a partir de los 6 árboles más parsimoniosos empleando el gen nuclear ∈-globina. Esta clasificación, además, se ajusta a la mayoría de los otros estudios referidos anteriormente (pag. 7-8). Las modificaciones fueron realizadas en ciertos grupos donde las reconstrucciones filogenéticas obtenidas empleando otros marcadores no fueron consistentes, como los agrupamientos filogenéticos dentro de la familia Callitrichidae que según Schneider *et al.* (1993) es una subfamilia dentro de Cebidae. Otras modificaciones fueron Alouattinae según Schneider *et al.* (1993) es una tribu Alouattini dentro de la subfamilia Atelinae; y Pitheciidae que según Schneider *et al.* (1993) es una subfamilia dentro de Atelidae. Estas modificaciones tuvieron como fin mantener una postura conservativa y subrayar la necesidad de estudios basados en "evidencia total" que permitan la propuesta de una clasificación sistemática para los MNM.

Tabla 2. Clasificación de los Monos del Nuevo Mundo (MNM) basada en Schneider *et al.* (1993) con modificaciones

Infraorder Platyrrhini
Familia Atelidae
Subfamilia Atelinae
Ateles
Brachyteles
Lagothrix
Subfamilia Alouattinae *
Alouatta
Familia Pitheciidae *
Callicebus
Pithecia
Chiropotes
Cacajao
Familia Cebidae
Subfamilia Cebinae
Cebus
Subfamilia Saimirinae
Saimiri
Subfamilia Aotinae
Aotus
Familia Callitrichidae *
Saguinus
Leontopithecus
Callimico
Callithrix
Cebuella

*Modificaciones

Tradicionalmente, las clasificaciones taxonómicas dentro de cada género se basaban en caracteres morfológicos craneales, dentarios y de coloración de pelaje, considerando también los patrones de distribución geográfica (*e.g.*, Hershkovitz, 1955, 1975, 1983, 1984). En los últimos años se han realizado estudios filogenéticos en base a datos de ADN en algunos géneros de monos platirrinos empleando en su mayoría secuencias mitocondriales e incluyendo a los géneros *Aotus* (COII, subunidad II de la citocromo oxidasa *c*, Ashley & Vaughn, 1995); *Saguinus* (secuencias parciales de citoromo *b* -cyt b- y región control mitocondrial, Jacobs *et al.*, 1995; Cropp *et al.*, 1999), *Saimiri* (cytb, Boinski & Cropp, 1999),

Callithrix (región control mitocondrial, Tagliaro *et al.*, 1997), *Ateles* (COII y la secuencia parcial de la región control mitocondrial, Collins & Dubach, 2000) y *Alouatta* (cytb, Bonvicino *et al.*, 2001; y cytb, ATPase 8/6 -subunidad 8 y 6 de la ATPasa y los genes nucleares que codifican para calmodulina y RAG-1 -activador de la recombinación nuclear 1, Cortés-Ortiz *et al.*, 2002). En los últimos 10 años, el conjunto de estos trabajos han contribuido de manera importante en el entendimiento de los procesos de especiación en estos grupos y el esclarecimiento de su sistemática. Sin embargo son necesarios estudios de "evidencia total" para todos los géneros de platirrinos en los cuales se analicen simultáneamente caracteres morfológicos, genéticos, de comportamiento, de distribución geográfica y de ser posible fósiles, que permitirían realizar una propuesta de clasificación sistemática integrada. Una revisión de las clasificaciones sistemáticas para los distintos géneros de platirrinos se discute en el trabajo de Rylands *et al.* (2000) y Groves (2001).

2. Algunos aspectos de la genética poblacional

2.1. La evolución

Ya los antiguos griegos, 600 años antes de Cristo, concebían la idea de la evolución considerando que el hombre y otros animales descendían de los peces (Anaximandro, 611-547 a. C.). Sin embargo, es recién en 1809 cuando Lamarck (1744-1829) postula su teoría de la herencia de los caracteres adquiridos que se propone por primera vez un mecanismo para explicar los patrones de evolución. Lamarck con su teoría si bien equivocada genera una revolución en la ciencia de esa época que retoma a la evolución como eje de su pensamiento. Posteriormente, Charles Darwin (1809-1882) en su libro el *Origen de las Especies* (1859), propone el mecanismo de selección natural como el agente causal del cambio evolutivo. En la década de 1940, se publican numerosos trabajos importantes para la biología evolutiva que consolidan las bases para la formulación de la "Teoría Sintética de la Evolución" que integró al seleccionismo con la teoría cromósomica de la herencia contando con numerosas evidencias aportadas por la genética de poblaciones. La teoría darwiniana así formulada adquirió una gran capacidad explicativa, pero sin embargo, si bien a una escala microevolutiva es uno de los mecanismos principales que permite explicar el cambio del reservorio génico de las poblaciones, la selección natural solamente brinda una explicación incompleta al nivel macroevolutivo. Sus dos críticas principales han sido: el argumento gradualista y el argumento reduccionista (Gould, 1983). El primero, inherente al pensamiento darwiniano original, sostiene que todos los procesos evolutivos responden a la lenta y gradual acumulación de pequeños cambios genéticos a lo largo de las generaciones, y el segundo sostiene que los fenómenos macroevolutivos son explicables en términos de cambios de las frecuencias génicas, es decir, en términos de la teoría de la genética de poblaciones (Reig, 1984). Gould (1941-2002) (1998) relativiza el rol de la selección natural ya que considera que los procesos macroevolutivos están marcados por el azar y la contingencia, es decir que lo que

observamos en la actualidad se deberían a largas cadenas de estados anteriores impredecibles y no a procesos determinísticos, marcados por transiciones no graduales como equilibrios puntuados (Eldredge & Gould, 1972) y extinciones masivas. Según la teoría de los equilibrios puntuados, la evolución es un proceso fundamentalmente discontínuo, donde las nuevas especies surgen abruptamente y se mantienen en una situación de "estasis" evolutiva, sin manifestar mayores cambios en su fenotipo hasta que sobrevenga otro acontecimiento especiogénico (Eldredge & Gould, 1972).

En las últimas décadas, la teoría evolutiva esta siendo enriquecida por los aportes de la genética molecular y presenta una gran dinámica principalmente en sus metodologías a fin de comprender más acabadamente los complejos procesos evolutivos, sus causas y patrones.

2.2. La variabilidad genética

La materia prima del cambio evolutivo es la variabilidad genética, mientras que la unidad de el cambio es la población. A partir de la cuantificación de la variabilidad genética y el patrón de variación genética entre las poblaciones es posible analizar procesos microevolutivos como la selección, la endogamia, la deriva genética, el flujo génico y la mutación. Es así que luego del redescubrimiento de las Leyes de Mendel (1866), se formularon modelos matemáticos que permitieron describir la manera en que estos procesos cambian el reservorio génico de las poblaciones (Fisher, 1930; Haldane, 1932; Wright, 1932). Estos modelos son los antecedentes más antiguos sobre los que se ha desarrollado la teoría matemática de la genética de poblaciones. Actualmente esta disciplina permite no solo reconstruir las fuerzas evolutivas que han modelado, históricamente, el reservorio génico, sino que también tienen un poder predictivo. Aunque también es posible considerar que los modelos de la genética poblacional son la mayor simplificación de la complejidad de la dinámica poblacional actual (Wright,1932). Recientemente, el estudio de la inferencia

histórica ha cobrado interés debido a la disponibilidad de datos moleculares que permiten la comparación directa de los genes usados tanto para estudios de relaciones filogéticas entre los organismos como para analizar la historia de genes particulares o familias génicas.

El estudio de la variación a nivel molecular comenzó con el análisis de la variabilidad proteica en *Drosophila pseudoobscura* que permitió descubrir una gran cantidad de variabilidad alozímica en la poblaciones (Harris, 1966; Hubby & Lewontin, 1966). En los 80, el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de ADN nuclear y mitocondrial, permitieron los primeros análisis poblacionales de variabilidad a nivel de secuencias de ADN. En 1983, Kary Mullis desarrolló una técnica que revolucionó a la genética conocida como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Está técnica permite, a partir incluso de muy poco ADN, obtener una gran cantidad de copias de un determinado gen elegido mediante el empleo de una enzima polimerasa de ADN (Taq) resistente a altas temperaturas (95 °C) extraida de una arquibacteria termófila (*Termophilus aquaticus*). La PCR junto con las técnicas de secuenciación automática, permitieron el estudio de numerosos genes tanto nucleares como mitocondriales en estudios evolutivos. Entre los marcadores moleculares de más uso en la actualidad están los microsatélites. Estos son de locus único y comprenden secuencias de 2-5 nucleótidos repetidas en tandem (en general menores de 300 pares de bases). Muchos microsatélites son altamente variables en el número de las unidades de repetición. Si bien la electroforésis de proteínas sigue siendo una herramienta de gran utilidad para la cuantificación de la variabilidad genética en las poblaciones, en la actualidad podemos decir que los marcadores moleculares más usados para analizar estas problemáticas son las secuencias de genes nucleares y mitocondriales, y los microsatélites (*e.g.*, Bertorelle & Excoffier, 1998; Wiegand *et al.*, 2000; Hendry *et al.*, 2002).

2.3. Estructura poblacional

La población es el grupo de individuos que se reproducen entre sí y que coexisten en tiempo y espacio (Hedrick, 1999). El modelo más simple de población considera un número infinito de individuos en el que cada uno tiene igual probabilidad de cruzarse con otro. Esta se denomina población de apareamiento al azar o panmítica en ella, todos los individuos tendrían la misma posibilidad de cruzarse. Además, en una población de tales características no solo las frecuencias génicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones sino que las frecuencias genotípicas se ajustan a las proporciones esperadas según la ley de Hardy-Weinberg (H-W). En este caso se dice que la población está en equilibrio de H-W. Sin embargo, las poblaciones naturales presentan un tamaño finito y en ellas actúan diversos procesos demográficos como migración, subdivisión poblacional, generaciones superpuestas, etc. Todos estos factores pueden llevar a que en la población en estudio las frecuencias génicas y genotípicas muestren discrepancias respecto de lo esperado bajo el modelo nulo de H-W.

Para cuantificar los desvíos de la panmixia que puedan ocurrir en una población se han desarrollado varios modelos. En particular, cuando una población está subdividida o estructurada, ya sea por factores geográficos, ecológicos, o comportamentales, la cantidad de 'conectividad genética' entre las diferentes partes de una población puede variar. Por ejemplo, Mayr (1942, 1963, 1969) propone una primera aproximación considerando tres modelos principales para describir el grado de estructuración poblacional en relación a su distribución espacial:

1. Población continua (o de variación clinal): el rango central de distribución de una especie está formado por una serie de poblaciones contiguas. Incluso si hubiese una pequeña interrupción de ese continuo, habría un alto intercambio genético. La variación en esa población continua sería esencialmente clinal.

2. Aislamiento geográfico: todas las poblaciones geográficamente aisladas entre las cuales el flujo génico es mínimo o no existe. Toda población aislada geográficamente sería una especie incipiente.

3. Zona de intergradación secundaria: ocurre cuando una población geográficamente aislada reestablece contacto con la parte central de la población. El flujo génico entre las poblaciones se reestablecerá si aún no han adquirido mecanismos de aislamiento reproductivo.

Entre los distintos modelos planteados por Mayr, el factor limitante que llevaría a la divergencia entre las subpoblaciones es el grado de 'cohesión genética'. Esta dependerá principalmente de la cantidad de *flujo génico* efectivo, es decir la introducción eficaz de genes en una población resultante de la migración de individuos entre poblaciones. Cuando el flujo génico entre ellas sea alto, éste producirá un efecto homogenizador de la variabilidad. Cuando el flujo génico sea bajo, la deriva génica, la selección e incluso la mutación en grupos separados, puede llevar a la divergencia.

El concepto de mecanismos de aislamiento reproductivo (MAR) había sido definido por Dobzhnasky (1937) aplicándolo a cualquier factor que impida el apareamiento entre grupos de individuos considerando tanto factores de aislamiento espacial (exógenos) como cualquier agente que impida la intercruza aún en simpatría, incluyendo en esta idea a los factores endógenos de las poblaciones. Dentro del marco de la genética poblacional, "las especies son sistemas supraorganísmicos cuya individualidad radica en la posesión de un reservorio génico ('gene pool') cohesionado y discontinuo, cuya distinción está determinada por la existencia de barreras reproductivas que garantizan la ínter-esterilidad entre los distintos sistemas específicos. Por lo tanto la especiación debe concebirse como el proceso del advenimiento del aislamiento reproductivo" (Reig, 1983: 44). A esta concepción de la especie se la conoce como el concepto biológico de especie y fue propuesta por Mayr (1942), aunque este autor sólo se había referido al aislamiento geográfico.

Las primeras clasificaciones de los modelos de especiación se basaron en el aislamiento geográfico y por lo tanto tenían sólo una concepción exógena del proceso de cambio evolutivo. Cuando se comienza a reconocer a las especies como sistemas genéticos, a los individuos con sus comportamientos de apareamiento, y el papel de azar en función del tamaño poblacional, se evalúan también factores endógenos en estos procesos.

La primera teoría de la especiación fue formulada en base al concepto de aislamiento geográfico. Si bien la idea fue presentada por primera vez por Wagner (1868) no fue hasta el desarrollo de la teoría de la genética de poblaciones que contó con una explicación adecuada basada en los mecanismos que llevan a la diferenciación de las poblaciones aisladas.

Templeton (1981) hace una revisión precisa de los mecanismos de especiación propuestos por diferentes autores y que consideran tanto los factores exógenos como endógenos. Si bien la extrapolación de los procesos genéticos-poblacionales a la especie, es una simplificación, nos permite entender los mecanismos de especiación.

2.4. Modelos genético-poblacionales de estructura poblacional

La estructuración genética de las poblaciones puede ocurrir como una respuesta adaptativa a condiciones ambientales locales (*e.g.*, King & Zimmerman, 1993) o por el surgimiento de una barrera geográfica (*e.g.*, ríos, Peres *et al.* 1996). Alternativamente, la diferenciación genética entre las poblaciones ha sido explicada a través del modelo de aislamiento por distancia (Wright, 1943) donde ese aislamiento es definido por el número de individuos que migran o bien del *flujo génico* efectivo.

Existen varios modelos cuyo objetivo es analizar el papel del azar y la migración en la divergencia genética en poblaciones estructuradas (revisados en Hedrick, 1997; Fontdevila & Moya, 1999, entre otros). Uno de ellos es, como se mencionó en el párrafo anterior, el modelo de **aislamiento por distancia**, que considera que los individuos se encuentran distribuidos en

forma espacialmente continua y que la distancia de dispersión es variable siguiendo una función de distribución normal en dos dimensiones con una media de dispersión individual, medida como la distancia promedio entre el lugar de nacimiento y el de reproducción. Es decir que el aislamiento entre los individuos ocurre porque tienen una vagilidad limitada. Una forma de estudiar las propiedades de esta estructura poblacional es considerar a la población continua como una serie de "vecindarios" que se suceden unos con otros. Wright (1940) definió vecindario como "el área en la que los padres de los individuos centrales pueden considerarse extraídos al azar". Su tamaño eficaz (N_e) está directamente relacionado a la distancia de dispersión y la densidad de los individuos reproductores. Esto lleva a que si los individuos tienen una distribución normal en dos dimensiones, la mayoría (87%) tienen su descendencia en un círculo de radio σ (desviación estándar de la distancia de dispersión) (Fontdevila & Moya, 1999). Este modelo genera una diferenciación genética en el área ocupada por la población que aumenta con la distancia geográfica. Sin embargo, la diferenciación es función de la capacidad dispersiva de los individuos que varía conforme a la especie considerada (Fontdevilla & Moya, 1999).

Otro modelo de estructura poblacional es el **modelo de islas**. En este modelo se considera que la población está subdividida en demos, como las islas de un archipiélago, y que en cada generación una fracción (m) de sus individuos son inmigrantes provenientes de todos los demos en igual proporción. El modelo general asume que el flujo génico ocurre entre todas las partes de la población estructurada para lo cual se define una matriz de migración. En el caso de que la migración sea unidireccional se denomina **modelo de isla-continente** y considera que habría un flujo unidireccional desde el continente a la isla. Ambos modelos consideran que las islas o demos serían lo suficientemente grandes como para que los efectos de deriva sean pequeños en relación a los del flujo génico (Figura 4).

Una aproximación más realista, considera que las subpoblaciones están distribuidas en el espacio y que el flujo génico entre ellas es una función decreciente de la distancia que las separa. Este tipo de modelo se denominan **piedras de salto** ("stepping-stone model") (Kimura & Weiss, 1964). La disposición espacial de las subpoblaciones o demos puede ocurrir en 1 a n dimensiones, y puede ser linear, circular, rectangular, etc., pero se supone que la migración ocurre sólo entre demos adyacentes (Figura 4).

Figura 4. Representación esquemática de distintos modelos de migración: a) Modelo isla-continente; b) modelo de islas; c) modelo de piedras de salto en una dimensión; d) idem en dos dimensiones. N indica el tamaño eficaz de la población en cada demo y m es el número de genes emigrantes. La dirección de la migración se indica con la flecha. De Fontdevila & Moya (1999)

El término **metapoblación** ha sido usado para describir una población con subdivisiones espaciales y que presentaría alguna forma de estructuración que podría adecuarse a los modelos mencionados anteriormente. Levins (1969) en su definición original, describe el término como la existencia de subpoblaciones en parches discretos del hábitat en las que puede ocurrir un recambio ('turn over') debido a la extinción y recolonización a partir de otros parches ambientales. Asimismo, a lo largo del tiempo algunos de estos parches

podrían permanecer desocupados. En el modelo tradicional de metapoblación, cuando la tasa de extinción excede la de recolonización, la metapoblación se extingue.

Bajo un modelo de metapoblación, la variabilidad genética se ve fuertemente influida por el número y el origen de los individuos que recolonizan un parche ambiental. Los individuos reconolizadores (fundadores) de un parche vacío pueden provenir de un único parche ('propagule pool mode of colonization') o pueden conformar un conjunto de individuos provenientes de todos los otros parches ocupados ('migrant pool mode'). A su vez este patrón de extinción-migración-colonización hace que los demos no evolucionen independientemente unos de otros y que la metapoblación pueda alcanzar un estado de equilibrio sin que los demos locales lo estén.

En la literatura, también se citan **modelos de fisión-fusión** para el estudio de la variabilidad genética en poblaciones aborígenes cazadoras-recolectoras (Neel & Salzano, 1967). En estos grupos humanos habrían existido fisiones y fusiones a lo largo del tiempo en función de los recursos disponibles, como son poblaciones nómades, los efectos de la distancia no serían importantes, y a lo largo de las generaciones se esperaría que el flujo génico entre las aldeas sea suficiente como para que toda la tribu sea considerada como una unidad de cruzamiento.

2.5. Efecto fundador y cuello de botella

Entre los procesos por los cuales una población puede sufrir una disminución en su tamaño se encuentran el efecto fundador y el cuello de botella. El primer proceso se observa como resultado de la colonización de una nueva área por parte de un pequeño número de individuos es decir que la población se origina a partir de un número pequeño de organismos (fundadores). En el proceso dado por un cuello de botella sólo un pequeño número de

individuos de una población sobreviven en una generación particular. En estos casos el mecanismo evolutivo preponderante que conduce a cambios en las frecuencia génicas es la deriva génica. Si uno asume que la población crece luego de un evento fundador (o cuello de botella), la variación genética en la población va a estar determinada por el número de individuos fundadores (sobrevivientes), las frecuencias alélicas en ese grupo inicial y la tasa intrínseca de crecimiento a partir del evento fundador (Nei *et al.*, 1975).

2.6. La coalescencia genética

La tecnología de la secuenciación del ADN generó la posibilidad de comparar dos (o más) genes o alelos, base por base. Cuando comparamos un conjunto de secuencias homólogas (secuencias que descienden de una secuencia ancestral común), el patrón de similitudes entre las diferentes secuencias contiene información acerca de la historia evolutiva de esas secuencias (Hudson, 1990). Esta comparación provee información acerca de cuáles secuencias están más cercanamente relacionadas y de cuánto tiempo atrás compartieron una secuencia ancestro común, mostrando las relaciones genealógicas entre los alelos o genealogías.

La teoría matemática que se aplica para el estudio de las genealogías génicas o árboles de genes se conoce como teoría de la coalescencia (*e.g.*, Hudson, 1990, 1998; Li, 1997; Rosenberg & Nordborg, 2002). La teoría de la coalescencia nos permite estimar cómo fueron afectadas las genealogías por cambios en el tamaño y estructura poblacional y por el mantenimiento de alelos por selección. A lo largo de las generaciones, no todos los individuos son capaces de transmitir sus genes de generación en generación, por lo que el número de antepasados de la generación actual irá disminuyendo a medida que nos alejemos en el tiempo, llegando a ser igual a uno.

La idea básica de la coalescencia es que, a medida que retrocedemos en el tiempo, en ausencia de selección, los linajes muestreados podrían considerarse una muestra aleatoria de los parentales. Así como se observa en la Figura 5, el caso más sencillo es el de una población haploide de 2N individuos, donde de 15 objetos iniciales reproductores (ej. haplotipos mitocondriales) que dan origen a 0, 1 o 2 descendientes en cada generación, sólo la descendencia de uno de ellos persiste en la generación *t*. Los demás linajes se extinguen al azar en una u otra generación. Por consiguiente, los objetos presentes en una generación dada son todos descendientes de un objeto en una generación ancestral y es posible calcular la probabilidad de que esa generación sea la *t*-n (Hartl & Clark, 1989; Fontdevila & Moya, 1999) (Figura 5).

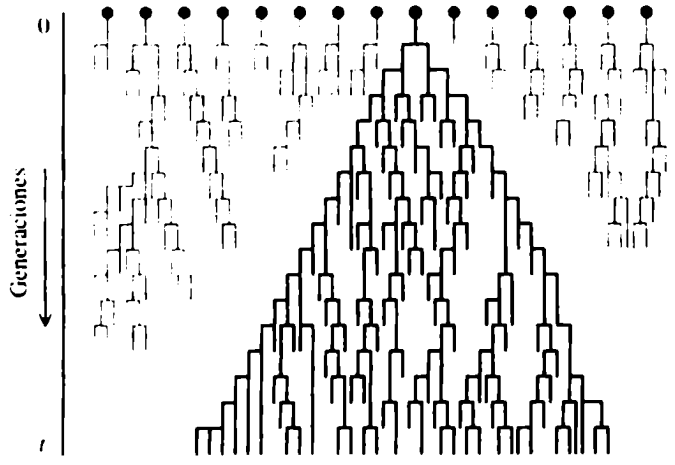


Figura 5. Árbol genealógico mostrando el fenómeno de coalescencia.

Por ejemplo, si tomamos dos secuencias de dos individuos y trazamos su linaje hasta cuando compartieron un alelo antepasado común, en ese punto se dice que coalescen. A medida que vamos hacia atrás en el tiempo el número de linajes se reduce en uno en cada evento de coalescencia, creando nodos en el árbol. Esta poda de linajes da lugar a una genealogía bifurcada con más ramas y por lo tanto más eventos de coalescencia. Cuando se llega al único alelo ancestral común a partir del cual todos los alelos actuales derivan, éste se denomina "antecesor común más reciente" (MRCA, 'most recent common ancestor'). La

formulación matemática de la teoría incluye la estimación de la probabilidad de que dos genes sean idénticos por descendencia en la generación *n* o lo que es lo mismo que hayan tardado *n* generaciones en coalescer (*e.g.*, Rosenberg & Nordborg, 2002) (Figura 5).

La estructura de una genealogía (estimando longitud y número de ramas) depende de la tasa mutacional, el tamaño efectivo poblacional (N_e), el patrón e intensidad de la selección, la historia de la recombinación y la demografía de la población (Hudson, 1993). Si consideramos una población en crecimiento, los eventos de coalescencia habrán ocurrido con una mayor frecuencia en el pasado cuando la población era pequeña o al menos más pe-queña que en el presente. Esto se verá reflejado en un árbol genealógico cuya topología será diferente a la observada en una población que ha mantenido un tamaño poblacional constante (Figura 6 a, b) (Page & Holmes, 1998).

La topología de una genealogía también puede verse afectada por procesos de selección, por ejemplo, un proceso de selección positiva, o el incremento de la frecuencia de una variante con valor adaptativo, va a producir una genealogía muy corta y con un alto número de ramificaciones cerca de la raíz del árbol, donde todas los linajes coalescen rápidamente (Figura 6c) (Page & Holmes, 1998). Sin embargo, se podrían observar topologías similares cuando la población haya atravesado un cuello de botella debido a la disminución de la variabilidad genética, y luego la población se expandirá dando topologías 'estrelladas' (Figura 6c). Para diferenciar entre ambos procesos, selección positiva vs. cuello de botella seguido de una expansión poblacional, es necesario analizar otro locus no ligado, ya que la selección afectará sólo un locus (y loci ligados) en tanto que un evento demográfico de disminución y aumento del tamaño poblacional afectará por igual a todo el genoma. Por lo tanto la topología obtenida para un segundo otro locus presentará una topología diferente, en el caso de la selección positiva y una topología similar en forma de estrella si el evento ocurrido hubiese sido un cuello de botella (Figura 6c) (Pages & Holmes, 1998).

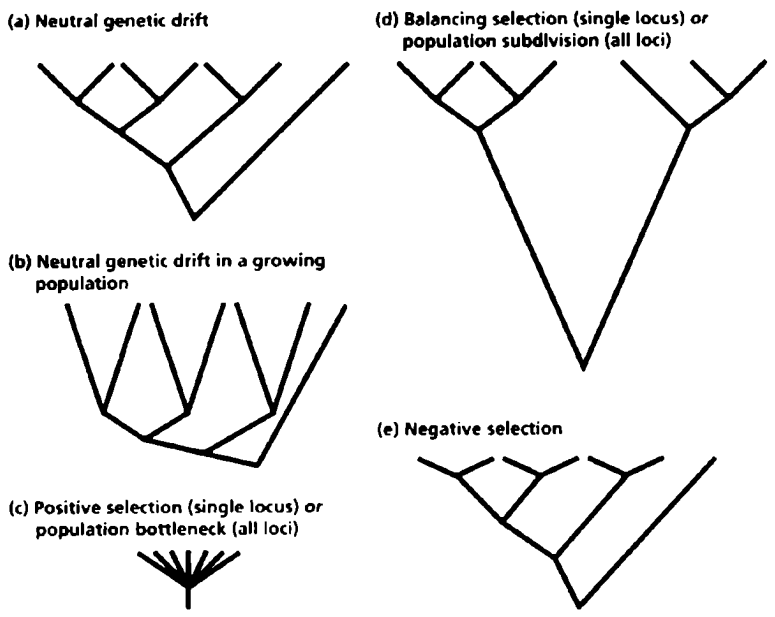


Figura 6. Diferentes topologías de árboles de genes y distribución de los tiempos de coalescencia en función de distintos procesos evolutivos (de Pages & Holmes, 1998).

En cambio, la selección equilibradora tenderá a mantener las variantes alélicas por un tiempo promedio mayor que el esperado para variantes estrictamente neutras cuyo destino está gobernado por la deriva genética. La presencia de polimorfismos equilibrados producirá un efecto neto de alargamiento de la topología de la genealogía ya que el tiempo de coalescencia será mayor al tiempo de coalescencia de alelos neutros de 4N generaciones (Figura 6d). Una genealogía con esa estructura también se podría obtenerse si los alelos muestreados provienen de un población estructurada porque los eventos de coalescencia pueden ser distintos en cada una de las subpoblaciones (Figura 6d). Nuevamente, los diferentes procesos evolutivos -selección equilibradora y estructuración poblacional - pueden diferenciarse comparando las genealogías obtenidas a partir de diferentes loci. Por último, la selección purificadora, o selección en contra de alelos perjudiciales, va a producir un exceso de alelos con tiempos de divergencia reciente, es decir cortos ya que las mutaciones deletéreas son eliminadas rápidamente de la población (Figura 6e) (Page & Holmes, 1998).

Como se mencionó en los párrafos anteriores, dado que la selección afecta la topología de las genealogías, se puede analizar la neutralidad de las mutaciones aplicando diferentes pruebas. Estas pruebas se basan en la hipótesis de que todas las mutaciones en el ADN son selectivamente neutras y contrastando los valores observados con los esperados bajo un modelo de evolución neutral. Algunas pruebas han sido desarrollados considerando solamente la variación intraespecífica, en tanto otras se basan en comparaciones que toman en cuenta el polimorfismo y la divergencia interespecífica (*e.g.*, Kreitman & Aguadé, 1986; Tajima, 1989; McDonald & Kreitman, 1991).

2.7. Teoría Neutralista

En 1968, Kimura publica la teoría neutralista de la evolución molecular proponiendo que la mayoría de las mutaciones a nivel molecular son neutras y que, a lo largo del proceso evolutivo, la mayoría de los cambios a nivel molecular se darían por la fijación al azar de variantes neutras. Con esto Kimura abre el debate neutralismo versus seleccionismo.

Los pilares de la teoría neutralista (TN) son:

- la mayor parte de la variabilidad a nivel genotípico es neutra
- la selección natural no es la principal fuerza evolutiva que conduce la evolución del genoma sino que es la deriva génica
- el tiempo de vida media de una variante neutra está directamente relacionada con la tasa de mutación

Las predicciones de la TN son:

- una correlación inversa entre el grado de requerimiento funcional ('functional constraint') de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos y las velocidades de sustitución.
- la composición de bases y la organización a nivel molecular de los genomas depende de procesos mutacionales y no de procesos selectivos
- hay una tasa constante de evolución de las secuencias, es decir un reloj molecular.

Respecto de la primera predicción los datos empíricos muestran que se cumple la relación entre restricción funcional y tasas de sustitución a nivel aminoacídico. A nivel nucleotídico, también se cumple esta predicción para las secuencias no codificantes que presentan una tasa de sustitución máxima, virtualmente todas sus posiciones son neutras. Sin embargo, a nivel de las secuencias codificantes esta predicción no se cumple. Los codones tienen dos clases de sustituciones: sustituciones de reemplazo, que producen cambio de un aminoácido por otro y sustituciones silenciosas o sinónimas, que no producen cambio de aminoácido (por ejemplo, cualquiera de las sustituciones posibles en la tercera posición de un codón cuatro veces degenerado). Mientras que las sustituciones de reemplazo podrían ser adaptativas, casi neutrales o neutrales, se esperaría que las sustituciones silenciosas fuesen neutrales, pero esto no siempre se cumple. De hecho en algunos sistemas genéticos, los codones sinónimos parecen no ser equivalentes desde el punto de vista selectivo, y los que presentan cierta ventaja selectiva tienen una mayor frecuencia, un fenómeno que se conoce como sesgo en el uso de codones (Pages & Holmes, 1998).

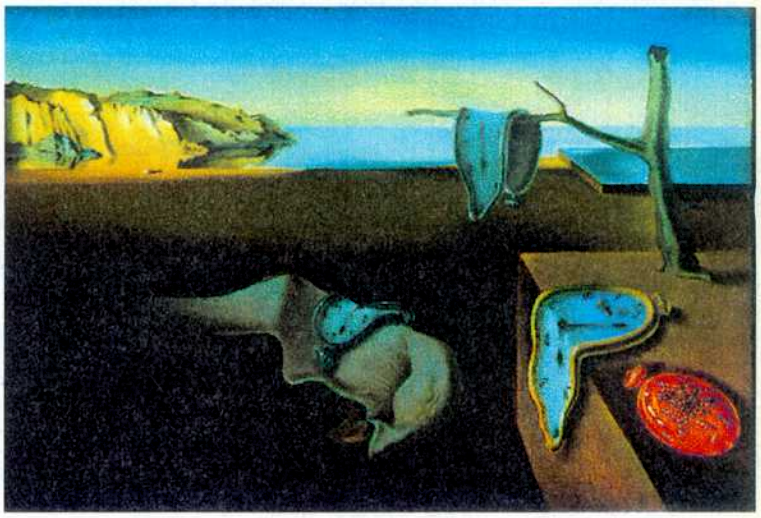
Relacionando la primera y segunda predicción, se observó en particular en los mamíferos que el sesgo en el uso del codón esta dado porque la base más frecuente en las posiciones 4 veces degeneradas es la misma en codones diferentes, en genes vecinos y también en regiones no codificantes cercanas (Bernardi *et al.*, 1985). Esto aparentemente se corresponde a la estructura de isocoros del genoma eucariota en la que la composición nucleotídica no es uniforme, existiendo regiones ricas en C+G y otras ricas en A+T, con longitudes de 300.000 pares de bases, y compuestas por exones, intrones, flanqueantes, espaciadoras, etc. Esta estructura en isocoros parece generar una restricción que lleva a una disminución en la tasa de sustitución sinónima esperada según la TN.

A lo largo de los años, se fue acumulando evidencia que indica que las predicciones absolutas de la teoría neutral no se cumplen. En particular para las sustituciones sinónimas, se

ha observado que no son estrictamente neutras, sino levemente selectivas ('weakly selected o nearly neutral'). Por lo tanto, si bien en poblaciones pequeñas podrían comportarse como neutras, en poblaciones grandes el proceso preponderante que actuaría sobre ellas sería la selección (Ohta, 1972, 1996). De todos modos, la TN ha marcado un avance importantísimo para la teoría de la evolución molecular ya que como alternativa al dogma neodarwinista, ha conducido a la revisión crítica del mismo, y fundamentalmente proporciona un modelo matemático predictivo convirtiéndose de este modo en la hipótesis nula de la evolución molecular. Es decir, la deriva estocástica de variantes selectivamente neutras a lo largo de las generaciones es la idea con la que hay que contrastar la presencia de fuerzas evolutivas determinísticas como la selección natural.

La tercer predicción de la TN es la existencia de un reloj molecular. La tasa de sustitución neutra por sitio por año, k, en una población diploide de tamaño 2N es igual al número de mutaciones neutras que aparecen cada generación, μ, multiplicado por su probabilidad de fijación, u. Entonces $k = 2N \mu u$. A su vez, la probabilidad de fijación de cualquier alelo neutro es 1/2N, es decir igual a su frecuencia inicial, mientras que el tiempo promedio que tarda en fijarse un alelo en la población es 4N (Kimura, 1986). El hecho de que tanto 2N como 1/2N estén incluidos en la ecuación lleva a que el tamaño poblacional se cancele siendo $k = \mu$, esto significa que la tasa de sustitución de mutaciones neutrales depende sólo de la tasa de mutación. Esto también vale para mutaciones con coeficientes de selección, s, menores de $1/2N_e$, siendo N_e el tamaño efectivo poblacional que es aproximadamente igual al número de individuos reproductores de una generación (Kimura, 1986). Nuevamente, si bien se ha acumulado evidencia que demuestra que la tasa de sustitución varía entre grupos de organismos, la TN ha aportado el marco teórico al concepto de reloj molecular.

2.8. La hipótesis de reloj molecular



El concepto de reloj molecular considera que a medida que los organismos divergen de su ancestro común, a lo largo de cada línea de descendencia se acumulan mutaciones a una tasa regular (Zuckerkandl & Paulig, 1965). Luego, cuando se compara la identidad de las secuencias entre los dos organismos que divergieron, se podría estimar el tiempo transcurrido desde que compartieron un antepasado común. De esta manera el reloj es una herramienta útil para datar tiempos de divergencia entre taxa en grupos en los que el registro fósil es escaso y aporta una dimensión temporal a las reconstrucciones filogenéticas.

La observación que diferentes genes y proteínas presentan una tasa de sustitución particular, aportó una evidencia a favor de la teoría neutral ya que en sus predicciones considera diferentes tasas evolutivas en los genes, en función de requerimientos funcionales de las proteínas que codifican. Así mismo como se mencionó en el punto anterior, la TN constituye la base conceptual del reloj molecular. A su vez, si consideramos un proceso de mutación bajo neutralidad absoluta, éste no seguirá un comportamiento de reloj perfecto (metrométrico), sino que será irregular (estocástico) en función de la probabilidad de mutación. Sin embargo, al considerar largos períodos de tiempo, este reloj irregular mostrará en promedio una tasa de cambio regular.

Además de la importancia de elegir el modelo correcto para la estimación del tiempo de divergencia, el punto crítico bajo la hipótesis del reloj molecular, es la suposición acerca de la constancia de la tasa de cambio entre linajes (Takezaki *et al.*, 1995). Actualmente, existe un

gran número de evidencias que parece demostrar que las tasas evolutivas varían entre diferentes grupos de organismos. Entre los factores que se han invocado para explicar los desvíos del reloj molecular están los selectivos, y también factores intrínsecos de linajes como por ejemplo las diferencias en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN (Britten, 1986) y diferencias en las tasas metabólicas (Martín *et al.*, 1992; Martin & Palumbi, 1993; Martin, 1995; Bromham *et al.*, 1996). Los efectos de linaje incluyen también el efecto del tiempo generacional que se basa en la idea de que las líneas germinales de las especies con tiempos generacionales cortos tienen un mayor número de replicaciones del ADN por año y por lo tanto una mayor probabilidad de error durante la replicación por unidad de tiempo, que aquellas especies con tiempos generacionales largos (Li *et al.*, 1987; Ohta, 1993; Mooers & Harvey, 1994). Un ejemplo de desvío del reloj molecular en un linaje es la disminución de la tasa de cambio en los homínidos ('hominid slowdown') que se manifiesta como un patrón decreciente de la tasa de sustitución partiendo de los cercopitecos, pasando por los monos antropomorfos y llegando hasta los humanos (Goodman, 1985; Li *et al.*, 1987; Hasegawa *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1991; Seino *et al.*, 1992). Esta disminución en la tasa de sustitución fue explicada por el efecto del tiempo generacional basado en la correlación entre un mayor tiempo generacional y una menor tasa de sustitución (Goodman, 1985; Wu & Li, 1985; Britten, 1986). Otros ejemplos de tasas específicas de linajes explicadas principalmente considerando la hipótesis de las diferencias en las tasas metabólicas, son las altas tasas de sustitución observadas en roedores (Li *et al.*, 1990), cuando se las compara con las bajas tasas estimadas en tiburones (Martín *et al.*, 1992) y en tortugas (Avise *et al.*, 1992).

3. El ADN mitocondrial

3.1. Características generales

La mitocondria es una organela citoplasmática cuya función principal en la célula eucariótica es la de proveer energía (en forma de ATP) a través de los procesos de respiración y fosforilación oxidativa. Al igual que el cloroplasto, la mitocondria contiene su propio ADN, que en los mamíferos consiste en una pequeña molécula de doble cadena de circular covalentemente cerrado (Brown, 1983, 1985) (Figura 7).

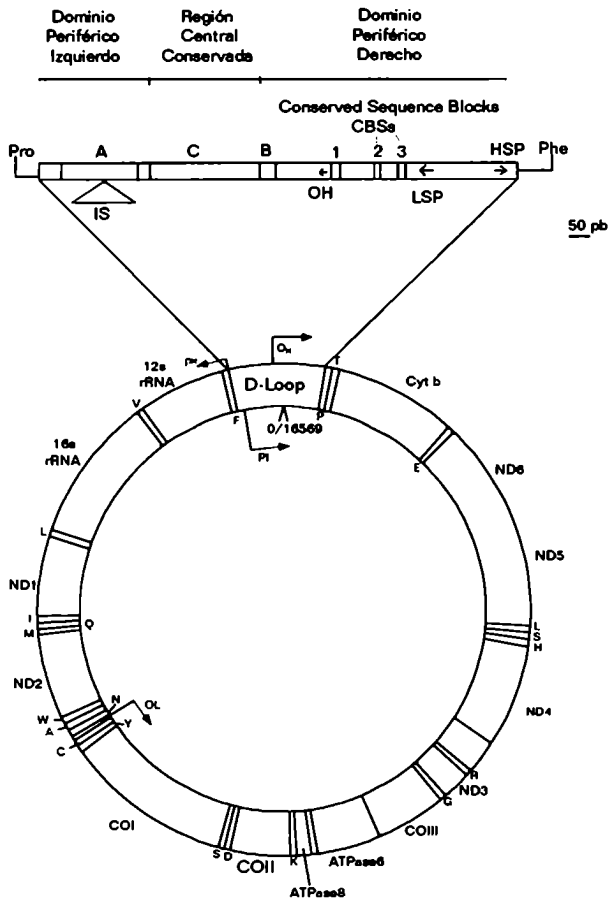


Figura 7. Mapa del genoma mitocondrial de mamíferos en general basado en el mtADN humano.

Dado que presenta un tipo de herencia haploide y materna (Giles *et al.*, 1980), los árboles filogenéticos que relacionan las variantes del mtADN pueden ser interpretadas como genealogías que reflejan las matrilíneas de una población o especie (Wilson *et al.*,1985;

Avise, 1986). Asimismo, el tamaño efectivo poblacional para los genomas mitocondriales es aproximadamente un cuarto respecto del genoma nuclear lo cual hace que los genes mitocondriales puedan ser más proclives al cambio estocástico por deriva ('sorting') (Birky *et al.*, 1983).

Estas características permitieron el uso del ADN mitocondrial en estudios evolutivos desde el análisis matrilíneas en grupos sociales hasta estudios filogenéticos supragenéricos. A su vez, es un marcador muy útil en estudios genéticos no invasivos y de ADN antiguo, ya que dado el alto número de por célula somática (de 100 a miles) junto a su pequeño tamaño (alrededor de 16.500 pares de bases en mamíferos) facilitan su extracción incluso de fuentes como pelos y heces, y materiales subfósiles o de museo (*e.g.*, Barnes *et al.*, 2002).

El genoma mitocondrial presenta genes de copia única y no presentarían recombinación. Se encuentra sumamente caracterizado conociéndose su secuencia completa en numerosos organismos. En primates se han caracterizado el genoma mitocondrial completo de humanos (*e.g.* Anderson *et al.*, 1981), chimpancé (*Pan paniscus*, Arnason *et al.*, 1996), gorila (*Gorilla gorilla*, Horai *et al.*, 1995; Xu & Arnason, 1996), orangután (*Pongo pygmaeus*, Xu & Arnason, 1996), gibón (*Hylobates lar*, Arnason *et al.*, 1996), *Papio hamadryas* (Arnason *et al.*, 1998), *Nycticebus coucang*, *Macaca sylvanus* y *Cebus albifrons* (Arnason *et al.*, 2000), recientemente *Tarsius bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002), y *Lemur catta* (Arnason *et al.*, 2002).

En los mamíferos, el mtADN muestra una alta conservación en la organización estructural de los genes, número de bases, y composición nucleotídica. Este genoma codifica para 37 genes, 22 corresponden a genes de tARNs (ARNs de transferencia), 2 rARNs (ARNs ribosomales), y para 13 genes estructurales relacionados a la respiración y fosforilación oxidativa (Wallace, 1986). Posee una región control no codificante o 'D-loop' donde

comienza y finaliza la replicación de este genoma. En general, en mamíferos se considera que carece de intrones, pseudogenes o secuencias repetidas.

La tasa de evolución conocida para muchos grupos de organismos, calculada en 0,02 sustituciones por par de bases por millón de años en promedio (Brown *et al.*, 1979, 1982; Wilson *et al.*, 1985, 1989). Tradicionalmente se consideraba que la tasa de sustitución en mtADN, era 5 a 10 veces más rápida que la del genoma nuclear (Brown *et al.*, 1979, 1982; Wilson *et al.*, 1985; Avise, 1994), sin embargo recientes trabajos considerando un gran número de genes nucleares (5.669 genes, 17.208 secuencias) incluyendo varios grupos de mamíferos, mostraron una tasa de sustitución promedio de 0,022 por base por millón de años para el conjunto de los genes nucleares (2,2 x 10-9 por base por año) (Kumar & Subramanian, 2002). Es decir la misma tasa propuesta para el genoma mitocondrial llevando a reevaluar la propuesta de la mayor velocidad de evolución del mtADN respecto del nuclear.

Estudios comparativos de distintos genes mitocondriales han mostrado que la tasa de sustitución está relacionada con la región del genoma que estemos analizando. En este aspecto, se pueden diferenciar dos grandes grupos, los rápidos y lentos. Los sitios no sinónimos, la región central de la región control, los genes de tARN y rARN evolucionan más lentamente que los sitios sinónimos y los dominios periféricos de la RC (Pesole *et al.*, 1999; Saccone *et al.*, 2002). En particular los sitios no sinónimos muestran tasas comparables con las de genes nucleares, en cambio los sitios sinónimos y los rARNs evolucionan 20 veces más rápido en la mitocondria que en el núcleo, mientras que los tARNs lo hacen 100 veces más rápido (Pesole *et al.*, 1999; Saccone *et al.*, 2002).

Algunas posibles explicaciones a la alta tasa de sustitución nucleotídica en los sitios sinónimos de ciertos genes mitocondriales y los mt tARNs en relación a su contraparte nuclear podrían ser las propuestas tradicionalmente: a) mayor frecuencia de mutaciones debidas al ambiente oxidativo de la mitocondria, b) ausencia de mecanismos de reparación

eficientes, c) mayor replicación del genoma mitocondrial (un fenómeno de tiempo generacional diferencial interno del organismo), d) alta tasa de fijación por deriva genética (*e.g.*, Brown *et al.*, 1979; Martin & Palumbi, 1993).

3.2. El ADN mitocondrial y su uso en estudios evolutivos en primates

Al pensar en este tema, es inevitable hablar del estudio de nuestros propios orígenes como humanos. Los estudios de antropología molecular basados en hibridación de ADN entre humanos y grandes monos (Sibley & Ahlquist, 1984), junto con las comparaciones de genes nucleares (Goodman, 1985) habían propuesto la ancestralidad común entre humanos y chimpancés y al mismo tiempo han permitido obtener estimaciones de tiempos de divergencia basados en la hipótesis de reloj molecular. El segundo gran aporte de la antropología molecular ha sido la propuesta del origen africano único (sin flujo génico con poblaciones de *Homo erectus*) y reciente (200.000 años) del hombre moderno o hipótesis de la Eva africana, basado en el análisis de RFPLs del genoma mitocondrial de individuos de diversas poblaciones actuales (*e.g.*, Cann *et al.*, 1987; Cann, 2002). Esta hipótesis ha ganado una gran aceptación ya que los datos obtenidos con diversos marcadores nucleares (secuencias de varios genes y microsatélites) y los estudios comparativos de antropología cultural, como los aportados por la lingüística apoyan a esta propuesta. Sin embargo, por un lado algunos paleontólogos se oponen a esta interpretación (*e.g.*, Wolpoff *et al.*, 1994) y por otro, recientes análisis de datos genéticos también han sugerido que las poblaciones de humanos africanos habrían tenido cierto grado de flujo génico y no habrían reemplazado totalmente a las poblaciones antiguas, manteniendo el debate abierto (Templeton, 2002).

El mtADN ha sido empleado como marcador molecular en numerosas investigaciones de primates no-humanos con objetivos diversos, desde el estudio de la estructura social, la estructuración geográfica de las poblaciones, la inferencia de las relaciones filogenéticas y

para la contrastación de hipótesis biogeográficas. Dependiendo de las cuestiones analizadas se han empleado RFLPs, secuenciación de genes como el citocromo *b* hasta región control. En particular, en esta Tesis se han empleado dos regiones diferentes del genoma mitocondrial, una, para realizar un estudio de estructura poblacional: la región control y la segunda fue el gen que codifica para la subunidad II de la citocromo oxidasa *c* (COII) para realizar inferencias filogenéticas.

3.3. La región control o 'D-loop'

La región control (RC) del genoma mitocondrial es una secuencia no codificante de aproximadamene 1.000 pb, que también recibe el nombre de D-loop ('displacement loop') debido a que forma una estructura de tres cadenas visibles al microscopio electrónico. Esta estructura aparece durante la replicación del genoma cuando la cadena naciente desplaza a la parental. La RC se caracteriza, en los mamíferos, por tener una región central conservada (RCC), flanqueada por dos dominios periféricos altamente divergentes (Saccone *et al.*, 1991). Mientras que la RCC presenta una muy baja tasa de evolución dada principalmente por mutaciones puntuales, los dominios periféricos evolucionan rápidamente presentando mutaciones puntuales, inserciones y deleciones ('indels'), y números variables de repeticiones en tandem (VNTRs) (Saccone *et al.*, 1991; Arnason *et al.*, 1993). En mamíferos, la RC muestra características particulares tales como una marcada variabilidad en las tasas de evolución según los linajes (Saccone *et al.*, 1991; Sbisà *et al.*, 1997; Pesole *et al.*, 1999; Larissa *et al.*, 2002). Pesole *et al.* (1999) compararon la tasa de sustitución nucleotídica entre varios grupos de mamíferos y observaron que la RC en promedio presenta una tasa de 12,6 x 10^{-9} sustituciones por año por sitio. Por otro lado, la tasa de evolución del dominio periférico izquierdo en humanos ha sido estimada en 0.33 por 10^{-6} sustituciones por sitio por año (Ward *et al.*, 1991). Esta alta tasa de sustitución observada particularmente en esta región de la RC,

la constituye en la región mitocondrial más empleada en estudios poblacionales. Particularmente en primates no humanos se la ha utilizado en estudios genético-poblacionales de bonobos (*Pan paniscus*, Hashimoto *et al.*, 1996); babuinos ('baboons', *Papio hamadryas*, Hapke *et al.*, 2001); gorilas (*Gorilla gorilla*, Garner & Ryder, 1996; Saltonstall *et al.*, 1998; Jensen-Seaman & Kidd, 2001). En el caso de los platirrinos los trabajos publicados incluyen estudios biogeográficos en calitrícidos (Tagliaro *et al.*, 1997), *Saguinus* (Jacobs *et al.*, 1995; Cropp *et al.*, 1999) y *Saimiri* (Cropp & Boinski, 2001); y poblacionales en *Alouatta seniculus* (Pope, 2000).

3.4. La subunidad II de la citocromo oxidasa *c* mitocondrial (COII)

El complejo dimérico de la citocromo oxidasa *c* se encuentra en la membrana mitocondrial interna y es una proteína que interviene en la cadena respiratoria de todos los organismos aeróbicos. Cada monómero de la citocromo oxidasa *c* está compuesto por 3 subunidades (I-III) codificadas por el genoma mitocondrial y 10 subunidades codificadas por el genoma nuclear. La citocromo oxidasa *c* juega un papel crítico en el último paso oxidativo de la cadena respiratoria pues transfiere los electrones de un citocromo *c* reducido (proteina codificada por el núcleo) al oxígeno para formar agua. Justamente la subunidad que interacciona fisicamente con el citocromo *c* es la subunidad II (COII). (Capaldi, 1990; Cooper et al., 1991; Adkins *et al.*, 1994).

Adkins *et al.* (1994) han observado una alta tasa de reemplazo de aminoácidos en el comienzo de la radiación de los antropoides, y que este incremento en la tasa es coincidente con una aceleración similar en la tasa de sustitución del citocromo *c* nuclear, sugiriendo que ambas moléculas han evolucionado en forma correlacionada probablemente debido a impedimentos estructurales y funcionales. Sin embargo, esta alta tasa de reemplazo aminoacídico parece no haber afectado posiciones de importancia funcional en la molécula,

aunque sí ha aumentado la variación de la región amino terminal de la proteína, produciendo cambios estructurales, y también modificaciones en la interacción física con el citocromo *c* (Grossman *et al.*, 2001).

Cuando se analizan las tasas relativas en primates se observa un patrón creciente en el valor de las tasas de sustitución comenzando en los prosimios, luego platirrinos, hominoideos, y cercopitecos que presentan la tasa más alta de sustitución para COII (Adkins *et al.*, 1994) habiéndose estimado una tasa de sustitución para COII en homínidos de 0.85% /millón de años (Ruvolo *et al.*, 1993). De la comparación de varios genes mitocondriales de vertebrados se observó la presencia de tres grupos los de tasa de sustitución rápida, media y lenta, sin embargo la tasa de sustitución no estaría fuertemente correlacionada con su utilidad en la inferencia filogenética (Zardoya & Meyer, 1996). En particular, COII entraría dentro del grupo de los genes de sustitución media (Zardoya & Meyer, 1996).

El gen COII ha sido empleado para estudios evolutivos en insectos (*e.g.*, Pruess *et al.*, 2000), distintos grupos de mamíferos como roedores (*e.g.*, Honeycutt *et al.*, 1995) y primates (Adkins & Honeycutt, 1994), entre otros. En particular, COII ha demostrado ser un marcador útil para la inferencias filogenéticas en ciertos grupos de primates como en Monos del Viejo Mundo (Disotell *et al.*, 1992), hominoideos (Ruvolo *et al.*, 1991; 1993), en los géneros de platirrinos *Aotus* (Ashley & Vaughn, 1995) y *Ateles* (Collins & Dubach, 2000).

4. La estructura social y la dinámica genética de las poblaciones

4.1. Aspectos generales de la organización social en primates

La sociabilidad es un comportamiento presente en un gran número de especies animales. La variación de estructura social, *i.e.* tamaño y composición por edad y sexo de los grupos, es muy amplia. Un tema de gran interés para los primatólogos dedicados a la ecología, ha sido estudiar cómo la variación en la estructura social, dentro de una especie o entre especies podría estar relacionada con diferencias ecológicas o variables sociodemográficas (Crook & Gartlan, 1966). Diferentes hipótesis han sido planteadas para estudiar estos factores, si bien en una primera etapa prevalecían aquellas explicaciones que consideraban que los factores ecológicos eran los determinantes del comportamiento social, actualmente se está considerando el papel de la competencia sexual y el legado filogenético en la determinación de los patrones de sociabilidad (Janson, 1992, 2000).

En general se considera que las potenciales ventajas de vivir en grupo son: una mayor protección de los predadores, un mejor acceso a los alimentos y a cópulas, y la ayuda en el cuidado de las crías (Feagle, 1998). A su vez, estas mismas ventajas se transforman en potenciales desventajas ya que vivir en grupo también puede significar: una mayor visualización por los predadores, y un aumento en la competencia entre individuos por los recursos, cópula y asistencia en el cuidado de la cría y mayor contagio de enfermedades (Fleagle, *op. cit.*).

Hasta 1920 los estudios conocidos en primates no humanos estaban referidos principalmente a su anatomía y taxonomía. En 1927, Köhler publica un trabajo de comportamiento en chimpancés. Entre 1930 y 1950 se desarrollan los primeros trabajos que sientan las bases de los estudios de la socioecología de primates (ver Fleagle, 2000). Entre estos investigadores pioneros cabe destacar a Carpenter quien realizó los primeros estudio de

campo en Monos del Nuevo Mundo, en una población de monos aulladores (*Alouatta paliatta*) en la Isla de Barro Colorado, Panamá (1934, 1954, 1962).

Los primates viven en sociedades que pueden ser identificadas como conjuntos de animales que interactúan regularmente entre ellos más que con miembros de otros grupos (Struhsaker, 1969). Presentan la mayor variación en los patrones de organización social que cualquier otro grupo de vertebrados caracterizado por una gran diversidad interespecífica en tamaño y composición de edad y sexos de los miembros de los grupos (Janson, 1992). A su vez, grupos que presentan una misma estructura pueden manifestar comportamientos sociales diferentes; *e.g.*, el monógamo *Aotus* suele presentar un importante cuidado parental por parte del macho ('male parental care'), mientras que en el monógamo gibón (*Hylobates*) ese comportamiento es mínimo (Janson, *op. cit.*). Más aún, el grado de parentesco entre los miembros de un grupo social de primates es altamente variable entre *taxa*. Pueden distinguirse al menos 7 tipos de sociedades de primates desde especies en que los adultos son solitarios hasta especies donde cientos de individuos están organizados en grupos con varias subunidades dentro de una jerarquía (Kappeler, 1997). Este último autor describe los siguientes patrones de organización social:

I- Especies solitarias: los individuos forrajean solos pero pueden formar grupos para dormir con otros adultos (Bearder, 1987). Presentan superposición en sus *áreas de acción*, con hembras jóvenes que se distribuyen en áreas de acción cercanas a las de su madre (comportamiento filopátrico) constituyendo matrilíneas. Con excepción del orangután (*Pongo pygmaeus*), el resto de las especies solitarias son nocturnas. Su sistema de apareamiento es poligínico, con competencia de machos, y presentan *dimorfismo sexual* en el tamaño corporal. *e.g.*, lorísidos.

II- Especies que viven en pareja, un macho adulto y una hembra adulta permanentemente asociados (Leighton, 1987) con hijos que dejan su área natal. El sistema de apareamiento es monógamo, y no presentan dimorfismo sexual aunque algunas especies pueden presentar dicromatismo. *e.g.*, *Aotus*.

III- Grupos poliándricos, una hembra activa reproductivamente asociada a dos machos adultos. Ambos machos tienen acceso al apareamiento con la hembra (poliandria) y proveen de cuidado parental a la cría. Tanto machos como hembras se dispersan de su grupo natal. La poliandria que es rara en mamíferos, está presente en los calitrícidos, que carece de dimorfismo sexual.

IV- Grupos unimachos, varias hembras y un macho adulto que presenta un comportamiento territorial con un sistema de apareamiento poligínico. El patrón de dispersión es variable, en algunas especies se dispersan los machos, en otras las hembras, y en otros casos ambos sexos. Presentan reemplazo de macho que está asociado a infanticidios por parte del nuevo macho (Struhsaker & Leland, 1987; Kowalewski *et al.*, 1995). En general, presentan un marcado dimorfismo sexual en tamaño corporal y de caninos. *e.g.*, *Cebus*, *Alouatta caraya*.

V- Grupos multimacho, varios hembras y machos están permanentemente asociados y son reproductivamente activos. Pueden distinguirse tres tipos de grupos multimacho: a) las hembras son filopátricas con formación de lazos sociales entre las hembras originando matrilíneas (*e.g.*, *Saimiri sciureus*); b) ausencia de lazos sociales entre ellas, ambos sexos migran (*e.g.*, *Saimiri oerstedi*, *Alouatta palliata*); y c) machos filopátricos, *e.g.*, *Colobus*. En general, el apareamiento es promiscuo, *i.e.* tanto machos como hembras se aparean con varios miembros del sexo opuesto. En especies con tamaño de grupo pequeño, el apareamiento es poligínico, *i.e.* un macho se aparea con las hembras del grupo (Pope, 1990).

VI- Sistema 'fisión-fusión', varios machos que presentan lazos sociales defienden un área en la que se encuentran varias hembras que son básicamente solitarias. En esa comunidad se pueden formar subgrupos temporales que varían en tamaño y composición. Las hembras jóvenes migran. El apareamiento es promiscuo y presentan poco dimorfismo sexual. *e.g.*, *Ateles*, *Brachyteles*.

VII- Sociedades con varios niveles, un macho con varias hembras forman la unidad social más pequeña (unidad unimacho) que se organiza en niveles jerárquicos de inclusión. Un ejemplo es *Papio hamadryas*, varias de esas unidades están fuertemente asociadas formando un clan, y a su vez, varios clanes forman una banda, que es el nivel más alto de organización. Las bandas pueden asociarse para dormir. Cada hembra en estro se aparea con el macho de su unidad. Presentan un marcado dimorfismo sexual, siendo en algunas especies el tamaño corporal del macho el doble que el de la hembra.

La pregunta acerca de cómo las poblaciones están estructuradas genéticamente ha sido de continúo interés para los biólogos evolutivos. La estructuración genética ocurre cuando la población se subdivide en subpoblaciones o demos que están al menos parcialmente aisladas unas de las otras, usualmente por distancia (Wright, 1963, 1969). Cuando la población se subdivide podemos observar varios procesos, no mutuamente excluyentes, como:

- la acumulación de diferencias genéticas (diferenciación) por acción de la *selección natural*,
- aumento de la *endogamia*,
- fijación y pérdida de variantes alélicas por acción de la *deriva génica*.

Si bien es ampliamente aceptado que el aislamiento geográfico puede producir estructuración genética en las poblaciones a una escala regional, no está claro si la organización en unidades sociales pueden conducir a una estructuración genética entre los grupos de una misma población (*e.g.*, diferenciación dentro de una misma colonia). La forma en que la organización social puede influir en la estructura genética de una población tendrá importantes consecuencias en relación con la flexibilidad de la población para responder a cambios ambientales. El tamaño efectivo, los patrones de dispersión, y los sistemas de apareamiento pueden influir en el mantenimiento de la diversidad genética dentro de la población, y la proporción del genoma expuesto a la selección (Wright, 1946, 1965, 1980; Slatkin, 1976). La consecuencia genética de las tasas y patrones de migración entre los demos puede ser descripta empleando los modelos básicos descriptos anteriormente (Punto 2.4.) donde los efectos del aislamiento por distancia se compensan con el efecto cohesivo de la migración (Wright, 1943; Kimura, 1953; Kimura & Weiss, 1964).

En la mayoría de las poblaciones socialmente estructuradas, el grupo social es la unidad mínima de evolución donde pueden ocurrir variaciones en las frecuencias génicas o de rearreglos cromosómicos (*e.g.*, Bush, 1975, Bush *et al.*, 1977; Wilson *et al.*, 1975; Chesser *et*

al., 1993). A su vez, la estructuración genética se verá afectada por el resultado de la relación entre el sistema de apareamiento y los patrones de migración de cada sexo. Por ejemplo, considerando la restricción impuesta por la estructuración social al flujo génico en combinación con el sistema de apareamiento poligínico, se esperaría una reducción del tamaño efectivo (N_e) de los demos locales (Chesser *et al.*, 1993; Nunney, 1993; Storz, 1999). Bajo esta organización social la deriva génica podría ser la fuerza evolutiva preponderante y ha sido el factor invocado para explicar la correlación observada entre las rápidas tasas de evolución cromosómica y especiación en mamíferos sociales (Bush, 1975; Wilson *et al.*, 1975). Sin embargo, para la mayoría de los mamíferos, los efectos de la estructuración social en el destino de las variantes genéticas es una pregunta abierta.

4.3. Estudios genéticos poblacionales en primates

Los primates como mamíferos de vida larga y socialmente complejos, constituyen modelos óptimos para observar los efectos del comportamiento y la demografía sobre la estructura genética (Melnick, 1987). Estas observaciones podrían tener importantes implicancias en la comprensión de su rápida tasa de evolución. A su vez, algunas particularidades como la amplia diversidad en sus patrones de organización social, composición de grupos (edad y sexo), y patrones de migración incluso entre especies cercanas, los convierte en modelos de gran interés para este tipo de estudio.

Existen numerosos trabajos referidos al análisis de estructura genética de poblaciones en varias especies de monos catarrinos, principalmente en los macacos, papios (o babuinos) y mandriles, y también en las especies de monos antropomorfos chimpancé, gorila y orangután, empleando diversas metodologías como la electroforesis de proteínas sanguíneas (Melnick, 1987; Melnick & Kidd, 1985); de ADN mitocondrial (Hoelzer *et al.*, 1994; Melnick & Hoelzer, 1996; James *et al.*, 1997); RFLPs de ADN nuclear (Rogers & Kidd, 1996),

secuenciación de la región control del genoma mitocondrial (RC) o 'D-loop' (*e.g.*, Hashimoto *et al.*, 1996; Saltonstall *et al.*, 1998; Jensen-Seaman & Kidd, 2001; Hapke *et al.*, 2001), polimorfismos de secuencia del cromosoma Y (*e.g.*, Tosi *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2002; Gagneux, 2002) y microsatélites (*e.g.*, Gagneux *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2000; Vigilant *et al.*, 2001).

En macacos cuando se analizan genes nucleares (herencia mendeliana) se observa una marcada homogeneidad entre poblaciones mientras que la distribución de la variabilidad a nivel de genes mitocondriales (herencia materna) muestra una marcada diferenciación entre las poblaciones (Melnick & Hoelzer, 1996). La falta de concordancia entre los genes nucleares y mitocondriales, podría explicarse al considerar la organización social de los macacos. Estos presentan una estructura social multimacho con dispersión de los machos cuando alcanzan la adultez, mientras que las hembras son filopátricas, esto presenta un correlato genético ya que el análisis de la distribución de las variantes moleculares mostrarían patrones homogeneos de la variabilidad nuclear junto con una estructuración geográfica y social de la variabilidad mitocondrial (Melnick & Hoelzer, 1996).

Estudios similares se han realizado en algunos monos hominoideos, como el bonobo (*Pan paniscus*) y el chimpancé (*Pan troglogytes*) que tienen estructura sociales de tipo 'fisión-fusión', en la que los machos son filopátricos y las hembras se transfieren entre los grupos (*e.g.* Idani, 1991; Gagneux *et al.*, 1999). En estos casos no se ha observado una estructuración a nivel del ADN mitocondrial debido a que el flujo génico es el resultado de la dispersión de las hembras (*e.g.* Morin *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1996).

A su vez, en orangutanes (*Pongo pygmaeus*) también se observaron discordancias entre los patrones de variación nuclear y mitocondrial, con un cierto grado de estructuración de la variabilidad mitocondrial pero ausencia de diferenciación a nivel de loci de microsatélites (Warren *et al.*, 2000, 2001). También en este caso, los datos genéticos son

concordantes con las observaciones comportamentales, ya que si bien *Pongo pygmaeus* se considera una especie solitaria, las hembras mantienen áreas de acción cercanas a su origen (Warren *et al.*, 2001).

En contraposición al importante número de estudios sobre la relación entre la organización social y la estructuración genético-poblacional realizados en primates catarrinos, en los platirrinos, los trabajos son escasos, contando hasta el presente como únicos antecedentes los estudios de dos monos aulladores: *Alouatta pigra* (James *et al.*, 1997) y *A. seniculus* (Pope, 1990, 1992, 1996, 1998, 2000), basados en datos alozímicos y de mtADN. En el primer caso los autores observan una ausencia de estructuración genética tanto a nivel nuclear como mitocondrial, sugiriendo que la población habría atravesado recientemente un cuello de botella probablemente como consecuencia de un huracán que azotó la región de estudio en los años 80 (James *et al.*, 1997). Por su parte las poblaciones venezolanas de *Alouatta seniculus* estudiadas en los trabajos de Pope, han sido largamente investigadas por numerosos primatólogos dirigidos por el Dr. Eisenberg. Esto ha permitido contar con datos demográficos desde principios de los 70 (*e.g.*, Eisenberg, 1991). Con esta información y sumando los hallazgos genéticos obtenidos a partir del análisis de electroforesis de proteínas y secuencias de la región control mitocondrial, Pope observa: a) que las tropas, *i.e.* los grupos sociales, están estructuradas genéticamente, b) que la diferenciación genética entre las poblaciones se relaciona con la tasa de migración observada, c) que los nuevos grupos sociales se formarían con hembras no emparentadas, y d) que luego del establecimiento del grupo sólo un linaje mitocondrial se fijaría por competencia entre las hembras, proceso que estaría correlacionado con el crecimiento poblacional (Pope, 1992, 1998, 2000).

5. El modelo

5.1. El genero *Alouatta*

Entre los Monos del Nuevo Mundo, el género *Alouatta* que agrupa a los monos aulladores, es uno de los grupos más estudiado en cuanto a su ecología y uno de los más interesantes debido al gran número de patrones contrastantes en relación al habitat como ser el habitar ambientes de selva de inundación tanto como xerófilos, sistemas sociales unimacho asociado a comportamientos territoriales y sistemas multimacho sin presentar comportamiento territorial (Crockett & Eisenberg, 1987). Una característica común dentro del género es que ambos sexos se dispersan de su grupo natal (*e.g.*, Crockett, 1984; Clarke & Glander, 1984; Rumiz, 1990).

El género *Alouatta* ha sido considerado como un grupo pionero con adaptaciones generalizadas a una diversidad de ambientes (*e.g.*, Eisenberg, 1991). Las características relacionadas a su plasticidad para adaptarse a variadas y extremas condiciones ecológicas, incluyen:

a) Distribución geográfica: Dentro de los primates neotropicales, *Alouatta* tiene una de las distribuciones más amplias que se extiende desde el sur de México hasta el norte de Argentina (*e.g.*, Eisenberg, 1979; Crockett & Eisenberg, 1987; Rylands *et al.*, 2001)
b) Ambientes: Los aulladores habitan el rango de ambientes más amplio que cualquier otro género de primates, incluyendo la selva tropical lluviosa, selva de inundación, bosques en galería, parches de bosque, y ambientes estacionales deciuos y semideciduos (Crockett & Eisenberg, 1987, Zunino *et al.*, 2001)
c) Dieta: Principalmente son folívoros con capacidad de extraer agua de las hojas que comen, por lo cual pueden vivir en áreas donde la disponibilidad de agua no sea permanente (Eisenberg, 1991).
d) Ambientes marginales o perturbados: Se lo observa formando parte de comunidades de hasta 11 especies de primates (Terborgh, 1983), si bien por el contrario, en algunos lugares, *Alouatta* ha sido descripta como la única especie de primate presente, como es el caso de *A. seniculus* y *A. caraya*, aún en áreas perturbadas por el hombre (Eisenberg *et al.*, 1972; Eisenberg ,1979; Rodríguez-Luna *et al.*, 1996; Kowalewski & Zunino, 1999).

En cuanto a su taxonomía, el género *Alouatta* Lacépedè, 1799, se consideraba tradicionalmente formado por seis especies: *A. palliata* (o *A. villosa*), *A. pigra* (o *A. villosa pigra*), *A. seniculus*, *A. belzebul*, *A. fusca* y *A. caraya* (Hill, 1962; Crockett & Eisenberg, 1987). Actualmente, varias subespecies fueron elevadas al rango de especie, aunque es una clasificación que se encuentra en discusión e incluiría 9 especies: *A. seniculus*, *A. sara*, *A. nigerrima*, *A. belzebul*, *A. guariba*, *A. palliata*, *A. coibensis*, *A. pigra* y *A. caraya* (Rylands *et al.*, 2000).

Junto con el resto de los atélidos constituyen los platirrinos más grandes con una media de aproximadamente 10 kg. en cuanto a su tamaño corporal, y poseen cola prensil con anillos de fricción en la parte distal de la cola de posición ventral que emplean en la suspensión (*e.g.*, Napier & Napier, 1967; Milton, 1982). Presentan dimorfismo sexual tanto en tamaño corporal con machos mucho más grandes que las hembras, aunque en algunas especies este dimorfismo es leve, como en sus caninos, y en algunos casos como en *A. caraya* y *A. fusca* también presentan dicromatismo, con el macho más oscuro que la hembra (*e.g.*, Thorington *et al.*, 1984; Hirsch *et al.*, 1991). Otra característica particular del género es la expansión del hueso hioides que constituye una caja de resonancia que les permite generar fuertes y largas llamadas o aullidos, de ahí su nombre de "aulladores".

En vida silvestre, la longevidad de los machos puede ser mayor a 25 años, y la de las hembras de 20 (Coppo & Resoagli, 1978; Eisenberg, 1991). En cuanto a su reproducción, la edad media de la primera parición es a los 5 años, en general tienen una cría con una gestación de alrededor de seis meses y medio (186 días en *A. palliata* y 191 días en *A. seniculus*) e intervalos de casi dos años entre partos. Si bien se reproducen en cualquier época del año, presentan un pico de nacimientos asociado a la disponibilidad de recursos alimenticios (Glander, 1980; Crockett & Sekulic, 1982; Zunino, 1986, 1996; Eisenberg, 1991; Kowalewski, com. per.).

Las áreas de acción van de 4 a 60 ha, con mayor variación dentro de las especies que entre ellas, mostrando una relación con variaciones ambientales (Crockett & Eisenberg, 1987). En relación al área de acción que presentan, los aulladores pasan poco tiempo desplazándose y tienen largos períodos de descanso y digestión. A su vez, éstas están inversamente relacionadas a la densidad poblacional y en situaciones de alta densidad poblacional las áreas de acción se superponen (Crockett & Eisenberg, 1987).

Como ejemplo del amplio rango de valores de densidad poblacional que se observa en aulladores, se puede citar a *A. caraya* que en poblaciones marginales de en Bolivia presentó la más baja densidad observada de 0,8 individuos por km^2 (Helte *et al.*, 1976) hasta la mayor densidad poblacional dada por 280 individuos por km^2 en islas del Paraná (Rumiz, 1990; Zunino *et al.*, 2001). La abundancia de alimentos así como el número de especies de primates en competencia han sido propuestos tradicionalmente como límites de la densidad poblacional en primates influyendo a su vez en la estructura de grupos de la misma (Struhsaker, 1978; Eisenberg, 1979; Dittus, 1980; Milton, 1980). Sin bien se observan correlaciones entre variaciones en la composición de los hábitats y la estructura poblacional, los factores relacionados con la historia del grupo también afectarían los patrones de estructuración (Chapman & Balcomb, 1998). Entre estos últimos, un factor que podría condicionar la estructura poblacional es el crecimiento demográfico, *i.e.*, poblaciones que se encuentran en esa fase, podrían mostrar estructuras poblacionales diferentes respecto de poblaciones que se encuentran en una fase estable, al menos en parte, debido al proceso demográfico (Crockett, 1996; Crockett & Eisenberg, 1987; Crockett & Rudran, 1987). Chapman y Balcomb (1998) analizan el tamaño de grupo, relación de hembras y machos por grupos y la relación de hembras e infantes entre las distintas especies de aulladores, concluyendo que sólo los dos primeros varían significativamente entre especies. Si bien estos autores proponen que no hay datos suficientes para establecer qué parámetros podrían afectar la variación en densidad y

estructura de grupos en aulladores, sugieren que mucha de esa variabilidad estaría relacionada a eventos recientes como alteración de hábitat, caza, y enfermedades.

5.2. *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812)

5.2.1. Generalidades de la especie

Alouatta caraya o mono aullador negro o `karayá´ en guaraní, posee una de las distribuciones más amplias dentro del género e incluso dentro de las especies de platirrinos, se distribuye desde el Brasil central, hasta Paraguay, este de Bolivia, y noreste de Argentina (Cabrera, 1958; Thorington *et al.*, 1984; Rumiz, 1990; Bicca-Marques, 1990; Hirsch *et al.*, 1991) (Figura 8). Ocupa la distribución sur de todos los platirrinos, por consiguiente, una parte de la población está expuesta a condiciones ambientales extremas, respecto de otras que viven en ambientes tropicales más estables, centrales o incluso en el extremo norte de su distribución.

Figura 8. Límites de la distribución geográfica de *Alouatta caraya* adaptado de Wolfheim (1983).

Su límite sur se considera en el noreste de Argentina, 28° 30′ S, 59° 10′ O (Pope, 1966), si bien recientemente se lo ha descripto en el sur de Brasil, 29° 56′ S, 55° 59′ O (Bicca-Marques, 1990) y en islas del río Paraná cercanas a la localidad de Reconquista (Santa Fé, Argentina) (Zunino, com. per.). Estas nuevas observaciones podrían reflejar un movimiento reciente del límite sur de distribución en donde el factor antrópico no puede ser descartado. Para otra especie de aullador de distribución sur, *Alouatta fusca*, también se observó un corrimiento hacia el sur del límite de su distribución (Printes *et al.*, 2001). Esta colonización de nuevas áreas apoya la idea de la gran capacidad adaptativa de los aulladores, ya que hasta el momento no se ha descripto un corrimiento similar en otras especies de distribución sur de monos platirrinos. Sin embargo, esto sí se ha observado en especies de plantas, insectos y aves que han sido empleadas como modelo en los estudios del impacto de los recientes cambios climáticos, y en particular el aumento de la temperatura global (*e.g.*, Thomas *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2002). En general se acepta que las características climáticas como temperatura y precipitaciones pueden influenciar la distribución de las especies (*e.g.*, Hoffman & Parson, 1997). En este sentido los aulladores constituyen un modelo interesante en mamíferos para estudiar los efectos de estos parámetros junto con la distribución de los ambientes sobre el posible desplazamiento de su límite sur (Zunino, com. per.).

Cuando el límite sur de la distribución de *A. caraya* es ampliamente discutido en la literatura, los trabajos hacen poca referencia acerca del límite norte y oeste de la especie. Hirsch *et al.* (1991) cita como localidad más al norte en la cual se reportó su presencia a Conceiçao do Araguaia (Pará, Brasil) (8° 15′ S, 49° 17′ O) mientras que Deane (1976) propone que el límite estaría dado en los 10° S (Wolfheim, 1983). Así el carayá se distribuiría ocupando desde la catinga, al nordeste de Brasil, pasando por el cerrado, pantanal del Mato Grosso, chaco central, hasta el noreste de Argentina y en Bolivia, donde su límite occidental máximo estaría cercano a la localidad de San José de Uchupiamonas (La Paz) (14° 12S′, 68°

04 ´O) (Anderson, 1997) (Fig. 8). Sin embargo, estos datos se basan en observaciones parciales y en datos de colecciones de museos, por lo cual se hace necesario un estudio de la distribución geográfica de la especie en la actualidad.

Además del dimorfismo sexual de tamaño corporal y de caninos, esta especie presenta un marcado dicromatismo sexual. El macho adulto es negro con gran desarrollo del hioides y pesan 6,5 kg. aprox., las hembras son color habano con un peso de 4,5 kg., los jóvenes de cada sexo son del color de la hembra adulta aunque suelen ser más claros (Cabrera, 1958; Rumiz, 1990) (Figura 9). Los machos jóvenes al avanzar a la adultez, se van oscureciendo, hasta tener el color negro a la edad de 4,5 años y con 5 kg de peso en promedio (Thorington *et al.*, 1984).

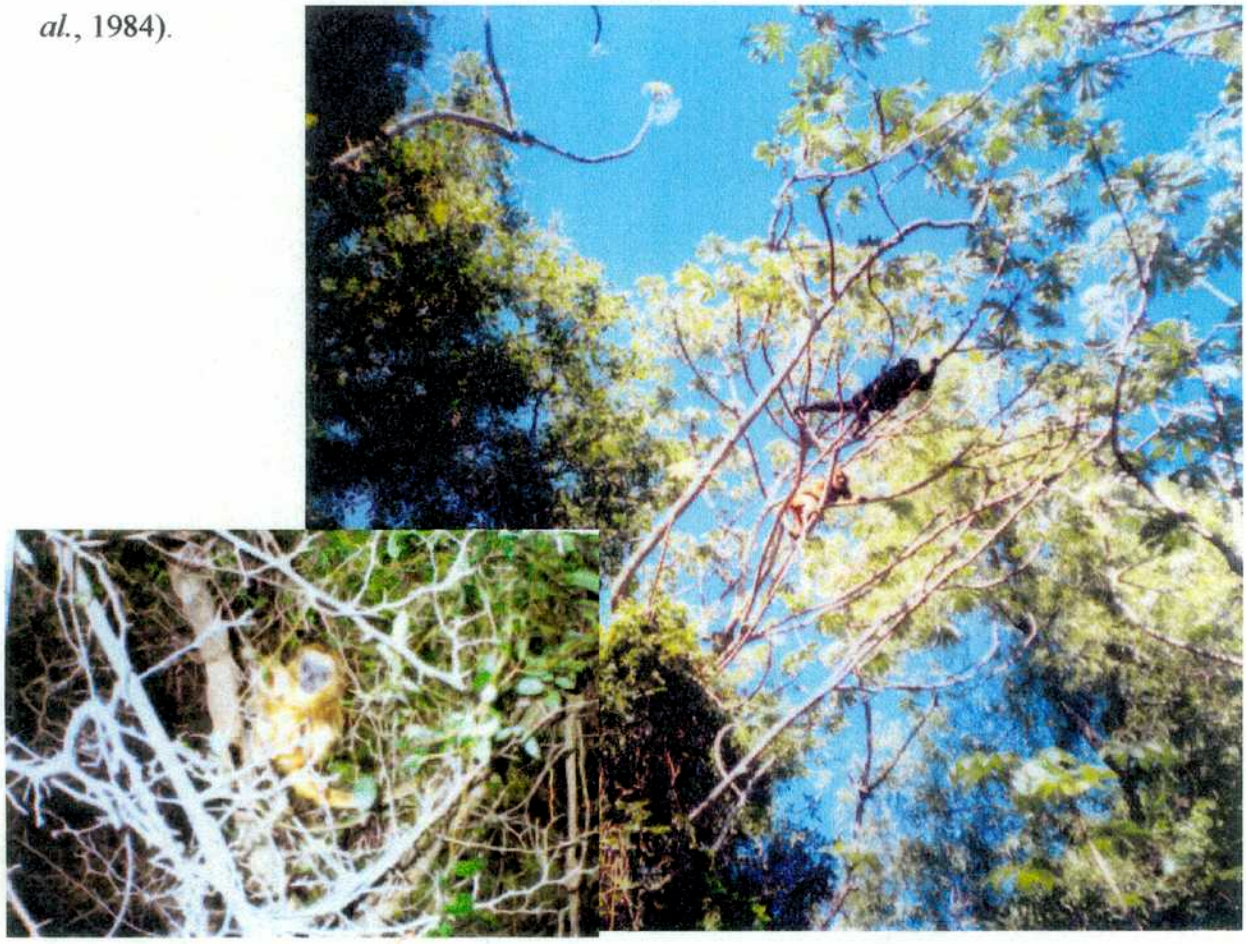


Figura 9. Izquierda: *Alouatta caraya* infante (color habano claro) en CAPRIM (Corrientes, Argentina) (foto M. S. Ascunce). Derecha: *Alouatta caraya* macho (negro) y hembra (color habano) adultos en Isla Brasilera (Chaco, Argentina) (foto L. Oklander).

Como todos los platirrinos, el carayá es básicamente arborícola ocupando los estratos superiores de la selva, se desplaza entre las ramas usando también su cola, la que suelen usar para quedarse suspendidos completamente de ella (Piantanida *et al.*, 1984). En general no descienden al suelo aunque en Corrientes (NE de Argentina) se los ha observado trasladarse de un parche de bosque a otro caminando (Piantanida *et al.*, 1984) y también para pasar de un albardón a otro en Isla Brasilera. Una particularidad de estos aulladores en su distribución sur es que se los ha observado nadando (Zunino, com. per.).

En los aulladores, el comportamiento alimenticio se adecuaría a una estrategia que maximiza el balance nutricional y minimiza los efectos nocivos de los compuestos secundarios de las hojas (*e.g.*, Clutton-Brock, 1977; Milton, 1980; Bicca-Marques & Calegaro-Marques, 1994). Milton (1978) considera que los aulladores son "folívoros comportamentales" ('behavioral folivores') sugiriendo que utilizan adaptaciones comportamentales, como un patrón regular de inactividad diurna y el consumo de alimentos energéticamente ricos cuando están disponibles. En particular, durante el 77,4% de su actividad diaria, el carayá permanece inactivo (Zunino, 1986). Si bien se los consideran folívoros generalistas, su dieta también incluye una buena cantidad de frutos, sin embargo este segundo componente de su dieta está sujeto a la disponibilidad estacional. Bicca-Marques & Calegaro-Marques (1994) encontraron que en una población de *A. caraya*, el comportamiento alimenticio incluía un 60,9 % de su tiempo comiendo hojas, 28,9 %, frutos y semillas, 6,4%, troncos verdes; 2,7%, flores, 1% cortezas, y 0,1%, líquenes. Como parte del estudio del rol de *A. caraya* en la regeneración de la selva como dispersor de semillas, Bravo & Zunino (1998) observaron que parte de semillas (19-23%) presente en los frutos consumidos por *A. caraya* en distintos ambientes estaban infectadas por larvas de insectos. En base a estos resultados, los autores proponen que no sólo hay que considerar el consumo de frutos en aulladores como

consumo de azúcares, sino que hay que reevaluar su rol en la ingestión de proteínas animales (Bravo & Zunino, 1998).

5.2.2. El hábitat de *Alouatta caraya* en la Argentina y su organización social

En Argentina, el carayá se distribuye por el este de Formosa y Chaco, noreste de Santa Fe y el centro-norte de Corrientes (Brown & Zunino, 1994). También se puede encontrar más hacia el oeste en los remanentes de selva en galería en muy baja densidad (Brown & Zunino, 1994). El área de distribución austral del *carayá* se encuentra dividida en dirección norte-sur, por dos grandes ríos: el Paraná y el Paraguay. Estos ríos determinan dos tipos de ambientes habitados por los aulladores, la selva de inundación presente en islas y márgenes (**SI**), y el bosque alto sobre terrenos más elevados con distribución en parches (**TF**), difiriendo ambos en su composición florística y disponibilidad de recursos alimentarios (Figuras 10 y 11).

Figura 10. Selva de inundación en Isla Brasilera (Chaco, Argentina). Izquierda: Margen de la Isla Brasilera. Derecha: Albardón principal *A. caraya* juvenil suspendido de su cola comiendo (fotos M. S. Ascunce).

La selva de inundación constituye un *corredor biológico latitudinal* que ingresa desde la zona tropical, con aportes de la Mata Atlántica y del Mato Grosso, constituyendo una cuña

de aporte tropical, favorecida por el efecto atemperado del río Paraná, y que sufre un empobrecimiento gradual hacia el sur, a medida que disminuye la temperatura media y aumenta la amplitud térmica (Brown & Zunino, 1994).

La selva de inundación se caracteriza por su baja diversidad de especies arbóreas, principal sustrato y fuente de recurso para los aulladores. Por otra parte el bosque alto, que forma estrechas franjas a lo largo de ríos y arroyos (selvas en galería) y manchones (o parches) en terrenos alejados de los cursos de agua, muestra una mayor diversidad de especies arbóreas y estacionalidad más marcada en la producción de recursos (Zunino, 1989).

Figura 11. Zona entre parches de bosque (zona CAPRIM, Corrientes) (foto M. S. Ascunce)

Acompañando esta diferencia en el hábitat, existe un dicotomía en el comportamiento social de los grupos pertenecientes a TF o SI. En los bosques altos, se observan grupos pequeños cuyo tamaño promedio es de 6 individuos, correspondiendo a una baja densidad grupal, de comportamiento territorial y con un sólo macho adulto (grupos unimachos) (Zunino, 1989; Rumiz, 1990). Mientras que en las islas, el tamaño medio grupal observado es de 9 individuos (alta densidad), ausencia de comportamiento territorial y formación de grupos con varios machos adultos (grupos multimachos) (Zunino, 1989; Rumiz, 1990; Zunino *et al.*, 2001) (Tabla 3).

Tabla 3. Densidad y organización social en poblaciones de *A. caraya* del NE argentino

Tipo de ambiente	Localidad [1]	Grupos	Densidad [2]	Tamaño de grupo	Adultos por grupo	Hembras /Machos[3]	Infante/ Hembras[4]	R[5]
Selva Paranaense								
	Iguazú	3	<0,01	3,5	3	1,83	?	(1)
Bosque en galería								
	Riachuelo	17	0,9	5,7	3,37	2,15	0,3	(1)
	Puerto Bermejo	12	1,3	8,9	2,8	1,95	?	(2)
	Riacho Pilagá	15	1,1	6,3	4	1,72	0,18	(3)
	Riacho Pilagá	?	0,09	?	?	?	?	(4)
Selva de Inundación	Islas Tragadero	17		8	6	0,9	?	(5)
	Isla Guáscara	10	2,8	12,4	6,8	1,75	0,19	(1)
	Isla Brasilera	31	2,7	9	5,2	2	0,28	(1)

? Dato no disponible. [1] Localidades. Iguazú: Parque Nacional Iguazú (Misiones), Río Riachuelo (Corrientes); Puerto Bermejo (Formosa); Riacho Pilagá "Estancia Guaycolec" (Formosa); Islas Tragadero: grupo de islas del sistema Tragadero e Isla Ulfeldt (Santa Fé); Isla Guáscara e Isla Brasilera (Chaco). [2] Densidad expresada en individuos por hectárea. [3] Relación entre hembras y machos adultos. [4] Relación entre infantes y hembras adultas. [5] Referencias: (1) Zunino *et al.* (2001); (2) Thorington *et al.* (1984); (3) Brown y Zunino (1994); (4) Arditi (1992); (5) Pope (1968)

Esta diferencia de comportamiento social marcada por la disponibilidad de recursos alimenticios en relación al hábitat, y correlacionada a la formación de grupos unimachos a bajas densidades, y grupos multimachos a altas densidades, también fue observada en otras especies de aulladores reflejando la plasticidad adaptativa del género permitiéndonos considerarlos como especies colonizadoras (Eisenberg *et al.*, 1972).

En nuestro país, como área de distribución marginal de los primates, la presencia de grupos de *carayás* en islas de formación reciente y la rápida repoblación que se observó luego de prolongadas inundaciones (Zunino com. per.) constituiría una evidencia de la alta capacidad de colonización del carayá a lo largo de las islas.

6. Objetivo general

Evaluar la relación entre la organización social y la variabilidad genética en platirrinos caracterizando la variabilidad nucleotídica a nivel del ADN mitocondrial en algunas especies de platirrinos, y en especial en *Alouatta caraya* empleando marcadores mitocondriales con diferentes tasas de sustitución nucleotídica. Primero, como marcador con tasa de sustitución intermedia, emplear la secuencia nucleotídia correspondiente a la subunidad II de la citocromo oxidasa *c*, a fin de estudiar las relaciones filogenéticas entre 7 géneros de platirrinos que se diferencian en el tamaño corporal y varias características de vida e intentar relacionar tasas de sustitución molecular con características intrínsecas de cada grupo y género. Segundo, usar como marcador con tasa de sustitución alta, la región control mitocondrial, para caracterizar la variabilidad nucleotídica a nivel poblacional en *Alouatta caraya* en su distribución marginal sur.

Capítulo II
Materiales y Métodos

1. Muestras

1.1. Obtención y conservación

Los ejemplares incluídos en el presente estudio fueron capturados en distintas oportunidades y ambientes y fueron procesados en el GIBE (FCEN-UBA). Los individuos de la especie *Alouatta caraya* fueron capturados en sus ambientes naturales por el Dr. Zunino (CONICET-MACN) empleando un rifle y dardo anestésicos (PNEUDAR). La toma de muestras de los animales de cautiverio fue realizada por los veterinarios de las instituciones correspondientes y en general fueron anestesiados por vía intradérmica. En la mayoría de los casos, la anestesia fue realizada con Ketamina (Parke Davis) en dosis de 10 mg/kg. de peso. De acuerdo al tamaño corporal de los ejemplares se extrajeron entre 2 y 5 ml de sangre por punción en la vena femoral utilizando heparina (Abott) como anticoagulante. Con la muestra de sangre entera se realizó una centrifugación diferencial separando: plasma, eritrocitos y glóbulos blancos. Después de la primera centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, se extrajo la fracción sobrenadante de plasma que se congeló a -20C°. A continuación se realizaron una o dos centrifugaciones, empleando solución salina de cloruro de sodio (9%) hasta aclaración completa del sobrenadante, separando la fracción de glóbulos blancos de la de eritrocitos. Ambas fracciones se guardaron en una solución glicerina-NaCl (9%): 50% v/v y a -20°C, empleando la primera fracción en los estudios de genética molecular desarrollados en este trabajo.

De algunos ejemplares, se obtuvieron muestras de pelos que fueron colectadas arrancando, con guantes de latex, un mechón de 20-30 pelos aproximadamente del animal anestesiado que se almacenaron en sobres de papel en heladera a 4° C.

1.2. Muestras de *Alouatta caraya*

1.2.1. Localidades de muestreo

Las localidades de muestreo para *Alouatta caraya* fueron Isla Brasilera (Chaco, Argentina), ubicada sobre el río Paraná, 5 km al sur de la confluencia con el río Paraguay, junto con Itatí, Loreto, San Cayetano y CAPRIM, todas en la provincia de Corrientes (Argentina) y dos sitios en Paraguay: uno frente a la Isla de Yaciretá (actualmente inundada por el embalse) (Figura 12) y otro cercano a la ciudad de Asunción, denominado Paraguay en este trabajo (no se indica en el mapa ya que su ubicación no corresponde a la distribución marginal sur de la especie en estudio).

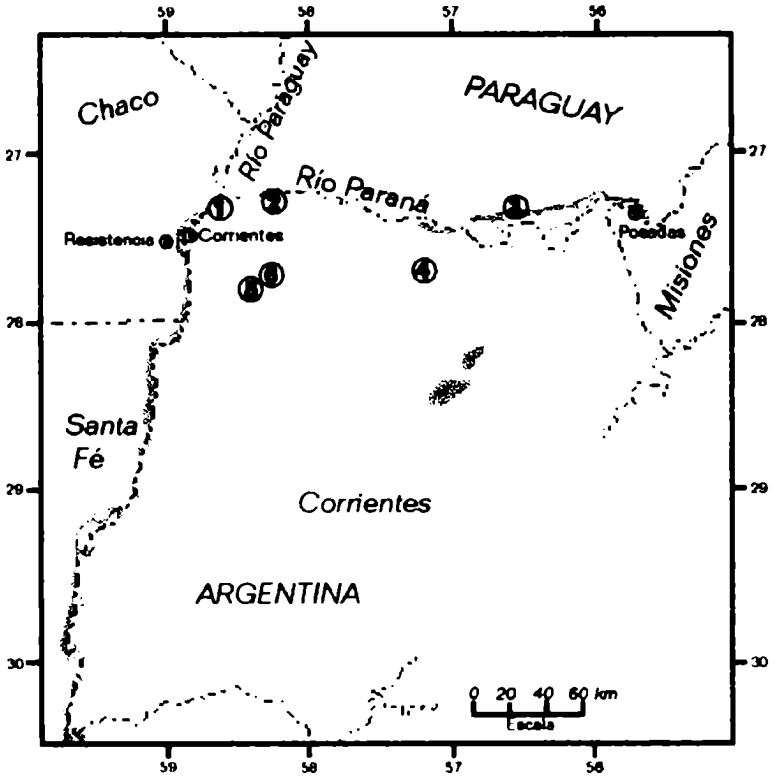


Figura 12. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo para *Aloutta caraya* de distribución marginal sur: **1** Isla Brasilera, **2** Itatí, **3** Yaciretá, **4** Loreto, **5** San Cayetano y **6** CAPRIM.

Todas las localidades, excepto Isla Brasilera, constituyen ambientes de tierra firme (TF) que se caracterizan por los parches de bosque y las selvas en galería a lo largo de los ríos que en esta región son tributarios del Paraná. **Yaciretá** (27° 28'S, 56° 44'O) se ubica sobre la margen derecha del Paraná, mientras que sobre la margen izquierda se encuentra **Itatí** (27° 20'S, 58° 40'O), **Loreto** (27° 46'S, 57° 17'O), **San Cayetano** (27° 30'S, 58° 41'O) y **CAPRIM** (27° 31'S, 58° 38'O). La localidad de muestreo **Paraguay**, ubicada en la margen derecha del río Paraguay, también constituye un ambiente de tierra firme.

Isla Brasilera (IB) (27° 20'S, 58° 40'O) presenta un hábitat correspondiente a selva de inundación y tiene una superficie de 292 ha. En la Isla se observan dos ambientes según la elevación del terreno: tierras bajas frecuentemente inundadas (suelos saturados) (IBSUR) y tierras más elevadas con menor frecuencia de inundación (suelos húmedos) (IBALB) (Zunino *et al.*, 2001). En cuanto a la población de carayás que habita IB, el análisis de la densidad poblacional mostró grandes diferencias entre estos dos ambientes dentro de la isla, donde en IBALB se observó una alta densidad de aulladores (3,02 ind/ha) con un tamaño grupal promedio de 11,25 individuos por grupo, mientras que en IBSUR los valores fueron de 1,8 ind/ha y 6,13 individuos por grupo. En promedio la IB presentó una densidad de 2,7 ind/ha y la relación de hembras y machos adultos fue de 2 y 2,16 para IBALB e IBSUR (Zunino *et al.*, 2001). Estos trabajos de campo brindaron información acerca de la fenología de la isla, ciertos parámetros poblacionales y la estructura social de los grupos que permitió elegir, para este estudio, a la población de *A. caraya* de Isla Brasilera. A su vez, también se conoce la ubicación de las tropas en la isla (Figura 13) (Zunino, com. personal). En este trabajo se consideraron dos tipos de ambientes en la isla: Albardón principal que correspondería a ambientes de suelos húmedos, y Monte que correspondería en general a ambientes de suelo saturado (Zunino *et al.*, 2001).

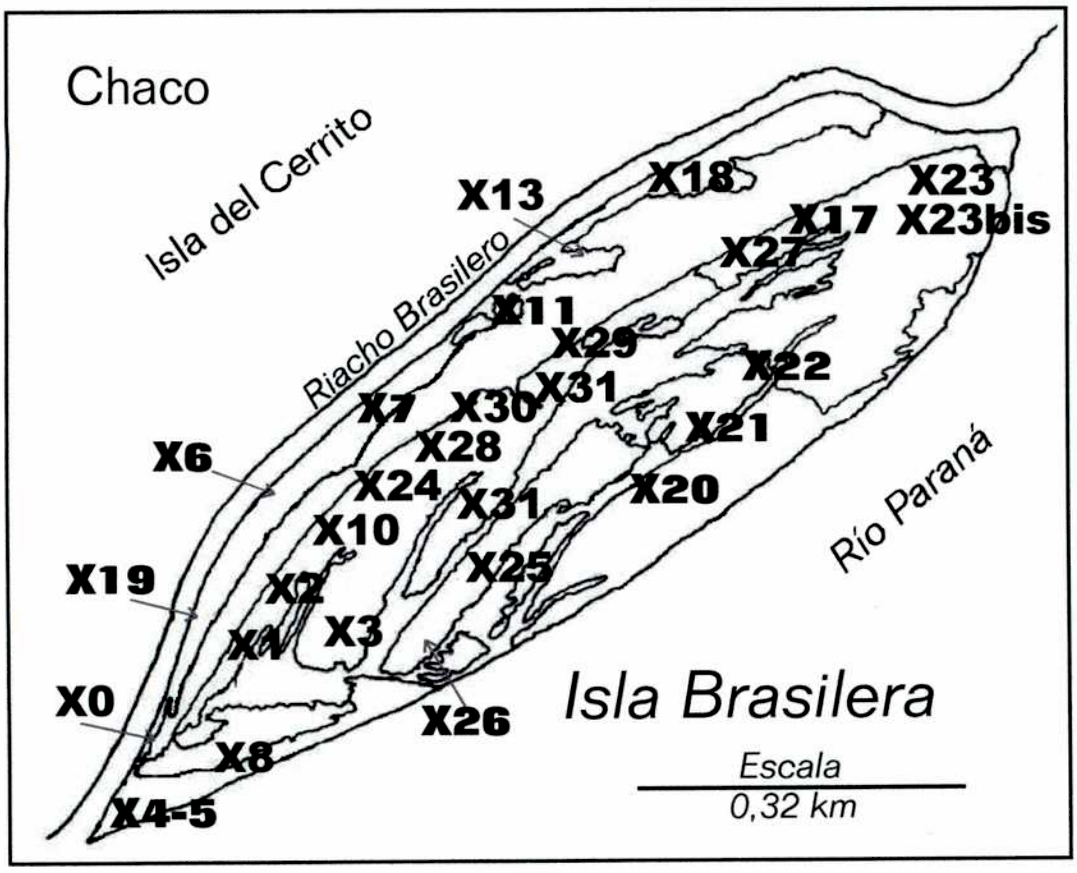


Figura 13. Mapa de Isla Brasilera indicando la distribución de las tropas (mapa y datos cedidos por G. Zunino, 1997-1999)

1.2.2. Análisis de región control mitocondrial

En este trabajo de Tesis se analizó un total de 70 ejemplares de *Alouatta caraya*. En la Tabla 4 se describe la procedencia de las muestras y en la Tabla 5 se detallan las tropas de Isla Brasilera analizadas en el presente trabajo.

Tabla 4. Procedencia de las muestras detallando el tipo de ambiente

Número de Localidad	Localidad	Número de individuos	Tipo de ambiente
1	Isla Brasilera	57	Selva de inundación
2	Itati	4	Tierra firme
3	Yacireta	1	Tierra firme
4	Loreto	2	Tierra firme
5	San Cayetano	2	Tierra firme
6	CAPRIM	3	Tierra firme
7	Paraguay	1	Tierra firme
	Total	70	

Tabla 5. Individuos de Isla Brasilera discriminados por tropas y su localización

Tropas	Individuos muestreados	Total individuos por tropa	Isla Brasilera
X0	2	2	Monte
X2	1	15	Albardón principal
X4-X5	5	11	Monte
X6	1	5	Monte
X10	4	11	Albardón principal
X11	2	12	Monte
X19	2	5	Monte
X23	2	13	Monte
X24	6	20	Albardón principal
X28	11	14	Albardón principal
X29	14	15	Albardón principal
X30	4	?	Albardón principal
X31	3	.	Albardón principal
Total 12	57	115	

? dato no disponible

1.2.3. Análisis de microsatélites

Como análisis complementario se realizó un estudio por microsatélites en un total de 27 ejemplares de *Alouatta caraya*. Si bien los resultados obtenidos son parciales constituyen datos enriquecedores para la discusión final (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Localidades y tipo de ambiente de procedencia de los ejemplares de *Alouatta caraya*

Número de localidad	Localidad	Número de individuos	Tipo de ambiente
1	Isla Brasilera	17	Selva de inundación
2	Itati	1	Tierra firme
3	Yacireta	1	Tierra firme
4	Loreto	2	Tierra firme
8	Zoológicos*	6	Cautiverio
Total 7		27	

* Instituciones de las cuales de obtuvieron las muestras de sangre de los ejemplares de cautiverio: Ezeiza Flora y Fauna, y Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires (Argentina)

Tabla 7. Individuos de IB genotipificados discriminados por tropas

Tropas	Individuos genotipificados	Total individuos por tropa	IB
X0	1	2	Albardón principal
X6	1	5	Monte
X11	2	12	Monte
X19	1	5	Monte
X23	1	13	Albardón principal
X24	4	20	Albardón principal
X28	3	14	Albardón principal
X29	4	19	Albardón principal
Total 8	17	90	

1.3. Muestras de monos platirrinos

Para los análisis filogenéticos que incluyeron comparaciones entre subespecies hasta interfamiliares, se analizaron 11 muestras de sangre de primates platirrinos incluyendo 2 *Alouatta caraya*, 1 *Ateles paniscus*, 3 *Ateles belzebuth*, 1 *Aotus azarae azarae*, 1 *Cebus apella paraguayanus*, 1 *Cebus apella nigritus* y 2 *Saimiri boliviensis* (Tabla 8).

Tabla 8. Ejemplares de monos platirrinos según su clasificación taxonómica (modificada de Schneider *et al.*, 1996).

Clasificación taxonómica	Género	Especie	Origen geográfico	Procedencia[1]
Familia Atelidae				
Subfamilia Alouattinae				
	Alouatta	*caraya*	Argentina	1
		caraya	Argentina	1
Subfamilia Atelinae				
	Ateles	*belzebuth*		2
		belzebuth		3
		belzebuth		4
		paniscus		3
Familia Cebidae				
Subfamilia Cebinae				
	Cebus	*apella nigritus*	.	5
		a. paraguayanus	Paraguay	6
Subfamilia Saimirinae				
	Saimiri	*boliviensis*	Bolivia	7
		boliviensis	?	8
Subfamilia Aotinae				
	Aotus	*azarae azarae*	Argentina	8

? origen desconocido

[1] Procedencia: 1) vida silvestre, 2) Zoológico de Buenos Aires, 3) Jardín Zoológico de La Plata, 4) Ezeiza Flora y Fauna, 5) ECAS, "Estación de Cría de Animales Silvestres", La Plata, 6) IICS, "Instituto de Investigaciones Científicas y de la Salud", Asunción, Paraguay, 7) CAPRIM, "Centro Argentino de Primates", Corrientes, 8) CEM, "Complejo Ecológico Municipal", Roque Saenz Peña, Chaco, Argentina.

2. Materiales y Métodos de laboratorio

2.1. Análisis poblacional en *Alouatta caraya*

La región control o 'D-loop' del genoma mitocondrial, marcador molecular empleado para este análisis, es una secuencia no codificante de herencia haploide materna. Tiene una tasa de sustitución nucleotídica de 8,4% -12,6 % por millón de años, muy superior a la del genoma mitocondrial analizado como un todo que es de 2% por millón de años (Gemmell *et al.*, 1996; Pesole *et al.*, 1999). Estas características hacen que la RC sea un marcador muy útil para estudios poblacionales y en particular para el estudio de los linajes maternos (matrilíneas).

2.1.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de sangre se siguieron dos protocolos. Para ambos se utilizó la fracción enriquecida en glóbulos blancos que se obtuvo luego del fraccionamiento detallado en el punto 1.1 de este capítulo. Para el primer protocolo, se tomaron 4-8 µl de la fracción enriquecida en glóbulo blancos y se realizó la extracción de ADN empleando 200 µl de una solución al 5% de CHELEX 100® (BIORAD) (Walsh *et al.*, 1991). El segundo protocolo empleado fue el tradicional fenol-cloroformo, con incubación previa toda la noche ('over night') con buffer 2XCTAB y proteinasa K.

En la extracción de ADN a partir de muestras de pelos (10 pelos aproximadamente de cada individuo) se utilizó el 'kit' Qiagen's DNA Tissue Kit (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante.

2.1.2. Amplificación por PCR de la región control mitocondrial (RC)

La región control mitocondrial se amplificó empleando la metodología de 'amplificación en cadena de la polimerasa' (PCR) usando los iniciadores ('primers') L15926 y H00651 propuestos (Kocher *et al.*, 1989) dada la alta conservación de su secuencia en mamíferos:

L15926 TACACTGGTCTTGTAAACC

H00651 AAGGCTAGGACCAAACCT

Los nombres de los oligonucleótidos indican la cadena pesada H (heavy) y liviana L (light) según la composición de nucleótidos de cada hebra del mtADN; los números indican las posiciones del extremo 3' según la numeración de la secuencia del genoma mitocondrial humano propuesta (Anderson *et al.*, 1981).

Las amplificaciones se realizaron en microtubos de 0,5 ml siguiendo un programa de amplificación que incluyó 35 ciclos, cada uno con un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto; un segundo paso de anillamiento a 51-54 °C por 1 minuto, y un tercer paso de extensión a 72 °C por 1,30 minuto. En todos los casos las amplificaciones se realizaron incluyendo un blanco de PCR o control negativo (sin templado) y un control positivo de amplificación con un ADN conocido de templado. Si bien se emplearon varios termocicladores (máquinas de PCR), en función de la disponibilidad horaria de cada uno para el análisis de la región control se trató de usar, en lo posible, siempre el mismo (ProGene). Como resultado de la optimización de las condiciones de PCR, las reacciones de amplificación se realizaron con:

- volumen final de reacción para amplificación inicial: 25 µl
- volúmenes variables de la extracción: 5, 7,5 y 10 µl (100 - 120 ng de ADN total)
- condiciones de reacción: 1X PCR Buffer (Promega), 2 mM $MgCl_2$, 0,8 mM dNTPs (dinucleótidos) y 0,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega).
- 1,5 µl de la solución de cada iniciador (concentración 10 µM)

Para las amplificaciones en las que el ADN había sido extraído de pelo, la única variación que se introdujo fue aumentar en número de ciclos de la PCR inicial, de 35 a 40, en tanto que el resto de las condiciones como así también los pasos subsiguientes fueron los mismos que para los ADNs obtenidos a partir de la fracción de glóbulos blancos.

2.1.3. Diseño de iniciadores

En el diseño de iniciadores para la región control de *A. caraya* se utilizaron como referencia secuencias de otros platirrinos ya publicadas para los géneros *Leontopithecus* y *Callithrix* (Platyrrhini, Callitrichidae) (Tagliaro *et al.*, 1997). Luego del alineamiento de estas secuencia con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) se observó un total de seis regiones conservadas que fueron seleccionadas para el diseño de 6 iniciadores con el programa GenRunner v 3.02 (Hastings Software, Inc.), esperando que en esas regiones por ser conservadas, hubiese homología con las secuencias propias de los aulladores (Tabla 9).

Posteriormente a la secuenciación parcial de varios ejemplares, se diseñaron 10 nuevos iniciadores específicos para *A. caraya* que permitieron la concreción del presente trabajo. Si bien estos iniciadores constituyen parte de los hallazgos originales del trabajo de tesis dado que fueron utilizados como material para el análisis de las muestras se describen en este punto (Tabla 9).

Tabla 9. Iniciadores y sus temperaturas de anillamiento (T_a) utilizados en *A. caraya*

	Nombre del iniciador[2]	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	T_a (C°)
	L15926	TACACTGGTCTTGTAAACC	19	51-54
	H00651	AAGGCTAGGACCAAACCT	18	51-54
I[1]	+38	CCACCATCAACACCCAAAGC	20	55
	-398	GGTTTCACGGAGGTTGGTAG	20	55
	+458	ATATAGACAGGGCTTGGTTA	20	55
	-690	ACATTCCTTTCCTACCAGAG	20	55
	+692	CTGGTAGGAAAGGAATGTAC	20	55
	-1276	ACCCGTCTAGACATTTTC	18	55
II	+24	AAAGCCCTACCATAAAGTAC	20	55.5
	+212	CAACCATAGCACATATAATG	20	55.5
	-204	GTGCTATGGTTGCCTGTAGA	20	55.5
	-576	CAGGTTAAGAGGGTGATAGC	20	55.5
	+763	CACTAAGGTGTTATTCAGTC	20	55
	-864	GGCTAATTTGTGATGGTGGT	20	55.5
	+869	ACACACCTGACTAGACTTTC	20	55
	-1017	TGAAGGGTATGATCTAGGTG	20	52-55
III	-338	GAAGAGAACTTACCGAGTGC	20	52-54
	-398	GGTTTCACGGAGGATGGTAG	20	54-55.7
	-806	GCGTGGTGCTGGTAAAGTTG	20	54-58

[1] I, II, III: Etapas temporales en las que se desarrollaron los iniciadores.

[2] (L) o (+) Cadena liviana del mtADN y (H) o (-) cadena pesada.

2.1.4. Visualización de los productos de amplificación

Para verificar el resultado de las amplificaciones se empleó la técnica de electroforesis sembrando un volumen de 5-10 µl de los productos de amplificación en geles de agarosa al 0,8% - 1% con Bromuro de Etidio (BrEt) que se sometió a posterior electroforesis. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales con el gel sumergido en una solución tampón ('buffer') TAE 1X o TBE 1X, a 75 volts durante 45 minutos. Una vez finalizada la corrida, los productos se visualizaron por transiluminación con UV. Como

marcadores de peso molecular se emplearon el 100bp Ladder (Promega) y el 1Kb Plus DNA Ladder (Promega).

2.1.5. Nueva ronda de amplificación empleando iniciadores internos

Para obtener la cantidad necesaria de ADN para la secuenciación manual se realizó una segunda ronda de amplificación empleando como templado el producto de amplificación obtenido en el paso anterior. A partir de la primera amplificación se realizó una dilución 1:200 en agua bidestilada estéril. De ahí se tomaron: 1, 5, 10 µl para realizar la segunda PCR en un volumen final de 50 µl. En este caso, los iniciadores empleados fueron internos a los primeros (Amplificación anidada): +38 y -1276, con una temperatura de anillamiento de 55 °C y 35 ciclos de amplificación (Tabla 9).

2.1.6. Purificación de fragmentos de ADN amplificados

El fragmento obtenido de la segunda amplificación se purificó con el 'kit' QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). En cada purificación, se reunieron 3 re-amplificaciones de cada individuo que fueron sembradas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y sometidas a electroforesis como se indicó antes. Al finalizar la corrida electroforética, se extrajeron las bandas, y se purificaron empleando una única columna por fragmento para las 3 bandas cortadas de cada individuo. Para ilustrar éste y puntos anteriores se presentan fotos donde se muetran los resultados de amplificaciones. En particular en la Figura 14 se observaron los productos de las amplificaciones obtenidas a partir de ADN extraído de muestras de sangre empleando los inciadores L15926-H00651, y re-amplificaciones con los iniciadores +38/-1174 y +212/-806. En la Figura 15 se pueden observar los productos de amplificación obtenidos a partir de ADN extraído de pelos.

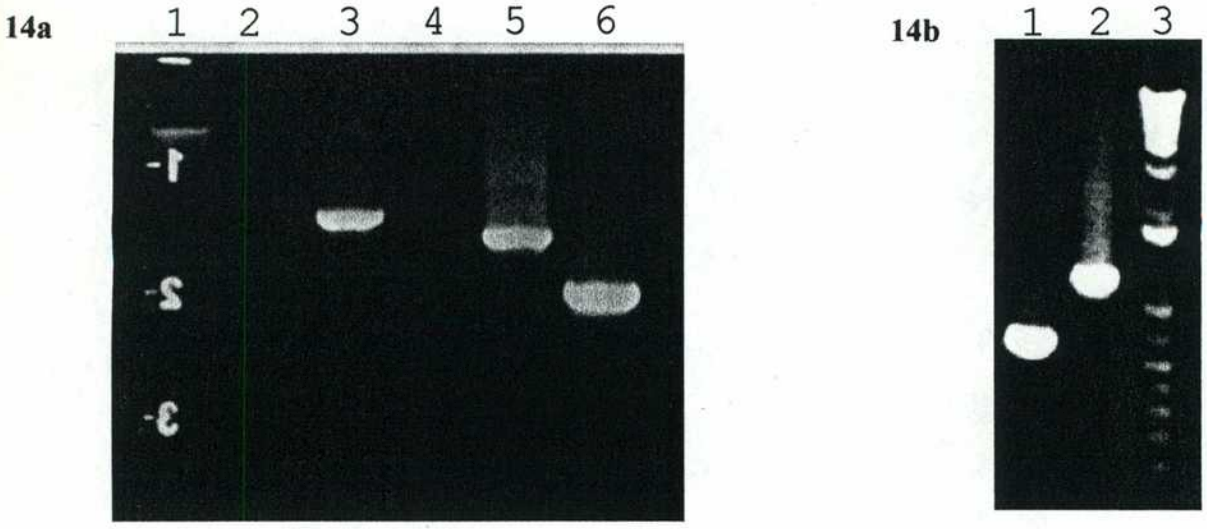


Figura 14. Electroforesis de los productos de amplificación y re-amplificación de la RC en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt y visualizados con un transiluminador de UV. **14a.** Gel de bajo punto de fusión. Calle 1: marcador de peso molecular 1 Kp Ladder (Promega), calle 3: fragmento amplificado con los iniciadores L15926-H00651, calle 5: fragmento obtenido con los iniciadores +38/-1174, calle 6: iniciadores +251/-817, las calles 2 y 4 sin sembrar. **14b**. Gel de agarosa común. Re-amplificación, calle 1: fragmento obtenido con los iniciadores +38/-1174, calle 2: iniciadores +251/-817 y calle 3: marcador de peso molecular 1 Kp Ladder (Promega).

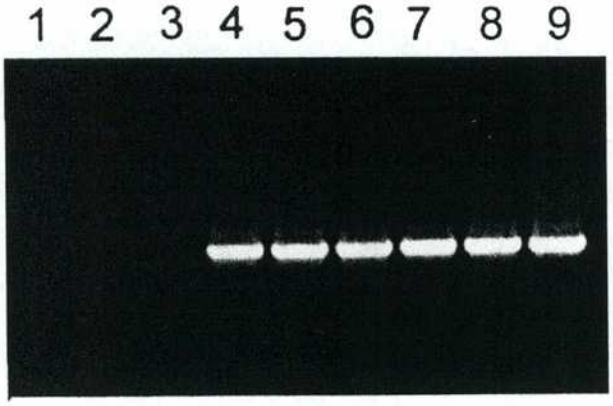


Figura 15. Productos de amplificación de la RC obtenido a partir de ADN extraído de muestras de pelo. Calle 1: control negativo, calle 2 y 3 extracciones a partir de muestras de pelo guardadas por 4 años, en otro experimento se usaron iniciadores internos y se obtuvo amplificación lo sugiriendo degradación del ADN, calle 4-5, 6-7, y 8-9, corresponden a 3 extracciones diferentes con pelos de un mes de colectados, las réplicas se realizaron con 10 y 7 µl de cada extracción.

2.1.7. Cuantificación de ADN

Se emplearon dos metodologías: a) por visualización en un gel con Bromuro de Etidio a través de transiluminación con UV y comparación con muestras de ADN de masa conocida; y/o b) por espectrofotometría empleando un cuantificador de ADN GeneQuant Pharmacia Biotech.

2.1.8. Secuenciación manual

2.1.8.a. Reacciones de secuenciación

La secuenciación de los productos de amplificación se realizó con el el 'kit' *f*mol®DNA Sequencing System (Promega), método que combina la técnica de PCR con la secuenciación por terminación de cadena (Sanger, 1981), realizándose las cuatro reacciones de secuenciación correspondientes a cada dideoxinucleótido en tubos separados y empleando una *Taq* DNA polimerasa modificada (Sequencing grade *Taq* DNA Polymerase). La marcación radioactiva se realizó por el método de incorporación directa con α-S^{35}-dATP.

Si bien en general se siguieron las recomendaciones del fabricante, fue necesario optimizar los parámetros del programa de amplificación y la cantidad de ADN a emplear. En el primer caso, los parámetros óptimos para el programa de amplificación para la secuenciación fueron: 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto; el anillamiento a 52-58 °C (dependiendo del iniciador) por 1 minuto; y la extensión a 72°C por 1 minuto. El rendimiento óptimo de las reacciones de secuenciación se logró empleando entre 200 a 500 ng de ADN total en cada reacción. En la secuenciación de la región control de la mayor parte de los individuos se emplearon los iniciadores:+212, +458, -398 y -806 con las temperaturas de anillamiento indicadas en la Tabla 9.

2.1.8.b. Visualización de las reacciones

Para la visualización de las reacciones de secuenciación se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante en cubetas verticales (GIBCO BRL modelo S6). Previo a la siembra de las muestras se realizó una pre-corrida del gel que consistió en someterlo a una electroforesis con buffer TBE 1X durante una hora a fin de aumentar la temperatura del gel, y evitar que las muestras se re-naturalizaran. Las corridas se realizaron a una potencia constante de 50 Watts, mientras que el voltaje varió entre 1800 a 2200 voltios. Cada reacción se sembró de manera consecutiva, de izquierda a derecha las reacciones correspondientes a los dideoxinucleótidos de terminación: Guanina, Adenina, Citosina y Timina (GACT). De cada reacción se realizaron 3 descargas espaciadas en lapsos de una hora y quince minutos, de manera de extender los rangos de lectura de las secuencias.

Una vez finalizada la corrida, los geles se transferieron a una membrana de papel (Wathman) cubriéndolos con un film plástico adherente. Posteriormente, se procedió al secado del gel para lo cual se lo colocaba en una secadora de geles conectada a una bomba de vacío durante 1 hora aproximadamente. En un cuarto oscuro se colocaba el gel seco en contacto con una película Kodak (Diagnostic Film, T-Mat™ G/RA-1) o AGFA, la cual se dejaba en exposición durante 3 a 4 días para las reacciones con azufre radioactivo. Los films se revelaron manualmente con solución reveladora y fijadora (Kodak) según las recomendaciones del fabricante y las autoradiografías se leyeron empleando un transiluminador de luz blanca.

2.1.9. Secuenciación automática

Una parte de las muestras fueron secuenciadas automáticamente y algunas que habían sido secuenciadas manualmente fueron repetidas de manera automática a fin de comparar las secuencias obtenidas con ambas las metodologías. De las muestras que se amplificaron "de

novo", se usó otra enzima Taq polimerasa (QIAGEN) 0,65 unidades, con un volumen final de reacción fue de 25 µl y microtubos de 0,2 ml manteniendo el resto de las condiciones. Dado que la eficiencia de la amplificación fue muy buena, no se requirió una segunda ronda de amplificación. Es decir con los iniciadores L15926 y H00651 se obtuvo el fragmento que se purificó en un gel de bajo punto de fusión. El trozo de gel con el producto de amplificación fue digerido con una enzima usando 1 µl GELase™ (Epicentre Technologies, Madison, WI) a 70° C por 5 minutos, seguidos por una incubación de 3-8 horas a 45° C. En este caso la purificación se realizó con una única reacción de amplificación.

Entre 2 a 3 µl del producto purificado se usaron como templado para la reacción de secuenciación empleando el Applied biosystems (ABI) Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto de secuenciación fue diluido en 10 µl de agua desionizada y purificado empleando columnas (Centrisep) llenas de un resina (G-50 Sephadex) que retiene los productos de secuenciación y permite la elusión de los dideoxinucleótidos no incorporados. En el último paso de la purificación se eluyó el producto de secuenciación, se lo secó en una centrífuga al vacío (Speed-Vac) y se lo resuspendió en buffer de siembra. La electroforesis de los productos de secuenciación se realizó en un secuenciador automático (377 Automated DNA Sequencer ABI) según las recomendaciones del fabricante, con una duración de 7 horas.

Luego de la elecroforesis se obtuvieron los cromatogramas de las corridas, y las secuencias fueron editadas empleando el programa Sequencher ™ 3.1 (Gene Codes Corporation, Inc.). Las formas en que se infiere la secuencia obtenida en función de las técnicas de secuenciación manual y automática pueden ser comparadas en la Figura 16.

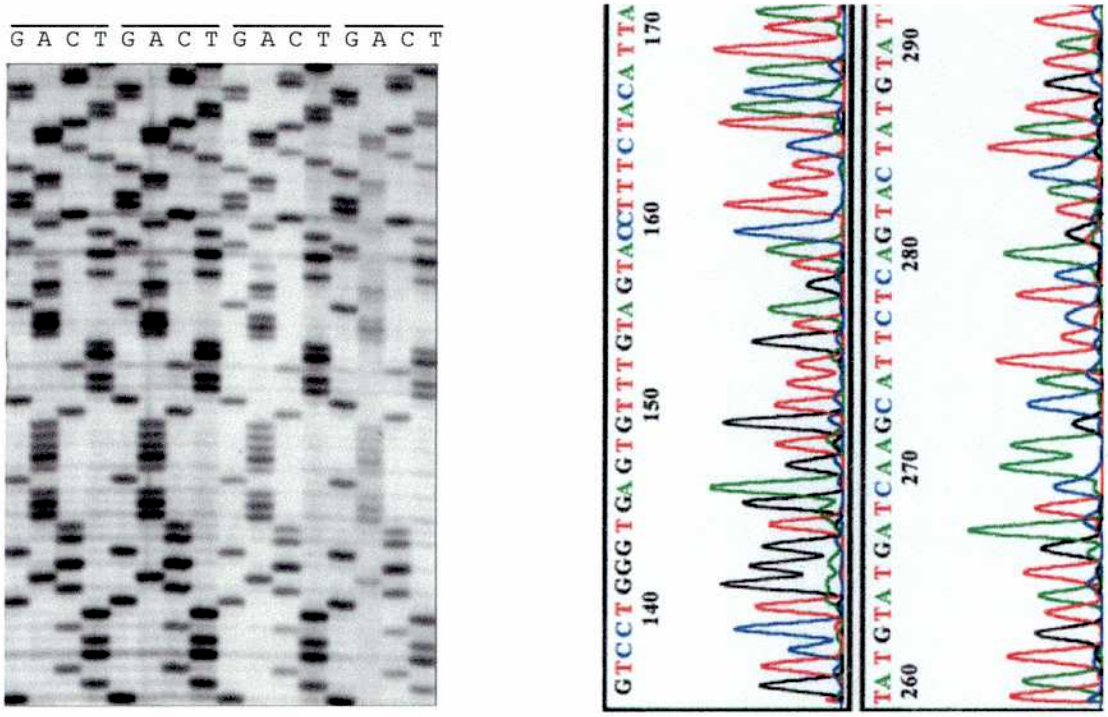


Figura 16. Técnicas de secuenciación. **Izquierda**. Secuenciación manual indicando los cuatro nucleótidos: G, A, C y T. **Derecha**. Cromatograma obtenido por secuenciación automática sin editar.

2.1.10. Análisis del Citocromo *b*

Dado que se contaba con las secuencias publicadas para el gen mitocondrial que codifica para el citocromo *b* (cytb) de ejemplares de *A. caraya* de Brasil, se decidió analizar esta secuencia en ejemplares de distribución marginal en Argentina sur a fin de contar con nuevos elementos para evaluar posibles procesos de dispersión de la especie.

El gen fue amplificado empleando el iniciador degenerado GLUGG-5′ (5′-TGACTTGAARAACCAYCGTTG-3′) (Palumbi, 1996) que se ubica en el gen tARN ^{Glu} y el iniciador +212 correspondiente a la región control (Tabla 7). Las secuencias se obtuvieron por secuenciación automática según se describió en el punto 2.1.9. de este capítulo.

2.1.11. Análisis de microsatélites

2.1.11.a. Características generales

Los microsatélites pertenecen a la familia de secuencias repetidas que presentan los genomas nucleares eucariotas. Constituyen fragmentos no codificantes que se caracterizan por tener la unidad de repetición formada por dinucleótidos o tetranucleótidos, en humanos el motivo más común es el $(CA)_n$ donde el sufijo *n* indica el número de veces que se repite. El número de repeticiones es altamente variable, en primates se observa un amplio rango de variación que va desde 100 hasta 400 repeticiones (*e.g.*, Clisson *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2002). La variación de tamaño puede deberse a la adición o a la deleción de una unidad de repetición. Uno de los mecanismos para la variación en la longitud propuestos para explicarlo es el intercambio entre cromátidas hermanas, en un proceso de deslizamiento entre las cadenas que produce un mal apareamiento (*strand slippage mispairing*) (*e.g.*, Sommer *et al.*, 2002). Estudios de secuenciación de los microsatélites mostraron una alta variabilidad también a nivel de la composición nucleotídica entre individuos y entre especies (*e.g.*, Clisson *et al.*, 2000).

2.1.11.b. Descripción de los iniciadores analizados y las condiciones de amplificación

Dada la gran variación que presentan, los microsatélites se consideran herramientas de gran utilidad diagnóstica y han sido usados para la caracterización de individuos incluyendo desde estudios de filiación hasta análisis de estructura genética poblacional, hibridación e intragenéricos (*e.g.*, Vigilant *et al.*, 2001). Si bien, el tamaño en la longitud de los microsatélites es altamente variable, estos marcadores presentan secuencias flanqueantes que están altamente conservadas en los genomas de mamíferos. Estas secuencias se emplean para el diseño de iniciadores y la amplificación de los microsatélites, es por eso que muchos iniciadores para microsatélites han podido ser usados en un gran número de especies relacionadas (*e.g.*, Clisson *et al.*, 2000).

En este trabajo se analizaron 8 *loci* de microsatélites, 3 diseñados en base a genotecas de *Alouatta palliata*: Ap40, Ap68 y Ap74 (Ellsworth & Hoelzer, 1998), y 5 diseñados para humanos: D5S111, D6S260, D8S165, D14S51 y D17S804 (Tabla 10). En esta tabla también se describen las condiciones de amplificación en *Alouatta caraya* obtenidas luego de los pasos de optimización para cada *loci*.

Tabla 10. Iniciadores usados y su temperatura óptima de amplificación en *Alouatta caraya*.

Locus	Secuencia de los iniciadores	T_a(C°)	$MgCl_2$ (10 mM)
Ap40	5´-CCACGGTGGCAGAGGAGATTT-3´ 5´-AGAGGCACGAAGACAAGGACA-3´	72	0.6 µl
Ap68	5´-TGTTGGTATAATCTTTCCTA-3´ 5´-ACATACACCTTTGAGTTTCT-3´	50	0.8 µl
Ap74	5´-TGCACCTCATCTCTTTCTCTG-3´ 5´-CATCTTTGTTTTCCTCATAGC-3´	52	0.2 µl
D5S111	5´-GGCATCATTTTAGAAGGAAAT-3´ 5´-ACATTTGTTCAGGACCAAAG-3´	52	0.6 µl
D6S260	5´-TTTTCACTATCAATGGCAGC-3´ 5´-TTCATTTTCAGCAGCAATTT-3´	55	0.6 µl
D8S165	5´-ACAAGAGCACATTTAGTCAG-3´ 5´-AGCTTCATTTTTCCCTCTAG-3´	53	0.6 µl
D14S51	5´-GATTCTGCACCCCTAAATCC-3´ 5´-ATGCTCAATGAACAGCCTGA-3´	60	0.4 µl
D17S804	5´-GCCTGTGCTGCTGATAACC-3´ 5´-CACTGTGATGAGTGTCATTCC-3´	65	0.6 µl

Las reacciones de amplificación se realizaron en microtubos de 0,2 ml de acuerdo a las siguientes condiciones:

- volumen final de reacción para amplificación de 10 µl
- volúmenes variables de la extracción de ADN: 1, 2 y 3 µl (100 - 120 nanogramos)
- condiciones de reacción: 1X PCR Buffer (QIAGEN), concentración de $MgCl_2$ según Tabla 13, 0,8 mM dNTPs (dinucleótidos) y 0,35 unidades de Taq ADN polimerasa (QIAGEN).
- 0,3 µl de cada iniciador a una concentración 8 µM, uno de los cuales estaba marcado con un fluorocromo.

Para verificar el resultado de la amplificación, se sembraban 5 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 3% con BrEt y se visualizaba por transiluminación con UV (Figura 17). Estos fueron geles de control solamente ya que los geles de electroforesis de agarosa normal no presentan suficiente resolución para observar variación en el tamaño de los alelos de los microsatélites.

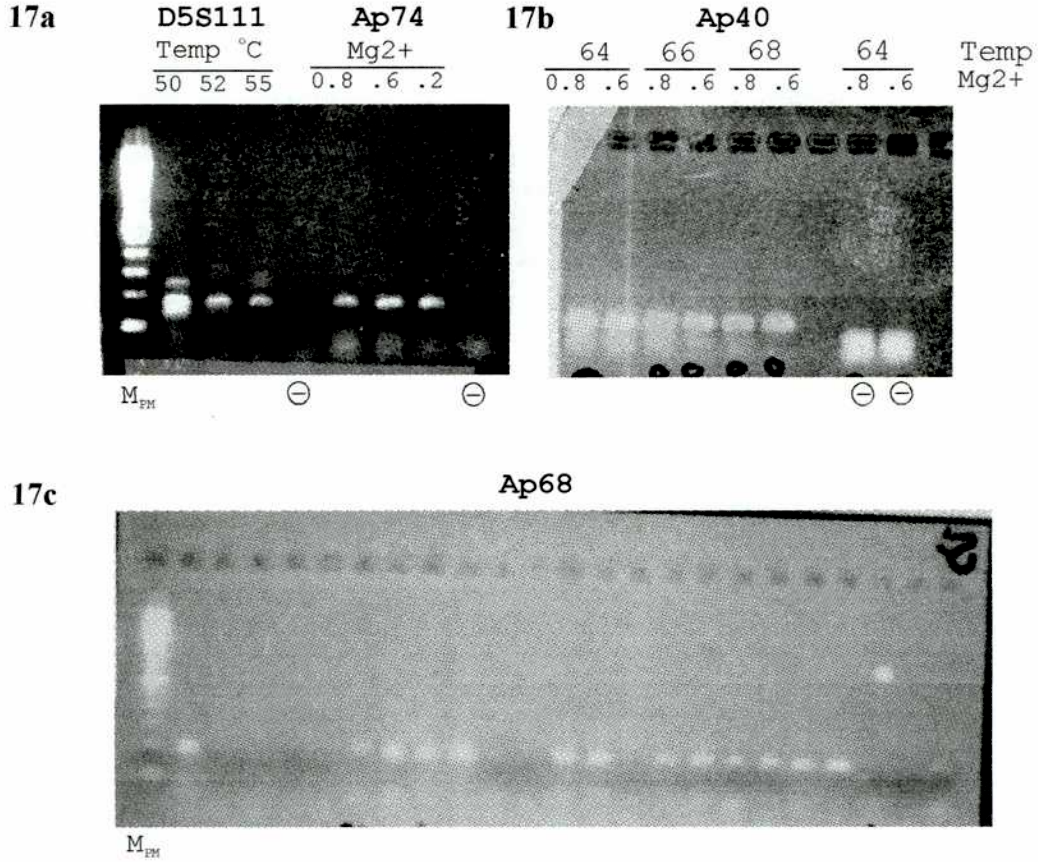


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa común al 3% teñidos con BrEt y visualizados con un transiluminador de UV de los productos de amplificación de microsatélites. **17a**. *Izquierda*: Optimización de T° para el locus D5S111 realizada con un termociclador con gradiente de T°. *Derecha*: Optimización de la concentración de Mg^{2+} en µl para el locus Ap74. **17b**. Optimización de T° y Mg^{2+} simultánea para el loci Ap40, también realizada con un termociclador con gradiente de T°. **17c**. Grupo de ejemplares analizados simultáneamente ya con las condiciones optimizadas para el loci Ap68. M_{PM}: marcador de peso molecular.(-): control negativo (sin ADN).

Dada la alta sensibilidad de los microsatélites a las condiciones de amplificación, una vez optimizadas las mismas para cada locus, todas las muestras fueron analizadas de la misma manera, cuando fue posible simultáneamente, es decir en una misma ronda de amplificación,

y siempre se usó el mismo termociclador para cada locus. En las amplificaciones realizadas para optimizar las condiciones se tuvieron en cuenta 3 variables principales1) la cantidad de ADN, 2) la temperatura de anillamiento (T_a) y 3) la concentración de Mg^{2+}. La optimización la T_a y del Mg^{2+}, es compleja porque se crea un compromiso entre rendimiento y calidad, más aún con estos microsatélites que no fueron diseñados específicamente para *A. caraya*.

2.2.10.c. Visualización de los productos de amplificación de microsatélites en geles de poliacrilamida

Una vez, verificada la amplificación, se preparaba la muestra para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida verticales en un secuenciador automático (377 Automated DNA Sequencer ABI). Se tomaba de 0,2 a 1 µl de la muestra y se les agregaba 1 µl de la solución de carga, luego se desnaturalizaba por temperatura a 96° C durante 5 minutos y se colocaron 0,8 µl de la muestra en un peine de membrana de 64 calles. Para 'cargar el gel' se usaba ficol como interfase ya que permite que la muestra ingrese al gel de poliacrilamida. El gel se sometía a electroforesis durante 3 horas. El buffer de carga contenía: 45 µl de formamida, 20 µl Blue loading (Dextran), y 20 µl del marcador de peso molecular GS500 TAMRA (Perkin-Elmer) con una marcación fluorescente de color rojo, y fragmentos cuyos tamaños varían entre 50 y 500 a manera de una escalera.

Los criterios para estandarizar el valor de los tamaños de los alelos fueron: 1) usar siempre el mismo marcador de peso molecular GS500 TAMRA (Perkin-Elmer), 2) emplear 2 amplificaciones de microsatélites cuyo tamaño estaba confirmado por secuenciación a partir de su producto clonado, y 3) en lo posible, correr en un mismo gel las amplificaciones para cada locus de todos los ejemplares analizados.

Los geles fueron analizados empleando el programa GeneScan™ 2.0 con el cual se estandarizaron los tamaños de los alelos siguiendo el patrón del marcador de peso molecular.

Posteriormente, se analizaron los perfiles cromatográficos de cada muestra y se determinó el tamaño del alelo con el programa Genotyper® 2.0.

2.2. Análisis supraespecífico

Dada la alta tasa de sustitución nucleotídica que presenta la región control mitocondrial no es un marcador genético adecuado para el estudio por arriba del nivel de especie, y es por ese motivo que se eligió otro gen mitocondrial para esta parte del estudio que es el gen que codifica para la la subunidad II de la citocromo oxidasa *c* (COII). Este gen ha sido utilizado para estudios filogenéticos en varios grupos de primates como en Monos del Viejo Mundo (Disotell *et al.*, 1992), hominoideos (Ruvolo *et al.*, 1991; 1993), en los géneros de platirrinos *Aotus* (Ashley & Vaughn, 1995) y *Ateles* (Collins & Dubach, 2000) y en poblaciones de *Alouatta seniculus* (Figueiredo *et al.*, 1998). Otros estudios han abordado la caracterización de su evolución molecular en diversos linajes de organismos (Adkins & Honeycutt, 1994; Honeycutt *et al.*, 1995).

2.2.1. Extracción de ADN

Para los ejemplares detallados en la Tabla 9, la extracción de ADN se realizó según la metodología descripta en el punto 2.1.1. de este capítulo con CHELEX 100® (BIORAD) (Walsh *et al.*, 1991).

2.2.2. Amplificación por PCR del gen COII

Los iniciadores empleados para la amplificación del gen COII se ubican a ambos lados del mismo en los genes correspondientes al tARN ^{Asp} (L7552, 5'-AACCATTTCATAACTTT-GTCAA-3') y al tARN ^{Lys} (H8321, 5'-CTCTTAATCTTTAACTTAAAAG-3') (Ruvolo *et al.*,1991).

Las amplificaciones de los templados obtenidos se realizaron en microtubos de 0,5 ml siguiendo los siguientes parámetros: 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto; el anillamiento a 50 °C por 1 minuto y la extensión a 72 °C por 1,30 minutos. Como resultado de la optimización de las condiciones de PCR, las amplificaciones se realizaron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- volumen final de reacción para amplificación inicial: 50 µl
- volúmenes variables de la extracción: 10, 15 y 20 µl (100 - 120 nanogramos de ADN)
- condiciones de reacción: 1X PCR Buffer (Promega), 2 mM $MgCl_2$, 0,8 mM dNTPs (dinucleótidos) y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega).
- 2,5 µl de cada iniciador de concentración 10 µm

2.2.3. Purificación en un gel de bajo punto de fusión

Este paso se realizó debido a que la cantidad del fragmento obtenido en la primera amplificación no era suficiente para la secuenciación manual, y al contar con iniciadores internos se prefirió amplificar dos fragmentos parciales y superpuestos del gen. De la primera amplificación se realizó una purificación del fragmento obtenido mediante la corrida en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, con BrEt. El total del volumen (aproximadamente 35 µl) de la reacción de amplificación previamente visualizada como se describió en el punto 2.1.4., se sembró en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se realizó una electroforesis en 'buffer' TAE 1X.

Una vez finalizada la corrida, se visualizó la banda en un transilumidor de UV y rápidamente se la extrajo del gel, cortándola con un bisturí previamente flameado (estéril). La banda así extraída se colocó en un microtubo con 200µl de agua bidestilada estéril a incubar en un baño a 70 °C hasta la fusión de la agarosa. Luego se preparó una dilución 1:100 de esta solución que se guardó a -20°C hasta su utilización como templado en una segunda ronda de

amplificación. Este método permitió eliminar posibles amplificaciones no específicas contaminantes no visibles por UV así como los iniciadores y dNTPs no incorporados.

2.2.4. Nueva ronda de amplificación empleando iniciadores internos

En esta segunda ronda de amplificación se emplearon dos iniciadores más L8075 (5'-GAAGACGTCCTACACTCATG-3') y H8169 (5'-CCACAGATTTCAGAGCATTG-3') (Adkins & Honeycutt, 1994). Estos iniciadores se combinaron de a pares con los anteriores para generar fragmentos de menor tamaño, de las siguientes maneras:

L7553-H8169 fragmento A (de aproximadamente 650 pb.)
L8075-H8320 fragmento B (de aproximadamente 280 pb.)

Las reacciones de amplificación para esta segunda ronda se realizaron en las siguientes condiciones:

- volumen final de reacción para amplificación inicial: 50 µl
- volúmenes variables de la resuspensión: 1, 5 y 10 µl (50 - 100 nanogramos de ADN)
- condiciones de reacción: 1X PCR Buffer (Promega), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,8 mM dNTPs (dinucleótidos) y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega).
- 2 µl de cada iniciador de concentración 10 µm

En este caso como todo el ADN templado era blanco ('target'), es decir se amplificaba, se restringieron las condiciones, la modificación principal fue el aumento de la temperatura de anillamiento que pasó de 50 a 52,5° C.

2.2.5. Purificación de fragmentos, cuantificación y secuenciación manual

Las muestras se purificaron empleando el 'kit' de purificación Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega), para lo cual se reunieron 3 re-amplificaciones A o B de cada individuo, se las sembró en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se extrajeron las bandas, y se purificó empleando una única columna por fragmento para las 3 bandas cortadas de cada individuo. Los fragmentos purificados se cuantificaron según las metodologías descriptas en el punto 2.1.7. de este capítulo. Para la secuenciación manual se utilizó el 'kit' *f*mol®DNA Sequencing System (Promega) con marcación radioactiva por incorporación de α-S^{35}-dATP y en algunas ocasiones por marcación final del iniciador con γ-P^{32}-dATP. Los parámetros de la PCR para secuenciación secuenciación del gen COII fueron: 1) desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, 2) anillamiento a 50 °C por 1 minuto, y 3) extensión a 72°C por 1 minuto, por 35 ciclos. Finalmente, la visualización de las reacciones de secuenciación se realizó como se detalló en el punto 2.1.8.b.

3. Métodos generales de análisis

3.1. Alineamiento

Los análisis de secuencias de ADN se basan en suposiciones explícitas e implícitas. Cuando tenemos dos secuencias que son parecidas pero no idénticas, se tiene que definir cuáles de las regiones de los genes son homólogas mediante un método de alineamiento. Estos métodos incluyen matrices de costos y algoritmos que permiten evaluar todos los alineamientos posibles de manera de elegir el que con un menor costo represente la matriz de caracteres considerados homólogos para las secuencias analizadas (homología posicional). Por otro lado, los alineamientos se pueden clasificar en función del número de secuencias de análisis. Cuando se comparan dos secuencias, se denomina 'pairwise aligment', se considera una matriz de identidad de secuencia ('dot blot') y el valor en la diagonal es 1. Cualquier desvío de la diagonal tiene un costo, estos costos se calculan empleando algoritmos. En el caso de los alineamientos múltiples, los algoritmos son más complejos y se requiere especificar al menos dos parámetros de costos: uno para los gaps (apertura y extensión) y otro, considerando un modelo de sustitución que evalúa los costos relativos de cambios de transiciones y transversiones, los alineamientos múltiples dan soluciones heurísticas (Wheeler, 1995).

En este trabajo para todos los análisis de secuencias (región control, citocromo b y COII), se empleó el método de alineamiento múltiple implementado en el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), y a su vez los alineamientos obtenidos fueron inspeccionados manualmente.

3.2. Señal filogenética

Al comparar las secuencias nucleotídicas entre taxa, la variación observada puede contener señal filogénetica si la variabilidad encontrada en las secuencias es el resultado de una historia evolutiva común (datos estructurados) o bien puede deberse al azar (ruido) o a

otros procesos que podrían afectar su evolución como por ej. la selección (Hillis & Huelsenbeck, 1992). Es así como Hillis y Huelsenbeck (1992) analizaron la distribución de la cantidad de árboles obtenidos al azar bajo el criterio de parsimonia en función de su longitud y según un conjunto de datos definidos. Al evaluar la forma de esta distribución obtenida a partir de matrices generadas al azar, observaron que las curvas eran bastante simétricas. Por otro lado, aquellas matrices obtenidas a partir de datos de filogenias del fago T7 en laboratorio y que contenían, por lo tanto, señal filogenética daban como resultado curvas de distribución que estaban sesgadas de manera significativa a la izquierda. El sesgo de una distribución se mide con el estatístico g_1 donde $g_1=0$ indica una simetría perfecta, $g_1>0$ indica un sesgo hacia la derecha y $g_1<0$ indica un sesgo hacia a la izquierda (Sokal & Rohlf, 1981). Hillis y Huelsenbeck (1992) analizaron las distribuciones obtenidas a partir de los diferentes conjuntos de datos y propusieron valores críticos para g_1, en función del número de caracteres y taxa, analizados de tal manera que cuando los valores fueran menores a ese valor crítico los datos se considerarían significativamente más estructurados que si fueran datos debidos al azar, es decir que presentarían una estructuración dada por compartir una misma historia evolutiva.

En el presente trabajo los datos empleados en las reconstrucciones filogenéticas se evaluaron en base a su contenido de señal filogenética según el método propuesto por Hillis y Huelsenbeck (1992) empleando la opción de árboles obtenidos al azar ('random tree option') del programa PAUP* 4.0 b8 version (Swofford, 1998). A su vez, este estudio se completó considerando el número de árboles más parsimoniosos y el número de árboles que presentaran la segunda mejor solución, ya que también constituirían indicadores de la calidad de los datos (Hillis & Dixon, 1989; Miyamoto & Boyle, 1989).

3.3. Estimación de la distancia genética

Es sabido que las medidas de distancia genética pueden ser usadas para estimar el número de cambios evolutivos que ocurrieron desde que dos secuencias compartieron un antecesor común. El método más simple para estimar la distancia genética entre dos secuencias es contar el número de sitios nucleotídicos en que las mismas difieren (distancia genética no corregida). Sin embargo, en el ADN sólo tenemos 4 estados del carácter que corresponden a las 4 bases nucleotídicas: A, G, C y T. Cuando observamos un cambio de una sustitución por otra, si bien nos da la idea de que ocurrió un cambio es posible que haya más de uno en el transcurso de la evolución. También, puede observarse identidad aún cuando en realidad ocurrieron por ejemplo dos cambios siendo el segundo una reversión al estado inicial. De hecho, se observa que a medida que el número de sustituciones entre dos secuencias aumenta, también aumenta la probabilidad de que un mismo sitio haya sufrido más de una sustitución, este fenómeno se denomina de sustituciones múltiples ('multiple hits').

Dado que cuando se consideran las distancias observadas se podría subestimar la cantidad real de cambio evolutivo, se han desarrollado numerosos métodos para corregir esas distancias bajo distintos modelos de evolución molecular que se basan en considerar las frecuencias de cada tipo de base nucleotídica y las tasas de sustitución por transiciones y transversiones. A su vez, un mayor número de suposiciones van generando modelos de complejidad creciente con el fin de corregir las distancias genéticas observadas. El modelo más simple para la corrección de distancias genéticas es el **modelo de Jukes - Cantor** (JC) (Jukes & Cantor, 1969) que considera que las 4 bases están en igual frecuencia y que todas las sustituciones tienen igual probabilidad de ocurrir. Bajo este modelo la distancia entre dos secuencias está dada por

$$d_{J\text{-}C} = -\frac{3}{4}\ln\left(1 - \frac{4}{3}p\right)$$

donde p es la proporción de nucleótidos que son diferentes en las dos secuencias y ln es el logaritmo natural de la función.

Otro modelo es el **modelo de 2 parámetros** (Kimura, 1980) que considera una tasa diferencial de transiciones (más frecuentes) y transversiones (menos frecuentes). Kimura (1980) considera que la tasa de transiciones por sitio (α) puede ser distinta de la tasa de transversión para ese sitio (β), dando un total de tasa de sustitución por sitio de ($\alpha+\beta$). A su vez, la relación entre transiciones y transversiones (α / β) se representa con la letra κ. Bajo este modelo el número de sustituciones por sitio viene dado por

$$d_{K2P} = \frac{1}{2} \ln [(1 / (1 - 2P - Q)] + \frac{1}{4} \ln [1 / 1 - 2Q)]$$

donde P y Q son las diferencias proporcionales entre dos secuencias debido a transiciones y transversiones, respectivamente.

A diferencia de la cantidad de modelos propuesto para el análisis de distancias genéticas entre secuencias nucleotídicas, existen muy pocos modelos para el análisis de secuencias de aminoácidos. Un estimador de las distancias aminoacídicas entre secuencias de proteínas que no emplea ninguna corrección es *p*. Esta distancia representa la proporción de sitios aminoacídicos en los cuales 2 secuencias son distintas y se obtiene dividiendo el número de diferencias por el total de sitios comparados, y también se usa para secuencias de ADN.

En el presente trabajo, se usaron las matrices de distancias no corregidas o corregidas obtenidas según los modelos de Jukes-Cantor (1969) y el de 2 parámetros (Kimura, 1980) empleando el programa Mega v 2.0 (Kumar *et al.*, 2001).

3.4. Métodos de reconstrucción filogenética

Un **árbol** es una representación gráfica que se obtiene con algoritmos matemáticos y nos permite inferir las relaciones evolutivas que existen entre un grupo de genes u organismos. Un árbol está formado por nodos (unidades taxonómicas) conectados entre sí por ramas que conectan los nodos representando las relaciones evolutivas entre los organismos (Avise, 1994). Los nodos terminales del árbol se denominan unidades taxonómicas operativas (OTUs) o taxa terminales que representan las secuencias o los organismos a partir de los cuales obtenemos los datos. Los nodos internos representan ancestros hipotéticos.

Los árboles pueden estar enraizados o no. Un árbol enraizado tiene un nodo que se identifica como raíz del cual todos los otros nodos descienden y de esta manera el árbol cobra una dirección en el cambio evolutivo. El método más usado para ubicar la raíz es el método del grupo externo o `outgroup'. Los árboles no enraizados, como la expresión lo indica, no tienen raíz y por lo tanto no se pueden inferir relaciones ancestro-descendiente.

Los métodos para la reconstrucción filogenética pueden ser métodos de agrupamiento (`cluster') o métodos que se basan en un criterio de "optimalidad". Los métodos de agrupamiento se basan en datos de distancia genética y emplean una serie de pasos algorítmicos que dan como resultado un único árbol. Los métodos de "optimalidad" se basan en las secuencias mismas y los más usados son los de máxima parsimonia y máxima verosimilitud. Estos métodos analizan los datos generando todos los árboles posibles según el criterio del método y se les asigna un puntaje (`score') en función de la relación entre el árbol y los datos bajo el modelo supuesto.

El método para estimar árboles filogenéticos bajo el criterio de parsimonia se basa en que la mejor solución será la más simple o bien la que implique un menor número de pasos que permitan inferir las relaciones evolutivas entre los taxa analizados. Este método se enmarca en el paradigma metodológico de la Cladística o Sistemática Filogenética (Hennig,

1968; Farris, 1983) cuyo concepto principal es el uso de caracteres derivados compartidos (sinapomorfías) para reconstruir las relaciones entre los taxa teniendo en cuenta su ancestralidad común. El criterio de "optimalidad" empleado en parsimonia considera que la mejor solución estará dada por el árbol más corto (Swofford *et al.*, 1996). Para datos de secuencias nucleotídicas, el número total de cambios evolutivos en un árbol (longitud del árbol) está dado por la suma del número de cambios en cada sitio. Si se tienen *k* sitios, cada uno con una longitud l, la longitud total del árbol L estará dada por:

$$L = \sum_{i=1}^{k} l_i$$

De todos los árboles posibles, el método selecciona aquellos de longitud mínima y el número de árboles obtenidos está en relación con el número de taxa analizados por lo cual a mayor número de taxa, mayor es el número de árboles, en particular el número total de árboles no enraizados estrictamente bifurcados para T taxa estará dado por:

$$B(T) = \prod_{i=3}^{T} (2i - 5)$$

(Felsenstein, 1978). Por ej. para 3 taxa hay un único árbol posible, pero para 9 taxa existen 72 x 10^6 árboles posibles. En general, cuando el número de taxa es $T < 10$ es posible realizar una búsqueda exhaustiva calculando la longitud de todos los árboles posibles, y cuando el número de taxa es mayor, la estrategia de búsqueda es heurística. Este método considera sólo una pequeña porción de todos los árboles posibles, y no hay garantía absoluta de que se encuentre el árbol más parsimonioso (Nei & Kumar, 2000).

Muchas veces se obtienen varios árboles con distintas topologías e igualmente parsimoniosos es decir, con un mismo número de pasos que pueden ser evaluados individualmente o bien evaluando el árbol consenso de todos los obtenidos. Los árboles consenso más utilizados son los conocidos como árbol de consenso estricto y el árbol consenso de la mayoría, que se basan en la frecuencia de ocurrencia de un grupo en todos los

árboles. El árbol de consenso estricto contiene sólo aquellos grupos que aparecen en todos los árboles, mientras que el árbol consenso de la mayoría, usa distintos límites para aceptar un grupo o no, en general el más usado es el del 50% y en ese caso se mantienen los grupos que aparecen en más de la mitad de todos los árboles. Las reconstrucciones filogenéticas en base a parsimonia se denominan cladogramas.

Los métodos de parsimonia constituyen una familia de métodos relacionados que varían en las suposiciones acerca de las transformaciones de estado del carácter. Dentro de estos, el método de parsimonia generalizada permite asignar un costo a la transformación de cada estado del carácter (Swofford *et al.*, 1996).

Los métodos de agrupamiento emplean las matrices de distancias genéticas y las transforman a través de algoritmos para reconstruir el árbol que se denominan árboles aditivos, ya que contienen información referida al largo de las ramas ('branch lengths'), también se los denomina árboles métricos o filogramas.

Entre los algoritmos empleados para la reconstrucción de árboles aditivos, está el de vecino más próximo o 'Neighbor Joining' (NJ) (Saitou & Nei, 1987). Este método evalúa la distancia de a pares entre secuencias u OTUs construyendo en cada etapa una matriz de distancia transformada y también considera el ajuste de la longitud de las ramas entre cada par de nodos en base a la distancia media de todos los otros nodos. La construcción por NJ comienza con un árbol en forma de estrella que no supone ningún tipo de agrupamiento entre las secuencias. Se considera a todos los OTUs como vecinos potenciales y se evalúa qué par de OTUs *i* y *j* presenta el menor valor de largo de rama entre ellos. A partir de ahí se define un nodo A que conecta *i* y *j*. Luego se calcula la distancia entre ese nodo A y los taxa remanentes (k; $3 \leq k \leq m$). Esta distancia está dada por $D_{Ak} = (d_{ik} + d_{jk} - d_{ij}) / 2$, se calculan todas las distancias usando esa ecuación y se obtiene una nueva matriz de distancias transformadas de (m - 1) x (m - 1) dimensiones. A partir de esta matriz se calculan

nuevamente las longitudes de las ramas, y se sigue el mismo procedimiento hasta reunir todos los taxa.

Un método para evaluar estadísticamente las reconstrucciones filogenéticas es el método de "bootstrap". Este método toma todos los datos, excluye los caracteres al azar generando pseudoreplicas de la matriz de datos con reemplazo es decir, que el sitio excluido se devuelve al conjunto de datos antes de excluir otro sitio. A partir de cada pseudoréplica se construye el árbol empleando cualquier método. Esto se repite un número *n* de veces que en general es 1000 o más, dando como resultado un árbol de 'bootstrap'.

En el presente trabajo se realizaron reconstrucciones filogenéticas en base al criterio de optimalidad de máxima parsimonia según el método de parsimonia generalizada haciendo una búsqueda heurística empleando el programa PAUP* 4.0 b8 version (Swofford 1998) y en base al método de agrupamiento por NJ usando el programa MEGA v 2.0 (Kumar *et al.*, 2001). Para ambas metodologías se realizó el 'bootstraping' (Felsenstein 1985) implementado en los programas respectivos.

4. Análisis a nivel de especie en *Alouatta caraya*

4.1. Construcción de redes

Si bien las relaciones evolutivas basadas en secuencias de ADN por encima del nivel de especie pueden representarse a través de árboles filogenéticos, por debajo de ese nivel, las relaciones genealógicas se representan de manera más adecuada a través de redes o 'networks'. A diferencia de los tradicionales árboles filogenéticos que se basan en topologías bifurcadas, una red puede presentar ciclos, es decir un conjunto de nodos donde es posible trazar el camino de comienzo y fin en el mismo nodo, sin pasar por ningún otro nodo más de una vez. A su vez, la persistencia de un haplotipo ancestral en la población a partir del cual descienden otros haplotipos, mostrará topologías multibifurcadas o en estrella. Estas

filogenias intraespecíficas son explicadas en base a la teoría de coalescencia. En el presente trabajo se generaron las redes para los haplotipos de *A. caraya* empleando el programa TCS: estimating gene genealogies versión 1.13 (Clemente *et al.*, 2001).

4.2. Cuantificación de la variabilidad a nivel nucleotídico

Tradicionalmente, los estudios de polimorfismos alozímicos consideraban a la heterocigosis (h) como una medida práctica de la diversidad genética donde ésta correspondía a h siendo la probabilidad de que en una población dos alelos, tomados al azar, fueran diferentes. Sin embargo, esta medida no sería suficiente para los datos de ADN. De hecho, a medida que consideramos secuencias más largas, el valor de h se iría acercando cada vez más a uno, de manera que este estimador no permitiría la comparación entre diferentes loci y poblaciones y por lo tanto como medida de polimorfismo dejaría de ser un parámetro informativo (Li, 1997).

En el caso de secuencias de ADN, es más informativo considerar el número de diferencias nucleotídicas y así una medida apropiada para cuantificar la variabilidad es Π dado por el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias de la población tomadas al azar. Cuando se muestrean n secuencias de una población, Π se estima como

$$\Pi = \frac{1}{[n(n-1)/2]} \sum_{i<j} \Pi_{ij}$$

donde Π_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas entre las secuencias i y j y $n(n-1)/2$ es el número de pares posibles.

Alternativamente, se puede caracterizar primero la frecuencias de los diferentes alelos y estimar Π como

$$\Pi = \frac{n}{(n-1)} \sum_{i,j} x_i x_j \Pi_{ij}$$

donde x_i y x_j son las frecuencias de los alelos *i* y *j* respectivamente, y $n/(n\text{-}1)$ es el factor de corrección debido al sesgo del muestreo (Li, 1997).

El modelo mutacional que se usa comúnmente para estimar Π, es el **modelo de sitios infinitos**, que asume que el número de sitios nucleotídicos en la secuencia es tan grande que cada nueva mutación ocurre en un sitio que no había mutado anteriormente (Kimura, 1969). Bajo este modelo y bajo el supuesto de apareamiento al azar, Watterson (1975) mostró que la media de Π está dada por $E(\Pi) = \theta = 4N_e u$, y Tajima (1983) mostró que la varianza de Π está dada por

$$V(\Pi) = \frac{n+1}{3(n+1)}\theta + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n\text{-}1)}\theta^2$$

donde en una población dipolide N_e es el tamaño poblacional efectivo, y *u* es la tasa de mutación por secuencia por generación, asumiendo que no hay recombinación. En este caso θ representa el parámetro mutacional de la Teoría Neutralista que indica que la variabilidad neutra es proporcional a la tasa a la que se originan las variantes y el tamaño efectivo.

El valor de Π tiende a ser mayor a medida que aumenta el largo de la secuencia, esto se debe a que u es igual a L*v*, donde L es la longitud de la secuencia y *v* es la tasa de mutación por sitio por generación. Es por este motivo que se suele estandarizar Π dividiéndolo por L para poder establecer comparaciones entre loci. Entonces se considera: $\pi = \Pi / L$, Nei & Li (1979) denominaron como π a la **diversidad nucleotídica** que es el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre 2 secuencias tomadas al azar, cuya varianza es $V(\pi) = V(\Pi)/L^2$.

Otro estimador de la diversidad nucleotídica es el número de sitios nucleotídicos segregantes (S) que son los sitios polimórficos en la colección de las secuencias analizadas. Bajo el modelo de sitios infinitos y suponiendo apareamiento al azar Watterson (1975) mostró que la media y la varianza de S están dadas por

$$E(S) = a\theta \qquad V(S) = a\theta + b\theta^2$$

donde

$$a = 1 + \frac{1}{2} + \ldots + \frac{1}{n-1}$$

$$b = 1 + \frac{1}{2^2} + \ldots + \frac{1}{(n-1)^2}$$

Dado que S también depende del largo de la secuencia, es posible considerar el número de sitios segregantes por sitio nucleotídico $p_S = S/n$ donde n es el número total de nucleótidos. Al igual que con S, la estimación de $\theta = p_S / a$.

Las diferencias entre p_S y π están dadas por la ventaja de p_S sobre π debido a su menor varianza, pero a su vez π es independiente del número de secuencias analizadas. Esto indica que al estimar θ, el número de sitios segregantes es más informativo que la diversidad nucleotídica a su vez, si se considera que los tamaños poblacionales fluctúan de manera importante cuando se consideran largos períodos temporales, π es un mejor estimador de θ ya que p_S es más sensible a cambios en el tamaño poblacional que π (Nei & Kumar, 2000).

4.3. Prueba de neutralidad de Tajima (1989)

La teoría neutral de la evolución molecular provee de predicciones testeables acerca de las relaciones entre los polimorfismos observados por locus, la heterocigosidad, la divergencia genética entre poblaciones, brindando el marco teórico para la hipótesis del reloj molecular y también para la teoría de coalescencia (*e.g.*, Kimura, 1983, Nei, 1987; Li, 1997). De esta manera es posible analizar la consistencia interna de varios estimadores calculados bajo un modelo de evolución neutra (Nei & Kumar, 2000). Uno de los métodos más usados para estimar si la variabilidad observada en un conjunto de datos se ajusta a un modelo de evolución neutra es la prueba de Tajima (1989). Esta prueba compara los valores de θ estimados en base a π y p_s y analiza su correlación mediante un estadístico D que sigue una distribución beta (Tajima, 1989). La idea básica de esta prueba es que bajo un modelo de

evolución neutra, en el equilibrio entre mutación y deriva, siendo $\theta = 4N_e u$, la media y la varianza de D serían aproximadamente 0 y 1, respectivamente (Tajima, 1989).

4.4. Diferencias nucleotídicas entre poblaciones

El punto 3.3. de este capítulo se refirió a la estimación del número de sustituciones nucleotídicas entre secuencias de ADN sin considerar el efecto del polimorfismo que pueda aparecer dentro de las poblaciones. Si tenemos *n* diferentes alelos y m_x y m_y son el total de secuencias muestreadas en las poblaciones X e Y, respectivamente, y si $\bar{x}_i$ e $\hat{y}_i$ son las frecuencias del alelo *i* para la población X e Y. Luego, el número promedio de sustituciones nucleotídicas para un par de secuencias tomadas al azar de la población X se definirá como la diversidad nucleotídica (Dx) que se estima:

$$Dx = \frac{n}{(n-1)} \sum_{i,j}^{n} \bar{x}_i \bar{x}_j D_{ij}$$

D_{ij} es un estimador del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre los alelos *i* y *j*. Cuando todas las secuencias sean diferentes, $\bar{x}_i = 1/m_u$. A su vez, el promedio del número de sustituciones nucleotídicas (D_y) entre 2 secuencias tomadas de la población para Y puede ser estimado de la misma manera.

Al comparar las dos poblaciones, se observa que el número promedio (D_{xy}) de sustituciones nucleotídicas por sitio entre las secuencias muestradas de las poblaciones X e Y puede estimarse a partir de

$$D_{xy} = \sum_{i,j}^{n} \bar{x}_i \hat{y}_j D_{ij}$$

donde D_{ij} es un estimador del número de diferencias entre la secuencia i de la población X y la secuencia j de la población Y.

El número promedio neto de sustituciones entre dos poblaciones (D_a) (Nei & Li, 1979) se estima como $D_a = D_{xy} - (D_x + D_y) / 2$

4.5. Estructuración genética

Dado que la mayoría de las poblaciones naturales están subdivididas en unidades reproductoras o subpoblaciones y a su vez estas subpoblaciones no están aisladas completamente entre sí, se han desarrollado métodos para estimar la variación genética dentro y entre las subpoblaciones.

Cuando una población se encuentra subdividida mostrando una estructuración jerárquica, el método más tradicional para cuantificar la diferenciación genética entre esas subdivisiones es el método de Wrigth (1951, 1965). Este método consiste en la estimación de 3 índices que se denominan Indices de Fijación que sirven para estimar el grado de estructuración de la variabilidad genética en toda la población (T), sus subdivisiones (S) y los individuos (I). Estos 3 coeficientes son F_{IT}, F_{ST} y F_{IS} relacionados por la siguiente fórmula

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

La idea básica de Wright fue suponer que las poblaciones o subpoblaciones en estudio derivan de una única población ancestral en un mismo momento y que todas la poblaciones están igualmente relacionadas entre sí aunque no haya flujo génico entre las mismas. Es decir, las poblaciones se consideran como una muestra al azar de un conjunto infinito de poblaciones igualmente relacionadas. Sin embargo esto no se cumple en poblaciones naturales, por eso Nei (1977) redefinió los índices de fijación de Wrigth incluyendo en su formulación los valores de heterocigosidad observada y esperada.

De está manera, F_{IS}, F_{IT} y F_{ST} se definen en términos de tres valores de heterocigosidad: la heterocigosidad promedio observada en cada población (h_O), la heterocigosidad promedio esperada dentro de cada población (h_S) y la heterocigosidad

esperada total (h_T) en el conjunto de toda la población. En este contexto, la heterocigosidad se denomina diversidad genética. Los valores de heterocigosidad se formulan del siguiente modo:

$$h_O = \sum_{k=1}^{s} w_k \sum_{i \neq j}^{q} x_{kij}$$

donde x_{kij} ($i \neq j$) es la frecuencia del genotipo $A_i A_j$ en la subpoblación k, y w_k es el tamaño relativo de la subpoblación k.

La heterocigosidad esperada h_S y total h_T a su vez se calculan como:

$$h_S = 1 - \sum_{k=1}^{s} w_k \sum_{i=1}^{q} x_{ki}^2$$

$$h_T = 1 - \sum_{i=1}^{q} \bar{x}_i^2$$

donde $\bar{x}_i = \Sigma_k w_k x_{ki}$. Dado que en general no está disponible la información de w_k, se considera $w_k = 1/s$, donde s es el número de subpoblaciones y de esta manera los índices de fijación pueden definirse empleando h_O, h_S y h_T, del siguiente modo:

$$F_{IS} = (h_S - h_O) / h_S$$

$$F_{IT} = (h_T - h_O) / h_T$$

$$F_{ST} = (h_T - h_S) / h_T$$

F_{IS} y F_{IT} son medidas de los desvíos de las proporciones esperadas por Hardy - Weinberg dentro de las subpoblaciones y en el total de la población, respectivamente, donde los valores positivos indican deficiencia de heterocigotas, mientras que los valores negativos indican un exceso de heterocigotas. F_{ST} es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones y tiene siempre valor positivo.

Dado que la formulación de los índices de fijación Wright se basó en el caso de dos alelos, Nei (1973) definió en el caso de alelos múltiples un índice G_{ST} y fue definido como el coeficiente de diferenciación genética. En este casó como se trata de muchos alelos

d_{ST} ($= h_T - h_S$) se definió como

$$d_{ST} = (\Sigma_k \Sigma_l d_{kL}) / s^2$$

donde $d_{kl} = \Sigma_i(x_{ki} - x_{li})^2 / 2$ (Nei, 1987).

Dado que $d_{kk} = 0$, se obtiene que $d_{ST} = (s - 1)\, d'_{ST}/s$ donde

$$d'_{ST} = \Sigma\, d_{kl} / [s(s - 1)]$$

De esta manera la diferenciación normalizada entre las subpoblaciones puede ser estimada a partir de d'_{ST}, y se formula como

$$G_{ST} = \frac{d'_{ST}}{h'_T} = \frac{h'_T - h_S}{h'_T}$$

donde $h_T = h_s + d'_{ST}$, redefiniendo F_{IT}, como

$$F'_{IT} = (h'_T - h_O) / h'_T$$

Todos los análisis para estimar la estructuración genética se realizaron con el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

4.6. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Cuando una población se subdivide, uno esperaría un aumento de la diversidad haplotípica y un número importante de sitios segregantes a partir de las secuencias encontradas en diferentes poblaciones (Slatkin, 1987). Varios autores han desarrollado distintos índices considerando la fracción de diversidad nucleotídica encontrada dentro y entre las poblaciones a fin de proveer estimadores de la diferenciación genética entre las poblaciones (*e.g.*, G_{ST}, Nei, 1973). Excoffier *et al.* (1992) proponen un análisis jerárquico de la varianza molecular particionando la varianza total en componentes de covarianza donde la varianza molecular total (σ^2_T) es la suma de los componentes de covarianza que incluyen el componente de la varianza debido a diferencias entre los haplotipos dentro de una población

(σ^2_c), el componente de covarianza debido a diferencias entre los haplotipos de diferentes poblaciones dentro de una región (σ^2_b), y el componente de covarianza debido a diferencias entre los haplotipos de diferentes poblaciones (σ^2_a). De esta manera, la varianza total puede ser expresada como:

$$\sigma^2_T = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$$

En base a este análisis de la varianza, Excoffier *et al.* (1992) definen los índices de correlación de cada uno de los componentes de la varianza llamándolos estadísticos ϕ (phi) de la siguiente manera:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma^2_a + \sigma^2_b}{\sigma^2_T} \qquad \phi_{CT} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T} \qquad \phi_{SC} = \frac{\sigma^2_b}{\sigma^2_b + \sigma^2_c}$$

donde ϕ_{ST} es la correlación de la diversidad molecular observada en los haplotipos dentro de las poblaciones en relación a los haplotipos de toda la especie; ϕ_{CT} es la correlación de la diversidad molecular observada en los haplotipos dentro de un grupo de poblaciones en relación a los haplotipos de toda la especie, y ϕ_{SC} es la correlación de la diversidad molecular observada en los haplotipos dentro de las poblaciones en relación a los haplotipos de la región. Estos estadísticos se basan en el supuesto que no existe flujo génico entre las subpoblaciones (Excoffier *et al.*, 1992).

Para establecer la significación estadística de los valores observados de ϕ, se emplea una prueba no paramétrica de permutaciones que consiste en analizar la distribución de los valores de a pares de ϕ bajo una hipótesis nula de distribución de la varianza que considera que las muestras provienen de un única población panmítica y que la variación observada es debida a errores de muestreo. Esta distribución nula se obtiene permutando los haplotipos entre las poblaciones según los niveles jerárquicos analizados y luego de cada permutación se calculan nuevamente los valores generando así la distribución nula (Excoffier *et al.*, 1992).

Los valores obtenidos en la distribución nula se comparan con los valores observados y se indica el nivel de significación estadístico. Los análisis de AMOVA se realizaron con el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

4.7. Características demográficas

4.7.1. Flujo génico

En las poblaciones, el tamaño censal (N) representa el número total de individuos que la componen. En poblaciones de tamaño finito constante se observó un descenso en la heterocigosis respecto de la esperada y de esta manera se definió el tamaño efectivo (N_e) como el tamaño de una población ideal que genera un descenso de heterocigosis o un cambio de índice de fijación igual al observado en la población real. El tamaño efectivo poblacional es aproximadamente igual al número de individuos reproductores de una generación (Kimura, 1986). Wright (1943) demostró que cuando una población está dividida en una serie de subdivisiones (modelo isla continente o islas), cada una de las cuales contribuye de igual manera al acervo ('pool') de migrantes, entonces el N_e de la población como un todo es

$$N_e = \frac{N}{(1-F_{ST})}$$

Bajo el modelo de isla-continente y en el equilibrio de modo que m (la tasa de migración) es suficientemente baja ($m<<1$), se obtiene una aproximación de F_{ST} tal que

$$F_{ST} = \frac{1}{(4\,N_e m + 1)}$$

A partir de esta ecuación se puede estimar el número de migrantes por generación como:

$$N_e\, m = \frac{1 - F_{ST}}{4\,F_{ST}}$$

4.7.2. Tamaño efectivo y tiempo de divergencia

La relación entre la teoría de la coalescencia y la deriva génica nos permite estimar cuantas generaciones atrás dos secuencias (alelos) compartieron un ancestro común (*e.g.*, Hudson, 1990; Li, 1997). La probabilidad de que 2 secuencias compartieran un antecesor común en la generación anterior es 1/(2N) porque hay 2N secuencias en la población y porque el muestreo es con reposición (*i.e.*, el mismo alelo puede ser muestreado repetidamente). Luego, la probabilidad de que 2 secuencias deriven de un antecesor común 2 generaciones atrás es [1 / (2N)] [1 - 1 / (2N)] y la probabilidad de que eso ocurra en la generación G (t + 1) es

$$f(G) = (1/2N)\,(1-1/2N)^{G-1}$$

que se aproxima a

$$f(G) = (1/2N)\,e^{-(G-1)/2N}$$

asumiendo que los alelos son neutros y que el tamaño de la población se ha mantenido constante a lo largo del tiempo. Por otro lado, cuanto más pequeña es la población, mayores son los valores de probabilidad de coalescencia f (G) (Hudson, 1990). Ahora si se analiza un gran número alelos de un gen, el tiempo medio de coalescencia (t_G), para g alelos es

$$t_G = 4N\,(1 - 1/g)$$

Además sabemos que en el marco de la evolución de variantes neutras, el tiempo promedio que tarda el alelo en llegar a la fijación es 4N generaciones.

Esta relación entre tamaño poblacional y tiempo de coalescencia cuando conocemos la tasa de mutación permite estimar el tamaño efectivo. Supongamos que dos copias de un gen se originaron hace n generaciones a partir de un gen ancestral. A lo largo del tiempo ambas genealogías han ido acumulando mutaciones con una tasa u por generación, por lo que el total de diferencias nucleotídicas D entre secuencias será igual a 2 u n, que por el tiempo medio de coalescencia nos da $D = 2\,u\,n \times 2N = 4Nu$.

Tajima (1989) propuso que si se cuenta con una estimación de u y de la diversidad nucleotídica como θ, es posible estimar el tamaño efectivo, N_e, empleando la fórmula $\theta = 4N_e u$ y despejando $N_e = \theta / 4u$.

En el caso de genes mitocondriales, el tiempo medio que debemos retroceder para encontrar al ancestro común es la mitad (1/2) que en el de los genes nucleares porque el ADN mitocondrial se transmite solamente por vía materna, luego en el caso del mtADN, el tamaño efectivo será $N_e = \theta / 2u$.

Para la estimación de θ se emplearán diversos índices implementados en el programa DnaSP (Rozas & Rozas, 1999) que se detallarán en el capítulo de resultados.

4.7.3. Patrón demográfico

Los estudios de los eventos demográficos recientes como una expansión poblacional muestran que la mayoría de los eventos de coalescencia ocurren antes de la expansión dando genealogías comprimidas cerca de la raíz o bien en forma de estrella (Tajima, 1989; Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). El hecho de que los cambios en los tamaños poblacionales dejen una impronta particular en las secuencias de ADN ha permitido el desarrollo de pruebas estadísticas para detectar si una dada población experimentó o no una expansión poblacional (*e.g.*, Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Las pruebas estadísticas se pueden dividir en 3 grupos: I, II y III (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Las del grupo I se basan en la frecuencia de los sitios segregantes considerando que los eventos de expansiones poblacionales generarían un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía (*i.e.*, mutaciones recientes) y por lo tanto, un exceso de singletons (Tajima, 1989; Slatkin & Hudson, 1991). Dentro de este grupo se encuentra el estadístico D (Tajima, 1989) del cual ya se describió su utilidad como prueba de neutralidad

selectiva, y se basa en evaluar la diferencia entre dos estimadores del parámetro mutacional θ siendo $\theta = 2Nu$ (para mtADN). El estadístico R_2 también del grupo I, se basa en la diferencia entre el número de singletons y el número promedio de diferencias (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). La principal diferencia entre estos estimadores es su poder, siendo el segundo uno de los estadísticos más sensibles, principalmente para pequeños tamaños muestrales.

Dentro del grupo II, se encuentra el estadístico F_S (Fu, 1997) que se basa en la distribución de los haplotipos en el árbol (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

En el grupo III se encuentran los estadísticos que se basan en la distribución de las diferencias de a pares o "mismatch distribution" (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Estos estadísticos se basan en la idea de que los patrones de "mismatch distribution" preservarían un registro de las expansiones y fisiones poblacionales que han ocurrido a lo largo de la historia de una población (Rogers & Harpending, 1992). La curva definida por los "mismatch distribution" seguiría una función definida según los procesos poblacionales que hayan ocurrido (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Esta propuesta se basa en la teoría de la coalescencia, para lo cual se considera que en ausencia de recombinación (o con poca) y de acuerdo al modelo de sitios infinitos (Kimura, 1971), la probabilidad F_0 de que dos alelos al azar difieran en i nucleótidos en la generación t, donde u es pequeño y N grande, esta dada por

$$F_0(t+1) = 1/N + (1 - 2u - 1/N)\, F_0(t)$$

Watterson (1975) propuso que cuando una población se mantiene constante en el tiempo es decir que está en equilibrio, el valor de F_0 está dado por

$$F_0 = \theta_i / (\theta + 1)^{i+1}$$

donde $\theta = 4\,N\,u$. La distribución de los valores de esta probabilidad F_0 en función de i presenta una curva característica que permite que se comparen los valores observados de las frecuencias de las diferencias de a pares ('mismatch distribution') a fin de evaluar distintos

modelos demográficos (Rogers & Harpending, 1992). En particular, en el modelo de expansión poblacional, la distribución de la frecuencias de las diferencias de a pares se ajusta a una curva de Poisson -unimodal- (Rogers & Harpending, 1992). Uno de los estadísticos empleados para este tipo de análisis es la desigualdad o el "raggedness" *rg* que mide el ajuste de la `mismatch distribution' a un modelo de expansión poblacional (Harpending *et al.*, 1993; Harpending, 1994).

Para la realización de este tipo de análisis se emplearon los programas Arlequín (Schneider *et al.*, 2000) y DnaSP (Rozas & Rozas, 1999).

5. Análisis filogenético

5.1. Caracterización general del marcador

Se analizó la composición nucleotídica del gen en los distintos taxa y la frecuencia promedio de uso de codones empleando el programa Mega v 2.0 (Kumar *et al.*, 2001). A su vez, se evaluó la homogenidad de la proporción de bases nucleotídicas en todos los sitios y en las terceras posiciones empleando el test de χ^2 implementado en el programa PAUP* version 4.0 b8 (Swofford 1998). El programa Mega v 1.0 (Kumar *et al.*, 1993) se usó para comparar la frecuencia de sustituciones nucleotídicas entre codones, estos datos se emplearon para realizar un análisis de saturación en las sustituciones discriminando transiciones y transversiones.

El sesgo en el uso de los codones se analizó empleando el índice de sesgo en la composición *C* (`index of compositional bias') (Irwin *et al.*, 1991). Este índice mide el desvío de la proporción observada de cada base respecto de la esperada o sea el 25% para cada base. Este índice varía entre 0% que significa que no hay sesgo y 100% que indica que sólo un nucleótido está presente.

5.2. Análisis de parsimonia

Para las reconstrucciones filogenéticas en base al criterio de máxima parsimonia se emplearon distintos esquemas de pesado de transversiones (tv) y transiciones (ts) (1:1, 10:1, 1:0) para cada posición del codón, y también considerando todas las posiciones. Para este análisis se usó el programa PAUP* version 4.0 b8 (Swofford 1998) realizando una búsqueda heurística con adición simple de secuencias y según el método de construcción de árbol TBR ('tree bisection reconection') de 'branch swapping'.

5.3. Análisis de tasas relativas

La **hipótesis del reloj molecular** considera que para una dada macromolécula (proteína o secuencia de ADN) la tasa de evolución en todos los linajes es aproximadamente constante a lo largo del tiempo (Zuckerkandl & Pauling, 1965). Si bien existen varios métodos para evaluar si se cumple esta hipótesis, estos presentan ciertas dificultades tales como 1) la tasa absoluta de evolución molecular no puede ser estimada excepto si se cuenta con datos acerca del tiempo transcurrido desde la divergencia entre las especies, es decir si se tiene un buen registro fósil, 2) se debe conocer el patrón de sustitución para estimar el número de sustituciones por sitio, 3) se debe saber si existe heterogeneidad en la tasa de sustitución entre sitios para estimar el número de sustituciones por sitio, y 4) se deben conocer las relaciones filogenéticas antes de realizar el análisis. Los métodos desarrollados han logrado salvar algunas de estas dificultades. Uno de ellos es **la prueba de tasas relativas de Tajima** (1993) que salva los problemas mencionados, y es un método simple que se basa en un análisis de χ^2.

Esta prueba considera tres secuencias 1, 2, 3, siendo la 3 la secuencia del grupo externo. Se comparan las tres secuencias y se consideran sólo aquellos sitios en donde se observa alguna variación nucleotídica entre al menos 2 de las 3 secuencias. Se define el

número de sitios en el cual la secuencia 1 difiere de la 2 y la 3 como m_1. De la misma manera se definen m_2 y m_3.

$$m_1 = \sum_i \sum_{j \neq i} n_{ijj}$$

$$m_2 = \sum_i \sum_{j \neq i} n_{jij}$$

$$m_3 = \sum_i \sum_{j \neq i} n_{jji}$$

cuando la secuencia 3 es el grupo externo, el método propone que se esperaría que

$$E(m_1) = E(m_2)$$

Esta igualdad se puede testear usando el cálculo de χ^2

$$\chi^2 = \frac{(m_1 - m_2)^2}{m_1 + m_2}$$

Esto sigue una distribución de valores de χ^2 con un grado de libertad.

Si tenemos una secuencia como el ADN mitocondrial, que en general presenta una tasa de transiciones mayor a la de transversiones, este método permite discriminar cada tipo de sustitución, siendo s_1 las diferencias dadas por transiciones, v_1 las diferencias dadas por transversiones. A, G, C, y T se indican como 1, 2, 3 y 4, respectivamente, entonces se define

$$s_1 = n_{211} + n_{122} + n_{433} + n_{344}$$

$$v_1 = m_1 - s_1$$

y así con la secuencia 2 y 3, ahora el método propone que $E(s_1) = E(s_2)$ y $E(v_1) = E(v_2)$

$$\chi^2 = \frac{(s_1 - s_2)^2}{s_1 + s_2} + \frac{(v_1 - v_2)^2}{v_1 + v_2}$$

que seguiría una distribución de χ^2 con 2 grados de libertad.

Dado que en platirrinos no se conocen los patrones de evolución de casi ningún gen, el registro fósil es sumamente escaso, más aún por ejemplo en el género *Alouatta* no se conoce ningún fósil, se eligió esta prueba para evaluar las homogeneidad en las tasas de evolución implementada en el programa Mega v 2.0 (Kumar *et al.*, 2001).

Capítulo III

Tasas de evolución molecular en algunos géneros de platirrinos

I. Introducción

En base a diferentes evidencias genéticas, ecológicas y paleontológicas, varios autores han observado en mamíferos una correlación entre estructura social, tasa de evolución cromosómica y especiación (Bush *et al.*, 1975, 1977; Wilson *et al.*, 1975).

Los factores que explicarían las altas tasas de especiación y la evolución cromosómica en primates serían tanto demográficos, debido por ejemplo al reducido tamaño efectivo (N_e) y el flujo génico limitado, como comportamentales determinados por la organización social de los grupos. Además, un componente de la organización social en muchos primates es el desarrollo de sistemas de jerarquía con estatus sociales dominantes que llevan a una reproducción diferencial de los individuos (*e.g.*, machos dominantes), y formación (dispersión) de nuevos grupos sociales por divisiones de las matrilíneas (Baker & Marler, 1980; Bush, 1981; van Schaik, 1996). Estos factores acentuarían la diferenciación genética entre las poblaciones ya que la ausencia de flujo génico entre ellas conduciría al aumento de la endogamia local debido a la disminución del N_e que a su vez conlleva a una variación al azar de las frecuencias alélicas (deriva genética) y a un aumento de la probabilidad de fijación de reordenamientos cromosómicos (Crow & Kimura, 1970; Kimura & Ohta, 1971; Templeton, 1980).

Bush *et al.* (1977) propusieron que los primates presentan la mayor tasa de especiación y una alta diversidad cariotípica. A su vez, encontraron diferencias en cuanto a la evolución cromosómica en los dos géneros de Monos del Viejo Mundo (MVM) analizados: *Cercopithecus* y *Papio*, el primero se ajustaba a un modelo con grupos sociales pequeños y unimachos que presentaba una gran diversidad cariotípica, mientras que el segundo,

cariotípicamente más homogéneo, se caracterizaba por tener grupos de mayor tamaño y multimachos (Bush *et al.*, 1977). Posteriormente, Melnick (1987) analizó la hipótesis de 'especiación vía estructura social' en macacos (MVM) donde los grupos tienen una estructura multimacho y observó que ésta sólo se cumplía ante un aislamiento geográfico o ecológico que impidiera el completo flujo génico, por ej. en las especies insulares de macacos.

Considerando la hipótesis de 'especiación vía estructura social', también se evaluó la relación entre los procesos de evolución morfológica, cromosómica y molecular (Wilson *et al.*,1974). Si bien se observó que en algunos grupos había una correlación entre la evolución morfológica y la cromosómica, la evolución molecular seguía una velocidad regular coincidiendo con la hipótesis de reloj molecular (Wilson *et al.*,1974), posteriormente se observaron numerosos casos donde la relación morfología - rearreglos cromosómicos no se cumplía (ej. especies crípticas) (*e.g.*, Reig, 1979).

En particular, los platirrinos constituyen un modelo interesante para analizar esta temática dada su gran radiación adaptativa reflejada por una gran diversidad taxonómica representada por 16 géneros, 107 especies y 204 especies y subespecies (Rylands *et al.*, 2000) que se correlaciona con una gran diversidad cariotípica (*e.g.*, Mudry *et al.*, 2001). En particular el género *Alouatta* presenta un amplio rango en el número cromosómico desde 2n= 43-45 en *A. seniculus seniculus* hasta 2N=54 en *A. palliata* (*e.g.*, Chu & Bender, 1961; Mudry *et al.*, 1981, 1998; Armada *et al.*, 1987; Lima & Seuánez, 1991). A su vez, estudios de hibridación fluorescente "in situ" y meiosis han confirmado que la determinación sexual cromosómica en 4 de las 6 especies tradicionales del género, está dada por sistemas sexuales múltiples definidos por traslocaciones Y-autosoma XY_1Y_2 en *A. belzebuth* y *A. palliata* (Consiglieri *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 2002), $X_1X_2Y_1Y_2$ en *A. caraya* y *A. seniculus* (Rahn *et al.*, 1996; Mudry *et al.*, 1998; Consiglieri *et al.*, 1998). Mientras que en las restantes especies

del género, *A. pigra* y *A. fusca*, los datos disponibles en la bibliografía no son suficientes para confirmar la presencia de un sistema sexual múltiple (Mudry *et al.*, 2001).

A su vez, en platirrinos, la divergencia de los grupos ha sido acompañada por una extensiva diversificación de historias de vida, incluyendo tiempo de gestación, tamaño de camada, cuidado de la cría, tiempo entre pariciones, edad de maduración sexual entre otros (*e.g.*, Fleagle, 1998). En cuanto a su estructura social también constituye un grupo diverso, con grupos monógamos (*e.g.*, *Aotus*), multimacho-poligínicos (*e.g.*, *Alouatta seniculus* y *A. caraya*), multimacho-poliándricos (*e.g.*, *Alouatta palliata*), unimacho-poligínico (*e.g.*, *Alouatta caraya*), entre otros (*e.g.*, Fleagle, 1998). Los tamaños poblacionales varían ampliamente entre los géneros, especies y regiones de distribución geográfica, revelando en muchos grupos una profunda plasticidad adaptativa en función de los recursos, se podría citar como ejemplo el género *Saimiri* con grupos que varían entre 15 a 75 individuos según la especie, la distribución geográfica, y la distribución espacial de los recursos (Boinski, 1999).

Desde el punto de vista molecular, diferentes estudios revelaron que las tasas evolutivas varían entre diferentes grupos de organismos, contradiciendo la hipótesis de reloj molecular (*e.g.*, Mindell *et al.*, 1996; Gary & Stanley, 1998). Uno de los factores más frecuentemente invocado para explicar la heterogeneidad en las tasas evolutivas ha sido el tamaño corporal que a su vez está correlacionado con: 1) tiempo generacional, 2) tamaño poblacional, y 3) tasa metabólica, donde los organismos de menor tamaño presentan, en promedio, menores tiempos generacionales, mayores tamaños poblacionales y altas tasas metabólicas (*e.g.*, Li *et al.*, 1987; Martín *et al.*, 1992; Martin & Palumbi, 1993; Martin, 1995; Bromham *et al.*, 1996). Otro factor propuesto en primates para explicar las discrepancias respecto de la predicción de la teoría del reloj molecular ha sido la estructura social (Hoelzer *et al.*, 1998). Nuevamente se plantea la hipótesis original de Bush *et al.* (1975) evaluando las consecuencias genéticas de la estructura social ahora a nivel molecular.

En este trabajo de Tesis, se analizó el efecto del tamaño corporal sobre la tasa de evolución molecular considerando los efectos del tiempo generacional y del tamaño poblacional, dado que no se contaba con suficiente información bibliográfica para analizar las tasas metabólicas. A su vez, también se evaluó la influencia de la estructura social sobre los desvíos del reloj molecular. En particular, en base a las secuencias obtenidas y disponibles, se compararon géneros de platirrinos de cuerpo grande como los atélidos: *Ateles*, *Lagothrix*, *Brachyteles* y *Alouatta* versus platirrinos más pequeños como los cébidos: *Cebus*, *Saimiri* y *Aotus*. La hipótesis a poner a prueba fue que en atélidos y cébidos, el mayor tamaño corporal estaría asociado a una tasa reproductiva menor y sería inversamente proporcional a la tasa de evolución molecular.

Para esta parte del estudio se eligió el gen mitocondrial que codifica para la subunidad II de la citocromo oxidasa *c* (COII) que había sido empleado en grupos de Monos del Viejo Mundo (Disotell *et al.*, 1992), hominoideos (Ruvolo *et al.*, 1991; 1993), y en ciertos géneros de platirrinos tales como *Aotus* (Ashley & Vaughn, 1995) y *Ateles* (Collins & Dubach, 2000), así como en poblaciones de *Alouatta seniculus* (Figueiredo *et al.*, 1998). Estos estudios previos permitían contar con numerosas secuencias publicadas las que, sumadas a las obtenidas en este trabajo, permitieron aumentar la cantidad de comparaciones. Asimismo, dada la necesidad de revisiones sistemáticas en la mayoría de los géneros de platirrinos, otro de los objetivos de esta parte del estudio fue evaluar la utilidad del gen mitocondrial COII en el estudio de la sistemática de los platirrinos.

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En atélidos y cébidos, el mayor tamaño corporal está asociado a una tasa reproductiva menor y es inversamente proporcional a la tasa de evolución molecular

Objetivos

1) Analizar la correlación entre las tasas de sustitución entre platirrinos de cuerpo cuerpo grande (*Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix* y *Brachyteles*) y platirrinos pequeños como *Saimiri*, *Cebus* y *Aotus* y el tamaño corporal, la tasa reproductiva y características demográficas propias de estos géneros de Monos del Nuevo Mundo

2) Evaluar la utilidad sistemática del gen COII mitocondrial en platirrinos

3) Aportar evidencias moleculares que permitan una mejor caracterización de las especies de primates que viven en Argentina

III. Resultados

1. Descripción del gen COII en algunos géneros de monos platirrinos

En este trabajo se obtuvieron las secuencias completas del gen COII de 11 ejemplares de primates platirrinos incluyendo 2 *Alouatta caraya*, 1 *Ateles paniscus*, 3 *Ateles belzebuth*, 1 *Aotus azarae azarae*, 1 *Cebus apella paraguayanus*, 1 *Cebus apella nigritus* y 2 *Saimiri boliviensis*. Además, a los fines comparativos, se incluyeron secuencias de platirrinos obtenidas del GenBank, completando un total de 29 secuencias de COII que abarcaron 7 géneros de platirrinos. La identificación de las especies, su origen geográfico, fuente y número de acceso a GenBank se muestran en la Tabla 11.

Además se incluyeron secuencias de los siguientes monos catarrinos: 2 *Homo sapiens* (1 de mi autoría-AF181091- y el otro obtenido por Ruvolo *et al.*, 1991), un ejemplar de los siguientes primates publicados por Ruvolo *et al.* (1991): *Macaca mulatta*, *Pongo pygmaeus*, *Gorilla gorilla*, y *Pan troglodytes*, y los publicados por Adkins & Honeycutt (1994): *Tarsius bancanus* y *Lemur catta*.

Tabla 11. Monos platirrinos incluidos en el análisis filogenético con su clasificación taxonómica (modificada de Schneider *et al.*, 1996).

Nivel Taxonómico	Género	Especie	Origen geográfico	N° Acceso GenBak/Fuente[&]
Familia Atelidae				
Subfamilia Alouattinae				
	Alouatta	*caraya 1* *	Argentina	AF181086 [a]
		caraya 2 *	Argentina	AF396459 [a]
		seniculus	Brasil	AF054293 [i]
		seniculus	Brasil	AF054299 [i]
		seniculus	Brasil	AF054291 [i]
		palliata	?	L22774 [j]
Subfamilia Atelinae				
	Ateles	*belzebuth*	Brasil	AF216236 [k]
		belzebuth	Brasil	AF216240 [k]
		belzebuth	Peru	AF216242 [k]
		belzebuth *	?	AF377897 [b]
		belzebuth *		AF377896 [c]
		belzebuth *	.	AF377898 [d]
		paniscus *	?	AF181087 [c]
		paniscus	Brasil	AF216250 [k]
		paniscus	Surinam	AF216247 [k]
		geoffroyi	Panama	AF216235 [k]
		geoffroyi	Honduras	AF216234 [k]
	Brachyteles	*arachnoides*	Brazil	AF216253 [k]
	Lagothrix	*lagotricha*	?	L22779 [j]
Familia Cebidae				
Subfamilia Cebinae	*Cebus*	*apella paraguayanus* *	Paraguay	AF181089 [e]
		apella nigritus *	?	AF181088 [f]
Subfamilia Saimirinae	*Saimiri*	*boliviensis* *	Bolivia	AF181090 [g]
		boliviensis *	?	AF396460 [h]
		sciureus		U36848 [l]
Subfamilia Aotinae	*Aotus*	*azarae azarae* *	Argentina	AF181085 [h]
		azarae boliviensis	?	U36846 [l]
		nancymae	.	U36770 [l]
		lemurinus	?	U36843 [l]

* Secuencias obtenidas en el presente trabajo.

[&] Fuente de las muestras de sangre: [a] vida silvestre, [b] Ezeiza Flora y Fauna, Argentina; [c] La Plata Zoo, Buenos Aires, Argentina; [d] Buenos Aires Zoo, Argentina; [e] IICS, "Instituto de Investigaciones Científicas y de la Salud", Asunción, Paraguay; [f] ECAS, "Estación de Cría de Animales Silvestres", La Plata, Argentina; [g] CAPRIM, "Centro Argentino de Primates", Corrientes, Argentina; [h] CEM, "Complejo Ecológico Municipal", Roque Saenz Peña, Chaco, Argentina.

Referencias de las secuencias publicadas por otros autores: [i] Figueiredo *et al.* (1998); [j] Adkins & Honeycutt (1994); [k] Collins & Dubach (2000); [l] Ashley & Vaughn (1995).

1.1. Características generales del marcador

En todos los ejemplares de monos platirrinos analizados en el presente trabajo de Tesis, la longitud total del gen COII fue de 696 pb, 12 nucleótidos más largos que en los restantes primates incluidos en el análisis. Se observó un total de 274 sitios variables, el 69% de los mismos se ubicaban en la tercera posición del codón, un 19% en la primera posición y el 11% restante en la segunda posición.

En los platirrinos, la composición nucleotídica de COII fue rica en Adenina y Timina (valor promedio de 60.5%) mostrando el típico sesgo de los genes mitocondriales en animales con bajos porcentajes de Guanina (Brown, 1985). En particular el contenido de Guanina fue del 13%, mientras que los otros nucleótidos mostraron valores de 32% para Adenina, 27% para Citosina y 28 % para Timina. Las frecuencias de bases entre los platirrinos fue homogénea considerando todos los sitios (χ^2 = 8.27, df = 84, P = 1.00), los sitios variables (χ^2 = 24.96, df = 84, P = 1.00) y las terceras posiciones variables (χ^2 = 32.83, df = 84, P = 0.99).

Considerando la gran heterogeneidad observada en la composición nucleotídica en cada posición del codón (Tabla 12), se calculó el sesgo en el contenido nucleotídico empleando el índice de sesgo en la composición *C* ('compositional bias') (Irwin *et al.*, 1991).

Tabla 12. Valores promedio de composición nucleotídica en antropoideos

	Primera posición				Segunda posición				Tercera posición				Todas	
Taxa	A-1	C-1	G-1	T-1	A-2	C-2	G-2	T-2	A-3	C-3	G-3	T-3	AT	GC
Platyrrhini	28,7	24,4	24,2	22,7	26,6	24,2	11,2	38,0	40,4	30,2	4,3	25,1	60,5	39,5
Catarrhini [a]	29,2	26,8	25,8	18,2	24,5	26,4	11,1	38,0	39,2	36,0	5,3	19,5	56,2	43,8
Primate [a]	28,5	26,0	25,4	20,1	25,6	25,6	11,2	37,8	39,9	32,0	5,1	23,0	58,3	41,7
Codon bias [b]														
Platyrrhini		0,05				0,19				0,30				
Catarrhini [a]		0,09				0,19				0,32				

[a] Datos obtenidos por Adkins & Honeycutt (1994)
[b] Codon bias calculado según Irwin, Kocher & Wilson (1991)

En los platirrinos, el sesgo en la composición nucleotídica fue máximo en la tercera posición del codón (30 %) y mínimo en la primera posición (5 %) (Tabla 12) como se observa en la mayoría de los primates (Adkins & Honeycutt, 1994). El mismo patrón de variación también fue observado en mamíferos para otros genes mitocondriales como el citocromo *b* (Irwin *et al.*, 1991).

1.2. Uso del codón

La frecuencia en el uso de los codones mostró el mismo sesgo en detrimento de Guanina observado en las terceras posiciones de los codones, en los tripletes terminados en Guanina (Tabla 13). En particular se observó una preferencia por los tripletes terminados en Adenina para los codones cuatro veces degenerados (V, P, T, A, R, G) y los seis veces degenerados que codifican para leucina (L) y serina (S) (Tabla 13). Cuando se analizó el índice relativo del uso de codones sinónimos (RSCU) (Sharp, Tuohy & Mosurski, 1986) se observó valores mayores a 1, 25 para todos los codones terminados en Adenina.

Tabla 13. Uso del codón[a] en el gen COII en platirrinos

UUU	(F)	5.5	(1.04)	UCU	(S)	1.7	(0.55)	UAU	(Y)	5.4	(0.87)
UUC	(F)	5.0	(0.96)	UCC	(S)	3.1	(1.03)	UAC	(Y)	7.1	(1.13)
UUA	(L)	6.1	(1.25)	UCA	(S)	8.7	(2.88)	UAA	(*)	0.7	(3.40)
UUG	(L)	0.2	(0.05)	UCG	(S)	0.7	(0.22)	UAG	(*)	0.0	(0.20)
CUU	(L)	6.7	(1.38)	CCU	(P)	3.5	(1.19)	CAU	(H)	1.9	(0.55)
CUC	(L)	2.4	(0.49)	CCC	(P)	2.5	(0.84)	CAC	(H)	4.9	(1.45)
CUA	(L)	11.5	(2.36)	CCA	(P)	5.7	(1.93)	CAA	(Q)	6.6	(1.84)
CUG	(L)	2.3	(0.47)	CCG	(P)	0.1	(0.04)	CAG	(Q)	0.6	(0.16)
AUU	(I)	12.2	(1.04)	ACU	(T)	3.2	(0.95)	AAU	(N)	3.2	(1.09)
AUC	(I)	11.2	(0.96)	ACC	(T)	4.2	(1.25)	AAC	(N)	2.6	(0.91)
AUA	(M)	12.0	(1.73)	ACA	(T)	5.8	(1.74)	AAA	(K)	3.4	(1.68)
AUG	(M)	1.8	(0.27)	ACG	(T)	0.2	(0.07)	AAG	(K)	0.7	(0.32)
GUU	(V)	1.7	(0.83)	GCU	(A)	3.9	(1.03)	GAU	(D)	4.0	(0.85)
GUC	(V)	2.9	(1.38)	GCC	(A)	6.4	(1.70)	GAC	(D)	5.5	(1.15)
GUA	(V)	3.3	(1.57)	GCA	(A)	4.8	(1.27)	GAA	(E)	12.0	(1.80)
GUG	(V)	0.5	(0.22)	GCG	(A)	0.0	(0.00)	GAG	(E)	1.3	(0.20)

UGU	(C)	0.3	(0.34)
UGC	(C)	1.7	(1.66)
UGA	(W)	4.5	(1.89)
UGG	(W)	0.3	(0.11)
CGU	(R)	1.5	(0.96)
CGC	(R)	1.8	(1.14)
CGA	(R)	2.9	(1.88)
CGG	(R)	0.0	(0.02)
AGU	(S)	0.6	(0.20)
AGC	(S)	3.4	(1.12)
AGA	(*)	0.0	(0.00)
AGG	(*)	0.1	(0.40)
GGU	(G)	1.2	(0.59)
GGC	(G)	3.2	(1.59)
GGA	(G)	2.8	(1.40)
GGG	(G)	0.8	(0.42)

[a] Valores promedio de las frecuencias del uso de cada codón en todos los platirrinos; código de aminoácidos estándar, y RSCU entre paréntesis.

1.3. Análisis de saturación

Está ampliamente documentado que en el genoma mitocondrial, las transiciones superan en frecuencia a las transversiones en comparaciones entre especies cercanamente relacionadas, mientras que la frecuencia de transversiones, tiende a aumentar cuando se comparan especies más distantes, debido a que las transiciones sufren sustituciones múltiples que derivan en la saturación de este tipo de cambio (*e.g.*, Brown & Simpson, 1982). Considerando la heterogeneidad en la distribución de los sitios variables y la composición nucleotídica entre las posiciones del codón, tanto la tasa total de sustitución como la abundancia relativa de transiciones (ti) y transversiones (tv) podrían variar en función de la posición en el codón. Para analizar el patrón de sustitución nucleotídica en cada posición del codón, se graficaron las sustituciones totales, y las ti y tv según las posiciones del codón para todas las comparaciones entre taxa (Figura 18). Las especies de monos catarrinos y *Tarsius* se incorporaron en el estudio con la idea de facilitar la determinación del nivel de saturación. Las comparaciones entre los monos catarrinos, y entre estos y *Tarsius* no fueron graficadas. Para cada posición del codón, se graficaron: el total de las sustituciones (Figura 18 A), la frecuencia relativa de ti y tv (Figura 18 B) y la relación de ti/tv (Figura 18 C) en función de la distancia corregida según el modelo de Jukes-Cantor (d_{J-C}).

Todos los gráficos mostraron la presencia de dos agrupamientos, donde el grupo de la izquierda comprendió todas las comparaciones entre platirrinos, mientras que el grupo de la derecha, mostró las comparaciones entre estos y los grupos externos. Todas las sustituciones para cada posición del codón mostraron un aumento lineal en función de la distancia genética y alcanzaron la saturación para algunas de las comparaciones que involucraron al tercer codon (Figura 18).

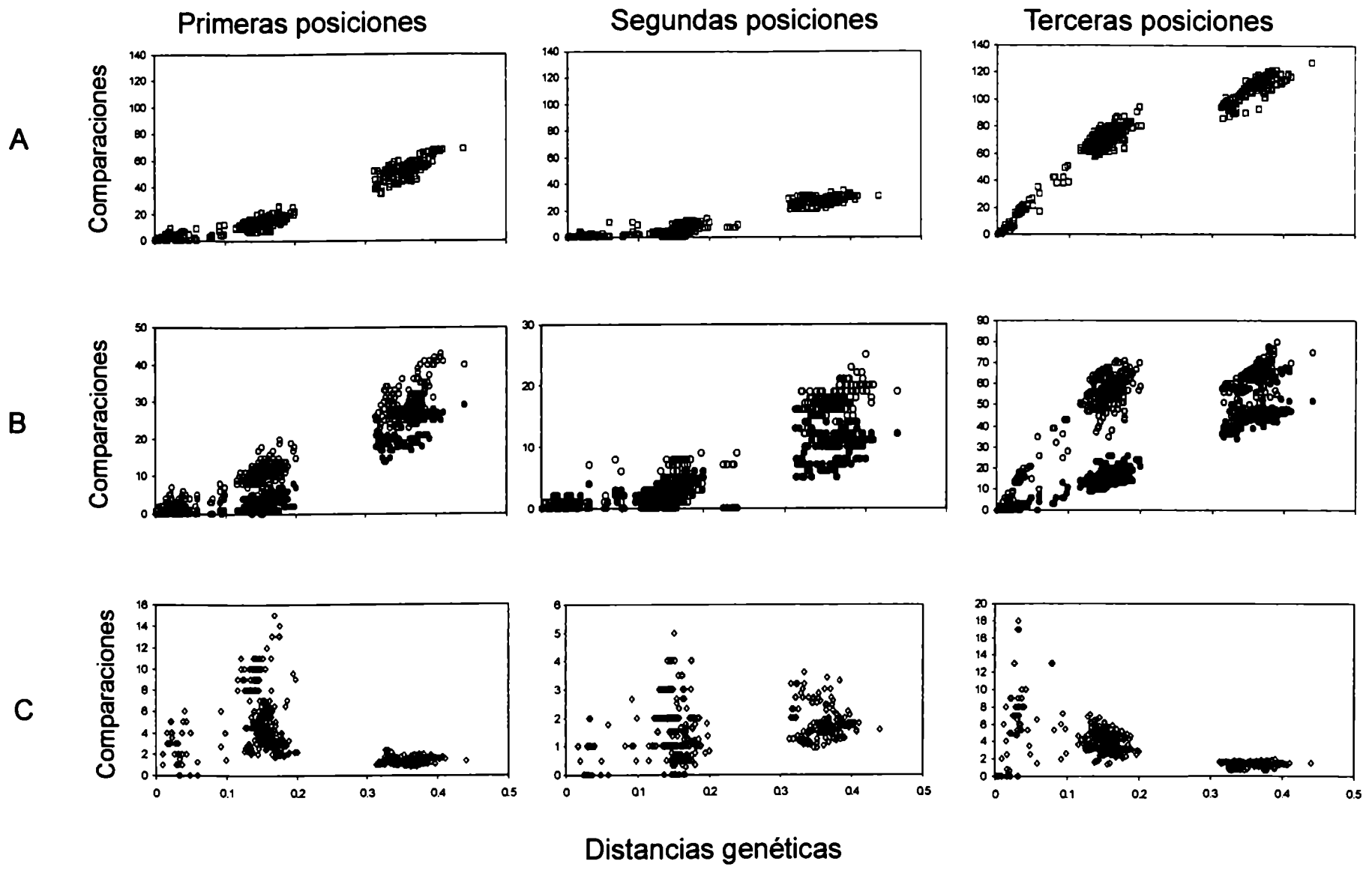


Figura 18. Análisis de saturación

Se observó un alto nivel de saturación para valores de d_{J-C} mayores a 0.1 que correspondieron a las comparaciones inter-genéricas o inter-familiares. Las tasas de evolución en la primera y segunda posición del codón fueron bajas debido a que cualquier sustitución en la segunda posición y la mayoría de las primeras posiciones darían un cambio aminoacídico mientras que sólo el 30% de las sustituciones en las terceras posiciones resultaría en un reemplazo (Graur & Li, 2000). Cuando las ti y tv se graficaron de manera separada (Figura 18 B), se observó que las tasas de ti fueron mayores que las de tv para todas las posiciones. Para la primera y segunda posiciones hubo ausencia de saturación, mientras que para las terceras posiciones se observó saturación de transiciones.

En las terceras posiciones, la relación entre ti y tv disminuyó rápidamente y alcanzó un mínimo estable en valores mayores que una ti por cada tv para distancias genéticas mayores a 0.3 (Figura 18 C). En las comparaciones entre platirrinos y el outgroup, la relación ti/tv se aproximó a un valor cercano a 2 para la primera posición del codon, en tanto que para las mismas comparaciones en la segunda posición la relación ti/tv disminuyó sin alcanzar un valor asintótico (Figura 18 C).

2. Distancias genéticas

Para las comparaciones entre platirrinos y los grupos externos, las distancias genéticas no corregidas mostraron valores mayores al 24 %. Entre los platirrinos, las mayores distancias se observaron en las comparaciones interfamiliares como por ejemplo *Lagothrix lagotricha vs Saimiri sciureus* (17%) (Tabla 14). En comparaciones intergenéricas las distancias no corregidas fueron mayores al 11 % (Tabla 14). A nivel intragenérico e intraespecífico se observó un patrón de divergencia variable dependiendo de cada género y especie. En el género *Alouatta*, las mayores distancias se observaron en las comparaciones de *A. palliata* con las otras especies de aulladores: *A. caraya* y *A. seniculus* (Tabla 14).

Tabla 14. Matriz de distancias genéticas no corregidas por arriba de la diagonal y corregidas por debajo

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	*Alouatta*	*caraya*		0,012	0,034	0,047	0,035	0,055	0,128	0,129	0,136	0,126	0,122	0,125	0,122	0,131	0,129	0,138	0,129	0,133	0,125	0,148	0,138	0,132	0,15	0,139	0,128	0,146	0,124	0,149	0,137
2		*caraya*	0,012		0,044	0,057	0,047	0,064	0,129	0,131	0,138	0,128	0,123	0,126	0,123	0,132	0,131	0,14	0,125	0,128	0,12	0,14	0,139	0,135	0,147	0,135	0,123	0,141	0,123	0,149	0,139
3		*seniculus*	0,035	0,045		0,018	0,005	0,076	0,132	0,132	0,14	0,129	0,127	0,127	0,131	0,134	0,129	0,14	0,132	0,131	0,139	0,147	0,131	0,127	0,14	0,147	0,139	0,145	0,132	0,147	0,138
4		*seniculus*	0,049	0,06	0,018		0,02	0,087	0,144	0,144	0,152	0,141	0,139	0,139	0,142	0,145	0,142	0,152	0,144	0,144	0,15	0,157	0,144	0,141	0,15	0,158	0,154	0,146	0,145	0,16	0,151
5		*seniculus*	0,037	0,049	0,005	0,02		0,074	0,127	0,127	0,135	0,124	0,123	0,123	0,126	0,129	0,124	0,135	0,127	0,126	0,139	0,145	0,129	0,126	0,135	0,145	0,137	0,139	0,127	0,142	0,137
6		*palliata*	0,058	0,068	0,082	0,094	0,08		0,123	0,121	0,128	0,123	0,118	0,121	0,118	0,123	0,13	0,132	0,123	0,129	0,136	0,158	0,137	0,137	0,164	0,152	0,141	0,148	0,131	0,147	0,14
7	*Ateles*	*belzebuth*	0,145	0,146	0,15	0,164	0,144	0,138		0,011	0,014	0,029	0,024	0,03	0,036	0,009	0,016	0,017	0,033	0,033	0,115	0,12	0,132	0,136	0,153	0,149	0,145	0,129	0,138	0,141	0,134
8		*belzebuth*	0,147	0,148	0,15	0,164	0,144	0,136	0,012		0,014	0,032	0,03	0,033	0,03	0,009	0,016	0,023	0,036	0,036	0,108	0,117	0,135	0,139	0,153	0,149	0,145	0,127	0,135	0,138	0,129
9		*belzebuth*	0,156	0,158	0,16	0,175	0,154	0,145	0,015	0,015		0,037	0,036	0,039	0,036	0,009	0,022	0,023	0,042	0,042	0,116	0,125	0,147	0,151	0,165	0,161	0,157	0,134	0,147	0,147	0,138
10		*paniscus*	0,143	0,145	0,146	0,16	0,14	0,138	0,029	0,033	0,039		0,004	0,001	0,03	0,032	0,027	0,026	0,03	0,03	0,111	0,117	0,134	0,136	0,151	0,147	0,142	0,125	0,132	0,136	0,129
11		*paniscus*	0,138	0,139	0,144	0,158	0,138	0,133	0,025	0,031	0,037	0,004		0,006	0,026	0,03	0,029	0,03	0,032	0,032	0,108	0,115	0,129	0,132	0,148	0,142	0,138	0,125	0,128	0,133	0,129
12		*paniscus*	0,141	0,143	0,144	0,158	0,138	0,137	0,031	0,034	0,04	0,001	0,006		0,032	0,033	0,029	0,027	0,032	0,032	0,112	0,118	0,132	0,135	0,153	0,148	0,141	0,123	0,131	0,135	0,127
13		*paniscus*	0,138	0,139	0,148	0,162	0,142	0,133	0,037	0,031	0,037	0,031	0,027	0,033		0,033	0,037	0,037	0,043	0,046	0,111	0,124	0,134	0,134	0,153	0,144	0,142	0,138	0,134	0,138	0,134
14		*belzebuth*	0,148	0,15	0,152	0,166	0,146	0,138	0,009	0,009	0,009	0,033	0,031	0,034	0,034		0,016	0,02	0,036	0,036	0,114	0,122	0,141	0,145	0,159	0,155	0,151	0,131	0,141	0,144	0,135
15		*belzebuth*	0,147	0,148	0,146	0,162	0,139	0,147	0,016	0,016	0,022	0,028	0,029	0,029	0,039	0,016		0,022	0,032	0,029	0,115	0,124	0,142	0,147	0,161	0,159	0,152	0,125	0,139	0,143	0,132
16		*belzebuth*	0,158	0,16	0,161	0,175	0,154	0,15	0,018	0,024	0,024	0,027	0,031	0,028	0,039	0,021	0,022		0,03	0,033	0,124	0,124	0,143	0,141	0,167	0,163	0,159	0,138	0,151	0,153	0,14
17		*geoffroyi*	0,147	0,141	0,15	0,164	0,144	0,138	0,034	0,037	0,043	0,031	0,033	0,033	0,045	0,037	0,033	0,031		0,009	0,115	0,12	0,138	0,139	0,153	0,154	0,147	0,136	0,138	0,144	0,135
18		*geoffroyi*	0,151	0,145	0,148	0,164	0,142	0,146	0,034	0,037	0,044	0,031	0,033	0,033	0,048	0,037	0,03	0,034	0,009		0,118	0,12	0,139	0,143	0,155	0,158	0,15	0,132	0,142	0,143	0,134
19	*Brachyteles*	*arachnoides*	0,14	0,134	0,157	0,172	0,157	0,154	0,128	0,119	0,129	0,122	0,119	0,124	0,122	0,126	0,128	0,139	0,128	0,132		0,14	0,174	0,171	0,167	0,149	0,147	0,138	0,142	0,143	0,134
20	*Lagothrix*	*lagotricha*	0,17	0,159	0,168	0,181	0,166	0,183	0,133	0,129	0,14	0,129	0,127	0,131	0,138	0,136	0,138	0,139	0,133	0,134	0,158		0,157	0,161	0,175	0,173	0,171	0,129	0,16	0,157	0,132
21	*Cebus apella*	*nigritus*	0,156	0,158	0,146	0,162	0,144	0,155	0,148	0,152	0,167	0,151	0,145	0,149	0,151	0,16	0,162	0,162	0,156	0,157	0,204	0,18		0,017	0,158	0,134	0,132	0,157	0,135	0,164	0,156
22		*paraguayanus*	0,148	0,152	0,142	0,157	0,14	0,155	0,154	0,158	0,173	0,154	0,149	0,152	0,151	0,165	0,167	0,16	0,158	0,163	0,2	0,185	0,017		0,158	0,138	0,134	0,155	0,134	0,163	0,148
23	*Saimiri*	*sciureus*	0,171	0,167	0,159	0,171	0,153	0,19	0,176	0,176	0,193	0,174	0,17	0,176	0,177	0,184	0,186	0,195	0,176	0,178	0,194	0,205	0,181	0,181		0,057	0,046	0,136	0,093	0,15	0,151
24		*boliviensis*	0,158	0,152	0,167	0,182	0,165	0,174	0,172	0,172	0,187	0,168	0,163	0,17	0,165	0,179	0,185	0,19	0,178	0,183	0,172	0,201	0,15	0,155	0,06		0,024	0,146	0,086	0,133	0,142
25		*boliviensis*	0,144	0,138	0,157	0,176	0,155	0,161	0,167	0,166	0,182	0,163	0,158	0,161	0,164	0,174	0,176	0,185	0,169	0,174	0,168	0,2	0,148	0,15	0,048	0,025		0,146	0,082	0,133	0,142
26	*Aotus*	*azarae boliviensis*	0,168	0,161	0,166	0,168	0,158	0,171	0,145	0,143	0,152	0,141	0,141	0,139	0,157	0,148	0,141	0,157	0,155	0,15	0,156	0,145	0,181	0,179	0,154	0,167	0,167		0,078	0,057	0,044
27		*azarae azarae*	0,138	0,138	0,149	0,165	0,143	0,148	0,157	0,153	0,169	0,15	0,144	0,148	0,152	0,161	0,159	0,175	0,157	0,162	0,162	0,184	0,153	0,151	0,1	0,092	0,087	0,083		0,091	0,089
28		*nancymae*	0,171	0,172	0,168	0,185	0,162	0,169	0,161	0,157	0,169	0,155	0,151	0,153	0,157	0,165	0,163	0,177	0,165	0,163	0,162	0,18	0,191	0,189	0,172	0,15	0,15	0,059	0,099		0,047
29		*lemurinus*	0,156	0,158	0,157	0,173	0,155	0,16	0,152	0,146	0,158	0,146	0,146	0,144	0,152	0,154	0,15	0,16	0,154	0,152	0,151	0,149	0,181	0,17	0,174	0,162	0,162	0,046	0,096	0,049	

En el género *Saimiri*, la divergencia observada entre *S. boliviensis* y *S. sciureus* fue comparable a la observada entre otras especies de platirrinos, mientras que los ejemplares de *S. boliviensis* entre sí mostraron distancias del similares a las comparaciones entre subespecies (Tabla 14).

Las subespecies de *Cebus apella* mostraron valores de divergencia comparables a los valores observado entre especímenes de *Ateles belzebuth* y *Alouatta seniculus* de los que no se conoce a qué subespecie pertenecen (Tabla 14).

3. Señal filogenética

Para analizar la estructuración de los datos se empleó el método de Hillis & Huelsenbeck (1992) que analiza el valor g_1 de la distribución de los árboles obtenidos al azar. El análisis se realizó considerando distintos niveles taxonómicos y dado que del género *Ateles* se disponía del mayor número de secuencias disponibles de distintas especies este fue empleado a nivel taxonómico de género (Tabla 15).

Todos los valores de g_1 estimados en este trabajo fueron menores a los propuestos por Hillis & Huelsenbeck (1992), sugiriendo que el conjunto de datos contiene señal filogenética (Tabla 15). Considerando todos los taxa, los valores de g_1 obtenidos para todas las posiciones y para las primeras, segundas y terceras posiciones fueron de: -0.801, -1.162, -1.624, y -0.530, respectivamente, mostrando una pérdida de señal filogenética en las terceras posiciones (Tabla 15). Una tendencia distinta se observó cuando se consideró el nivel de género ya que en este caso, fue la segunda posición la que mostró los valores más bajos de g_1 (Tabla 15).

Tabla 15. Algunas características del gen COII para todas y cada una de las posiciones del codón según los diferentes niveles taxonómicos analizados

Posiciones del codón	Sitios totales	Sitios variables	Sitios informativos	g_1	Longitud del árbol[1] Mínima	Segunda
Todas	696					
Todos los taxa		382	313	-0,801	2170 (1)	2172 (2)
Platyrrhini		275	206	-0,434	1134 (1)	1152 (1)
Ateles		56	39	-0,590	104 (2)	105 (1)
Primeras	232					
Todos los taxa		105	80	-1,162	423 (1)	466 (3)
Platyrrhini		53	33	-0,263	164 (1)	170 (2)
Ateles		13	5	-0,934	18 (4)	19 (12)
Segundas	232					
Todos los taxa		59	38	-1,624	154 (1)	179 (2)
Platyrrhini		31	12	-1,149	59 (2)	60 (3)
Ateles		3	2	-0,192	5 (1)	6 (13)
Terceras	232					
Todos los taxa		218	195	-0,530	1489 (1)	1499 (1)
Platyrrhini		191	161	-0,474	895 (1)	902 (1)
Ateles		40	32	-0,676	77 (2)	78 (1)

[1] Número de árboles mostrando la longitud mínima (más parsimoniosos) y entre paréntesis, la segunda longitud más parsimoniosa.

Otro criterio para distinguir la estructuración de los caracteres respecto de variación al azar es evaluar el número de árboles más parsimoniosos y el número de pasos para la mejor solución siguiente (Hillis & Dixon, 1989; Miyamoto & Boyle, 1989). De los 12 análisis realizados 8 mostraron sólo un árbol más parsimonioso, el número de segundos árboles más parsimoniosos varió de 1 a 13, no observándose una relación directa con la variación en los valores de g_1 (Tabla 15).

4. Análisis filogenético

En el conjunto de los datos analizados (696 pb), 382 sitios fueron variables de los cuales 313 fueron filogenéticamente informativos (Tabla 15). Para cada una de las posiciones del codón, el número de sitios informativos observados fueron 80 para la primera, 38 para la segunda y 195 para la tercera (Tabla 15). Con el fin de evaluar distintos esquemas de pesado diferencial de tv y ti tv:ti (1:1; 10:1; 1:0), se analizó cada tipo de pesado en función de la posición del codón dando un total de 9 análisis. En la Figura 19, se muestra el árbol para cada posición del codón que mostró el árbol más resuelto. El árbol obtenido en base al análisis de la tercera posición del codón fue el que presentó la mayor resolución principalmente a nivel intragenérico (Figura 19). Por arriba de ese nivel, la resolución fue limitada ya que mostró una politomía involucrando a todos los géneros de platirrinos (Figura 19).

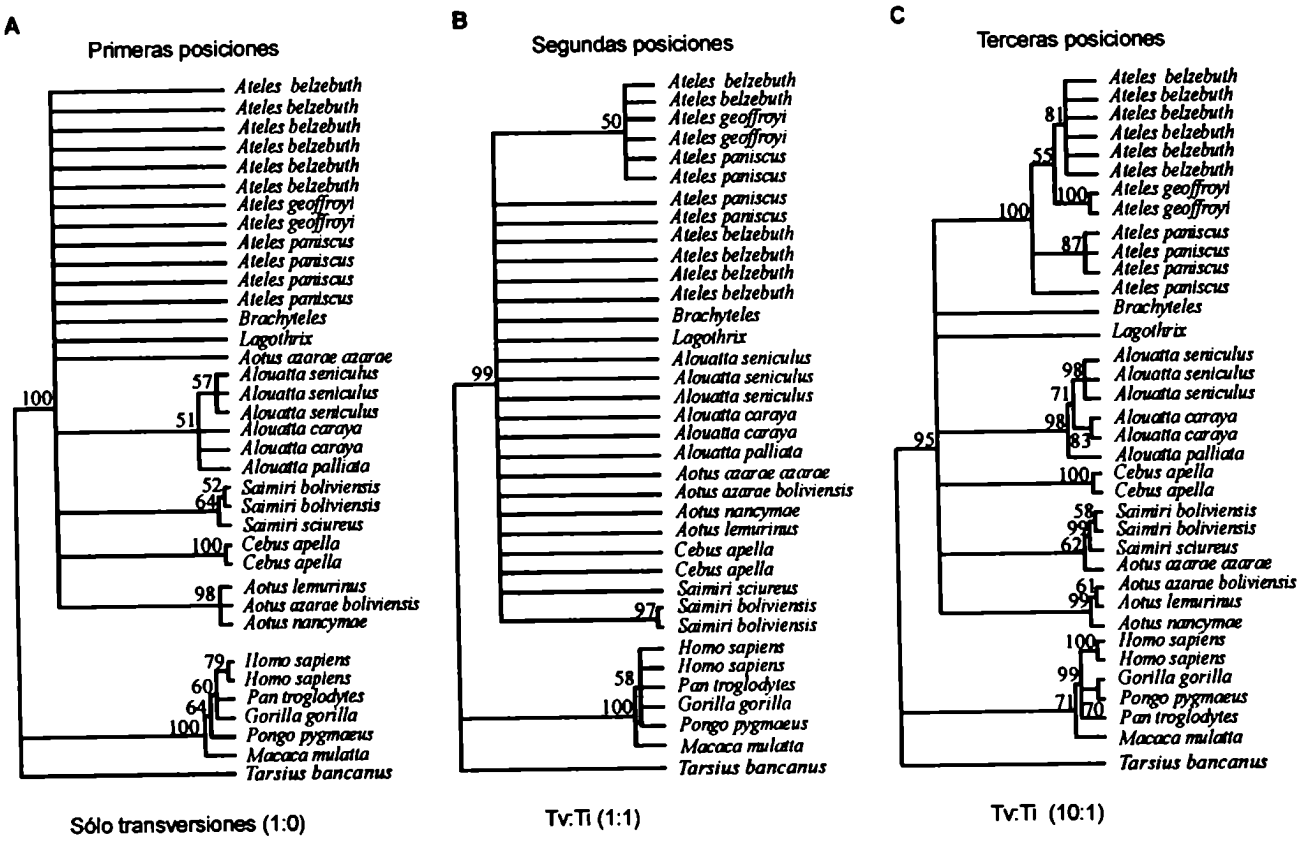


Figura 19. Árboles consenso de la mayoría (50%) obtenidos para (A) primera, (B) segunda y (C) tercera posición del codón. Los números indican los valores de `bootstrap´ luego de 1000 réplicas.

Considerando todas las posiciones del codón, el análisis de parsimonia se realizó empleando los mismos esquemas de pesado tv:ti (1:1; 10:1; 1:0), mientras que el fenograma se obtuvo según el modelo de 2 parámetros (Kimura, 1980) (Figura 20). Los árboles consenso de parsimonia mostraron topologías similares, con diferencias en los valores de 'bootstrap' en cada nodo. En la Figura 20 se muestra el árbol en base al esquema de pesado 10:1.

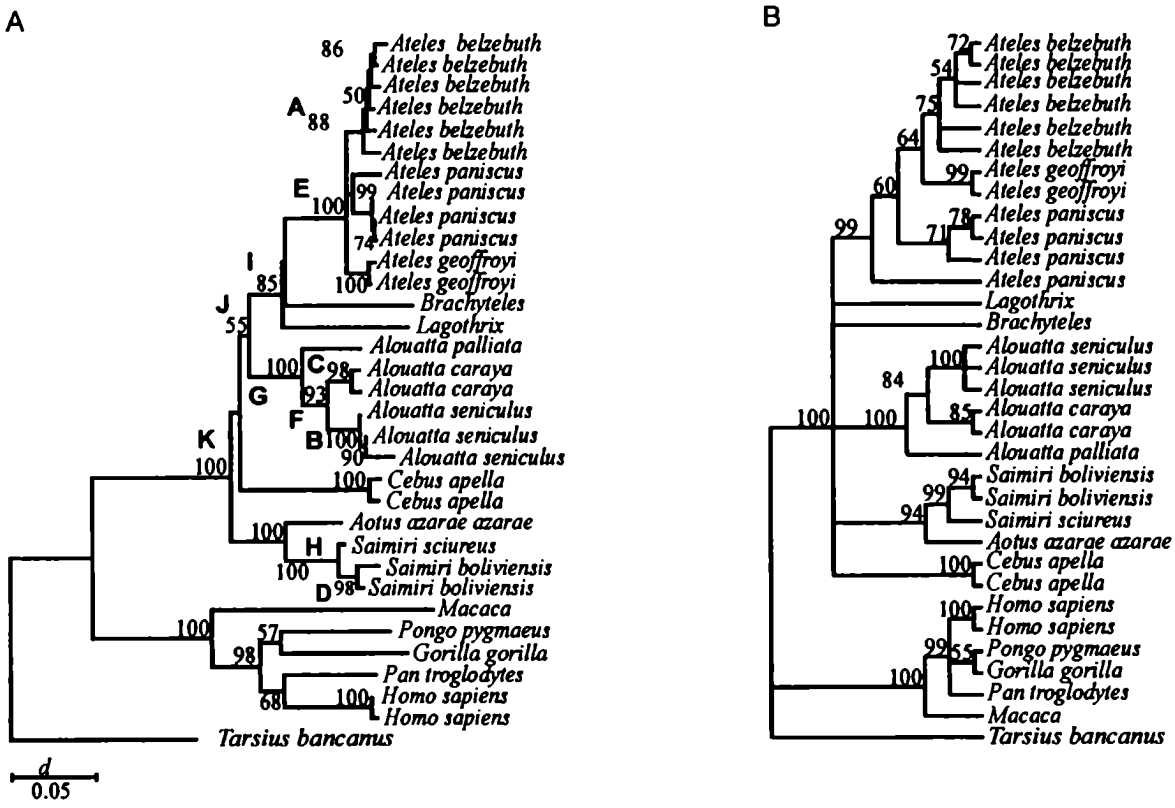


Figura 20. Reconstrucciones filogenéticas empleando la secuncia de *Tarsius bancanus* para enraizar el árbol. (A) Árbol de Neighbor-Joining y (B) Árbol de parsimonia obtenido con el esquema de pesado tv:ti 10:1. Los números indican los valores de bootstrap y las letras corresponden a los nodos referidos en la Tabla 19.

En la Figura 20 y la Tabla 16 se comparan el efecto de los distintos esquemas de pesado en el análisis de parsimonia y en el árbol de NJ considerando los valores de 'bootstrap' para nodos a nivel: intraespecífico, interspecífico e intergenérico. Los valores de 'bootstrap' disminuyen rápidamente por arriba del nivel de género y en general el árbol de NJ mostró mayores valores de 'bootstrap' para los nodos analizados (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de 'bootstrap' en los análisis de parsimonia y NJ

		Esquema de pesado (tv:ti)			
Nivel taxonómico	Nodo [a]	1:1	10:1	1:0	NJ
Intraespecífico	A	65	74	73	88
	B	99	100	100	100
	C	84	84	83	98
	D	95	94	88	98
Interespecífico	E	99	99	98	100
	F	85	83	83	93
	G	98	100	99	100
	H	100	99	100	100
Intergenérico	I	52	NC	53	85
	J	NC	NC	NC	55
Platirrinos	K	100	100	100	100

[a] Letra de los nodos referidos en la Figura 38 A

NC: valores de 'bootstrap' menores al 50%

5. Tasas evolutivas

Para evaluar la constancia del reloj molecular en algunos géneros de platirrinos se realizó un análisis de tasas relativas (Tajima, 1993) (Tablas 17, 18, 19 y 20). En las comparaciones entre platirrinos, *Homo sapiens* fue empleado como grupo externo. En algunas comparaciones también se emplearon otros géneros de catarrinos como grupos externos y si bien los valores de significación del χ^2 variaban mostrando la dependencia del test del grupo externo (Tajima, 1993), la tendencia se mantuvo. Entre platirrinos y catarrinos el grupo externo fue *Lemur*.

Ninguna de las comparaciones incluidas en el estudio mostró diferencias significativas en las primeras y segundas posiciones del codón (datos no mostrados). Sin embargo, en las terceras posiciones algunos tests mostraron diferencias significativas en la tasa de sustitución que constituían transiciones o transversiones (Tablas 17, 18, 19 y 20).

Tabla 17. Análisis de tasas relativas en platirrinos y antropoideos en general

Taxa			Todas las posiciones				Terceras posiciones										Sitios 4 veces degenerados			
							Todas las sustituciones						Transiciones		Transversiones					
1	*2*	*3*	m_1	m_2	1D	p	m_1 (s_1, v_1)	m_2 (s_2, v_2)	1D	p	2D	p	1D, ti	p	1D, tv	p	m_1	m_2	1D	p
Alouatta	*Ateles*	*Homo*	34	41	0.65	0.419	29 (26, 3)	32 (28, 5)	0.26	0.611	0.57	0.75	0.07	0.785	0.5	0.48	7	13	1.19	0.275
Alouatta	*Lagothrix*	*Homo*	39	32	0.69	0.406	34 (29, 5)	25 (18, 7)	1.37	0.241	2.91	0.234	2.57	0.109	0.33	0.564	11	8	0.47	0.491
Alouatta	*Cebus*	*Homo*	32	42	1.35	0.245	25 (17, 8)	33 (28, 5)	1.1	0.294	3.38	0.184	2.69	0.101	0.69	0.405	10	7	0.53	0.467
Alouatta	*Saimiri*	*Homo*	49	33	3.12	0.077	38 (29, 9)	21 (19, 2)	4.9*	0.027	6.54*	0.038	2.08	0.149	4.45*	0.035	4	15	5*	0.025
Ateles	*Lagothrix*	*Homo*	39	25	3.06	0.08	32 (25, 7)	19 (15, 4)	3.31	0.069	3.32	0.190	2.5	0.114	0.82	0.366	12	4	4*	0.046
Ateles	*Cebus*	*Homo*	41	45	0.19	0.666	30 (21, 9)	34 (28, 6)	0.25	0.617	1.6	0.449	1	0.317	0.6	0.439	13	5	3.56	0.059
Ateles	*Saimiri*	*Homo*	60	37	5.45*	0.02	45 (35, 10)	24 (23, 1)	6.39*	0.011	9.85**	0.007	2.48	0.115	7.36**	0.007	17	2	11.84**	0.001
Ateles	*Aotus*	*Homo*	47	35	1.76	0.185	38 (30, 8)	27 (26,1)	1.86	0.172	5.73	0.057	0.29	0.593	5.44*	0.02	13	4	4.76*	0.029
Lagothrix	*Cebus*	*Homo*	41	59	3.24	0.072	29 (21, 8)	46 (37, 9)	3.85*	0.05	4.47	0.107	4.41*	0.036	0.06	0.808	11	11	0	1
Lagothrix	*Saimiri*	*Homo*	49	40	0.91	0.34	35 (26, 9)	27 (26, 1)	1.03	0.31	6.4*	0.041	0	1	6.4*	0.011	13	6	2.58	0.108
Lagothrix	*Aotus*	*Homo*	41	43	0.05	0.827	32 (25, 7)	34 (29, 5)	0.06	0.806	0.63	0.73	0.3	0.586	0.33	0.564	10	9	0.05	0.819
Brachyteles	*Saimiri*	*Homo*	64	40	5.54	0.019	43 (30, 13)	23 (19, 4)	6.06*	0.014	7.23*	0.027	2.47	0.116	4.76*	0.029	13	4	4.76*	0.029
Brachyteles	*Cebus*	*Homo*	40	43	0.11	0.742	27 (18, 9)	32 (26, 6)	0.42	0.515	2.05	0.358	1.45	0.228	0.6	0.439	8	6	0.29	0.593
Brachyteles	*Aotus*	*Homo*	53	40	1.82	0.178	39 (28, 11)	29 (25, 4)	1.47	0.225	3.44	0.179	0.17	0.68	3.27	0.071	9	6	0.6	0.439
Cebus	*Saimiri*	*Homo*	54	27	9**	0.003	39 (29, 10)	14 (10, 4)	11.79**	0.001	11.83**	0.003	9.26**	0.002	2.57	0.109	12	5	2.88	0.09
Cebus	*Aotus*	*Homo*	47	31	3.28	0.07	36 (28, 8)	21 (17, 4)	3.95*	0.047	4.02	0.134	2.69	0.101	1.33	0.248	8	7	0.07	0.796
Saimiri	*Aotus*	*Homo*	19	30	2.47	0.116	9 (6, 3)	19 (14, 5)	3.57	0.059	3.7	0.157	3.2	0.074	0.5	0.48	2	8	3.6	0.058
Alouatta	*Homo*	*Lemur*	68	86	2.1	0.147	32 (20, 12)	54 (37, 7)	5.63*	0.018	5.93	0.052	5.07*	0.024	0.86	0.353	5	15	5*	0.025
Alouatta	*Macaca*	*Lemur*	74	94	2.38	0.123	34 (22, 12)	48 (28, 20)	2.39	0.122	2.72	0.257	0.72	0.396	2	0.157	7	13	1.8	0.18
Ateles	*Homo*	*Lemur*	67	89	3.1	0.078	30 (19, 11)	55 (34, 21)	7.35**	0.007	7.37*	0.025	4.25*	0.039	3.13*	0.077	5	17	6.55*	0.011
Ateles	*Pongo*	*Lemur*	71	86	1.43	0.231	32 (23, 9)	53 (29, 24)	5.19*	0.023	7.51*	0.023	0.69	0.405	6.82**	0.009	7	19	5.54*	0.019
Lagothrix	*Homo*	*Lemur*	65	85	2.67	0.102	32 (16, 16)	48 (27, 21)	3.2	0.074	0.68	0.411	3.49	0.175	2.81	0.093	7	9	0.25	0.617
Brachyteles	*Homo*	*Lemur*	71	89	2.02	0.155	34 (21, 13)	55 (34, 21)	4.96*	0.026	1.88	0.17	4.96	0.084	3.07	0.08	5	14	4.26*	0.039
Brachyteles	*Gorilla*	*Lemur*	80	91	0.71	0.4	38 (24, 14)	53 (30, 29)	2.47	0.116	2.19	0.139	2.86	0.24	0.67	0.414	7	14	2.33	0.127
Cebus	*Pan*	*Lemur*	82	79	0.06	0.813	42 (26, 16)	47 (31, 16)	0.28	0.596	0.44	0.803	0.44	0.508	0	1	7	10	0.53	0.467
Saimiri	*Macaca*	*Lemur*	82	86	0.1	0.758	39 (27, 12)	45 (26, 19)	0.43	0.513	1.6	0.449	0.02	0.891	1.58	0.209	10	13	0.39	0.532
Aotus	*Homo*	*Lemur*	71	74	0.06	0.803	33 (21, 12)	44 (29, 15)	1.57	0.21	1.61	0.446	1.28	0.258	0.33	0.564	5	9	1.14	0.285

* Significativo al nivel del 0.05 y ** significativo al nivel del 0.01.

En la Tabla 17, en la mayoría de las comparaciones donde el género *Saimiri* estaba involucrados se observó un bajo número de sustituciones únicas para este género, particularmente en las terceras posiciones de los codones y en los sitios 4 veces degenerados. A su vez, una tendencia similar se observó en las comparaciones de los sitios cuatro veces degenerados en las que estaban involucrados los géneros *Aotus* y *Cebus*, si bien las comparaciones significativas fueron pocas (Tabla 17). En las comparaciones entre *Cebus* y atélidos (*Ateles*, *Lagothrix*, *Brachyteles* y *Alouatta*), se observó un mayor número de sustituciones únicas totales y en las terceras posiciones, sin embargo en los sitios 4 veces degenerados éstas fueron menores (Tabla 17).

En las comparaciones entre platirrinos y catarrinos, se observaron dos tendencias (Tabla 17). En las comparaciones entre atélidos y catarrinos algunos valores de heterogeneidad fueron significativos, mientras que en las comparaciones entre cébidos y catarrinos no se observó este patrón (Tabla 17).

Las comparaciones dentro de la familia Atelidae (*Ateles*, *Lagothrix*, *Brachyteles* y *Alouatta*) empleando como grupo externo a *Homo sapiens*, no mostraron valores significativos, si bien se observó una tendencia a un menor número de sustituciones únicas en las comparaciones donde la especie *Alouatta caraya* se comparó con *Ateles* y *Brachyteles*, mientras que en las comparaciones de aulladores con *Lagothrix* todas las especies de aulladores mostraron un mayor número de sustituciones únicas (Tabla 18).

Tabla 18. Detalle del análisis de tasas relativas en las comparaciones del género *Alouatta* y otros géneros de monos platirrinos

Taxa		Todas las posiciones				Terceras posiciones										Sitios 4 veces degenerados			
		Todas las sustituciones				Todas las sustituciones						Transiciones		Transversiones					
1	*2*	m_1	m_2	1D	p	m_1 (s_1, v_1)	m_2 (s_2, v_2)	1D	p	2D	p	1D, ti	p	1D, tv	p	m_1	m_2	1D	p
Alouatta caraya 1	*Saimiri*	49	33	3.12	0.077	38 (29, 9)	21 (19, 2)	4.90*	0.027	6.54*	0.038	2.08	0.149	4.45*	0.035	15	4	5.00*	0.025
Alouatta caraya 1	*Ateles*	34	41	0.65	0.419	29 (26, 3)	32 (28, 5)	0.26	0.611	0.57	0.75	0.07	0.785	0.5	0.48	7	13	1.19	0.275
Alouatta caraya 2	*Ateles*	32	44	1.89	0.17	27 (24, 3)	36 (31, 5)	1.29	0.257	1.39	0.5	0.89	0.345	0.5	0.48	9	14	1.09	0.297
Alouatta seniculus	*Ateles*	35	34	0.01	0.95	29 (25, 4)	26 (22, 4)	0.16	0.7	0.19	0.9	0.19	0.66	0	1	9	14	0.2	0.655
Alouatta palliata	*Ateles*	32	35	0.13	0.71	28 (25, 3)	27 (24, 3)	0.02	0.89	0.02	0.9	0.02	0.886	0	1	10	11	0.05	0.827
Alouatta caraya 1	*Brachyteles*	39	47	0.74	0.388	31 (26, 5)	34 (26, 8)	0.14	0.71	0.69	0.7	0	1	0.69	0.4	10	11	0.05	0.827
Alouatta caraya 2	*Brachyteles*	34	47	2.09	0.149	26 (21, 5)	34 (26, 8)	1.07	0.302	1.22	0.542	0.53	0.466	0.69	0.4	9	10	0.05	0.819
Alouatta seniculus	*Brachyteles*	39	38	0.01	0.9	32 (26, 6)	27 (21, 6)	0.42	0.515	0.53	0.766	0.53	0.466	0	1	10	9	0.05	0.819
Alouatta palliata	*Brachyteles*	44	48	0.17	0.677	37 (32, 5)	35 (26, 9)	0.06	0.814	1.76	0.414	0.62	0.431	1.14	0.285	12	9	0.43	0.513
Alouatta caraya 1	*Lagothrix*	39	32	0.69	0.406	34 (29, 5)	25 (18, 7)	1.37	0.241	2.91	0.234	2.57	0.109	0.33	0.564	11	8	0.47	0.491
Alouatta caraya 2	*Lagothrix*	35	33	0.06	0.8	30 (25, 5)	26 (19, 7)	0.29	0.593	1.15	0.562	0.82	0.366	0.33	0.564	9	8	0.06	0.8
Alouatta seniculus	*Lagothrix*	42	30	2	0.157	36 (29, 7)	23 (17, 6)	2.86	0.091	3.21	0.2	3.13	0.077	0.08	0.782	12	8	0.8	0.371
Alouatta palliata	*Lagothrix*	43	32	1.61	0.2	37 (32, 5)	23 (19, 4)	3.27	0.07	3.42	0.18	3.31	0.069	0.11	0.739	12	7	1.32	0.251
Alouatta caraya 1	*Cebus*	32	42	1.35	0.245	25 (17, 8)	33 (28, 5)	1.1	0.294	3.38	0.184	2.69	0.101	0.69	0.405	10	7	0.53	0.467
Alouatta caraya 2	*Cebus*	30	47	3.75	0.053	24 (16, 8)	37 (31, 6)	2.77	0.096	5.07	0.079	4.79*	0.029	0.29	0.593	11	8	0.47	0.491
Alouatta seniculus	*Cebus*	29	35	0.56	0.453	22 (14, 8)	26 (22, 4)	0.33	0.564	3.11	0.211	1.78	0.182	1.33	0.248	12	7	1.32	0.251
Alouatta palliata	*Cebus*	33	40	0.67	0.413	26 (18, 8)	29 (25, 4)	0.16	0.686	2.47	0.29	1.14	0.286	1.33	0.248	14	7	2.33	0.127

Nota: En todas las comparaciones *Homo sapiens* (AF181091) fue el grupo externo. * Significativo al nivel del 0.05 y ** significativo al nivel del 0.01.

Tabla 19. Detalle del análisis de tasas relativas en las comparaciones dentro del género *Alouatta*

Taxa [1]			Todas las posiciones				Terceras posiciones												Sitios 4 veces degenerados			
							Todas las sustituciones								Ti		Tv					
2	1	3	m_1	m_2	1D	p	m_1	(s_1,v_1)	m_2	(s_2,v_2)	1D	p	2D	p	ti	p	tv	p	m_1	m_2	1D	p
ASE 2	ASE 1	ACA 1	1	1	6.40	0.011	2	(2,0)	0	(0,0)	2	0.157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASE 3	ASE 1	ACA 1	2	1	0.33	0.564	2	(2,0)	0	(0,0)	2	0.157	-	-	2	0.157	-	-	1	0	1	0.317
ASE 3	ASE 2	ACA 1	2	9	4.45*	0.035	2	(2,0)	2	(0,2)	0.0	1	4	0.135	2	0.157	2	0.157	1	0	1	0.317
ACA 1	ASE 1	ABE	8	9	0.06	0.8	8	(8,0)	7	(6,1)	0.07	0.796	1.29	0.526	0.29	0.593	1	0.317	3	3	0	1
ACA 2	ASE 1	ABE	12	12	0.00	1	12	(12,0)	11	(9,2)	0.04	0.835	2.43	0.297	0.43	0.513	2	0.157	4	4	0	1
ACA 1	APL	ABE	20	14	1.06	0.303	18	(18,0)	13	(13,0)	0.81	0.369	-	-	0.81	0.369	-	-	5	4	0.11	0.739
ACA 2	APL	ABE	23	17	0.9	0.343	21	(21,0)	16	(16,0)	0.68	0.411			0.68	0.411			6	5	0.09	0.763
ASE 1	APL	ABE	24	16	1.6	0.2	20	(20,0)	15	(15,0)	0.71	0.398			0.71	0.398			6	5	0.09	0.763
ACA 1	ACA 2	ASE 1	0	7	7.00**	0.008	0	(0,0)	7	(7,0)	7.00**	0.008			7.00**	0.008			0	1	1	0.317
ACA 1	ACA 2	APL	1	7	4.50*	0.034	1	(1,0)	7	(7,0)	4.50*	0.034	-	-	4.50*	0.034	-	-	0	2	2	0.157

[1] Taxa: ACA *Alouatta caraya*: ACA 1 (AF181086)-ACA 2 (AF396459); ABE *Ateles belzebuth* (AF377897); ASE *Alouatta seniculus*, ASE 1 (AF054293), ASE 2 (AF054299) y ASE 3 (AF054291), APL *Alouatta palliata* (L22774)
El guión - indica datos insuficientes para el análisis. Significación al nivel 0.05 *; y a nivel 0.01 **.

Al comparar las distintas especies de aulladores entre sí con *Ateles belzebuth* como grupo externo, *Alouatta palliata* mostró el menor número de sustituciones únicas, siendo las diferencias no significativas (Tabla 19). Cuando se compararon entre sí las secuencias de *Alouatta caraya* empleando como grupo externo las otras especies de aulladores, ACA1 (correspondiente al linaje A para la región control, ver Capítulo IV) mostró un menor número de sustituciones únicas respecto del ejemplar ACA2 (correspondiente al linaje B para la región control). Estos resultados muestran que si bien dentro de la especie *Alouatta caraya* podría haber diferencias en las tasas relativas de sustitución nucleotídica, *A. caraya* como especie no mostraría tasas de sustitución nucleotídica a nivel del ADN mitocondrial diferentes respecto de las otras especies de aulladores (Tabla 19).

Teniendo en cuenta en *Saimiri*, la observación de un menor número de sustituciones únicas, se consideró ampliar el análisis a todos los ejemplares de *Saimiri* analizados en este trabajo (Tabla 20). El detalle de este análisis confirmó la tendencia observada en un principio indicando que todos los ejemplares de *Saimiri* incluidos en este estudio presentarían un menor número de sustituciones únicas (Tabla 20). Por ejemplo, para los sitios 4 veces degenerados, todas las comparaciones de *Saimiri* con *Ateles belzebuth* fueron significativas (Tabla 20). En la comparación con especies cercanas filogenéticamente se mantuvo esa tendencia, ya que por ejemplo con *Cebus*, 10 de las 18 comparaciones fueron significativas (Tabla 20).

Tabla 20. Detalle del análisis de tasas relativas en las comparaciones del género *Saimiri* con otros géneros de platirrinos

Taxa [1]		Todas las posiciones				Terceras posiciones										Sitios 4 veces degenerados			
						Todas las sustituciones						Ti		Tv					
1	2	m_1	m_2	1D	p	m_1 (s_1,v_1)	m_2 (s_2,v_2)	1D	p	2D	p	ti	p	tv	p	m_1	m_2		p
ACA	SBO1	49	33	3.12	0.077	38 (29,9)	21 (19,2)	4.9*	0.027	6.54*	0.038	2.08	0.149	4.45*	0.035	15	4	5*	0.025
ACA	SBO2	43	33	1.32	0.251	35 (28,7)	22 (19,3)	2.96	0.085	3.32	0.19	1.72	0.189	1.6	0.206	13	5	3.56	0.059
ACA	SSC	43	37	0.45	0.502	33 (26,7)	25 (22,3)	1.10	0.294	1.93	0.380	0.33	0.564	1.6	0.206	13	6	2.58	0.108
ABE	SBO1	60	37	5.45*	0.02	45 (35,10)	24 (23,1)	6.39*	0.011	9.85**	0.007	2.48	0.115	7.36**	0.007	17	2	11.84**	0.001
ABE	SBO2	54	37	3.18	0.075	42 (34,8)	25 (23,2)	4.31*	0.038	5.72	0.057	2.12	0.145	3.6	0.058	15	2	9.94**	0.002
ABE	SSC	51	39	1.6	0.2	38 (31,7)	27 (24,3)	1.86	0.172	2.49	0.288	0.89	0.345	1.6	0.206	13	2	8.07**	0.005
LLA	SBO1	49	40	0.91	0.34	35 (26,9)	27 (26,1)	1.03	0.31	6.4*	0.041	0	1	6.4*	0.011	13	6	2.58	0.108
LLA	SBO2	45	42	0.1	0.748	34 (26,8)	30 (27,3)	0.25	0.617	2.29	0.318	0.02	0.891	2.27	0.132	12	7	1.32	0.251
LLA	SSC	46	47	0.01	0.917	33 (26,7)	34 (28,6)	0.01	0.903	0.15	0.927	0.07	0.785	0.08	0.782	11	8	0.47	0.491
CAN	SBO1	54	27	9**	0.003	39 (29,10)	14 (10,4)	11.7**	0.001	11.8**	0.003	9.26**	0.002	2.57	0.109	12	5	2.88	0.09
CAN	SBO2	50	29	5.58*	0.018	37 (28,9)	16 (10,6)	8.32**	0.004	9.13*	0.01	8.5**	0.004	0.6	0.439	11	6	1.47	0.225
CAN	SSC	54	37	3.18	0.075	36 (27,9)	20 (12,8)	4.57*	0.033	5.08	0.054	5.77*	0.016	0.06	0.808	11	7	0.89	0.346
AAZ	SBO1	30	19	2.47	0.116	19 (14,5)	9 (6,3)	3.57	0.059	3.7	0.157	3.2	0.074	0.5	0.48	8	2	3.6	0.058
AAZ	SBO2	26	21	0.53	0.446	17 (14,3)	11 (7,4)	1.29	0.257	2.48	0.29	2.33	0.127	0.14	0.705	7	3	1.6	0.206
AAZ	SSC	25	27	0.08	0.782	17 (14,3)	17 (12,5)	0	1	0.65	0.721	0.15	0.695	0.5	0.48	7	4	0.82	0.366

[1] Taxa: *Alouatta caraya* (ACA); *Ateles belzebuth* (ABE); *Lagothrix lagotricha* (LLA); *Cebus a. nigritus* (CAN); *Aotus a. azarae* (AAZ); *Saimiri boliviensis* de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia (SBO1); *Saimiri boliviensis* de procedencia desonocida (SBO2); *Saimiri sciureus* (SSC).
En todas las comparaciones Homo sapiens (AF181091) fue el grupo externo.
Significación al nivel 0.05 *; y a nivel 0.01 **.

IV. Discusión

1. Utilidad sistemática de COII

El gen COII en platirrinos mostró el típico sesgo en la composición, uso del codón, efecto en la posición del codón y saturación en las sustituciones (Punto 1). Particularmente, en la tercera posición del codón, el valor medio de Timina fue mayor en platirrinos que en catarrinos mientras que guanina mostró los menores valores incluyendo catarrinos y primates en general. Se observó una concordancia entre los valores observados para catarrinos y platirrinos sugiriendo que las diferencias se deben a la divergencia de ambos linajes (Adkins & Honeycutt, 1994).

El análisis de saturación mostró que en las terceras posiciones existe un cierto grado de saturación para las comparaciones intergenéricas e interfamiliares presentan saturación de las transiciones, un patrón concordante con lo observado en de otro gen mitocondrial (citocromo *b*) en primates (Yoder *et al.*, 1996).

A pesar de la saturación a nivel de las transiciones en la tercera posición del codón, se observó señal filogenética para todas y cada una de las posiciones del codón incluso entre taxa distantes (Tabla 15). A su vez, se observaron diferentes valores de g_1 en función del nivel taxonómico, por ej. la segunda posición del codón mostró valores mayores cuando fueron considerados todos los taxa mientras que las terceras posiciones mostraron valores mayores en comparaciones a nivel intragenérico.

Los análisis de parsimonia realizados con datos correspondientes a cada una de las posiciones del codón mostraron que las terceras posiciones daban árboles con mayor resolución (Figura 19 C). Mientras que cuando se analizaban sólo las primeras y segundas posiciones, la mayoría de los taxa estaban involucrados en una politomía (Figura 19 A y B). Esta pérdida general de resolución demuestra que las terceras posiciones contienen

información filogenética. En este sentido, el árbol de parsimonia considerando las terceras posiciones y empleando el esquema de pesado tv:ti 10:1 (Figura 19 C) mostró una topología similar al árbol de parsimonia considerando todas las posiciones y el mismo esquema de pesado (Figura 20 C). Esta similitud podría reflejar restricciones funcionales que operan en la secuencia aminoacídica dado que mientras todas las sustituciones en las segundas posiciones significan un reemplazo de aminoácido, sólo el 30% de las sustituciones en las terceras posiciones producen un reemplazo (Graur & Li, 2000). De esta manera, las tasas de evolución en las terceras posiciones, que presentan menores restricciones funcionales, serán mayores y más susceptibles de cambios homoplásicos que las primeras y segundas posiciones. Estos resultados indican que en platirrinos cualquier análisis filogenético que emplee el gen COII como marcador molecular y excluya las terceras posiciones del análisis ignoraría la mayor parte de la información filogenética del conjunto de datos. Observaciones similares se han informado en otros estudios tanto para genes mitocondriales como nucleares (Cao *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 1995; Zardoya & Meyer, 1996).

Estos resultados muestran que el gen COII es útil para el estudio de las relaciones evolutivas a nivel intragenérico en platirrinos. En un rango taxonómico superior de análisis otros genes constituirían una mejor opción tales como ε-globin, γ-globin o IRBP intron 1 (Schneider *et al.*, 1993, 1996; Harada *et al.*, 1995; Meireles *et al.*, 1999a).

Alouatta

El género *Alouatta* presenta una de las mayores distribuciones geográficas entre los primates neotropicales extendiéndose desde el el sur de México hasta el norte de Argentina y ocupando un amplio rango de ambientes (*e.g.*, Eisenberg, 1979; Crockett & Eisenberg, 1987; Rylands *et al.*, 2001) (Figura 21). Como la mayoría de los primates platirrinos, la clasificación de *Alouatta* está en discusión, la última propuesta sistemática incluiría 9 especies: *A. seniculus*, *A. sara*, *A. nigerrima*, *A. belzebul*, *A. guariba*, *A. palliata*, *A. coibensis*, *A. pigra* y *A. caraya* (Rylands *et al.*, 2000).

Estudios moleculares basados en el pseudogene de la globina γ^1 consideraron el grupo `seniculus´, formado por las especies *A. seniculus*, *A. fusca* y *A. belzebul* que estarían cercanamente relacionadas entre sí y diferenciadas de *A. caraya* (Meireles *et al.*, 1999a, 1999b). Sin embargo, recientes trabajos considerando genes mitocondriales y nucleares, coinciden en agrupar a *A. caraya* junto con *A. seniculus*, mientras que *A. fusca* y *A. belzebul* formarían un grupo monofilético (Bonvicino *et al.*, 2001; Cortés-Ortiz *et al.*, 2002). Si bien en este trabajo no se analizaron todas las especies del género, los resultados obtenidos mostraron un agrupamiento que incluye a *A. caraya* y *A. seniculus*, mientras que *A. palliata* apareció más distante en concordancia con estudios previos moleculares, morfológicos, cromosómicos y de distribución geográfica (Hershkovitz 1949; Hill 1962; Bonvicino *et al.*, 2001; Solari *et al.*; 2002; Cortés-Ortiz *et al.*, 2002).

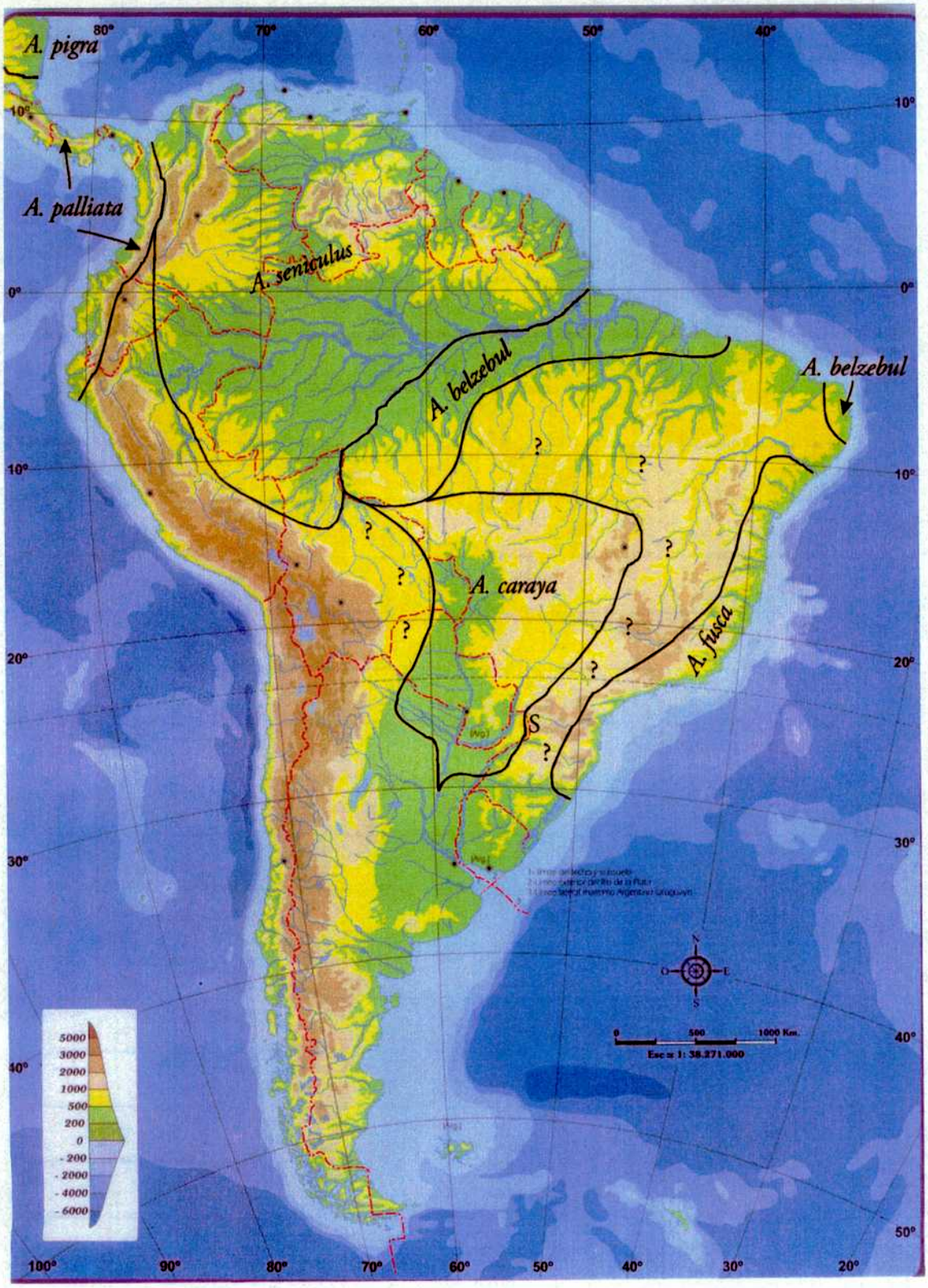


Figura 21. Límites de las distribuciones de las especies del género *Alouatta* consideradas por Hill (1962) en base a Pope (1966), Wolfheim (1983), Hirsch *et al.* (1991), Crockett (1998), y Cortés-Ortiz *et al.* (2002). Los signos de preguna (?) indican distribución dudosa, S representa una probable zona de simpatría entre *A. caraya* y *A. fusca*.

Saimiri

La sistemática del género *Saimiri* es sumamente controvertida, algunos autores lo consideraron formado por una única especie *Saimiri sciureus* mientras que otros describieron en *Saimiri* hasta 7 especies y 17 especies y subespecies (*e.g.*, Rylands *et al.*, 2000). El género, presenta una distribución disyunta que incluye un área en la zona oeste de Panamá y Costa Rica en América Central, y luego un área continua del otro lado de los Andes que abarca el macizo amazónico extendiéndose a las Guyanas, norte de Paraguay, Perú y Bolivia (Hershkovitz, 1984) (Figura 22). Hershkovitz (1984) hizo una revisión del género analizando caracteres morfológicos, cariotípicos, comportamentales y biogeográficos, proponiendo la existencia de 4 especies: *Saimiri oerstedii*, *S. sciureus*, *S. ustus* y *S. boliviensis*. Sin embargo, en base a esas mismas características otros autores difirieron de la propuesta de Hershkovitz (1984) considerando sólo dos especies *Saimiri sciureus* y *Saimiri oerstedii* (Costello *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en base a COII muestran que *Saimiri boliviensis* y *S. sciureus* han alcanzado un grado de divergencia del orden de lo observado para otras especies de platirrinos apoyando la propuesta de Hershkovitz (1984) que las consideró como especies completas. A su vez, otros estudios moleculares usando la secuencia del citocromo *b* también apoyaron la propuesta de Herskovitz (1984) (Boinski & Cropp 1999).

Cebus

La taxonomía del género *Cebus* es controvertida debido al amplio rango de variación fenotípica y comportamental, y la distribución geográfica, entre otros (Torres, 1988). El género se extiende desde Honduras hasta el Paraguay y norte de Argentina (Emmons, 1990) (Figura 23). Tradicionalmente, la mayoría de los autores concordaban en definir cuatro especies dentro del género, separadas en dos grupos: (a) grupo sin copete, mechón o "tuff", en el cual se incluye a *Cebus capucinus, C. albifrons* y *C. nigrivitatus*; y (b) grupo con copete, donde únicamente se ubicaría a *Cebus apella*.(Mittermeier & Coimbra Filho, 1981). Recientemente, se describieron un total de 7 especies y 32 subespecies, sin existir un acuerdo

general en cuanto a esta taxonomía, debido en parte a la falta de un estudio que analice al género en su totalidad (*e.g.*, Rylands *et al.*, 2001). *Cebus apella* es la especie de mayor distribución en los platirrinos y no existe un acuerdo acerca del número de subespecies que la componen. Algunos autores han descripto 5 (Kinzey, 1980), 11 (Napier & Napier, 1967), y hasta 16 subespecies (Hill, 1960). En su distribución marginal sur han sido descriptas 3 subespecies de *Cebus apella: C. a. pallidus* en Bolivia, *C. a. paraguayanus*, en Paraguay y en Argentina donde habita las selvas y bosques montanos en el NO (provincias de Salta y Jujuy) entre los 300 y 1700 m. sobre el nivel del mar; y *C. a. nigritus* en el SE de Brasil y en Argentina en la selva paranaense (provincia de Misiones) entre los 200 y 400 m. sobre el nivel del mar (*e.g.*, Crespo, 1950, 1974; Cabrera, 1957; Kinzey, 1979; Brown, 1984). A pesar de la gran controversia de sistemática en este grupo, en base a la información actualmente disponible, los resultados obtenidos en este trabajo son los únicos datos moleculares que comparan las 2 subespecies de *Cebus apella*: *C. a. paraguayanus* y *C. a. nigritus*. La diferenciación genética estimada en base a la secuencia del gen COII sugeriría una divergencia reciente de estas dos subespecies, probablemente asociado a eventos biogeográficos de expansión del rango de distribución de la especie hacia al sur luego de las glaciaciones del Pleistoceno hace unos 10.000 años (ver Capítulo VI). Sin embargo, un estudio que incluya un mayor número de individuos se hace necesario para analizar esta propuesta biogeográfica. A su vez, los resultados obtenidos concuerdan con observaciones a nivel morfológico y cariotípico de estas dos subespecies que describieron la presencia de un patrón diferencial en la distribución de la heterocromatina como así también en la coloración del pelaje (*e.g.*, Mudry, 1990; Ponsà *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 2002).

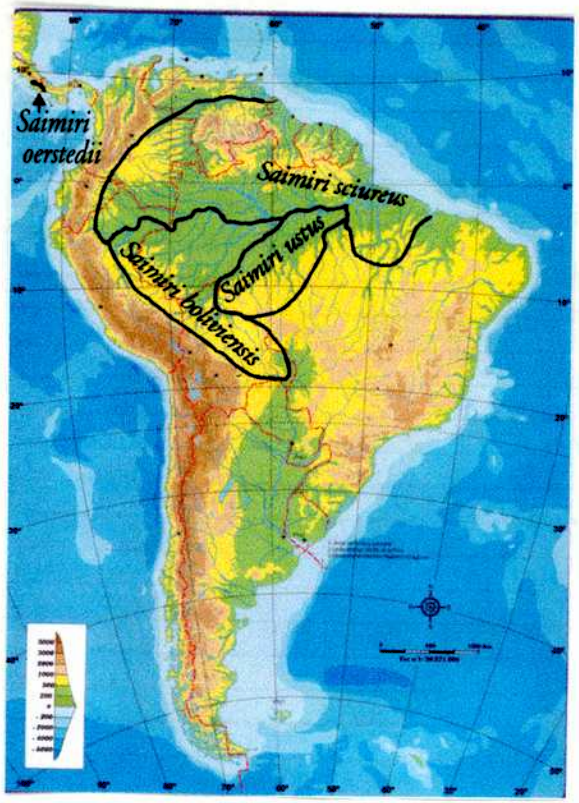


Figura 22. Mapa de distribución del género *Saimiri* en base a Hershkovitz (1984), Costello *et al.* (1993) y Boinski (1999).

Figura 23. Límites de la distribución de las dos subespecies de *Cebus apella* analizadas. En base a Hershkovitz (1949), Hill (1962), Mittermeier & Coimbra-Filho (1981), Kinzey (1982), Eisenberg (1989), y Groves (1993).

3. Tasas de evolución molecular

La teoría del reloj molecular postulaba originalmente que la tasa de evolución de una dada proteína (ahora también los genes) es aproximadamente constante a lo largo del tiempo en todos los linajes (Zuckerkandl & Pauling, 1965). Sin embargo, esta hipótesis ha sido muy controvertida desde su postulación, y actualmente tiene un variado grado de aceptación. Por un lado, Ochman & Wilson (1987) sugirieron la existencia de un reloj universal de sustituciones sinónimas aplicable a todos los organismos, mientras que un gran número de evidencias postulan que las tasas de evolución (sinónimas y no sinónimas) varían en los distintos grupos de organismos (*e.g.*, Goodman, 1981; Mindell *et al.*, 1996; Gary & Stanley, 1998). Entre los factores que permiten explicar los desvíos del reloj molecular está la selección natural, y también los factores intrínsecos de linajes como por ejemplo diferencias en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN (Britten, 1986) y en las tasas metabólicas (Martín *et al.*, 1992; Martin & Palumbi, 1993; Martin, 1995; Bromham *et al.*, 1996).

Los efectos de linaje incluyen el efecto del tiempo generacional que considera que los organismos con tiempos generacionales más cortos tendrán un mayor número de divisiones en las células germinales por unidad de tiempo, y por lo tanto, una mayor tasa de mutación que los organismos grandes (Kimura, 1970; Kohne, 1970). Esto supone que la mayoría de las mutaciones son el resultado de errores durante la replicación del ADN, que el número de células germinales en división son aproximadamente similares por generación y que la mayoría de las mutaciones son neutras (Kimura, 1970). Bajo un modelo de evolución de variantes neutras, Kimura (1970, 1983) demostró que la tasa de sustitución dependerá de la tasa de mutación (μ) y el tiempo generacional (g): $k = \mu/g$. De esta manera el reloj molecular se ajustaría a los tiempos generacionales (Kimura, 1970; Kohne, 1970).

Entre los ejemplos clásicos de efectos de linaje sobre la tasa de evolución molecular, se puede citar las comparaciones entre roedores como ejemplo de organismos con tiempos generacionales cortos *vs* primates como ejemplo de organismos con tiempos generacionales largos. En su comparación se observó que las tasas de sustitución sinónima fueron 2,6 veces mayores en roedores que en primates, ajustándose al modelo de tiempos generacionales (Ohta, 1995). Otro ejemplo clásico es el 'hominid slowdown' o desaceleración de la tasa de sustitución nucleotídica de sinónima en los humanos, que presenta tiempos generacionales mayores, comparativamente con los grandes monos (*Pan*, *Gorilla* y *Pongo*) y los monos del Viejo Mundo (cercopitecoideos) (Goodman, 1961, 1985; Chang *et al.*, 1994). Sin embargo, otros estudios que consideraron tanto genes nucleares como mitocondriales, han propuesto que no existirían diferencias entre el linaje de los humanos y otros primates y que en Primates, en general, el genoma como un todo evolucionaría a una tasa uniforme (Easteal, 1991). En cambio, Li *et al.* (1996) proveyeron nuevas evidencias que apoyan la hipótesis del efecto del tiempo generacional sobre las tasas evolutivas tanto en la comparación roedores *vs* primates, como humanos *vs* grandes monos, en concordancia con la propuesta original de Goodman (1961), dejando abierto el debate.

El concepto de que los tamaños poblacionales puedan afectar las tasas de evolución molecular deriva de la teoría casi neutral de la evolución que considera aquellas sustituciones que no son estrictamente neutras, sino levemente perjudiciales ('weakly selected o nearly neutral') (Ohta, 1972, 1996). Esta teoría considera que la evolución de las variantes levemente perjudiciales en las poblaciones va a estar directamente relacionada con el tamaño de las poblaciones, aquéllas con tamaños efectivos pequeños experimentarán tasas rápidas de evolución ya que la deriva genética será el proceso predominante mientras que en poblaciones con tamaños efectivos grandes será la selección la que afecte la evolución de las variantes levemente perjudiciales (Ohta, 1972, 1996).

En las poblaciones estructuradas en grupos sociales, la diferenciación genética estará determinada por el sistema de apareamiento, los patrones de dispersión y la formación de nuevos grupos (Storz, 1999). La influencia de la estructura social en la heterogeneidad de las tasas evolutivas, es un tema que no ha sido abordado exhaustivamente en la literatura. Hoelzer *et al.* (1998) analizaron mediante estudios de simulación cómo la estructuración de una población en grupos sociales filopátricos y poligínicos con una organización jerárquica en hembras y distintos niveles de migración, afectaban el tiempo medio de coalescencia de los haplotipos mitocondriales y la tasa de sustitución en el mtADN. Este estudio mostró que la jerarquía en hembras, si bien reduce el tamaño efectivo dentro de los grupos sociales, lo aumenta a nivel poblacional llevando a un aumento del tiempo de coalescencia para los haplotipos de las hembras de mayor jerarquía, esto a su vez reduce la tasa de sustitución en el ADN mitocondrial permitiendo la retención de polimorfismos por más tiempo afectando la constancia del reloj molecular (Hoelzer *et al.*, 1998).

3.1. Platirrinos vs catarrinos

Adkins & Honeycutt (1994) analizaron la tasa de sustitución aminoacídica para el gen COII en primates y encontraron tanto en catarrinos como en platirrinos que la tasa fue cerca del doble que la hallada en los otros grupos de primates. En este trabajo, las comparaciones entre platirrinos y catarrinos, mostraron dos tendencias, una caracterizada por la ausencia de diferencias significativas en las comparaciones entre cébidos (*Cebus*, *Saimiri* y *Aotus*) y catarrinos, y la otra por la presencia de diferencias significativas en algunas comparaciones entre atélidos (*Ateles*, *Brachyteles*, *Lagotrhix* y *Alouatta*) y catarrrinos (Tabla 16). La heterogeneidad entre atélidos y catarrinos también fue observada en otros estudios -si bien no se habían incluido todos los géneros de atélidos- mostrando un menor número de sustituciones únicas en atélidos, heterogeneidad que reflejaría una aceleración en la tasa de sustitución en

los catarrinos en concordancia con propuestas anteriores (Adkins & Honeycutt, 1994). La homogeneidad entre cébidos y catarrinos no fue analizada por otros autores, y podría reflejar el mantenimiento de estados ancestrales del linaje de los platirrinos que ocurrieron luego de la divergencia con catarrinos. Estos polimorfismos ancestrales del linaje de los platirrinos probablemente luego evolucionaron en los atélidos dando un menor número de sustituciones únicas en comparación con catarrinos debido a la homoplasia.

3.2. Platirrinos

Las comparaciones entre atélidos no mostraron valores significativos sugiriendo que los géneros presentan una tasa de sustitución homogénea (Tabla 17). Las especies de aulladores analizadas mostraron también una tasa homogénea de sustitución, sugiriendo que *Alouatta caraya*, como especie, no mostraría una diferencia significativa en la tasa de sustitución nucleotídica respecto de las otras especies de aulladores (Tabla 18). Asimismo, la comparación entre los ejemplares de *Alouatta caraya* mostró valores significativos pudiendo reflejar efectos de eventos demográficos particulares ocurridos diferencialmente en cada linaje mitocondrial (Tabal 18).

Saimiri

Un caso interesante fue el de *Saimiri* que mostró un bajo número de sustituciones únicas particularmente en las terceras posiciones de los codones y en los sitios 4 veces degenerados (Tabla 16 y 19). Considerando que las sustituciones en los sitios 4 veces degenerados no producen un cambio aminoacídico podrían considerarse selectivamente neutras, sin embargo actualmente se cuenta con evidencia (ej. sesgo en el uso del codón) que ha cambiado esa perspectiva. Si también, los cambios sinónimos podrían considerarse como sustituciones casi neutrales podrían ajustarse a un modelo de selección débil (Ohta, 1996;

Graur & Li, 2000). Si esto fuera así, se esperaría un uso diferencial de los codones en *Saimiri* en relación a los otros géneros de platirrinos. Para evaluar esta posibilidad, se estimó el sesgo del uso del codón para todos los géneros de platirrinos analizados en el presente trabajo, empleando varios índices: RSCU (Sharp *et al.*, 1986), ENC (Wright, 1990), CBI (Morton, 1993) y el análisis de χ^2 (Shields *et al.*, 1988). Se observó que el sesgo del codón en *Saimiri* fue similar al observado en el resto de los platirrinos por lo cual se descartó un posible proceso de selección débil en *Saimiri* como causa de la tasa de evolución heterogénea.

Una segunda propuesta para explicar la menor tasa de sustitución nucleotídica en *Saimiri* se basa en su tamaño corporal pequeño asociado a tiempos generacionales cortos y tamaños poblacionales grandes y también en características particulares de su organización social. El peso promedio en los ejemplares de *Saimiri sciureus* es de 635 gr para las hembras y 740 gr en machos mientras que en *Saimiri boliviensis* el peso en las hembras es de 751 gr y en los machos de 992 gr (Boinski, 1999). En relación al resto de los platirrinos, en *Saimiri* se observan los mayores tamaños de grupos que varían de 15 a 75 individuos por grupo y también se observan las mayores densidades poblacionales que van de 50 a 75 individuos/km^2 (Robinson & Janson, 1986; Boinski, 1999). *Cebus* también presenta grandes grupos sociales de 10 a 35 individuos y con densidades poblacionales de 5 a 40 individuos/km^2, con un peso corporal medio de 2,2 kg en hembras y 3,8 kg en machos (Robinson & Janson, 1986; Boinski, 1999). Siendo el único mono antropoide nocturno, *Aotus* no presenta dimorfismo sexual en cuanto al tamaño corporal ya que los machos tienen prácticamente el mismo peso que las hembras -e incluso en algunas especies levemente menor- mostrando valores entre 690 a 1232 gr según la especie (Fleagle, 1998). Vive en grupos familiares monógamos de 3 a 5 individuos que ocupan áreas de acción de 6 a 10 ha mostrando densidades entre 16 y 64 individuos/km^2 (Fleagle, 1998; Fernández-Duque *et al.*, 2001). Mientras que en *Saimiri* y *Cebus* el tiempo entre nacimientos es de 1 a 2 años, en *Aotus* es de 1 año, esta diferencia en la estrategia

reproductiva ha sido explicada en base a que *Aotus* presenta cuidado parental por parte del macho que reduciría el costo metabólico en las hembras permitiendo mantener cortos intervalos entre nacimientos (Garber & Leigh, 1997). Estas características demográficas y biológicas de los cébidos, difieren de las observadas en general en atélidos (*Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* y *Lagothrix*) donde se observan grupos de 4 a 40 individuos con densidades de 5 a 15 individuos/km^2 (Robinson & Janson, 1986; Rosenberger & Strier, 1989). Estos son valores promedio, ya que como se mencionó en la introducción, *Alouatta caraya* presenta densidades mayores en hábitats de selva de inundación (Zunino *et al.*, 2001) pudiéndose considerar como algo poco común entre los atélidos. Entre los platirrinos, los atélidos se caracterizan por presentar bajas tasas de reproducción debido a que se alcanza la madurez sexual a edades avanzadas entre los 4 años en *Alouatta* hasta los 8 años en *Lagothrix*, y con intervalos de nacimientos de 2 años para *Alouatta* hasta 3 años en *Ateles* (Glander, 1980; Milton, 1982, Robinson & Janson, 1986; Chapman & Chapman, 1990; Strier, 1996).

Bajo la hipótesis del tamaño corporal la expectativa es que *Saimiri* con tamaño corporal pequeño, mayor tasa reproductiva y tamaño poblacionales grandes tenga una mayor tasa de sustitución molecular, opuesto a los resultados observados. Si se considera el efecto de la estructuración social en *Saimiri* definida por matrilineas y más aún en *S. boliviensis* que se caracteriza por una marcada jerarquía en hembras (Boinski, 1999) y sumado a los grandes tamaños de grupo y poblacionales es posible proponer que la heterogeneidad en la tasa de sustitución observada en *Saimiri* se deba a la retención de estados plesiomórficos o ancestrales del mtADN.

Por otro lado, *Cebus* y *Aotus*, que tienen tamaños corporales medios no mostraron diferencias significativas en sus tasas de sustitución al compararlos con los atélidos, probablemente debido a que presentan tamaños de grupo y densidades poblacionales menores sumado a tipos diferentes de estructura social comparados con *Saimiri*.

Los primates como mamíferos de vida larga y socialmente complejos, constituyen modelos óptimos para observar los efectos del comportamiento y la demografía sobre la evolución de los grupos. En particular, la gran radiación adaptativa observada en los platirrinos permite considerar a cada género como un modelo particular para el estudio de procesos de divergencia a nivel de especies y poblaciones. En este trabajo se compararon dos familias de monos platirrinos Atelidae y Cebidae, analizándose los efectos de linaje en las tasas de evolución molecular. Los resultados obtenidos sugieren que la estructura social y las características demográficas representan factores que podrían influir en la tasa de evolución molecular a nivel mitocondrial en *Saimiri*. Asimismo se observó una tendencia similar en dos géneros cercanos filogenéticamente y con características demográficas similares como son *Cebus* y *Aotus*. Esto parece indicar que tanto las característica demográficas como de estructura social afectan la tasa de evolución molecular apoyando la hipótesis original de Bush *et al.* (1975) en una interpretación más amplia considerando la influencia de la estructura social sobre la diversidad genética de las poblaciones, pero no a nivel de mayor número de especies en el caso de *Saimiri*. Si bien, se hacen necesarios más estudios en cada uno de los géneros de platirrinos el aislamiento geográfico sería un factor determinante en la especiación de los platirrinos. De hecho, en base a estudios moleculares, se ha propuesto que la especiación en algunos géneros de platirrinos ocurrió como resultado de procesos vicariantes, incluyendo los refugios durante el Pleistoceno (Ashley & Vaughn, 1995), los eventos geológicos asociados a la elevación de los Andes (Collins & Dubach, 2000; Cortés-Ortiz *et al.*, 2002), y los ríos como barreras de aislamiento geográfico (Peres *et al.*, 1996). Si bien las características poblacionales y de estructuración social determinan la probabilidad de fijación de los cambios genéticos en general, los eventos contingentes habrían sido determinantes en la especiación en platirrinos.

3.3. *Alouatta caraya* como especie monotípica

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, *Alouatta caraya* presentaría una tasa de evolución molecular homogénea respecto del resto de los aulladores, dejando nuevamente planteada la controversia observada en *A. caraya* dada por su homogeneidad cromosómica y morfológica *vs* su amplia y diversa distribución geográfica. Si bien, hace falta una revisión exhaustiva de la especie abarcando toda su distribución, hay un consenso en considerarla una especie monotípica -junto con *A. pigra*- a diferencia de las otras de especies de aulladores caracterizadas como politípicas e incluso con un número variable de subespecies (*e.g.*, Rylands *et al.*, 2000). En particular el grupo 'seniculus' que forma un grupo monofilético con 'carayá' (Bonvicino *et al.*, 2001; Cortés-Ortiz *et al.*, 2002) presenta tanto una gran diversidad taxonómica con probablemente 2 especies y 7 subespecies -si bien aún su taxonomía esta en discusión (Rylands *et al.*, 2000)- como cariotípica con taxa que presentan 2N= 42 + 1-3 microcomosomas o 2n=46 + 1-3 microcromosomas (*e.g.*, Consiglieri *et al.*, 1998).

¿Por qué *A. caraya*, que presenta una de las distribuciones más amplias dentro del género *Alouatta*, es una especie monotípica tanto desde el aspecto morfológico como cariotípico? (*e.g.*, Mudry *et al.*, 1990; 1998; Hirsch *et al.*, 1991; de Olivera, 1996). La ausencia de variación morfológica se describió para los caracteres de color de pelaje y craneometría en ejemplares de Brasil, Bolivia, Paraguay y Argentina, mientras que la homogeneidad cariotípica analizada en base al número cromosómico y patrón de distribución de la heterocromatina fue descripta para ejemplares de Brasil, Paraguay y Argentina (*e.g.*, Mudry *et al.*, 1990; 1998; Hirsch *et al.*, 1991; de Olivera, 1996). Por otro lado, en ejemplares de distribución marginal sur en Argentina, a nivel de marcadores bioquímicos, se observó que de 15 loci analizados sólo 4 fueron polimórficos con un valor de heterocigosis (H = 0,05+/- 0,03) que estaría en el orden de los valores descriptos en la literatura para otros aulladores (Szapkievich, 2001).

A medida que aumentan los conocimientos acerca de los organismos, se observa que los modelos generales no se cumplen, y que cada grupo de organismo podría representar en sí un modelo con una historia y características biológicas propias. *Alouatta caraya* constituiría un modelo particular desde el punto de vista de la biología evolutiva donde predicciones que se cumplen en especies cercanas no se observan en `carayá´.

Capítulo IV

Variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya* en su distribución marginal sur

I. Introducción

El marco teórico de la biogeografía permite explicar las distribución de los taxa actuales en función de factores intrínsecos de la biología de los organismos como así también factores extrínsecos como cambios climáticos y eventos geológicos (Bermingham & Martín, 1998). Dentro de esta disciplina, la filogeografía analiza la distribución de los genotipos y su genealogía en espacio y tiempo, proponiendo patrones de diversificación de los organismos asociados a eventos históricos (Avise, 2000). El análisis e interpretación de estas genealogías requiere del aporte de evidencias provenientes de variadas disciplinas como la genética molecular o poblacional, la etología, la demografía, la paleontología, y la geología (Avise, 2000). De esta manera, la filogeografía provee un marco integrador para analizar los procesos evolutivos que incluyendo tanto procesos microevolutivos hasta macroevolutivos y su interacción (Avise, 2000).

Dentro de los procesos microevolutivos, la historia demográfica de las poblaciones tiene una gran importancia sobre los patrones filogeográficos debido a su impacto sobre la estructura de las genealogías o bien de la variación genética observada donde la teoría de la coalescencia provee el marco teórico para su análisis (Avise, 2000). La mayoría de las especies constituyen poblaciones estructuradas geográficamente, algunas de las cuales pueden tener o no contacto (flujo génico) por largos períodos de tiempo, también algunas pueden caracterizarse por presentar expansiones recientes de su áreas de distribución mostrando una gran conexión genealógica entre las poblaciones (Avise, 2000).

El marcador molecular más ampliamente usado en estudios filogeográficos desde hace más de 20 años ha sido el ADN mitocondrial si bien en la actualidad los microsatélites, como marcadores nucleares, permiten complementar los análisis mitocondriales (Avise, 2000). En particular, los análisis de mtADN en base a secuencias de evolución rápida como la región control (RC), han sido empleados en estudios poblacionales (*e.g.*, Vila *et al.*, 1997), mientras que regiones de evolución más lenta han sido usadas en estudios interspecíficos (*e.g.*, Bonvicino *et al.*, 2001).

En el GIBE, el estudio de la variabilidad genética en las poblaciones de distribución marginal sur en *Alouatta caraya* han sido analizado desde la citogenética y a través del empleo de marcadores bioquímicos. Los estudios citogenéticos mostraron que *Alouatta caraya* presenta un cariotipo estable con un número modal constante de 2n = 52 y bajo nivel de polimorfismos heterocromáticos que no estarían asociados a un origen geográfico determinado (*e.g.*, Mudry *et al.*, 1992). A partir de estudios de isoenzimas, incluyendo poblaciones de ambas márgenes del río Paraná, se observó una ausencia de estructuración geográfica de la variabilidad genética proponiendo que podría ser el resultado de un alto flujo génico entre las poblaciones o bien una divergencia reciente que no permitía detectar una diferenciación de las poblaciones (Szapkievich, 2001). Si bien estas son hipótesis apoyadas por los resultados obtenidos en esos estudios, también podría ocurrir existir estructuración genética y que los marcadores genéticos citados no presentaran suficiente variabilidad como para detectarla de modo que la ausencia de estructuración sería el resultado de una limitación metodológica. Por este motivo, el uso de un marcador más sensible como el ADN mitocondrial y en particular la región control (RC) del mtADN podría ser útil para analizar la estructuración genética en las poblaciones de distribución sur de esta especie.

En esta de Tesis se analiza la variabilidad nucleotídica mitocondrial en *Alouatta caraya* en la región marginal sur de su distribución. Considerando que la estructura genética

de una población es el resultado tanto de procesos actuales como pasados, la interpretación de los tiempos de coalescencia y tamaños efectivos poblacionales se realizó desde una perspectiva filogeográfica considerando los procesos biogeográficos que pudieron afectar la historia demográfica de las poblaciones de *Alouatta caraya*.

Cuando se analiza el ADN mitocondrial se debe considerar la herencia materna de este genoma y con ella las características etológicas de los organismos. En general, en muchos organismos se observan patrones de dispersión y flujo génico asimétricos en función del sexo. Cuando las hembras filopátricas se observaría que a lo largo del tiempo las poblaciones presentarían una estructuración geográfica de los linajes mitocondriales (matrilíneas) (Avise, 2000). A su vez, distintas combinaciones de flujo génico y dispersión según el sexo, darán en cada caso patrones particulares de estructuración de la variabilidad genética (Avise, 2000).

Si bien se considera que en los aulladores ambos sexos emigran del grupo natal (*e.g.*, Crockett & Eisenberg, 1987), también es sabido que su éxito y estrategia en ingresar a una nueva tropa varía dependiendo del sexo (*e.g.*, Crockett, 1984). En este sentido, el recambio de machos adultos incluso asociado a infanticidios está ampliamente documentado en aulladores (*e.g.*, Kowalewski *et al.*, 1995). Sin embargo, los estudios de incorporación de hembras a tropas establecidas sugieren que estos son muy aislados y no serían la regla general (*e.g.*, Rudran, 1979). A su vez, los estudios demográficos en aulladores citan numerosos casos de desaparición de hembras subadultas de una población que es la edad a la que emigran (*e.g.*, Crockett, 1984). En general se propone que, fuera de su grupo natal, una hembra sólo podría reproducirse en un nuevo grupo formando parte de las hembras fundadoras o bien formando una pareja con un macho solitario (*e.g.*, Pope, 1999). En *Alouatta seniculus*, según análisis genéticos de matrilíneas junto con datos detallados de demografía (migración, nacimientos, etc.) se observó que en tropas de formación reciente, los grupos estaban formados por hembras de distintas matrilíneas y al cabo de 20 años, se alcanzaba la fijación de sólo un

linaje materno en la tropa (Pope, 2000). Si bien en *Alouatta caraya* los estudios ecológicos indican que ambos sexos emigran (*e.g.*, Zunino, 1988), no hay estudios que analicen la relación de parentesco entre los machos y las hembras dentro los grupos. Por otro lado, en ambientes de tierra firme también se analizaron comportamientos jerárquicos en las hembras mediante la observación de comportamientos agonísticos entre hembras de una misma tropa, asimismo esta jerarquía fue asociada a una prioridad en el acceso a recursos alimentarios más beneficiosos y un mayor éxito reproductivo de las hembras de mayor rango (Zunino, 1986).

En base a estos conocimientos, en este estudio se puso a prueba la hipótesis de que la estructuración de la variabilidad genética en *Alouatta caraya* respondería a un patrón diferencial de flujo génico entre hembras y machos donde las hembras se caracterizarían por presentar comportamientos filopátricos. Retomando la hipótesis de Bush *et al.* (1977) en una interpretación más amplia, se discute el rol de las unidades sociales en la diferenciación genética de la población de "carayá" de una población que habita un ambiente de selva de inundación.

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En *Alouatta caraya*, el comportamiento filopátrico de las hembras determina la estructuración geográfica de la variabilidad mitocondrial.

Objetivos

1. Caracterizar la variabilidad genética en *A. caraya* de distribución marginal sur de empleando como marcador genético a la secuencia nucleotídica de la región control del ADN mitocondrial.

2. Analizar la estructuración geográfica de la variabilidad a nivel de la región control mitocondrial

3. Evaluar la influencia del patrón asimétrico de migración según los sexos en la estructuración de la variabilidad mitocondrial

4. Analizar el papel de los grupos sociales en la estructuración de la variabilidad mitocondrial en una población insular de *A. caraya*

5. Dilucidar los efectos de los eventos históricos sobre los patrones de estructuración genética

III. Resultados -Nivel regional

1. Características generales de la región control (RC) en *Alouatta caraya*

1.1. Descripción general

La RC es una secuencia no codificante, flanqueada por las secuencias del tARN ^{Pro} a la izquierda y el tARN ^{Phe} a la derecha (Figura 7, página: 30) por lo cual no se pueden inferir de manera directa sus límites. Por esa razón en el presente trabajo se realizó un análisis comparativo de las secuencias de 1200 -1266 pb obtenidas para 7 ejemplares de *Alouatta caraya* y otras especies de primates incluyendo un humano (*Homo sapiens*, Número de acceso al GenBank X93334, Arnason *et al.*, 1996) y dos especies de la familia Callitrichidae (*Cebuella pygmaea*, U89004, y *Callithrix penicellata*, U89010, Tagliaro *et al.*, 1997). En la Figura 23 se muestra el alineamiento de una de las secuencias de *Alouatta caraya* con las de los calitrícidos que son las que tienen mayor cercanía evolutiva. De esta manera, se pudo caracterizar la RC en *A. caraya* y delimitar la región central conservada (RCC) (Figura 24) que presentó desde un 75% a un 93% de similitud respecto de humano y los calitrícidos, respectivamente. A nivel intraespecífico, la RC completa de *A. caraya* presentó un tamaño que varió entre 1102 y 1104 pbs debido a 'indels' mientras que la RCC comprendió 228 pb y presentó únicamente 2 sitios variables.

Para los restantes 63 ejemplares se obtuvieron secuencias parciales de 743 - 800 pb a partir de las cuales se realizó un alineamiento que dio como resultado una matriz compuesta por 674 sitios que es la que se usó en los análisis posteriores.

La composición nucleotídica de la RC obtenida del análisis de las 70 secuencias fue de 31.1 % Adenina, 25.4 % Citosina, 17.1 % Guanina y 26.4 % Timina mostrando el típico sesgo de los genes mitocodriales hacia una baja proporción de Guanina (Brown, 1985).

Figura 24. Alineamiento de la región control completa obtenida para *Alouatta caraya* en el presente trabajo comparada con las secuencias publicadas para dos géneros de la familia Callitrichidae (Platyrrhini) (Tagliaro *et al.*, 1997). Las * indican `match´ o coincidencia de bases en las 3 secuencias comparadas, - son `gaps´ o ausencia de base en esa posición. Los extremos 5´y 3´del tARN ^{PRO} están indicados con [y] respectivamente, y el extremo 5´del tARN ^{PHE} está indicado con]. Las flechas ← → indican los límites de la región central conservada.

```
CLUSTAL X (1.8) multiple sequence alignment

                                        [                    tARN Pro                                        ]
calli010          ----CTGCTCCCAAAGACA-CTCAAGGAGAGAATTTTTAATTCCACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAGCATTAAACTACTCCCTGCATCCTAAA-----CTCTATTAATGATGGA
Cpenicillata89    ----CTGCTCCCGAGGATA-CTCAGGGAGAGAATATTTATTTCCACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATATTAAACTACTCCTTGTACCTC--------CTCTTTTATTGATGGA
Aca89             GAACTCTCTCCCCAGGACATCTCAGGGAAAGAATCCTCCATTCTACCTTCAACACCCAAAGCTGAAATTCTAATCTTAAACTACCCCCTGAATATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGC
                        ***** * ** * **** *** *****  *   *** *** ***************** ******   ********* ** ** *           ** * *** ***  *

calli010          CTAGCAATAAAGTACTTTGCAAGTACACGCAACTCCACAAATTTTTATGTAATTAGTGCATTAATGTTTTACCCCATGAATAATATATAGTACTGAAGTTGCTTAATTATACATAGTACA
Cpenicillata89    CTAGCAATGAAGTACTTTGCAAGTATGCATAACATTTTAAACTTTTATGTAATTTGTGCATTAATGCTTATCCCCATGAATAATATATAGTATTAAACATGCTTGATCATACATAGTACA
Aca89             CCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCA--CCCGTATGTAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACA
                  *   * ** ****** *  ** ***     ***     *      ********* ******** ** **  ********************* * *   ***** ** ************

calli010          TTAAATCTTTAACATACATAAAATCCTTGAAATACATGCTTACAAGCAAGAACTGAAAACGCACAACGAACCAAAACCTGTAAAACCTTAAAACC--CATAGGAAGCTAG--AAAACATG
Cpenicillata89    TAAAAT-TTCAACGTACATAAAATTCTTGAAAAACATGCTTATAAGCAGGAATTAACACTGCCAAACGAACTATCGACTATTAAATCTTTATACCA-CATAACTGCTTAA--AGAAAATG
Aca89             TCACCC-ATAAACATACATTAAAACATCCTCA-ACATGCTTACAAGCATGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACATATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACG
                  * *     * *** ***** ***   *    * ********* ***** * * *          **  *** *       *  **  *  * *     * *      **      * * *

calli010          CCTATCATTGACCAAATGA-ATATTCATAGACAACATAGTACATTAAAATATTGGTCGTACATAGTACATTA-ATAGGGTA------GTCGTCCGGTACATGGATATCCAGCAGGTAAC-
Cpenicillata89    ACTATCATTTACCAAATAAGATGCTAGTTAGAACATTAATACATAAAGATATTAATCGTACATAGTACATTAGAAAGAATT------ATTGTCCGGTACATGGATATCCAACAGGTATT-
Aca89             GATATTGTACAGCACATAA-ATCCATAACAGTACA-TAGCACATTAATCTATTGATCGTACATAA-ACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCAGGTATTG
                    ***  *  * ** ** * **          *   **  **** **  ****  *********  ***  * * **          *  **    * * ********  ******

                                  →  ____________________________________ Región Central Conservada ____________________________________
calli010          TTTGGTCTCTTAATCTACCAACCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCCACATCT-ACTAGTATTCTCGCTCCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATCCTGAAACTATATCTGGCATTTG
Cpenicillata89    CTTGGTCTCTTAATCTACCAACCTCCGTGAAACCAGCAACCCGCCCACATCT-ACTAGTATTCTCGCTCCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATCCTGAAACTATATCTGGCATTTG
Aca89             TTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTG
                   ** **************** ************** ************** *  *   * ************************************* *********************
```

```
                                                                  Región Central Conservada
calli010          GTTCCTACCTCAGGGCCATAA-AATTAAGATCGCACATACGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCTCCCTCTCGTTCTCG-CGTCACTGGATGCATGGGTGCCTC
Cpenicillata89    GTTCCTACCTCAGGGCCATAATAAATAAGTCCGCACATACGTTCCCCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCTCCCTCTCGTTCTCG-CGTCACTGGATGCATGGGTGCCTC
Aca89             GTTCCTACCTCAGGGCCATAC-CTTCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAGGAATGCACGCGGAGGGCCTCC
                  ********************      **    *  **** ***** ************************************ ******    ** * *   * ** * **   **  *  *

                   ←
calli010          TGGTAGGAAAGGAATGTACTCATCAGCATCGTCGAAAGACTCCTGGAAAGAGGTTCCAACAATCATCCTGTAGCACTTGACTGTGACTTGCCAGGCTTTATGCTATCATCGCGCCTGATA
Cpenicillata89    TGGTAGGAAAGGAATGTACTCATCAGCATCGTCGAAAGACTCCTGGAAAGAGGTTCCAATTATCATCCTGTAGCACCTGACTGTGATTTGCCAGACTTTATGCTATCATCGCGCCTGGTA
Aca89             ATGGGGGAGGGTTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGG--CTGGAGGAAAAGGTTCCAACGATAGTCCTGTGGCGTCTGGATGTGATTTGCCAGGCTTTATGCTGTCATCGCGCCTCTGA
                    *  ***  *  ******** ******* * ** * *       * ** *********  **  ****** **   **  ***** ******* ********* ***********   *

calli010          TTGAATGTCTTAGTCCCCAGCCCGCCC-CCTAGGTGCTATTAAGTCAATGGTTTCAGGACATAATAAGCGAATTT-TTGGCACTCCAGCCAAAATTTAAATTTTAACCACACATATCCAA
Cpenicillata89    TTGAATGTCTTGG-CCCCAGCCCGCCC-CCAAGGTGCTATTAAGTCCATGGTTTCAGGACATAATAAACGAGTTT-TTGGCTCCAAACCAAAAATTTGAATTTTAACCACTCACTACCAA
Aca89             TTGAATGTCTTGGCCCCCATCCCGACCACTAAGGTGTTATTCAGTCAATGGTTACAGGACATAATAAACAACTTTACCAGCACCACGCCCAAAATT--------ACCCACCCATCACCAA
                  *********** * ***** **** ** *  ***** **** **** ****** ************* * * ***    ** *     * ******        * **** **   ****

calli010          AATTCTTAACCCATTTAAATCCAAATTAAACCCACATTCTCTGAGGCACGTACCATAAAGAGAAAATCCACTATTGGCCCCCAT-----------TTTCCCCCCCCCGTTAAT-------
Cpenicillata89    AATATTTGCCCCACT------------AAACCCACATTCTCTGAGGCACGAATCACAAAGAGATAACCCACTATTGACCCCACTATTAAACAAAATTTCCCATCCCAACATATCC-ACCC
Aca89             AAATTTAGCCCTTAAAATCAGACACACCTGACTAAACTTTCTGAGGCGCGTATCGTAAAGAGACATCCCCCTACCAACATATTCACTATTTAATACTTAAAAGACACACAAACCCTACAA
                  **   *   **                    * * * * ******** ** * *  ******* *  ** ***    *                  **      *      *

calli010          -A-CACACATTGCC-TAAACCACTATATAA-CTGTTACTCCTCACTTACCTCAAACAACACCCTTCAGAGAATGTACTTGTACTAATACAATGGGGGCACTCCCCAAACCACTGACATAA
Cpenicillata89    CAACATACATTAC--TAAGTGACTGTATAAACCGTTACTCCTCGCATACCTCAAACAATGCCCTTCAGAGAATGTACTTATATTAACACAGCAGGGGGACCCCCC----CCCCCATATTC
Aca89             CCCCACACAATCCGACAAATAATATTACCCCTGATTACTTCCCACGCACCT-AGATCATACCCTTCAGAAAGCATACTTATATTTGTACAATAAAAATTAAATCTA----A--CAAAT-C
                     ** *** * *   **   *   **       ***** * * *  **** * *  *  ********* *   ***** ** *   ***             *         * **

                                                  [                    tARN Phe
calli010          ATTCCCCCATATAACATTAAAAATAGCCCAAGTTAATGTAGCTTAAC--TTTAAAGCAAGACACTGAAAATGTCTAGACGGGT----------------
Cpenicillata89    ATCGCCC-------------AAATAACCCGAGTTAGTGTCGCTTAAT--TTTAAAGCAAGACAATGAAAATGTCTAGACGGGT----------------
Aca89             ATTGCCCGGAC--------ATACTATATTAAGTTAATGTAGCTTAATAACTTAAAGCAAGACACTGAAAATGTCTAGATGGGTAACTTCTACCCATAAG
                  **  ***             * **     ***** *** ******    ************* ************** ****
```

1.2. Descripción de los haplotipos

De los 674 caracteres definidos a partir del alineamiento, 27 constituyeron sitios variables (sin incluir indels) de los cuales 19 fueron informativos ('parsimony-informative characters') (posiciones 90, 112, 123, 154, 161, 193, 203, 211, 251, 252, 257, 260, 273, 292, 303, 311, 373, 386 y 668) (Figura 25). La mayoría de los sitios variables (92%) se observaron entre los sitios 90 y 386 correspondiendo al dominio periférico izquierdo de la RC (Saccone *et al.*, 1991). A su vez, todas las sustituciones detectadas fueron transiciones: A ⇄ G (13 cambios) y C ⇄ T (14 cambios) (Tabla 21). El alineamiento mostró la presencia de 5 'indels' cada uno en distintos haplotipos, dos de los cuales corresponden a inserciones de una sola base en las posiciones 284 y 605, uno es la deleción de una base en la posición 349, y por último una inserción de dos pares de bases (posiciones 635/636) (Tabla 21). En el sitio 349 se observó, además de la deleción, una sustitución en otro haplotipo (Tabla 21).

Figura 25. Secuencia correspondiente al Haplotipo H033. Los números señalan la posición en el alineamiento y las flechas → ← indican los límites de la región central conservada (RCC). En negrita y subrayado se indican los sitios variables y en rojo los 'indels'.

```
    5          15         25         35         45         55         65
TATTTAACCA ACCTATATTA TTGAAAGCCC TACCATAAAG TACCTCACAG GTAAATTAAA CATCCCACCC

    75         85         95        105        115        125        135
GTATGTAATT AGTGCATTAT TGCTTGTCCC CATGAATAAT ACATAGTACT GAGAATGCTT GATCATACAT

   145        155        165        175        185        195        205
AGTACATCAC CCACAAACAT ACATTAAAAC ATCCTCAACA TGCTTACAAG CACGGATTAT AGATCTACAA

   215        225        235        245        255        265        275
GCAACCATAG CACATATAAT GTAGAAAGTA CTACAAACAC CTACCCGGGA CACGGATATT GTACAGCACA

   285        295        305        315        325        335        345
TAA-ATCCAT AGCAGTACAT AGCACATTAA TCTATTGATC GTACATAAAC AGCATACAGC ACTCGGTAAG
  *                                                                        *

   355        365        375        385        395 →      405        415
TTCTCTTCAA TACGGATATC CCCCAGGTAT TGTTTGGTCT CTTAATCTAC CATCCTCCGT GAAACCAACA

   425        435        445        455        465        475        485
ACCCGCCCAC ATTTTGCCGC TCTTCTCGCT CCGGGCCCAT ATAGACAGGG CTTGGTTATA CTGAAACTAT

   495        505        515        525        535        545        555
ATCTGGCATT TGGTTCCTAC CTCAGGGCCA TACCTTCAAA ACTGTGCATA TGTTCCTCTT AAATAAGACA

   565        575        585        595        605        615        625
TCACGATGGT GTGGCGCTAT CACCCTCTTA ACCTGGTCAG GAAT-GCACG CGGAGGGCCT CCATGGGGGA
                                                   *                      ←

   635        645        655        665        674
GGGTATTATG TACTCCTCAG CATTGCCGTA GGCTGGAGGA AAAG
    **
```

En la Tabla 21 se describen los haplotipos observados junto con su frecuencia según la localidad de procedencia de cada uno. Entre los 70 ejemplares analizados se observó un total de 33 haplotipos diferentes incluyendo los `indels´ como sitios variables (quinto estado del carácter) (Tabla 21). A la vez que, en Isla Brasilera con el mayor tamaño muestral (N=57), se detectó la presencia de 27 haplotipos. El haplotipo (H001), detectado en 11 de los 70 ejemplares estudiados, fue el más frecuente observándose en localidades geográficas distantes 50 km. en promedio que incluyeron las localidades de San Cayetano (2 ejemplares), Itatí (2 ejemplares) e IB (7 ejemplares).

En la localidad de Itatí, además del haplotipo H001, se encontró el H006 y se observó que diferían entre sí en sólo la sustitución de una base. Por otro lado, los ejemplares de la localidad de CAPRIM formaban un grupo familiar aislado integrado por un macho adulto que presentó el haplotipo H031, y una la hembra adulta y su cría, que presentaron el mismo haplotipo H005 como cabe esperar dada la herencia materna del genoma mitocondrial. Este último haplotipo difiere en una única base del haplotipo H001, mientras que el H031 se diferencia del H001 por 9 cambios. Las secuencias completas correspondientes a cada haplotipo se presentan en el Anexo I que se adjunta al final del trabajo.

Título de la Tabla 24 que está en la siguiente página

Tabla 24. Descripción de los haplotipos definidos a partir del alineamiento de la región control (674 pb.). La numeración se corresponde con el alineamiento de las secuencias analizadas. El nucleótido presente para cada posición se indica para el haplotipo H001 que se toma como referencia. Para los otros haplotipos, se indica el nucleótido cuando es diferente del de referencia, mientras que cuando es igual se indica '.'. Los indels se indican '-'. Se detallan las localidades de muestreo, el número total de individuos para cada haplotipo y localidad.

Tabla 21. Descripción de los haplotipos definidos a partir del alineamiento de la región control (674 pb.).

Haplotipos	Posiciones nucleotídicas																																	Localidades [2]						
	90	112	123	154	156	161	193	200	203	211	251	252	257	260	273	284	286	292	303	311	325	349	356	369	373	386	513	605	635	636	668	N [1] Total	1	2	3	4	5	6	7
H001	C	C	G	T	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	A	-	T	A	C	T	A	A	T	T	T	A	C	-	-	-	G	11	7	2			2		
H002	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	1	1						
H003	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	1	1						
H004	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	1	1						
H005	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	2						2	
H006	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	2		2					
H007	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	2	2						
H008	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	-	-	.	1							1
H009	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	A	9	9						
H010	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	3	3						
H011	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	2	2						
H012	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	-	-	A	1	1						
H013	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	A	1	1						
H014	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H015	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-	.	.	T	C	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H016	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	-	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H017	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	-	.	.	T	C	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H018	T	.	.	.	.	A	.	.	A	.	C	T	G	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1				1			
H019	T	T	.	.	.	.	T		A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	-	.	.	C	.	.	-	-	-	.	2	2						
H020	T	T	.	.	.	.	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H021	T	T	A	.	.	A	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	8	8						
H022	T	T	A	.	.	A	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H023	T	T	A	.	.	A	.	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H024	T	T	A	.	.	.	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	-	-	-	.	1	1						
H025	T	T	.	.	G	A	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H026	T	T	.	.	.	A	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	5	5						
H027	T	T	.	.	.	A	T	.	.	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	2	2						
H028	T	T	.	.	.	A	T	.	.	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H029	T	T	.	.	.	A	.	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H030	T	T	.	.	.	A	.	.	A	.	C	T	.	.	.	-	.	.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	-	-	-	.	1	1						
H031	T	.	.	C	.	.	T	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	1						1	
H032	T	.	.	C	.	A	.	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	G	.	.	.	.	.	.	C	G	.	-	-	-	.	1			1				
H033	T	.	.	C	.	A	.	.	A	.	C	T	G	.	.	-	.	G	.	.	.	.	.	.	C	G	.	-	T	A	.	1				1			
																																70	57	4	1	2	2	3	1

Nota de tabla: [1] N: número total de individuos que presentaron cada haplotipo descripto.
[2] Localidades: 1: Isla Brasilera, 2: Itatí, 3: Yaciretá, 4: Loreto; 5: San Cayetano, 6: CAPRIM, 7: Paraguay.

1.3. Distancias genéticas absolutas

El cálculo de las distancias genéticas no corregidas, es decir el número de sitios nucleotídicos en que los 33 haplotipos diferían entre sí incluyendo los 'indels' y considerando la inserción de 2 pb (posiciones 635/636) como una única diferencia, se presenta en la Tabla 25. El número de diferencias entre todos los haplotipos varío entre 0 y 12 pb (Tabla 22). El número de diferencias promedio entre todos los haplotipos fue de 5,57 ± 1,38.

Tabla 22. Matriz de distancia considerando el número absoluto de diferencias (incluyendo indels) entre los 33 haplotipos mitocondriales descriptos en *Alouatta caraya* en el presente trabajo.

	H001	H002	H003	H004	H005	H006	H007	H008	H009	H010	H011	H012	H013	H014	H015	H016	H017	H018	H019	H020	H021	H022	H023	H024	H025	H026	H027	H028	H029	H030	H031	H032
H002	1																															
H003	1	2																														
H004	1	2	2																													
H005	1	2	2	2																												
H006	1	2	2	2	2																											
H007	1	2	2	2	2	2																										
H008	2	3	3	3	3	3	1																									
H009	2	3	3	3	3	3	3	4																								
H010	1	2	2	2	2	2	2	5	1																							
H011	2	3	3	3	3	3	3	4	2	1																						
H012	3	4	4	4	4	4	4	5	1	2	3																					
H013	4	5	5	5	5	3	5	6	2	3	4	3																				
H014	3	4	4	4	4	4	2	3	3	2	3	4	5																			
H015	5	6	6	4	6	6	4	5	5	4	5	6	7	4																		
H016	5	6	6	6	6	6	4	5	5	4	5	6	5	4	4																	
H017	6	7	7	7	7	7	5	6	6	5	6	7	6	5	3	1																
H018	9	10	10	10	10	8	8	9	9	8	9	10	7	8	10	6	7															
H019	9	10	10	10	10	8	8	9	9	8	7	10	7	6	10	6	7	6														
H020	8	9	9	9	9	7	7	8	8	7	6	9	6	5	9	5	6	5	1													
H021	10	11	11	11	11	9	9	10	10	9	8	11	8	7	11	7	8	5	3	2												
H022	11	12	12	12	12	10	10	11	11	10	9	12	9	8	12	8	9	6	4	3	1											
H023	9	10	10	10	10	8	8	9	9	8	9	10	7	6	10	6	7	4	4	3	1	2										
H024	10	11	11	11	11	9	9	10	10	9	8	11	8	7	11	7	8	7	3	2	2	3	3									
H025	10	11	11	11	11	9	9	10	10	9	8	11	8	7	11	7	8	5	3	2	2	3	3	4								
H026	9	10	10	10	10	8	8	9	9	8	7	10	7	6	10	6	7	4	2	1	1	2	2	3	1							
H027	8	9	9	9	9	7	7	8	8	7	6	9	6	5	9	5	6	5	3	2	2	3	3	4	2	1						
H028	9	10	10	10	10	8	8	9	9	8	7	10	7	6	10	6	7	6	3	3	3	4	4	5	3	2	1					
H029	8	9	9	9	9	7	7	8	8	7	8	9	6	5	9	5	6	3	3	2	2	3	1	4	2	1	2	3				
H030	8	9	9	9	9	7	7	8	8	7	8	9	6	5	9	7	8	5	5	4	4	5	3	6	4	3	4	5	2			
H031	8	9	9	9	9	7	9	10	8	7	6	9	6	9	9	5	6	7	5	4	6	7	7	6	6	5	6	7	6	8		
H032	10	11	11	11	11	9	9	10	10	9	10	11	8	9	11	7	8	5	7	6	6	7	5	8	6	5	6	7	4	6	6	
H033	11	12	12	12	12	10	10	11	11	10	11	12	9	10	12	8	9	6	8	7	7	8	6	9	7	6	7	8	5	7	7	1

2. Reconstrucción filogénetica de las relaciones entre los haplotipos

2.1. Análisis de redes

En general, las genealogías intraespecíficas no pueden ser representadas por árboles bifurcados, debido a la topologías multibifurcadas donde secuencias 'hijas' coexisten con sus antecesores (Posada & Crandall, 2001). Es por este motivo que las genealogías intraespecíficas se representan de manera más adecuada a través de redes o 'networks' habiéndose desarrollado una familia de métodos para su estimación (Posada & Crandall, 2001).

En este trabajo, empleando el programa TCS (Clemente *et al.*, 2001), se obtuvieron una serie de redes considerando distintos niveles jerárquicos de análisis (Figuras 26, 27, 28). Este programa utiliza un método de distancia para la construcción de redes y al mismo tiempo realiza una evaluación estadística que se basa en el criterio de parsimonia por lo cual se lo denomina de parsimonia estadística ('statistiscal parsimony'). El algoritmo de la parsimonia estadística comienza estimando el número máximo de diferencias entre los haplotipos con un 95% de probabilidad, número que se denomina "límite parsimonioso de conexión" ('parsimony connection limit'). Luego de esto se conectan aquellos haplotipos que difieren en un cambio, luego los que difieren en dos y así sucesivamente, hasta que todos los haplotipos son incluidos en una única red.

Una característica de las redes es que al permitir considerar ciclos, en el caso de los haplotipos mitocondriales - sin recombinación- estos reflejan la posibilidad de ocurrencia de mutaciones paralelas. En la Figura 25a se muestra una red que conecta a todos los haplotipos incluidos en el presente trabajo, el tamaño de los óvalos está en relación con la frecuencia de cada haplotipo. El método ilustra todas las soluciones igualmente parsimoniosas posibles pudiéndose observar cómo los haplotipos aparecen interconectados entre sí de diferentes

modos (ej. H014 con H010 y H007 por dos pasos, y con H020 por 5 pasos). Por estas razones las redes suelen ser poco claras y se deben considerar ciertos criterios para su interpretación.

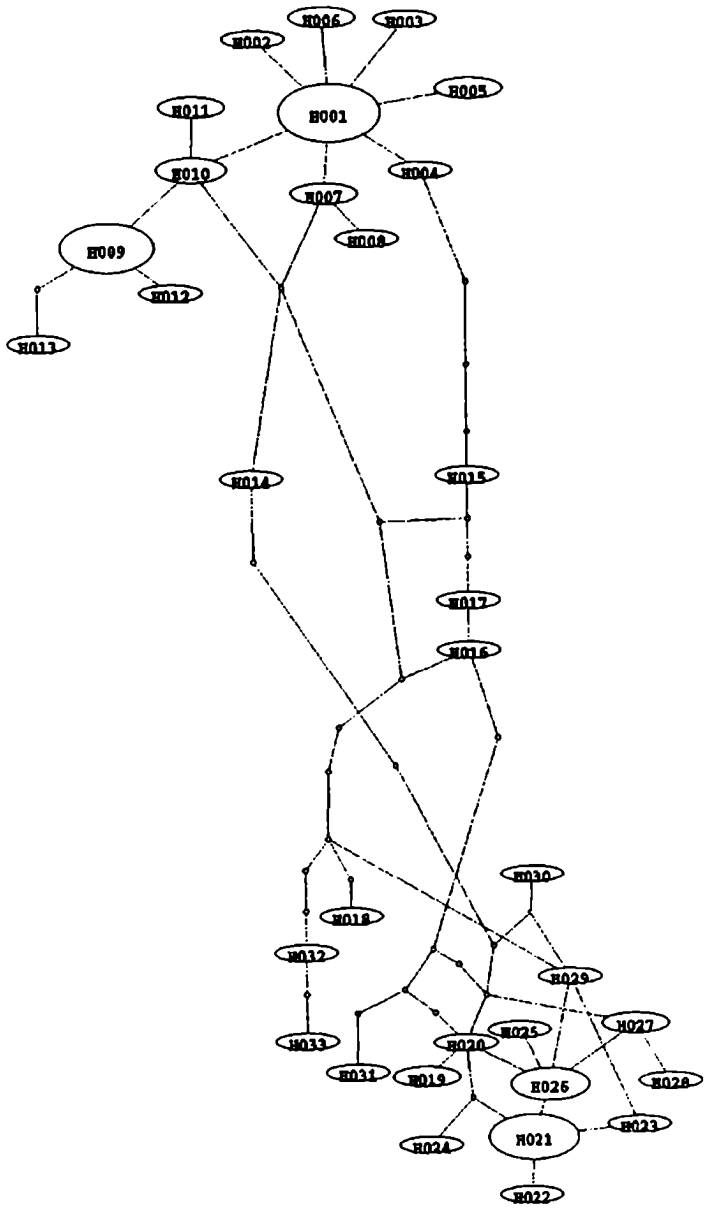


Figura 26a. Red obtenida a partir del análisis de todos los haplotipos considerando todas las conexiones posibles empleando el programa TCS. En todas las figuras de redes, el haplotipo que se indica en el centro de los óvalos y cada rama indica un cambio.

Crandall y Templeton (1993) proponen interpretar las redes en el marco de la teoría de la coalescencia. Estos autores suponen que los haplotipos más antiguos en la población tendrían una mayor probabilidad de que se produzca una mutación en su secuencia dando como resultado haplotipos derivados. Estos haplotipos aparecerían con una menor frecuencia en la población y su probabilidad de aparición estaría directamente relacionada con la frecuencia del haplotipo más frecuente del cual derivan. También evalúan la frecuencia y posición de los 'singletons' (haplotipos que están presentes en un único individuo) que se encuentran preferencialmente en los extremos de la red mientras que los haplotipos de mayor frecuencia son internos (Crandall & Templeton, 1993). Asimismo, los autores sugieren que los 'singletons' tienden a estar más relacionados con haplotipos de su misma población que con haplotipos de otra población independientemente del flujo génico entre ellas. En este trabajo, se observó un número importante, 22, de haplotipos únicos o 'singletons', sobre el total de 33 haplotipos (Tabla 21). Del total de los singletons, 17 correspondieron a ejemplares de IB (17/27 haplotipos), 2 a localidades donde sólo se analizó un ejemplar (Yaciretá y Paraguay), 2 a ejemplares de una misma localidad (Loreto) y el restante correspondió a la localidad de CAPRIM.

Para resolver las conexiones ambiguas, es decir aquéllas que se establecían a partir de un número igual de pasos entre los haplotipos, se tomaron en cuenta los criterios propuestos por Crandall y Templeton (1993). Estos consistieron en: todos los haplotipos en general y los singletons en particular, se relacionarán con mayor probabilidad con un haplotipos a) más frecuentes, y b) geográficamente más cercanos por ej. en la misma tropa. Los resultados de estos análisis se observan en las Figuras 26b, 27 y 28.

A partir del análisis de redes se observó la ausencia de un patrón geográfico de agrupamiento de los haplotipos en todos los niveles (Figuras 26, 27 y 28). Todas las redes analizadas mostraron dos grupos principales de haplotipos que se corresponden con dos

clados principales de haplotipos mitocondriales que se denominaron: A y B. El clado A se definió a partir del grupo de haplotipos que se ubican en la parte superior de las figuras y el clado B a partir del grupo de haplotipos que se ubican en la parte inferior de las mismas.

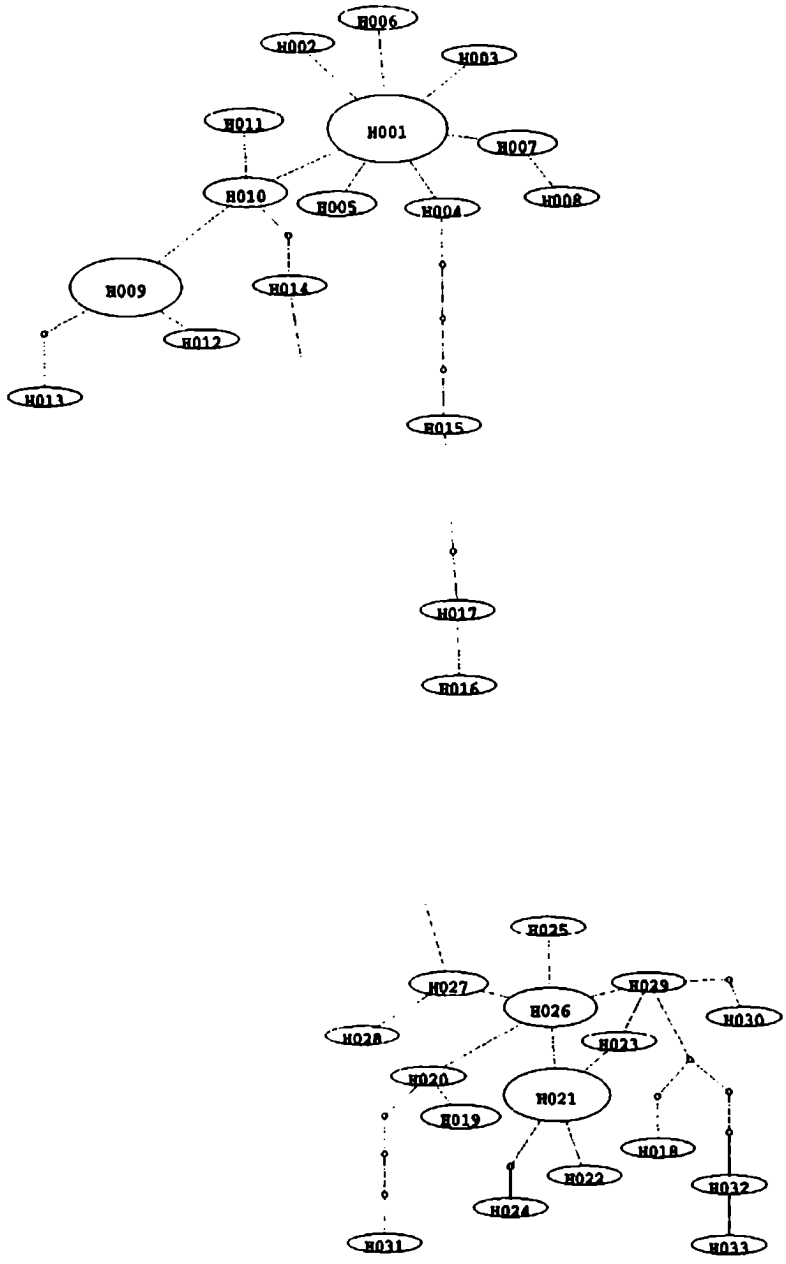


Figura 26b. Red obtenida a partir del análisis de todos los haplotipos considerando sólo las conexiones más probables (Crandall & Templeton, 1993).

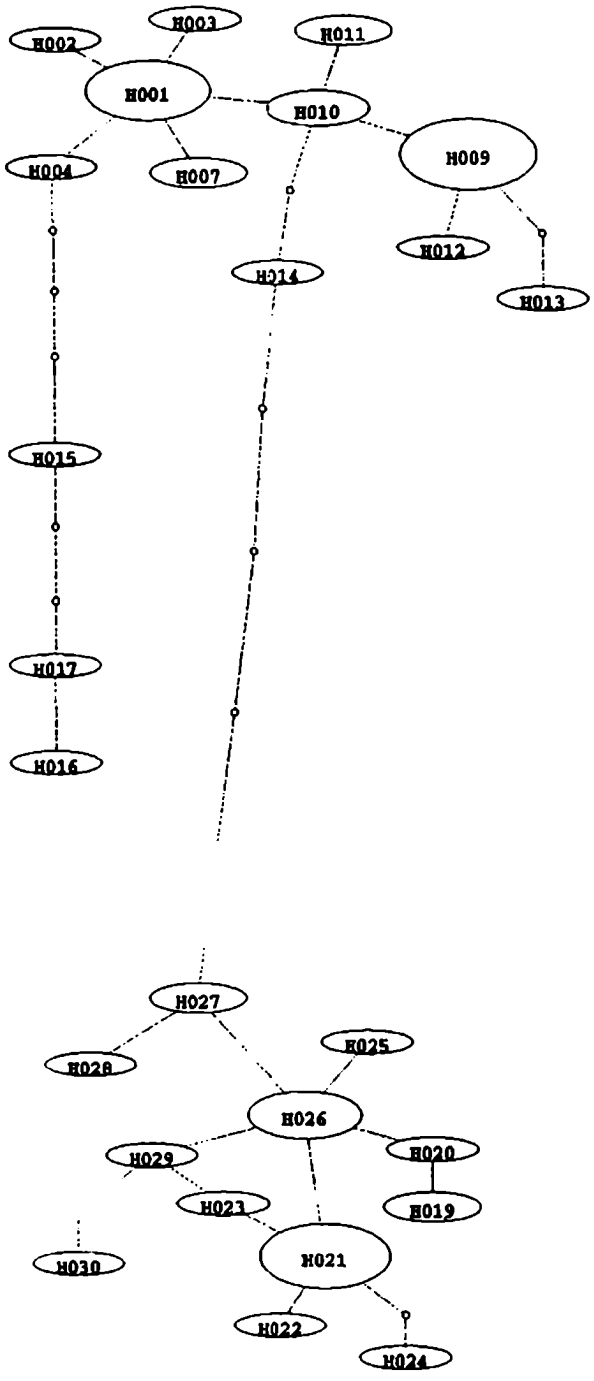
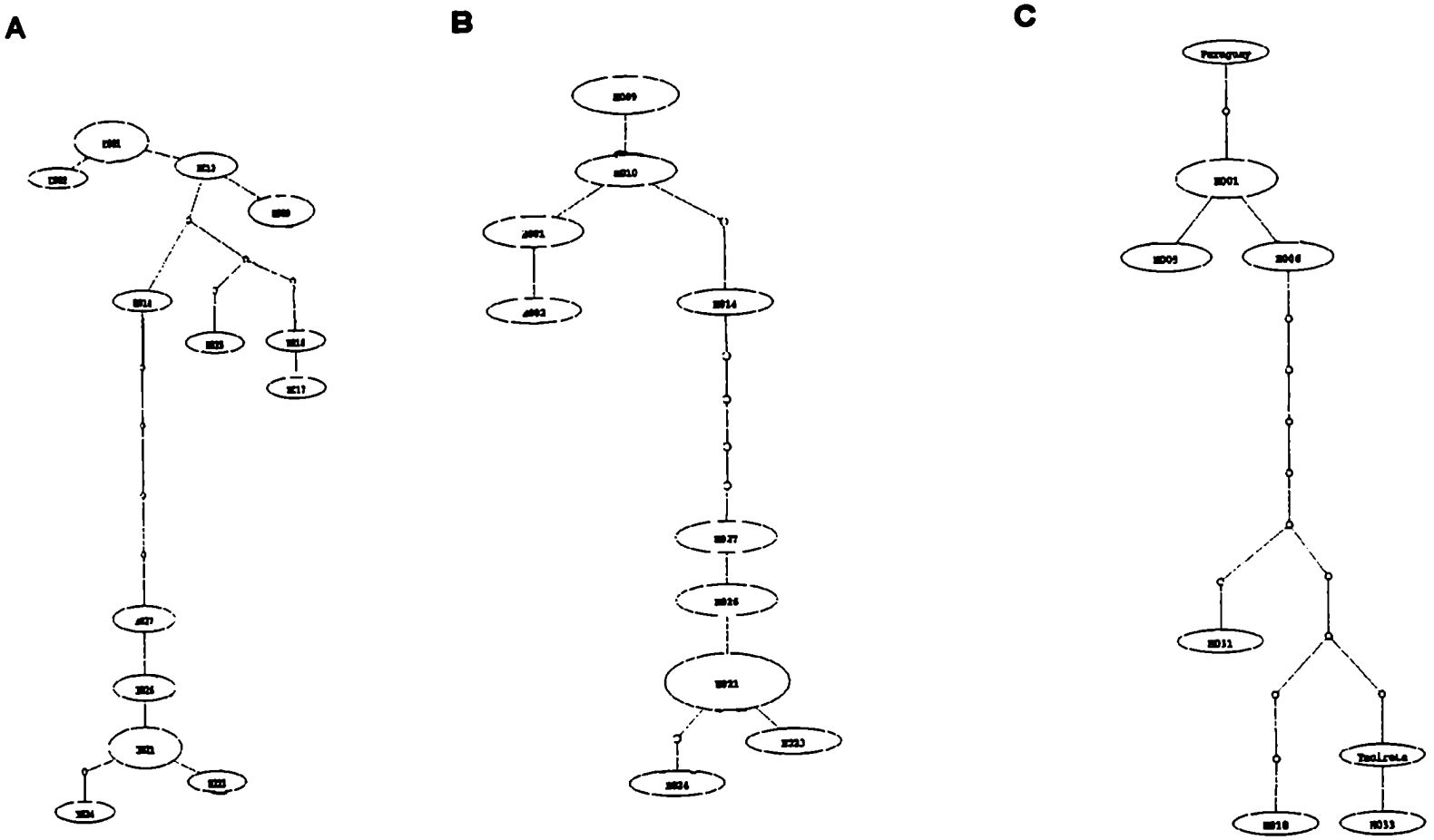


Figura 27. Red obtenida a partir de los haplotipos hallados en Isla Brasilera considerando sólo las conexiones más probables (Crandall & Templeton, 1993).

Figura 28. Redes obtenidas a partir del análisis de los haplotipos observados en las hembras en Isla Brasilera (**A**), en las hembras de Isla Brasilera que se encuentran en tropas del Albardón Principal (**B**) y en los ejemplares que no procedían de Isla Brasilera (**C**)



En la Figura 26b, ambos grupos están relacionados entre sí por 5 pasos mutacionales entre los haplotipos H014, que es un haplotipo único, y H027. En esa misma figura, el clado A incluyó al haplotipo mayoritario H001 que presenta una topología estrellada con 7 haplotipos derivados de los cuales 3 son 'singletons', mientras que el segundo haplotipo más frecuente H009 también del clado A, presentó 3 haplotipos derivados. En el clado B el haplotipo más frecuente fue H021 del cual derivan 4 haplotipos. Asimismo se podría considerar como un tercer grupo o bien un grupo derivado del clado principal A, al grupo formado por 3 haplotipos únicos: el H015, H016, y H017 que difieren entre sí por 1 - 4 sustituciones. Estos se diferencian del resto por 4 cambios en el caso del H015, y por 7 y 8 en los casos de H016 y H017, respectivamente. Cuando se consideró sólo la población de carayás de IB (total de individuos y sólo hembras) y todos los ejemplares fuera de IB (Figura 27 y 28) se observaron los dos mismos agrupamientos. Estos resultados sugieren la existencia de un patrón de variabilidad mitocondrial común en la región sur de la distribución de *A. caraya* que estaría definido por la presencia de estos 2 clados principales: A y B.

2.2. Análisis de la distribución geográfica de los haplotipos

Complementario con los análisis de redes, se realizó una reconstrucción filogénetica considerando las diferencias de a pares entre todos los haplotipos, empleando el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), y analizando su distribución geográfica (Figura 29). Los dos clados principales: A y B detectados en las redes, también se visualizaron en el fenograma presentando un 'bootstrap' del 55% dado que la comparación incluyó un alto número de secuencias que presentaron un bajo número de diferencias entre sí, en coincidencia a lo observado por Warren *et al.* (2001) en estudios de variabilidad mitocondrial en orangutanes. Dentro de cada uno de estos clados la mayoría de los grupos de haplotipos presentaron bajos valores de soporte estadístico de los nodos. Asimismo, los haplotipos

mostraron cierta tendencia al agrupamiento en función de la cercanía geográfica como por ejemplo los haplotipos observados en Loreto y Yaciretá se agruparon cercanamente en el mismo clado principal B (Figura 29).

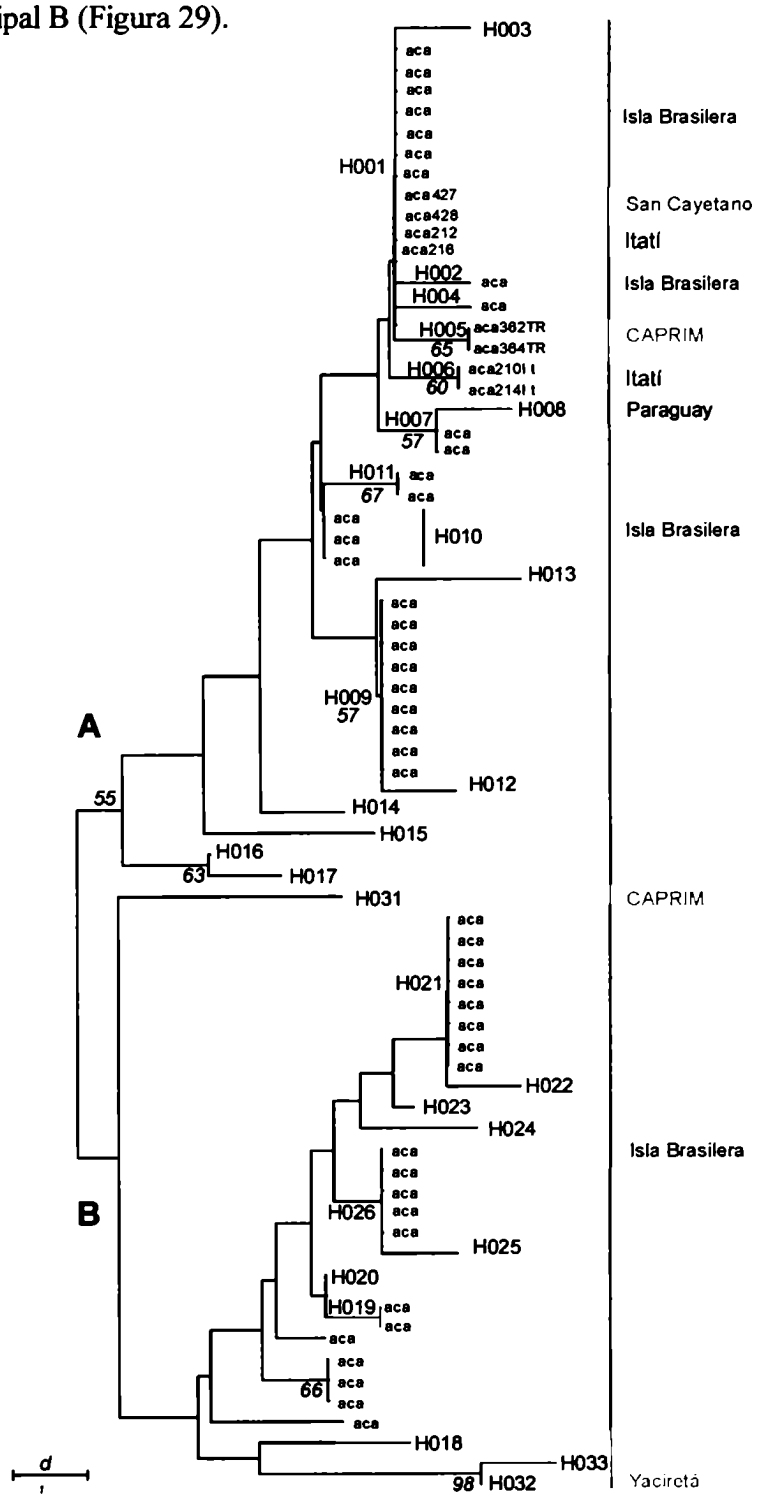


Figura 29. Árbol de Neighbor-Joining en base a las diferencias de a pares entre todos los individuos analizados. Los indels se indican con color rosa. En el fenograma se detallan los haplotipos y a la derecha de la figura se indica las localidades. Los números en cursiva son el valor de bootstrap mayor al 50% luego de 1000 réplicas. Los individuos señalados como aca pertenecen a Isla Brasilera.

2.3. Análisis de la distribución de las diferencias entre pares de secuencias

Dado que la distribución de frecuencias del número de diferencias entre pares de secuencias puede servir para poner en evidencia la presencia de los dos clados detectados en las redes y el árbol de NJ, se graficaron las mismas en función del número de diferencias (Figura 30). La distribución de las diferencias de a pares mostró una curva bimodal que evidencia, nuevamente, la presencia de dos linajes diferentes donde las comparaciones de la izquierda corresponden a las comparaciones entre secuencias de un mismo clado y la de la derecha correspondió a las comparaciones entre clados (Figura 30). El valor promedio de diferencias de a pares entre todas las secuencias fue de 5,58 (rango de 0 a 12, sin considerar indels), mientras que dentro de cada clado el número promedio de diferencias fue de 2,3 y 3,1 para los clados A y B, respectivamente. Este patrón de variación haplotípica corresponde con un patrón filogeográfico de tipo II, caracterizado por la presencia de linajes principales -dos en este caso- que coexisten en simpatría, la explicación más pausible para este patrón es que representa zonas de contacto secundario entre especies alopátricas o poblaciones que han divergido en alopatría (Avise, 2000).

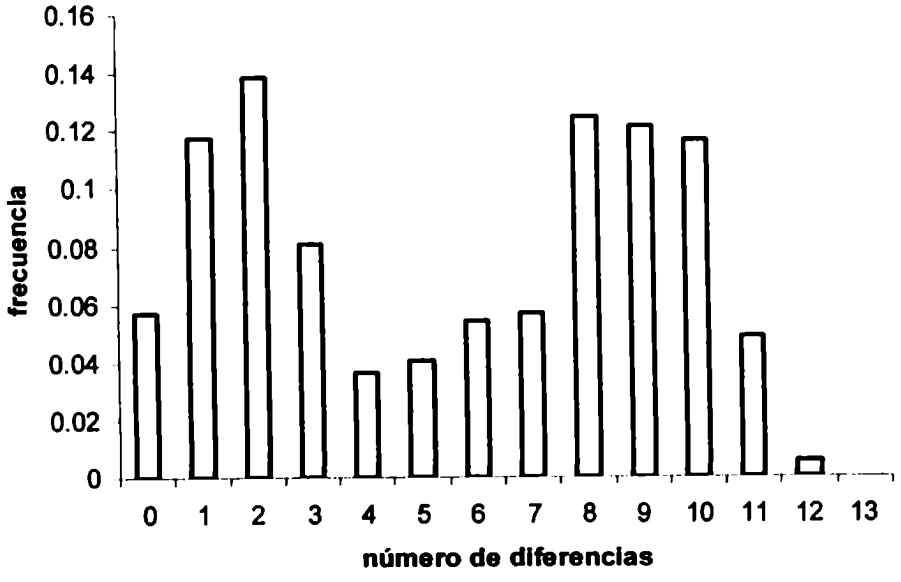


Figura 30. Distribución de las diferencias de a pares en *A. caraya*. En el eje *y* se indica la frecuencia relativa de las veces en que se observó un número dado de diferencias nucleotídicas.

3. Inferencias filogeográficas

Al observar el patrón de variación haplotípica a nivel regional en la distribución marginal sur de *A. caraya* caracterizado por dos haplotipos mitocondriales principales, se consideraron diferentes explicaciones alternativas. En otros grupos de organismos en los que se observó un patrón similar, el mismo fue explicado en base a la colonización de la región por poblaciones ancestrales divergentes a través de diferentes rutas de dispersión (*e.g.*, en osos, Taberlet *et al.*, 1995). Bajo esos modelos, y con el objetivo de proponer una hipótesis explicativa del modo en que pudo haber tenido lugar la colonización de la región sur en *A. caraya*, se realizó un análisis filogenético preliminar. En este estudio se empleó la secuencia mitocondrial correspondiente al citocromo b (cytb) incluyendo secuencias de *A. caraya* obtenidas en este trabajo y las publicadas por otros autores (Bonvicino *et al.*, 2001) (Tabla 23).

Tabla 23. Procedencia y haplotipos de los ejemplares de *A. caraya* empleados

GenBank [1]	Haplotipo cytb	Haplotipo RC[2]	Localidad
AF289516	CB1	?	Río Quilombo (15°27´S, 55°44´W), Mato Grosso, Brasil
AF289519	CB2		Río Casca (15°26´S, 55°21´O), Mato Grosso, Brasil
AF289517	CB3		?
AF289518	CB4	?	Serra da Mesa, Goiás, Brasil
Presente trabajo	CB1	H001	Itatí, Corrientes, Argentina
Presente trabajo	CB5	H018	Loreto, Corrientes, Argentina
Presente trabajo	CB5	H033	Loreto, Corrientes, Argentina

[1] GenBank cytb, número de acceso al GenBank para las secuencias correspondientes al cytb publicadas por Bonvicino *et al.* (2001).
[2] Haplotipo RC para la región control obtenido en el presente trabajo
? Desconocido

A partir del alineamiento de un fragmento parcial del cytb de 899 pb se observaron 17 sitios variables (14 transiciones y 3 transversiones) que dieron como resultado 7 cambios aminoacídicos), y un número de diferencias promedio entre haplotipos de 7,05 ± 3,77. La

reconstrucción filogenética se realizó empleando loa métodos de análisis de redes (TCS, Clemente *et al.*, 2001) y de parsimonia (PAUP* version 4.0 b8; Swofford, 1998). De este último análisis se obtuvieron tres árboles más parsimoniosos, de 21 pasos cada uno y con un índice de consistencia CI = 0,952, indicando poca homoplasia en los datos. Estos tres árboles diferían entre sí en las posiciones de CB3 y CB4, uno de ellos coincidía con la red de 18 pasos y es el que se muestra en la Figura 31.

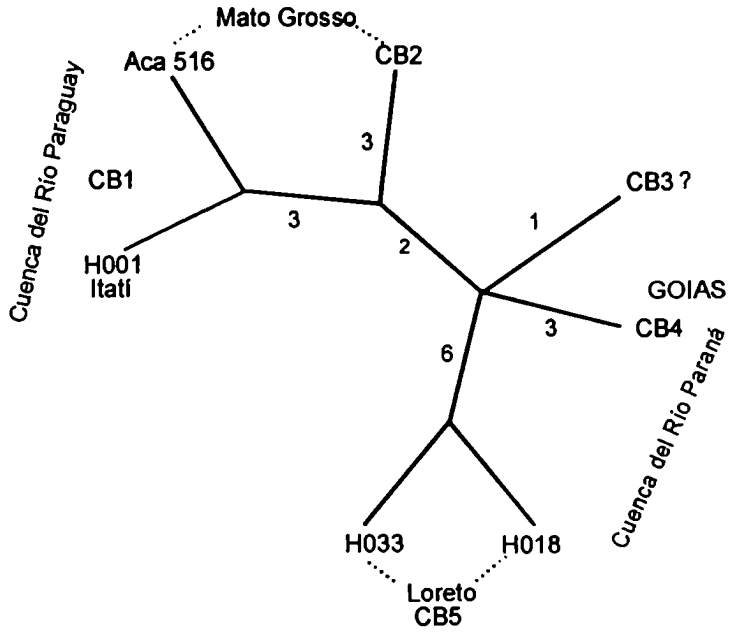


Figura 31. Cladograma en base a las secuencias nucleotídicas del cyt *b* en *Alouatta caraya*.

En el cladograma de la Figura 31, los números indican la cantidad de pasos mutacionales que conectan cada haplotipo. Como se observa tanto en la Tabla 26 como en la Figura 31, el haplotipo CB1 se observó en dos individuos, uno procedente de la región del Mato Grosso (Brasil) y el otro, procedente de la localidad de Itatí el haplotipo H001 para la región control. Los dos individuos de Loreto que presentaron distintos haplotipos que difieren en 6 pb para la región control, mostraron el mismo haplotipo para cytb (CB5), reflejando una divergencia reciente entre estos linajes mitocondriales que sólo se manifiesta en la región control. A su vez para el citocromo *b*, el mayor número de diferencias nucleotídicas se

observó para las comparaciones de a pares entre los haplotipos CB1 *vs* CB5 y CB2 *vs* CB5 que mostraron en cada caso con 11 diferencias.

Estos resultados preliminares obtenidos en base al cytb coinciden con lo observado para la RC al presentar de dos haplotipos claramente diferenciados (CB1 y CB5) en localidades geográficas cercanas de una misma región, sugiriendo el mismo patrón filogeográfico de clase II descripto para la región RC. El hecho de que el individuo de Itatí con el haplotipo para la región control H001, presentara el mismo haplotipo CB1 que un individuo de la región del Mato Grosso, permitiría proponer un patrón de migración desde esa región hacia el sur empleando al río Paraguay como ruta de dispersión.

Asimismo en el árbol se puede observar que el haplotipo CB5 muestra en promedio una mayor diferenciación que los otros haplotipos si bien se ubica más cercano al haplotipo CB3 de procedencia desconocida y al CB4 de la región de Goiás. En este caso, dada la cercanía con el río Paraná, es posible suponer que los individuos de Loreto provendrían de la región de Goiás habiendo alcanzado la región sur siguiendo el curso del río Paraná como ruta de dispersión. El análisis de más individuos procedentes de localidades cercanas a ambos ríos tanto de la región de distribución sur como central permitiría evaluar esta hipótesis.

4. Diversidad haplotípica

En la Tabla 24, se puede observar las frecuencias haplotípicas en cada localidad. Como se describió anteriormente, el haplotipo H001 está presente en 3 poblaciones (I. Brasilera, Itatí y San Cayetano) y que el haplotipo más frecuente en Isla Brasilera es el H009 que sólo se encontró en esa localidad (Tabla 24).

Tabla 24. Frecuencias relativas de los haplotipos descriptos en la Tabla 24. Entre paréntesis se indica el número total de individuos analizados por localidad.

HAPLOTIPOS	LOCALIDADES						
	I. Brasilera (57)	Itatí (4)	Yaciretá (1)	Loreto (2)	San Cayetano (2)	CAPRIM (3)	Paraguay (1)
001	**0,119**	**0,5**	0	0	**1**	0	0
002	0,0169	0	0	0	0	0	0
003	0,0169	0	0	0	0	0	0
004	0,0169	0	0	0	0	0	0
005	0	0	0	0	0	0,667	0
006	0	0,5	0	0	0	0	0
007	0,0339	0	0	0	0	0	0
008	0	0	0	0	0	0	1
009	0,153	0	0	0	0	0	0
010	0,0508	0	0	0	0	0	0
011	0,0339	0	0	0	0	0	0
012	0,0169	0	0	0	0	0	0
013	0,0169	0	0	0	0	0	0
014	0,0169	0	0	0	0	0	0
015	0,0169	0	0	0	0	0	0
016	0,0169	0	0	0	0	0	0
017	0,0169	0	0	0	0	0	0
018	0	0	0	0,5	0	0	0
019	0,0339	0	0	0	0	0	0
020	0,0169	0	0	0	0	0	0
021	0,136	0	0	0	0	0	0
022	0,0169	0	0	0	0	0	0
023	0,0169	0	0	0	0	0	0
024	0,0169	0	0	0	0	0	0
025	0,0169	0	0	0	0	0	0
026	0,0847	0	0	0	0	0	0
027	0,0339	0	0	0	0	0	0
028	0,0169	0	0	0	0	0	0
029	0,0169	0	0	0	0	0	0
030	0,0169	0	0	0	0	0	0
031	0	0	0	0	0	0,333	0
032	0	0	1	0	0	0	0
033	0	0	0	0,5	0	0	0

En negrita se indicó el haplotipo encontrado en más de una localidad

Una forma simple de describir la variabilidad es definir el número de alelos o haplotipos que se encontró en la muestra, si bien esto ya se describió anteriormente, en este punto se decidió incluir el análisis de cada clado por separado junto con el total, de manera comparativa. El número total de haplotipos encontrados en el conjunto de la muestra fue 33, 17 pertenecientes al clado A y 16 al clado B (Tabla 25).

Tabla 25. Variabilidad nucleotídica en *Alouatta caraya* de distribución sur

	Nivel regional (n=70)	**Clado A** (n=41)	**Clado B** (n=30)
Número de haplotipos	33	17	16
Diversidad haplotípica	0,943	0,8744	0,9015
D. E.	*0,014*	*0,0358*	*0,0409*
S	26	15	16
η	26	15	16
η_s **(singletons)**	7	4	8
Π	5,6	2,297	2,571
Rango de nº de diferencias	*2,72*	*1,285*	*1,419*
π	0,0083	0,0034	0,0038
D. E.	*0,0045*	*0,00213*	*0,0023*
θ (Π) por secuencia	5,6	2,297	2,571
D. E.	*3,016*	*1,428*	*1,5805*
θ (S) por secuencia	5,62	3,5264	4,0741
D. E.	*1,782*	*1,335*	*1,583*
θ (k)por secuencia	22,587	9,387	13,88
θ (π) por sitio	0,0083	0,0034	0,0038
θ (p_S) por sitio	0,0082	0,0052	0,006
D. E.	*0,0025*	*0,0019*	*0,0023*
θ (η) por sitio	0,0081	0,0052	0,006
D de Tajima	0,0822	-1,11	-1,261
P	*0,60*	*0,126*	*0,105*

n: número de individuos muestreados

Para cuantificar la variabilidad poblacional a nivel de la secuencia de nucleótidos se pueden usar varios estimadores (*e.g.*, Li, 1997). Para datos diploides, un índice empleado para cuantificar esta variabilidad es la heterocigosidad esperada, que se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. Conforme a este estimador, la diversidad haplotípica observada en este trabajo mostró valores altos y similares siendo 0,943 para el total de la muestra, 0,8744 dentro del clado A y 0,9015 en el clado B (Tabla 25). El número de sitios segregantes (S) definido como el número de sitios que presentan al menos dos variantes nucleotídicas fue de 27 en el total de la muestra, 15 en el

clado A y 16 en el clado B. Sin considerar indels, el número total de mutaciones observadas en el análisis η (eta) fue igual a 26, de los cuales 7 (η_s) fueron mutaciones únicas (singletons) (posiciones: 156, 200, 286, 325, 356, 369, 513, Tabla 25). Por otra parte, η_s en el clado A fue 4 y en el B 8 (Tabla 25).

El índice de diversidad haplotípica es poco informativo para datos de secuencias nucleotídicas. En estos casos es más adecuado estimar el índice de diversidad nucleotídica (Π) el cual se obtiene en base al número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias tomadas al azar de la población (*e.g.*, Nei, 1987; Li, 1997). El valor de Π hallado en este trabajo en el total de la muestra, fue el doble que el hallado entre las secuencias de un mismo clado (Tabla 25).

Debido a que el valor de Π es dependiente del largo de la secuencia, es decir que cuanto más larga sea la secuencia se esperarían mayores valores de Π, una forma de estandarizar ese valor es dividirlo por el número de sitios analizados (L). De esta manera se define π como la diversidad nucleotídica, por sitio, siendo la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar de la muestra sean diferentes (*e.g.*, Nei & Li, 1979; Tajima, 1983). En este caso, para el conjunto de la muestra π fue 0,008, más del doble que lo observado dentro de cada clado (Tabla 25).

Bajo el modelo de sitios infinitos, el valor esperado de Π está dado por θ, el parámetro mutacional de la Teoría Neutralista, donde $\theta = 2N_e u$ (para genes mitocondriales) (Watterson, 1975). Asimismo θ puede estimarse en base al número de sitios segregantes siendo $\theta = S/a$, donde a considera el tamaño de la muestra (Watterson, 1975). El parámetro θ es sumamente útil para estimar tanto el N_e como los tiempos de divergencia. Los valores de θ estimados en base a Π y S, fueron similares para el conjunto de los haplotipos pero dentro de cada clado los

valores de θ estimados en base a S fueron 1,5 veces mayores que los estimados en base a Π (Tabla 25).

Los valores de θ estimados en base al número de diferencias promedio por sitio π, al número de sitios segregantes por sitio p_S ($p_S = S/n$, donde n es el número total de nucleótidos) o al número total de mutaciones η (Nei & Kumar, 2000) mostraron valores similares para el conjunto de los datos (Tabla 25). En cambio, al diferenciar los clados, los valores de θ calculados en base a p_S y η son mayores a los obtenidos en base a π (Tabla 25) que es independiente del tamaño muestral y depende de la frecuencia en que se encuentran las variantes (Li, 1997).

Los valores de θ también se pueden estimar en base al modelo de alelos infinitos que considera que cada mutación crea un nuevo alelo que no estaba presente en la población. Para esta estimación se consideran el número de alelos (secuencias diferentes) (k) presentes en la muestra (Ewens, 1972). En este trabajo, los valores de θ en base a k, fueron de 22,58 para el total de las muestras, 9,39 y 13,88 para cada los clados A y B, respectivamente. Dado que este estimador depende tanto del tamaño muestral como del largo de la secuencia no es muy conveniente para la comparación entre loci o poblaciones (Li, 1997).

La prueba de neutralidad de Tajima (1989) se basa en la hipótesis nula que las estimaciones de θ en base a p_S (θ_S) y π (θ_π) son iguales, ya que ambos son estimadores del mismo parámetro $\theta=2N\mu$.. Por ejemplo, si en la población hay muchas variantes deletéreas, mantenidas en baja frecuencia por acción de la selección purificadora, entonces el estimador de θ definido como $\theta = p_S / a$ será mayor al estimado en base a π, ya que el valor de este último estará influenciado principalmente por las variantes que se encuentren en alta frecuencia (Nei & Kumar, 2000). Por el contrario, en presencia de la selección equilibradora que mantiene algunas variantes en una cierta frecuencia, se esperara que θ_π sea mayor que θ_S (Nei & Kumar, 2000). Sin embargo, estas diferencias también podrían deberse a eventos

demográficos como cuellos de botella o expansiones que llevarían a un aumento del número de variantes raras es decir aumentaría θ_S (Tajima, 1996). Por el contrario, la fusión de dos poblaciones alopátricas puede llevar a un exceso de variantes de frecuencias intermedias.

De esta manera, evaluando la diferencia entre θ_S y θ_π a través del estadístico D, se pueden detectar discrepancias respecto de lo esperado bajo un modelo de neutralidad selectiva y en poblacionales de tamaño constantes (Nei & Kumar, 2000). En este trabajo el conjunto completo de datos mostró valores no significativos del índice de Tajima (D), por lo cual se puede considerar que el espectro de frecuencias de las variantes se ajusta a un modelo de neutralidad selectiva. Sin embargo, al considerar cada clado por separado el valor de D fue negativo ($\theta_S > \theta_\pi$), si bien las diferencias no fueron significativas podrían sugerir que las poblaciones han atravesado algún evento demográfico. Este tema se retomará más adelante cuando se analice el patrón demográfico.

5. Estructuración genética

5.1. Divergencia nucleotídica

Una medida de la divergencia genética está dada por el número de diferencias nucleotídicas promedio por sitio que se observan entre dos poblaciones (D_{xy}) (Nei & Kumar, 2000) o bien por el número neto de sustituciones entre ellas (D_a) (Nei & Li, 1979). Ambas distancias pueden ser usadas para generar árboles filogenéticos, si bien D_{xy} da árboles más confiables debido a que su varianza es menor a la D_a (Nei & Kumar, 2000).

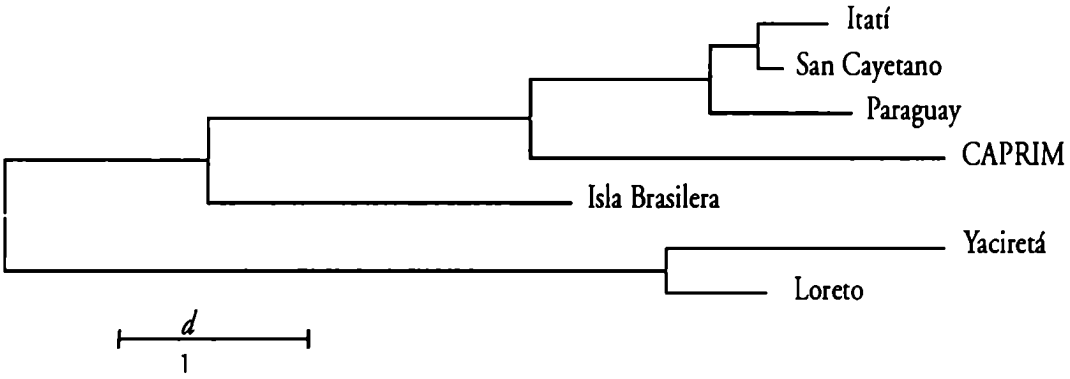
Las estimaciones del número de diferencias nucleotídicas promedio (D_{xy}) y las distancias netas (D_a) entre localidades se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26. Distancias netas (D_a) y número promedio de sustituciones (D_{xy}) entre las localidades tomadas de a pares por arriba y por debajo de la diagonal. El valor promedio de diferencias nucleotídicas dentro de cada localidad se indica en negrita en la diagonal.

Localidades	I. B.	Itatí	Yaciretá	Loreto	San Cayetano	CAPRIM	Paraguay
I. B.	**5,448**	1,851	5,345	2,345	2,159	0,504	2,108
Itatí	5,061	**0,666**	9,167	6,167	0,167	0,167	1,167
Yaciretá	8,035	9,5	**0**	0	10	6,333	9
Loreto	7,018	8,5	2	**4**	7	3,667	6
San Cayetano	5,018	0,5	10	9	**0**	0,333	1
CAPRIM	6,316	3,5	9,333	8,667	3,333	**6**	1,333
Paraguay	4,93	1,5	9	8	1	4,333	**0**

El mayor número de diferencias promedio se observó en la comparación entre Yaciretá y CAPRIM, mientras que la distancia neta mayor se observó entre Yaciretá y San Cayetano. Con las diferencias promedio entre las localidades se realizó un análisis de agrupamiento empleando el algoritmo de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) (Figura 32).

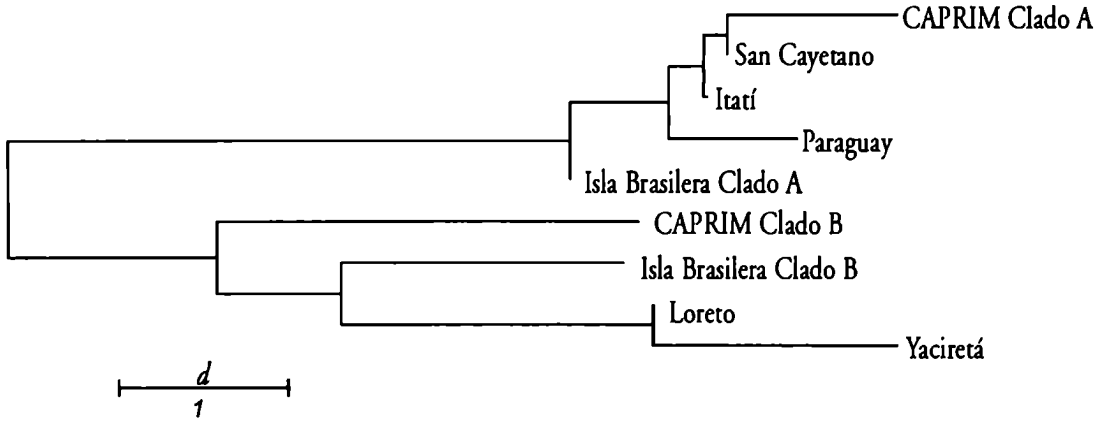
Figura 32. Fenograma obtenido en base a las distancias promedio (D_{xy}) entre las localidades



En este fenograma se pueden observar dos agrupamientos principales, uno que incluye a las localidades de Yaciretá y Loreto geográficamente cercanas, y el otro, Isla Brasilera junto con las restantes localidades (Figura 32). Las localidades de Itatí, San Cayetano y Paraguay presentaron sólo haplotipos del clado A, Yaciretá y Loreto sólo del clado B, mientras que en Isla Brasilera y CAPRIM coexisten ambos linajes.

Para analizar la influencia de los clados en la divergencia nucleotídica entre las localidades estudiadas, se subdividieron las localidades en las que se observó la presencia de ambos linajes, Isla Brasilera y CAPRIM. Con estas localidades subdivididas, se recalcularon las distancias nucleotídicas promedio de a pares (D_{xy}) y en base a éstas, se obtuvo un nuevo árbol de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) (Figura 33).

Figura 33. Fenograma obtenido en base a las distancias promedio entre los linajes mitocondriales



En este nuevo fenograma se observa una vez más la presencia de dos agrupamientos principales, uno que incluye sólo haplotipos del clado A y otro que incluye haplotipos del clado B, independientemente de la localidad de procedencia (Figura 33). Si bien está claro la presencia de ambos linajes mitocondriales en las muestras de distribución marginal sur de *A. caraya*, existirían ciertos agrupamientos preferenciales en algunas localidades donde sólo se observó un tipo de linaje mitocondrial sugiriendo algún tipo de aislamiento por distancia.

5.2. Divergencia genética vs. distancia geográfica

Para evaluar el grado de la diferenciación genética en función de la distancia geográfica (modelo de aislamiento por distancia, Wright, 1943) en la región marginal sur en *A. caraya*, se realizó una prueba de correlación de Mantel (Mantel, 1967). En este análisis se consideraron los valores promedio de las distancias nucleotídicas y la distancia geográfica entre las localidades muestreadas (Figura 34). Considerando que en esta parte del estudio se se analizó la estructuración de la variabilidad genética a nivel regional y dado que la localidad de Paraguay no pertenece a la distribución marginal sur, la misma se excluyó de los análisis siguientes.

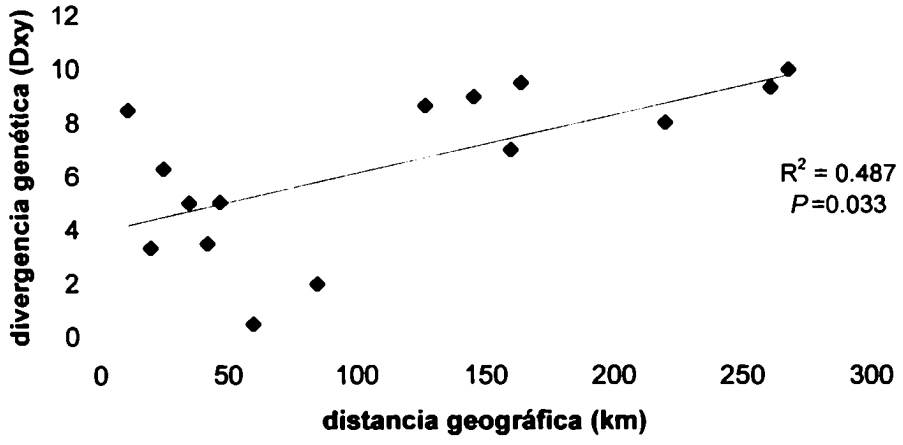


Figura 34. Relación entre la divergencia genética (D_{xy}) y la distancia geográfica entre cada par de localidades muestreadas

La relación entre las distancias genéticas y geográficas mostraron una correlación estadísticamente significativa, con un coeficiente de correlación r^2 = 0,487, que fue significativamente distinto de 0 (P = 0,033) y una pendiente b = 5,67 (Figura 34). Un resultado similar se obtuvo cuando se consideró el número neto de diferencias entre las localidades muestreadas (D_a) (r^2 = 0,591, b = 0,008, P = 0,032).

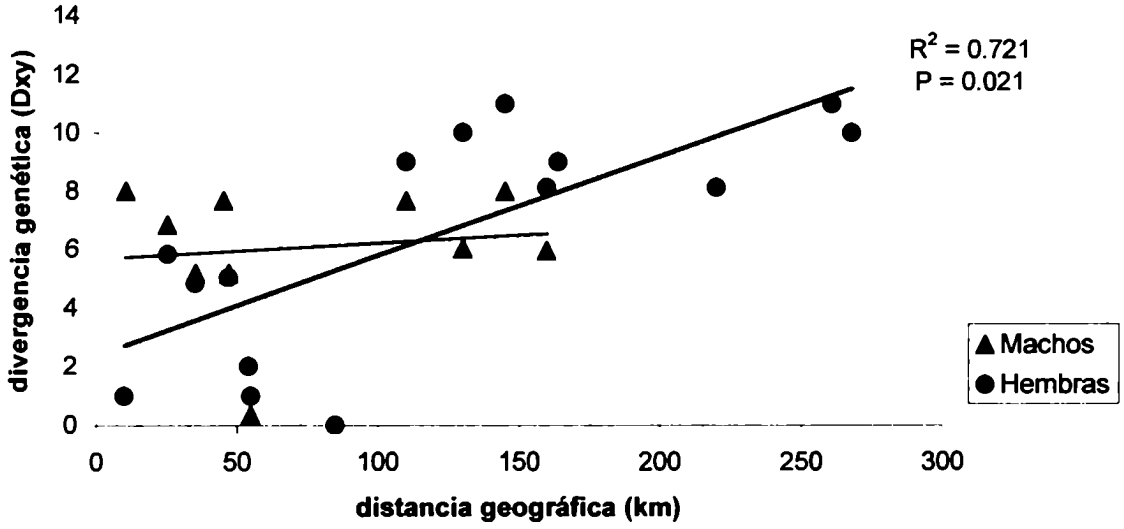
Estos resultados sugerirían que existe una relación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica entre las localidades muestreadas. Sin embargo, es necesario conocer los efectos de los dos linajes mitocondriales principales y la posible migración diferencial de machos y hembras para un mejor entendimiento de la estructuración de la variabilidad genética de la región.

5.3. Divergencia genética vs. distancia geográfica según el sexo

En este trabajo se propuso analizar si en *Alouatta caraya* existiría un patrón diferencial de flujo génico entre hembras y machos, siendo bajo en hembras y alto en machos y que en las hembras estaría asociados a menores distancias geográficas. Para contribuir a responder esta pregunta, se analizó la correlación entre el número de diferencias nucleotídicas promedio entre las localidades de procedencia de los aulladores con la distancia geográfica diferenciando, en este caso, entre las hembras y machos de cada una (Figura 35).

La prueba de Mantel mostró ausencia de correlación significativa para los machos (r^2 = 0,1082, b = 0,639, $P \geq 0,5$) mientras que para las hembras la correlación si lo fue (r^2 = 0,721, b = 6,885, P = 0,021) (Figura 34).

Figura 35. Relación según los sexos entre divergencia genética (D_{xy}) y distancia geográfica entre las localidades muestreados



Estos resultados sugieren un posible patrón de aislamiento por distancia en las hembras frente a un alto flujo génico en los machos. Si bien los resultados apoyan la hipótesis propuesta, un mayor número de muestras permitirían una contrastación más concluyente.

5.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

El AMOVA permite examinar si existe un patrón jerárquico en la distribución de la diversidad genética entre grupos (Excoffier *et al.*, 1992). Estos grupos pueden ser definidos por el usuario en función de la hipótesis que se desea poner a prueba (Excoffier *et al.*, 1992). El análisis jerárquico de la varianza permite dividir la varianza total (σ^2_T) en tres componentes de covarianza: uno debido a diferencias entre los individuos de una población (σ^2_c), otro a diferencias entre poblaciones (σ^2_a) y el tercero a diferencias entre regiones (σ^2_b). En base a esta partición se definen los estadísticos ϕ (phi) (Excoffier *et al.*, 1992) como:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma^2_a + \sigma^2_b}{\sigma^2_T} \quad \phi_{CT} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T} \quad \phi_{SC} = \frac{\sigma^2_b}{\sigma^2_b + \sigma^2_c}$$

En este trabajo, dado el bajo tamaño muestral para casi todas las localidades -excepto IB- en los AMOVAs, se decidió agrupar a los individuos en base a la cercanía geográfica de las localidades de procedencia (Tabla 27). De esta manera para los análisis de distribución marginal sur a nivel regional, se agruparon a los individuos de Loreto y Yaciretá como Grupo "Río Arriba" en referencia al Paraná, y a los individuos de San Cayetano, Itatí y CAPRIM como Grupo "Tierra Firme".

En el primer análisis (AMOVA 1) la pregunta (hipótesis ad hoc) planteada fue si existiría un patrón de estructuración de la variabilidad genética entre los 3 grupos definidos como "Río Arriba", "Tierra Firme", e Isla Brasilera. Se consideró una región con varios grupos y cada una de ellas se consideró como una unidad, es decir no se discriminaron las tropas o localidades muestradas (Tabla 27).

Tabla 27. AMOVA 1 Variabilidad entre grupos

Fuente de variación	g, l,[1]	% de variación	σ^2 medios esperados
Entre grupos	2 (G-1)	27,59	$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$
Dentro de las grupos	66 (N-G)	72,41	σ^2_b
Total	68 (N-1)		σ^2_T

Coeficiente de correlación $\phi_{ST} = \sigma^2_a / \sigma^2_T = 0,276$
$P < 0,00001$

[1] g. l. Grados de libertad, G, grupos, N, individuos.

[2] *P*, proporción del total de las permutaciones al azar en el cual el valor obtenido fue mayor al observado (o probabilidad de encontrar un componente de la varianza mayor al estimado debido sólo al azar).

En el AMOVA 1 se observó que el componente entre grupos permite explicar el 28% de la variación total y que las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas (ϕ_{ST}=0.276) (Tabla 27). Es decir que existiría una estructuración de la variablidad genética, pero la mayor parte de la variabilidad haplotípica (72 %) se puede explicar por la variabilidad dentro de los grupos.

Esta alta variabilidad encontrada dentro de los grupos podría reflejar la variación entre los linajes mitocondriales A y B. Para analizar esta posibilidad se realizó un segundo análisis de AMOVA (AMOVA 2). Para este análisis se subdividieron los ejemplares muestreados en las localidades de Isla Brasilera y de CAPRIM en los dos linajes de haplotipos A y B, como se realizó para la construcción del fenograma de la Figura 33. A su vez dentro de cada clado se mantuvieron los haplotipos por localidad dando un total de 8 grupos, 4 por cada clado (Tabla 28).

En el análisis de AMOVA 2 se pudo observar que la mayor parte de la variabilidad haplotípica se debería a variación entre los clados A y B (73%) con un coeficiente de correlación altamente significativo (ϕ_{ST} = 0,724). En este análisis se observó que la

variabilidad dentro de cada clado permitiría explicar el 27% del total de la variabilidad observada (Tabla 28).

Tabla 28. AMOVA 2 Comparación de los dos clados mitocondriales A y B

Fuente de variación	g. l.[1]	% de variación	σ^2 medios esperados
Entre clados A y B	7 (G-1)	72,43	$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$
Dentro de los clados	61 (N-G)	27,57	σ^2_b
Total	68 (N-1)		σ^2_T
Coeficiente de correlación $\phi_{ST} = \sigma^2_a / \sigma^2_T = 0,7243$ $P < 0,00001$			

[1] g. l. Grados de libertad, G, grupos: Clado A: IB-A, Itatí, San Cayetano y CAPRIM-A; clado B: IB-B, CAPRIM-B, Loreto y Yaciretá. N, individuos.

Considerando los dos clados mitocondriales y su posible vinculación con los ríos Paraguay y Paraná respectivamente como rutas de dispersión, la siguiente pregunta planteada fue si dentro de cada clado era posible detectar un patrón de estructuración en relación con cada uno de los ríos. De esta manera se diseñó el AMOVA 3 considerando los grupos "IB" (IB-A) y "Tierra Firme" (San Cayetano, Itatí y CAPRIM-A) dentro del clado A (Tabla 29). Este análisis mostró que sólo el 20% de la variación se debería a la variación entre los grupos con un coeficiente de correlación significativo ($\phi_{ST} = 0,1982$).

Tabla 29. AMOVA 3 Variación dentro del Clado A

Fuente de variación	g. l.[1]	% de variación	σ^2 medios esperados
Entre grupos	1 (G-1)	19,82	$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$
Dentro de las grupos	37 (N-G)	80,18	σ^2_b
Total	38 (N-1)		σ^2_T
Coeficiente de correlación $\phi_{ST} = \sigma^2_a / \sigma^2_T = 0,1982$ $P = 0,01$			

[1] g. l. Grados de libertad, G, grupos, N, individuos.

En cambio, cuando se analizó únicamente el clado B, considerando los grupos "IB" (Isla Brasilera-B) y "Tierra Firme" (Loreto, Yaciretá y CAPRIM-B) (AMOVA 4, Tabla 30). Este análisis reveló que el 57% de la variación dentro del clado B se debería a variación entre grupos, es decir más del doble del valor estimado entre los grupos del clado A (Tabla 29) (ϕ_{ST} = 0,5726).

Tabla 30. AMOVA 4 Variación dentro del Clado B

Fuente de variación	g. l.[1]	% de variación	σ^2 medios esperados
Entre grupos	1 (G-1)	57,26	$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$
Dentro de las grupos	28 (N-G)	42,74	σ^2_b
Total	29 (N-1)		σ^2_T
Coeficiente de correlación $\phi_{ST} = \sigma^2_a / \sigma^2_T = 0,57265$ $P < 0,00001$			

[1] g. l. Grados de libertad, G, grupos, N, individuos.

Considerando los resultados de los AMOVAs en su conjunto, la mayor parte de la variación sería explicable por la diferenciación entre los linajes mitocondriales A y B. Estos resultados apoyarían la hipótesis propuesta acerca de que cada linaje mitocondrial podría corresponder a dos eventos colonizadores independientes y que el patrón de estructuración de la variabilidad mitocondrial a nivel regional estaría marcado principalmente por los eventos históricos.

5.5. Índices de fijación

Con el fin de completar el análisis de estructuración genética se estimaron los índices de fijación (Wright, 1951, 1965) en base a las diferencias nucleotídicas promedio entre los grupos (D_{xy}) considerando los 3 grupos definidos para el AMOVA 1: Río Arriba, Tierra Firme e IB, (Tabla 31).

Tabla 31. Valores de F_{ST} por debajo de la diagonal, por arriba se muestran la proporción de permutaciones que presentaron valores mayores o iguales a los observados, obtenidos luego de 3024 permutaciones

	I. Brasilera	Tierra Firme	Río Arriba
I. Brasilera		0.0000	0.0000
Tierra firme	0.21164		0.0000
Río Arriba	0.34633	0.72108	

Los valores de F_{ST} fueron significativos en todas las comparaciones de a pares (Tabla 31) en concordancia con lo observado en el AMOVA 1 cuando se analizó la variabilidad entre grupos (Tabla 26). El mayor valor de F_{ST} se observó en la comparación entre Tierra Firme y Río Arriba, mientras que las comparaciones que involucraron a I. Brasilera mostraron valores intermedios que podrían ser explicados por la presencia en esta población de los dos clados mitocondriales A y B.

5.6. Estimación del flujo génico entre las poblaciones

El modelo de islas de Wright (1931, 1943) considera que una población está estructurada en un número finito de subpoblaciones cada una del mismo tamaño, y que en cada subpoblación, una proporción *m* del acervo genético proviene de inmigrantes que pueden ser considerados como una muestra al azar del total de la población. De esta manera, si *m* es pequeño, se puede definir el índice de fijación como

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4 Nm)$$

A su vez, Slatkin (1995) considera un modelo donde dos poblaciones de tamaño N provenientes de un conjunto de poblaciones, presentan una proporción *m* de migrantes en cada generación, y que la mutación es despreciable frente a la tasa de migración. En el equilibrio migración-deriva, el índice de fijación estaría dado por

$$F_{ST} = 1 / (2M + 1)$$

donde M es el número absoluto de migrantes entre las poblaciones y puede ser estimado por

$$M = (1 - F_{ST}) / 2 F_{ST}$$

En el caso de considerar dos poblaciones, M se divide por 2, dando el estimador $M' = Nm$, en el caso de haplotipos. El valor esperado de F_{ST} en este modelo viene dado por

$$F_{ST} = \frac{1}{\frac{(4 N m d)}{(d - 1)} + 1}$$

donde d es el número de demos entre los que ocurre flujo génico. Cuando d es grande F_{ST} tiende al valor $1 / (4Nm +1)$ de Wright (1931, 1943), pero cuando $d = 2$, F_{ST} es $1 / (8Nm+1)$.

Las estimaciones del flujo génico $M' = N m$ se obtuvieron de acuerdo a la metodología propuesta por Slatkin (1995) en base a las diferencias promedio (D_{xy}) (Tabla 32).

Tabla 32. Matriz M′ mostrando los valores de N*m* entre las localidades de muestreo

	I. Brasilera	Río Abajo	Río Arriba
I. Brasilera			
Río Abajo	1.86253		
Río Arriba	0.94369	0.19340	

En la Tabla 32 se observa un gradiente en los valores de flujo génico con un mínimo en la comparación Río Abajo y Río Arriba (N*m* = 0.19), intermedio entre I. Brasilera y Río Arriba (N*m* = 0.943) y máximo entre I. Brasilera y Río Abajo (N*m* = 1.86). El valor medio observado fue de N*m* = 0.999 que reflejaría el flujo génico a nivel regional.

5.7. Flujo génico y distancia geográfica

Para continuar con el análisis del modelo de aislamiento genético por distancia se evaluó la correlación entre las matrices M′ (N *m*) (Tabla 32) y la matriz de distancia geográfica según la prueba de permutación de Mantel (Mantel, 1967). Este análisis no mostró una correlación significativa debido probablemente a la presencia de los dos linajes mitocondriales en Isla Brasilera junto al hecho de estar más alejada geográficamente de la región Río Arriba.

Para completar el análisis de patrones de migración según los sexos, se debería realizar este mismo análisis evaluando cada uno de los sexos. Considerando la relación observada anteriormente entre divergencia genética y distancia geográfica según los sexos, se esperaría que al evaluar los índices de fijación y el flujo génico, estos mostrasen resultados concordantes. En las hembras se esperaría encontrar valores mayores de F_{ST} y menores de flujo génico al aumentar la distancia. En machos se esperarían menores valores de F_{ST} y mayores de flujo génico sin una correlación con la distancia. Sin embargo, debido a que las estimaciones del flujo génico se basan en los índices F_{ST} y dado que el tamaño muestral para algunas localidades es pequeño, no se pudieron realizar estos análisis para cada sexo.

6. Patrón demográfico y tamaño efectivo poblacional

6.1. Índices de fijación (F_{ST}) transformados

El índice de fijación F_{ST} se considera como un estimador de la diferenciación entre las poblaciones a lo largo del tiempo y del flujo génico entre las poblaciones en el marco de la teoría de coalescencia (Slatkin, 1991, 1995). Considerando 2 poblaciones de tamaño N que han divergido τ (tau) generaciones (también unidades mutacionales temporales), en ausencia de migración entre ellas, Slatkin (1995) propone que el índice F_{ST} puede ser expresado en términos del tiempo de coalescencia t_1, que es el tiempo medio de coalescencia o el tiempo que debemos retroceder para encontrar al ancestro común de dos alelos pertenecientes a dos poblaciones diferentes, y t_0 que es el tiempo medio de coalescencia de dos genes pertenecientes a una misma población. Slatkin (1995) define este modelo demográfico como modelo de radiación en el cual

$$F_{ST} = (t_1 - t_0) / t_1$$

A su vez, en ausencia de migración t_0 es igual a 2N, y t_1 es igual a τ + N, según la teoría de coalescencia (*e.g.*, Hudson, 1990), de esta manera se puede expresar

$$F_{ST} = \tau / \tau + N$$

donde el cociente D (o T) = F_{ST} / (1 - F_{ST}) que es igual a τ / N y es proporcional al tiempo desde que las dos poblaciones divergieron (Slatkin, 1995).

Considerando también la teoría de coalescencia, Reynolds *et al.* (1983) proponen que bajo un modelo de poblaciones con tamaños constantes el valor de F_{ST} estaría dado por

$$F_{ST} = 1 - (1 - 1/N)^{\tau} = 1 - e^{-\tau/N}$$

donde D = - log (1 - F_{ST}) que es aproximadamente τ / N considerando pequeños tiempos de divergencia y también se lo denomina coeficiente de coancestralidad.

Los valores de F_{ST} se calcularon entre los grupos muestreados según la fórmula linearizada propuesta por Slatkin (1995) donde $D = \tau / M = F_{ST} / (1 - F_{ST})$ (donde M = N para datos haploides, M = 2N para datos diploides) y el coeficiente de coancestralidad (Reynolds *et al.*, 1983) donde $D = \tau / M = - \ln (1 - F_{ST})$ (Tabla 33).

Tabla 33. Matriz de valores de D (τ / N) estimados empleando los valores de F_{ST} linearizado (Slatkin, 1995) por arriba y por debajo de la diagonal según los coeficientes de coancestralidad (Reynolds *et al.*, 1983)

	I. Brasilera	Río Abajo	Río Arriba
I. Brasilera		0,2684	0,5298
Río Abajo	0,2378		2,5853
Río Arriba	0,4251	1,2768	

En general, ambos estimadores de D mostraron valores similares para cada comparación, excepto entre Río Arriba y Río Abajo, donde el valor de D (τ / N) del F_{ST} linearizado (2,58) fue mayor al coeficiente de ancestralidad (1,27). Para interpretar estos hallazgos resulta interesante relacionar los valores estimados para τ / N con el flujo génico entre los grupos muestreados (Tabla 34).

Tabla 34. Valores estimados de N*m* entre los grupos por debajo de la diagonal y por arriba se indican los valores para D (τ / N) (Slatkin, 1995)

	I. Brasilera	Río Abajo	Río Arriba
I. Brasilera		0,2684	0,5298
Río Abajo	1,8625		2,5853
Río Arriba	0,9436	0,1934	

En la Tabla 34 se observó un patrón general donde un alto nivel de flujo génico presentó un bajo valor de D, por ej. la comparación Río Arriba y Río Abajo que mostró el menor valor de flujo génico y el mayor valor de D.

Este patrón podría ser el resultado de una divergencia reciente, o por un alto grado de cohesión entre las poblaciones. Considerados ambos estimadores basados en los valores de F_{ST}, no se pueden diferenciar los procesos contemporáneos (flujo génico) de los eventos históricos (coancestralidad) (Hedrick, 1999). Para lograr un mejor entendimiento del proceso de diferenciación genética en la región se realizó un análisis del los procesos demográficos empleando otros métodos basados en la teoría de coalescencia que permitieran inferir eventos de retracción-expansión poblacional.

6.2. Estimación de los tamaños poblacionales y tiempo de divergencia

La teoría de la coalescencia provee el marco teórico que permite inferir procesos evolutivos tanto determinísticos como eventos históricos (contingentes) a través de las genealogías de genes (*e.g.*, Cann, 2001). Dado que los cambios en el tamaño poblacional dejan una huella particular en las secuencias de ADN, se han desarrollado varias pruebas estadísticas para detectar expansiones poblacionales como las pruebas de Tajima, D (Tajima, 1989), R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) y F_S (Fu, 1997). También hay estadísticos como el "raggedness" *rg*, que se basa en el análisis de la distribución de diferencias entre secuencias o "mismatch distribution" (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). En particular, bajo un modelo de expansión poblacional la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias se debería ajustar a una curva de Poisson -unimodal- (Rogers & Harpending, 1992).

El modelo de expansión poblacional presupone una población inicial de tamaño N_0, caracterizada por un θ_0, que crece rápidamente hasta alcanzar un nuevo N_1 con un valor θ_1, este pico de crecimiento se asume que ocurrió en un tiempo mutacional τ (Slatkin & Hudson, 1991). Rogers (1995) realizó una simplificación del modelo considerando que en el caso de

una expansión poblacional, el valor de θ_1 tendería a infinito, permitiendo estimar los valores de τ' y θ'_0 en el momento en que ocurrió la expansión poblacional de acuerdo a

$\theta'_0 = (\upsilon - m)^{1/2}$

$\tau' = m - \theta'_0$

donde m y υ son la media y la varianza de las distribuciones de la 'mismatch distribution' (Rogers, 1995).

El objetivo de esta sección fue analizar si la variabilidad haplotípica observada a nivel regional tanto como en cada clado, permite detectar eventos de expansión poblacional. En caso afirmativo, el objetivo sería datar esos eventos con el fin de relacionarlos con la colonización de la región sur de distribución de la especie en un contexto filogeográfico. Para esto se estimaron los parámetros τ, θ_0 y θ_1 bajo un modelo de expansión poblacional según el método propuesto por Rogers y Harpending (1992) y también se evaluaron los estadísticos D, R_2, F_S y *rg* (Tabla 37).

En la Figura 36 se graficaron los patrones de distribución de los números de diferencias promedio entre pares de secuencias en el total de los datos y para cada clado por separado. En el clado A se observó un pico principal (correspondiente a una moda de 3 diferencias entre pares de secuencias) dando una curva unimodal que se ajusta a lo esperado bajo un modelo de expansión poblacional. Para el clado B, si bien la curva fue más achatada la moda y forma coincidió con la del clado A. En ambos clados las curvas indicarían procesos de expansión poblacional (Figura 36). Cuando se analizó la distribución, considerando ambos linajes, se observó una curva bimodal que no reflejaría cualitativamente una expansión poblacional sino un patrón filogeográfico de tipo II como fue descripto previamente (Figura 36).

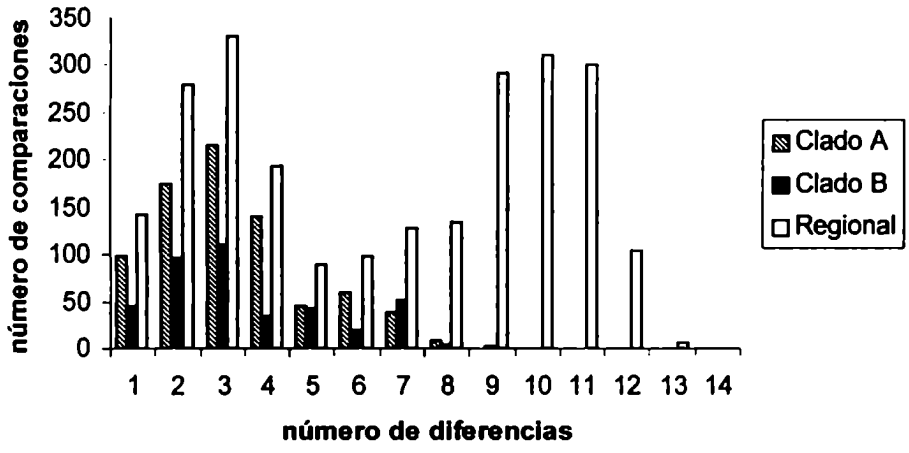


Figura 36. Frecuencia de la distribución de las diferencias entre los haplotipos de los Clados A y B, y en su conjunto considerado como variabilidad Regional.

En la Tabla 35 se dan los valores de los parámetros poblacionales observados y estimados suponiendo un modelo de expansión poblacional junto con los valores de los estadísticos de las pruebas para contrastar la hipótesis de expansión poblacional. Las pruebas estadísticas empleadas pusieron en evidencia diferente tipos de resultados. Por un lado los valores de *rg* fueron no significativos en los tres casos (Tabla 35) pero cabe mencionar que el *rg* se considera como un estadístico conservativo (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Por otro lado, los estadísticos D y R_2 sólo fueron marginalmente significativos para el clado B. En cambio, el estadístico F_S, considerado uno de los de mayor potencia (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), fue significativo para los 3 conjunto de datos (Tabla 35). Estos resultados apoyarían la hipótesis propuesta de que la variabilidad haplotípica tanto a nivel regional y dentro de cada clado reflejaría eventos de expansiones poblacionales.

Tabla 35. Parámetros poblacionales e índices de neutralidad

	Regional	Clado A	Clado B
Número de individuos	69	40	29
Número de haplotipos	29	16	13
Diversidad haplotípica	0,940	0,8744	0,889
S	26	15	16
θ (π) por sitio	0,0083	0,0034	0,0038
θ (p_S) por sitio	0,0082	0,0053	0,0061
m : valor de `Mismatch´ medio (Π)	5,6	2,297	2,571
υ: varianza de los `mismatchs´	7,9	2,797	3,816
τ: tiempo mutacional desde la expansión	2,854	1,591	1,456
θ_0 (antes de la expansión)	2,694	0,707	1,16
θ_1 (después de la expansión)	infinito	infinito	infinito
rg	0,0222 NS	0,0398 NS	0,07 NS
D	0,0882	-1,11	-1,261
P	*0,60*	*0,139*	*0,093*
R_2	0,103	0,0727	0,0728
P	*0,56*	*0,106*	*0,039*
F_S	-10,760	-8,484	-5,359
P	*0,007*	*0,003*	*0,02*

Por lo tanto, considerando el parámetro τ como estimador del tiempo mutacional siendo $\tau = 2\ u\ T$ (donde T es el tiempo generacional y u la tasa mutacional por generación), y que el N_e antes y después de la expansión se estima considerando el parámetro mutacional θ siendo $\theta_0 = 2N_{e0}\ u$ y $\theta_1 = 2N_{e1}\ u$ se puede estimar cuánto tiempo ha transcurrido desde la expansión poblacional (*e.g.*, Tajima, 1989; Harpending, 1994; Excoffier & Schneider, 1999).

La tasa mutacional por generación u se estimó como $u = \mu \times m_T \times g$, siendo m_T el largo de la secuencia analizada, g el tiempo generacional y μ la tasa de mutación por sitio por año (Rogers & Harpending, 1992). El largo de la secuencia analizada fue de 699 pb ya que el programa DNAsp (Rozas & Rozas, 1999) no considera los gaps y los excluye del análisis. Dado que no existe una tasa de mutación estimada para la región mitocondrial de *A. caraya*,

ni de otro platirrino y dada la dificultad de estimar una, en parte debido a la falta de evidencia fósil, se decidió considerar tasas de mutación estimadas y empleadas para otros primates. En particular se empleó la tasa de mutación usada comúnmente en humanos (*Homo sapiens*) y chimpancé (*Pan*) de 0,33 (μ_1) cambios por sitio por millón de años (Ward *et al.*, 1991). Dado que los cambios observados fueron sólo transiciones, se usó también la tasa de sustitución de transiciones estimada para gorilas (*Gorilla*) de 0.2 (μ_2) y 0.15 (μ_3) y cambios por sitio por millón de años (Jensen-Seaman & Kidd, 2001). El tiempo generacional considerado para *A. caraya* fue de 5 años ya que es la edad media de las hembras en la primera parición (Zunino, 1996). Los estimaciones de tiempo de coalescencia y tamaños efectivos se pueden observar en la Tabla 36.

Tabla 36. Parámetros poblacionales

Parámetros	μ_1	μ_2	μ_3
Regional			
Tiempo de coalescencia (años)	6500	10200	13600
Población inicial de hembras	1200	2000	2570
Población actual de hembras	2500	4000	5300
Clado A			
Tiempo de coalescencia (años)	3600	5700	7600
Población inicial de hembras	350	500	700
Población actual de hembras	1000	1600	2200
Clado B			
Tiempo de coalescencia (años)	3300	5200	7000
Población inicial de hembras	530	800	1100
Población actual de hembras	1300	1800	2500

μ_1: 0.33 x 10^{-6} cambios/ sitio/ año; μ_2: 0.2 x 10^{-6} cambios/ sitio/ año; μ_3: 0.15 x 10^{-6} cambios/ sitio/ año

Los valores estimado para el tiempo de divergencia de los dos clados A y B analizados, si bien son diferentes en función de la tasa de mutación empleada, varían en un rango de 13600 y 6500 años.

Los tiempos de coalescencia para cada clado presentan un rango similar entre los 3.300 y 7.600 años, revelando una brecha entre la divergencia de los dos clados y la expansión dentro de los mismos.

Este patrón genealógico podría indicar un proceso de subdivisión de la población o bien podría deberse al mantenimiento de los linajes por un proceso de selección equilibradora. Una forma de diferenciar si un proceso se debió a selección o a deriva es comparar las genealogías obtenidas a partir de diferentes loci, ya que un proceso selectivo sólo afectará un locus (y loci ligados) mientras que uno de deriva, afectará a todo el genoma produciendo una disminución de la variabilidad en general para todos los loci. En este trabajo a fin de diferenciar procesos determinísticos que podrían afectar al genoma mitocondrial se analizó la variabilidad genética a nivel de nuclear por microsatélites.

6.3. Análisis de microsatélites

En 27 ejemplares de *A. caraya*, los 8 loci de microsatélites analizados no mostraron variación de tamaño siendo todos monomórficos (Tabla 37).

Tabla 37. Tamaño (pb) de los alelos de microsatélites obtenidos en este trabajo en *A. caraya*.

Locus	Ap40	Ap68	Ap74	D5S111	D6S260	D8S165	D14S51	D17S804
Tamaño	171	168	174	166	189	143	139	176

Dado que en otras especies de aulladores, para los cuales se utilizaron los mismos loci se observaron patrones de variabilidad bajos (*Alouatta palliata* y *A. pigra*, Cortés-Oriz, com. personal) podría considerarse el hecho de que los marcadores empleados no fueran específicos y que probablemente en aulladores esos marcadores sean poco polimórficos y por lo tanto poco informativos. En este sentido otros estudios mostraron que una muestra de 12 ejemplares de *Alouatta seniculus* de procedencia desconocida, del análisis de 3 de estos loci (AP40, AP68 y AP74), uno (AP40) también fueron monomórficos, mientras que AP68 y AP74 presentaron 5 y 2 alelos respectivamente (Ruiz-García *et al.*, 2002) (Tabla 38). En 12 ejemplares de *Lagothrix lagotricha* -un atélido- para los loci AP74, D5S111, D6S260 y D17S804 se observaron: 8, 4, 7, 3, y 3 alelos respectivamente, en tanto que los loci AP40, AP68 y D14S51 fueron monomórficos (Ruiz-García *et al.*, 2002) mostrando en el mismo estudio un patrón de mayor variabilidad que el observado para *A. seniculus* (Tabla 38).

Tabla 38. Variación en el tamaño de los alelos (pb) para microsatélites en atélidos indicándose entre paréntesis el número de alelos descriptos en cada caso.

Locus	Ap40	Ap68	Ap74	D5S111	D6S260	D14S51	D17S804
Alouatta caraya	171	168	174	166	189	139	176
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Alouatta seniculus[1]	nd	192-200	164-168				
	(1)	(5)	(3)				
Lagothrix lagotricha[1]	nd	nd	145-167	nd	nd	nd	158-170
	(1)	(1)	(8)	(4)	(3)	(1)	(3)

[1] Ruiz García *et al.* (2002), nd dato no disponible

Cuando se incluyeron en la comparación especies de cébidos se observó un mayor número de alelos como en *Cebus albifrons* (n=33) y *Saimiri sciureus* (n=37) que presentaron 21 y 10 alelos respectivamente para el locus AP74 (Ruiz-García *et al.*, 2002). De esta manera se podría interpretar que, para estos microsatélites, los atélidos presentarían una menor variabilidad, siendo 2 de los loci (AP40 y D14S51) monomórficos para las tres especies de atélidos comparadas mientras que AP68 fue monomórfico para *Alouatta caraya* y *Lagothrix lagotricha* (Tabla 38).

Alternativamente, se podría considerar que algunos loci presenten alelos nulos es decir que la región flanqueante presentara una mutación que evite la amplificación del alelo. Ante frecuencias bajas o medias del alelo nulo, la mayoría de los individuos serían heterocigotos para el alelo nulo y sería clasificado erróneamente como homocigoto (Haavie *et al.*, 2000).

Para profundizar este tipo de estudios sería necesario diseñar iniciadores específicos para estudios poblacionales en *A. caraya*.

Si bien los resultados de la variabilidad nuclear obtenidos en microsatélites son preliminares, indicarían una disminución importante de la variabilidad genética. Esto indicaría los efectos de algún proceso demográfico como por ejemplo un cuello de botella, descartando un posible proceso selectivo.

IV. Resultados -Isla Brasilera

1. Diversidad mitocondrial en *Alouatta caraya* de Isla Brasilera

1.1. Descripción general de los haplotipos

Los 57 ejemplares de Isla Brasilera (IB) (Chaco, Argentina) analizados en esta Tesis 13 grupos sociales o tropas distribuidos en el Albardón Principal (AP) y Montes (M) de la isla (Figura 13, Capítulo II) (Tabla 39).

Tabla 39. Tropas muestreadas en IB

Tropas [1]	Fecha de Muestreo [1]	Tamaño de Grupo [1]	Muestras [1] totales	Muestras [1] hembras	Número de Haplotipos	Región en IB [1]
X0	12/3/99	2	2	1	2	Punta Sur
X2	2/11/99	15	1	1	1	AP
X4-X5	2/3/99	11	5	3	2	Punta Sur
X6	23/9/97	5	1	1	1	M-este
X10	5/3/99	11	4	1	4	AP
X11	5/7/99	12	2	1	2	M-Laguna
X19	27/7/98	5	2	1	2	M-este
X23	2/11/99	13	2	0	1	Punta Norte
X24	23/9/97	20	6	3	3	AP
X28	5/7/99-5/6/01	14	11	7	5	AP
X29	12/3-17/12/99	15	14	6	6	AP
X30	16/07/01	?	4	0	4	AP
X31	6/6/01	.	3	1	2	AP
Total 13		123	57	26		

? dato no disponible

[1] datos aportados por el Dr. Zunino. Se indican las regiones para una mejor explicación de la estructuración geográfica de los datos. M indica Monte, Punta Sur y Punta Norte son regiones de la isla que presentan ambientes referidos como Monte en este trabajo.

Del total de los 33 haplotipos descriptos en este trabajo, en IB se observaron 27 haplotipos diferentes. A su vez, 7 de estos haplotipos (H001, 009, 010, 011, 021, 026 y 027) se encontraron en más de una tropa (Tabla 39 y 40). El número promedio de diferencias entre haplotipos fue de 5,5 pb mostrando un rango entre 1 y 12 diferencias (Tabla 22).

Tabla 40. Frecuencias relativas de los haplotipos analizados en cada tropa de IB

Haplotipos	Tropas												
	X0	X2	X4	X6	X10	X11	X19	X23	X24	X28	X29	X30	X31
	(2)	(1)	(5)	(1)	(4)	(2)	(2)	(2)	(6)	(11)	(14)	(4)	(3)
001	0	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0,29	0	0
002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0
003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0
004	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
007	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
009	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0,36	0	0,67
010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0,33
011	0	0	0	0	0,25	0	0,5	0	0	0	0	0	0
012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0
013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0
014	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
015	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
016	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
017	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
019	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0	0
021	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0,64	0	0	0
022	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
023	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0	0
025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0
026	0	0	0	0	0	0	0	0	0,67	0	0	0,25	0
027	0	0	0	1	0	0	0	0	0,17	0	0	0	0
028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0	0
029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0
030	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0

A partir de la matriz de diferencias nucleotídicas entre las secuencias de todos los individuos se obtuvo una genealogía empleando el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) (Figura 36). En el fenograma se pudo observar nuevamente la presencia de dos grupos principales correspondientes a los clados A y B descriptos en la sección anterior de este capítulo. En general, no se visualizó una estructuración completa de los haplotipos en función de las tropas a las que pertenecían (Figura 36). Si bien, en las tropas de donde se obtuvieron más muestras (X29, X28 y X24) se observó un haplotipo mayoritario (Figura 36).

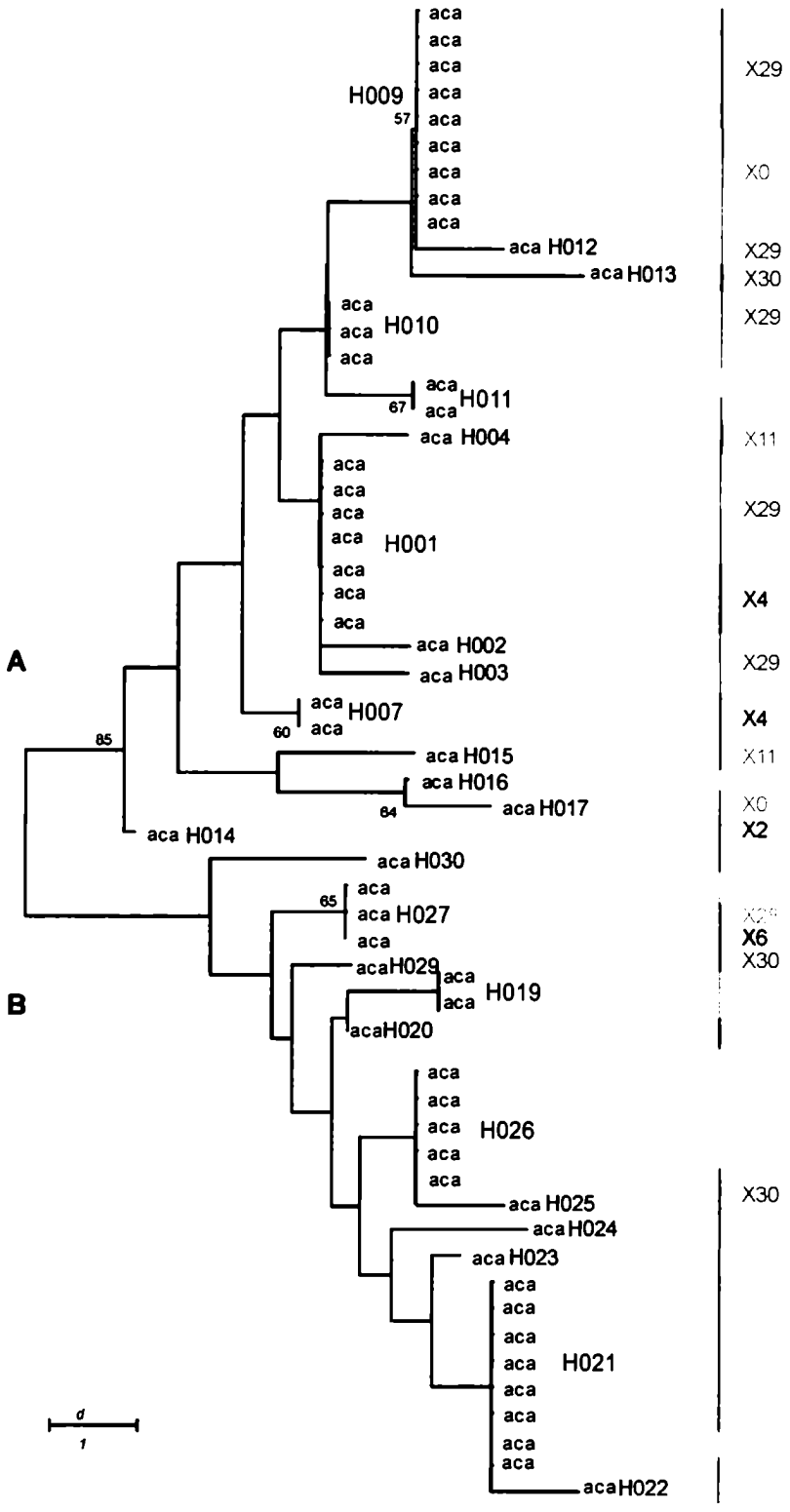


Figura 36. Árbol de Neighbor-Joining no enraizado en base a las diferencias de a pares entre todos los individuos analizados en Isla Brasilera. A la derecha de la figura se indica la tropa a la cual pertenece cada individuo. Los números en las ramas son el valor de bootstrap mayor al 50% luego de 1000 réplicas.

La diversidad haplotípica estimada para la población de Isla Brasilera (IB) fue de 0,936 (desviación estándar ± 0,0163). Se observó la presencia de 21 sitios segregantes (S) que coincidió con el valor observado para η (número de mutaciones), siendo 7 de ellas mutaciones únicas (singletons) (η_s) para las posiciones: 156, 200, 286, 325, 356, 369, 513 (Tabla 22).

El número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias tomadas al azar de la población o índice de diversidad nucleotídica (Π) estimado para IB fue de 5,5 (± 2,7) mientras que su valor en relación al número de sitios analizados (π) mostró un valor de 0,0082 (± 0,0044).

El parámetro mutacional $\theta = 2N_e u$ estimado en base a π y p_S (p_S = S/número de sitios analizados) mostró valores de θ (π) por sitio, igual a 0,0082 y θ (p_S) por sitio igual de 0,0071.

1.3. Divergencia nucleotídica entre las tropas

Para analizar el nivel de diferenciación genética entre las tropas de IB, se evaluaron las diferencias nucleotídicas promedio (D_{xy}) y las distancias netas (D_a) entre las tropas, y el número de diferencias promedio dentro de cada tropa (Tabla 41). La diferenciación promedio entre tropas mostró un amplio rango de valores desde 1,2 diferencias entre las tropas X29 y X31, hasta 10 diferencias entre las tropas X28 y X11 (Tabla 39). A su vez, el número promedio de diferencias nucleotídicas dentro de las tropas también mostró un amplio rango de variación con 0 diferencias en la tropa X23 (H019) y 6 diferencias promedio en la tropa X10 (Tabla 39) donde sobre un total de 11 individuos censados de los 4 individuos muestreados todos presentaron haplotipos distintos.

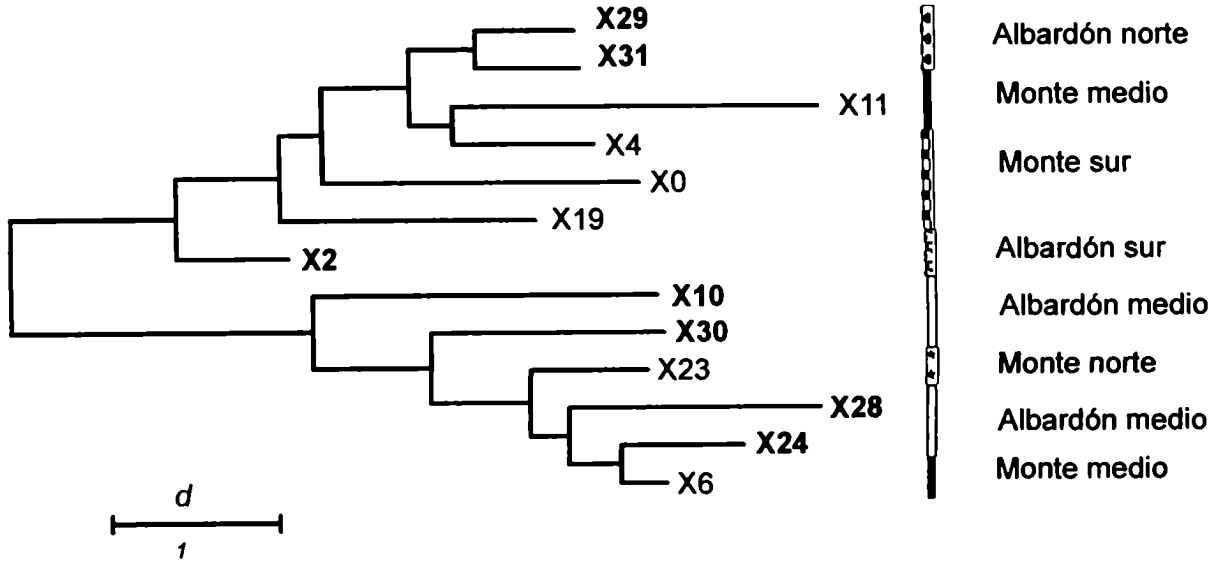
Tabla 41. Divergencia nucleotídica entre y dentro de las tropas de IB (Número neto de sustituciones y número promedio de sustituciones entre las tropas por arriba y por debajo de la diagonal, en la diagonal se indica el número de diferencias promedio en cada tropa)

Tropas	X0 (2)	X2 (1)	X4 (5)	X6 (1)	X10 (4)	X11 (2)	X19 (2)	X23 (2)	X24 (6)	X28 (11)	X29 (14)	X30 (4)	X31 (3)
X0	**6**	1	0,7	4	1,5	-0,5	-2	4	4,667	3,764	-0,1	1,917	-0,33
X2	4	**n/c**	2,3	5	2,5	2	1	5	5,667	4,945	2,33	3,667	2,333
X4	4	2,6	**0,6**	7,3	4	0,7	0,7	7,3	7,967	6,955	0,573	5,167	1,433
X6	7	5	7,6	**n/c**	1	7	3	2	0,667	1,218	7,33	0,667	7,333
X10	7,5	5,5	7,3	4	**6**	3,75	1	1	0,25	6,67273	3,83	4,91667	3,833
X11	4,5	4	3	9	8,8	**4**	0	7	7,667	6,673	0,901	4,917	1,333
X19	3,5	3,5	3,5	5,5	6,5	4,5	**5**	3	3,667	2,945	0,33	1,667	0,333
X23	7	5	7,6	2	4	9	5,5	**0**	1	0,945	7,33	0,667	7,333
X24	8	6	8,6	1	3,6	10	6,5	1,3	**0,667**	0,279	7,996	0,083	8
X28	8,2	6,4	8,7	2,6	4,2	10,1	6,9	2,5	2	**2,836**	6,834	0,248	6,794
X29	3,6	3,1	1,6	8,1	7,6	3,6	3,6	8,1	9,1	9	**1,484**	4,782	0,092
X30	7	5,8	7,5	2,8	4,5	9	6,3	2,8	2,5	3,8	7,6	**4,167**	4,667
X31	3	2,7	2,1	7,7	7,2	3,7	3,2	7,7	8,7	8,5	1,2	7,1	**0,667**

n/c indica que no se pudo calcular el estimador por datos insuficientes

Con los valores de las diferencias promedio de a pares entre las tropas se realizó un análisis de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) que se muestra en Figura 37. A la derecha de la misma se describe la región de la Isla Brasilera donde se ubica la tropa correspondiente.

Figura 37. Fenograma obtenido en base a D_{XY} entre las tropas en Isla Brasilera



Nuevamente se observó la diferenciación de dos grupos principales que al compararlo con el fenograma de la Figura 36, coincidiría en gran parte con los dos linajes mitocondriales principales A y B. En el grupo superior, el 100% de los haplotipos observados en cada tropa pertenecen al linaje A, mientras que en el grupo inferior, los haplotipos pertenecen en su mayoría al grupo B aún cuando en las tropas X10, X28 y X30 se observó un individuo con haplotipo del linaje A en cada una (Figura 36 y 37). En particular, en las tropas X10 y X30, se observó un macho adulto en cada una, con haplotipos del clado A, mientras que en la tropa X28 el ejemplar fue una hembra juvenil.

En el fenograma se puede observar que si bien no hubo correlación evidente entre los agrupamientos de las tropas (Figura 37) y la cercanía geográfica dentro de la isla (Figura 13) podrían considerarse ciertas tendencias en los distintos ambientes. En particular, en el albardón cuando se siguió el eje longitudinal Norte-Sur, se observó que varias tropas que se ubican geográficamente cercanas también estaban próximas en el árbol. Por ejemplo las tropas X29-X31 de la zona norte del albardón formarían un grupo hermano en el fenograma, o las tropas X24 y X28 en la zona media del albardón, también se ubican cercanamente entre sí (Figura 37 y 13). Por otro lado en las tropas de la zona de Monte, sólo se observó un cierto agrupamiento en las tropas de la Punta Sur de la isla (haplotipos del clado A), mientras que para las otras la distribución sería más aleatoria.

1.4. Estructuración genética

Para el análisis de estructura poblacional en Isla Brasilera, se consideraron sólo aquellas tropas de las que se contaba con 4 o más individuos: X4, X10, X24, X28, X29 y X30. A partir de las diferencias nucleotídicas entre ellas se estimaron los índices de fijación F_{ST} (Wright, 1951, 1965) (Tabla 42).

Tabla 42. Análisis de F_{ST} entre las tropas de Isla Brasilera debajo de la diagonal los valores de F_{ST} y por arriba de la diagonal los valores *P*

Tropas	X4	X10	X24	X28	X29	X30
X4	*	0,000	0,000	0,000	0,036	0,018
X10	0,588	*	0,027	0,315	0,000	0,864
X24	0,926	0,158	*	0,063	0,000	0,189
X28	0,756	*0,009*	*0,083*	*	0,000	0,099
X29	0,286	0,646	0,863	0,768	*	0,000
X30	0,712	*-0,129*	*0,111*	*0,103*	0,717	*

Las estimaciones de F_{ST} entre las tropas del grupo A y las del grupo B fueron en todos los casos mayores a 0,58 y significativas, en concordancia con lo observado en el fenograma de la Figura 37 (Tabla 42). Entre las tropas del grupo A: X4 ubicada en la punta sur de la Isla y *X29* del extremo norte del Albardón, el índice F_{ST} (0,28) fue significativo, mientras que entre las tropas del grupo B, el índice F_{ST} (0,15) fue significativo sólo para la comparación entre las tropas X10-X24 que se ubicaban de manera adyacente en la región del Albardón medio (Tabla 42). Entre las restantes tropas del grupo B, todas de la región media del albardón principal, los índices de fijación no fueron significativos, sugiriendo una divergencia reciente (Tabla 42).

1.5. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Se decidió evaluar si existía alguna estructuración de la variabilidad haplotípica en las tropas del Albardón ya que eran de las cuales se contaba con un mayor número de muestras, y la tropa X2 representada por un único individuo se excluyó en este análisis. Para el mismo, se empleó el análisis de AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). En el AMOVA 5, se consideraron dos regiones "Albardón Norte" formado por las tropas X29-X31 del linaje A, y "Albardón Medio" formado por las tropas X10, 24, 28 y 30 que presentarían mayoritariamente haplotipos del linaje B (Tabla 43).

Tabla 43. AMOVA 5, tropas de Isla Brasilera en el Albardón principal

Fuente de variación	g. l.	% de variación	Coeficientes de correlación	*P*
Norte *vs* Sur	1 (R-1)	24	ϕ_{SC} = 0,564	< 0,000*
Entre tropas	4 (T-R)	43	ϕ_{ST} = 0,66	< 0,000*
Dentro de las tropas	36 (N-T)	33	ϕ_{CT} = 0,234	> 0,5
Total	41 (N-1)			

* valores significativos

En la Tabla 43, el resumen del AMOVA 5 permite observar que la diferenciación entre las regiones explicaría el 24% (ϕ_{SC} = 0,564), mientras que las tropas dentro de una misma región presentaron un 43% de la variación total (ϕ_{ST} = 0,66). El remanente 33% de la variación podría explicarse como variación dentro de las tropas y no fue significativo. Sin considerar regiones, la diferenciación entre las tropas correspondió al 63% de la varianza total (ϕ_{ST} = 0,634).

Los análisis en su conjunto, sugerirían que al igual de lo que ocurre a nivel regional, en IB parte de la variación es explicable por la diferenciación entre los linajes mitocondriales A y B. A su vez, las tropas presentarían una cohesión genética asociada a la presencia de haplotipos de un mismo linaje mitocondrial A o B, de manera exclusiva para las tropas del linaje A y mayoritario para las del B. Las dos tropas del linaje A analizadas mediante el estadístico F_{ST} mostraron una diferenciación significativa que podría correlacionarse a dos procesos: uno debido a aislamiento por distancia y otro, por eventos históricos de colonización de IB. La ausencia de diferenciación significativa entre las tropas del linaje B en el albardón principal sugerirían una diferenciación reciente entre las mismas.

Si bien en *Alouatta caraya* los estudios ecológicos indican que ambos sexos emigran (*e.g.*, Zunino, 1986), no hay estudios que analicen la relación de parentesco entre los machos y las hembras desde la genética dentro los grupos. En este trabajo, se analizó la relación de parentesco por vía materna a través del análisis de matrilíneas en algunas tropas de IB, a su vez para abordar el análisis del rol de las matrilíneas asociadas a un comportamiento filopátrico de las hembras en la estructuración genética de la población, se realizaron análisis discriminando los sexos.

2.1. Divergencia nucleotídica entre las tropas

En la red que se muestra en la Figura 27a se puede observar que las hembras de IB muestreadas (n=25) presentan 13 haplotipos del total de 27 haplotipos detectados. A su vez, sólo 3 de estos haplotipos (H001, 009 y 027) estuvieron presentes en más de una tropa a diferencia de los 7 haplotipos compartidos (H001, 009, 010, 011, 021, 026 y 027) que se describieron al considerar también a los machos en el análisis (Tabla 39 y 40). En los haplotipos descriptos para las hembras de IB se observaron entre 1 a 11 diferencias con 5,57 ± 2,7 diferencias en promedio (Figura 27a y Tabla 22).

Incluyendo únicamente a las hembras, en un primer análisis se consideraron el número de diferencias nucleotídicas promedio (D_{xy}), las distancias netas (D_a) entre las tropas como el número de diferencias promedio dentro de cada tropa (Tabla 43). Al considerar sólo las hembras, se observó una tendencia a un mayor número de diferencias promedio entre las tropas y un menor número de diferencias promedio dentro de las tropas (Tabla 43) respecto de lo observado cuando se consideraron los dos sexos conjuntamente (Tabla 41).

Tabla 43. Divergencia nucleotídica entre y dentro de las tropas de IB considerando sólo las hembras (Número neto de sustituciones y número promedio de sustituciones entre las tropas tomadas de a pares por arriba y por debajo de la diagonal, en la diagonal se indica el número de diferencias promedio en cada tropa)

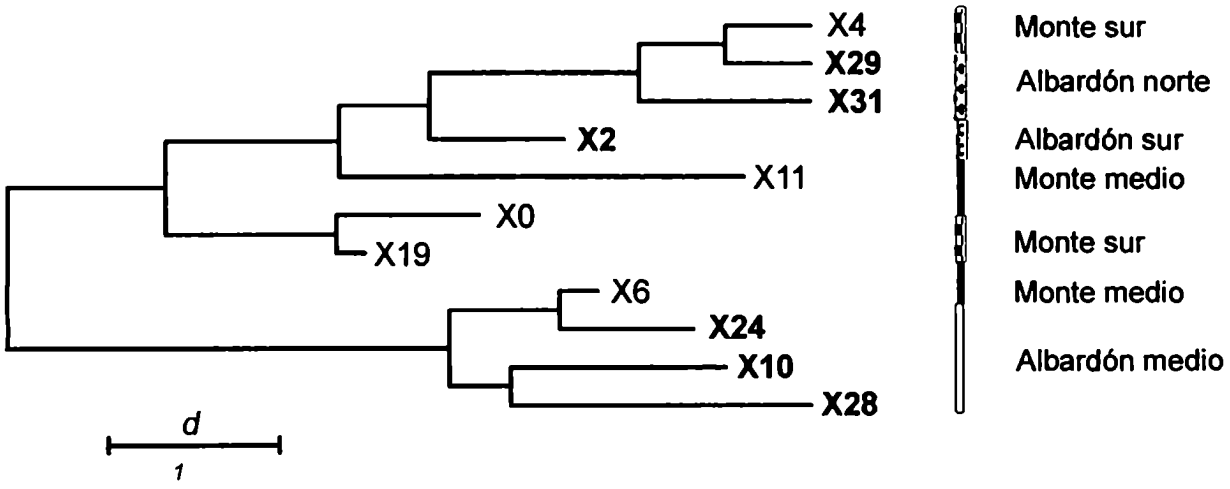
Tropas (# h)	X0 (1)	X2 (1)	X4 (3)	X6 (1)	X10 (1)	X11 (1)	X19 (1)	X24 (3)	X28 (6)	X29 (6)	X31 (1)
X0	**n/c**	5	6	6	7	3	1	6.333	5.733	5.2	6
X2	5	**n/c**	3	5	6	4	4	5.333	4.4	2.2	3
X4	6	3	**0**	8	9	5	5	8.333	6.733	0.2	2
X6	6	5	8	**n/c**	3	9	5	0.333	1.4	7.2	8
X10	7	6	9	3	**n/c**	10	6	2	0.733	8.2	9
X11	3	4	5	9	10	**n/c**	4	9.333	8.067	4.2	5
X19	1	4	5	5	6	4	**n/c**	5.333	4.733	4.2	5
X24	7	6	9	1	2	10	6	**0.667**	0.622	7.533	8.333
X28	8	7	9	4	3	10	7	3	**4.2**	5.878	6.4
X29	6	3	1	8	9	5	5	9	9	**1.267**	0.867
X31	6	3	2	8	9	5	5	9	9	2	**n/c**

n/c indican que no se pudo calcular el estimador por datos insuficientes, # h: número de hembras por tropa.

Para analizar las relaciones entre las tropas considerando las distancias promedio entre las hembras de cada tropa (D_{xy}) se realizó un análisis de agrupamiento empleando el algoritmo de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) (Figura 38).

En el fenograma se puede observar el mismo patrón que en la Figura 37, con los dos grupos principales reflejando los dos clados mitocondriales A y B y sin una estructuración geográfica clara (Figura 39). En este caso, en el grupo superior se agrupan las tropas del linaje A (100% de los haplotipos) y en el inferior sólo una hembra juvenil con haplotipo tipo A (H009) se encuentra en una tropa (X28) donde el resto de las hembras tienen los haplotipos H021 (4/6) y H024 (1/6) que pertenecen al clado B (Figura 38).

Figura 38. Fenograma obtenido según D_{XY} entre las tropas en IB considerando sólo a las hembras

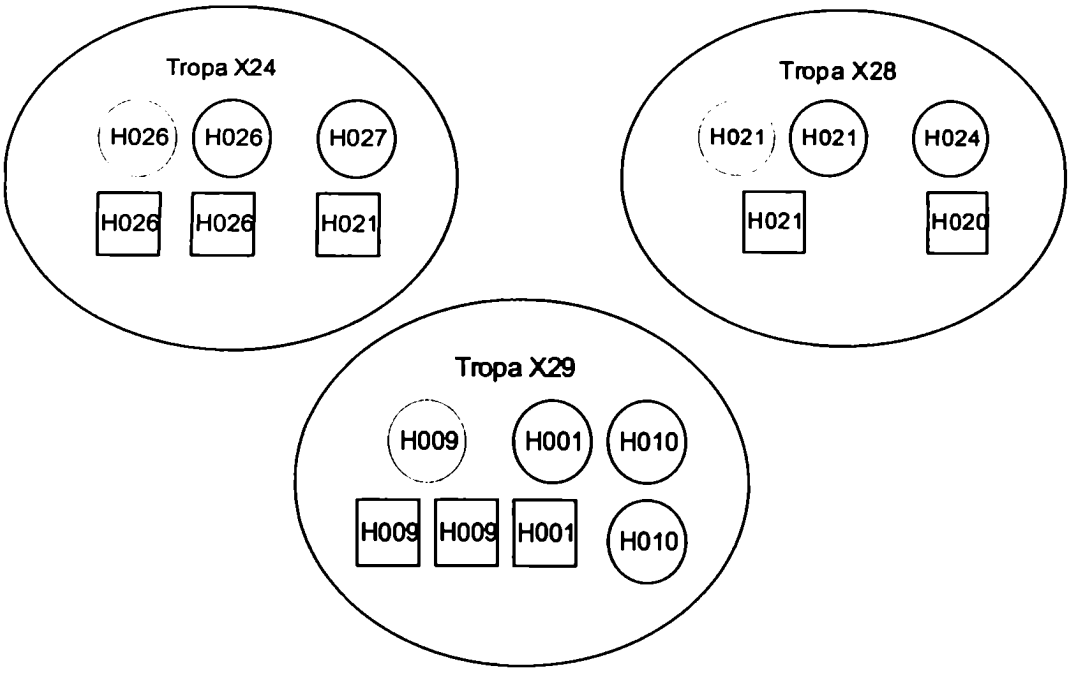


De la comparación de los fenogramas obtenidos considerando todos los individuos y sólo las hembras, se observó que si bien entre las hembras de distintas tropas existiría una mayor diferenciación (D_{XY}), también los machos mostrarían una relación de parentesco por linaje materno en las tropas.

2.2. Distribución de los haplotipos dentro de las tropas

Se analizó en *A. caraya* la composición hembras (círculos) y machos (cuadrados) adultos en relación a los haplotipos descriptos para cada uno de ellos y se realizó un gráfico por tropa considerando sólo las tropas del albardón principal: X24, X28 y X29, por tener los mayores tamaños muestrales (Figura 39).

Figura 39. Distribución de los haplotipos mitocondriales en hembras y machos adultos dentro de tres tropas de IB

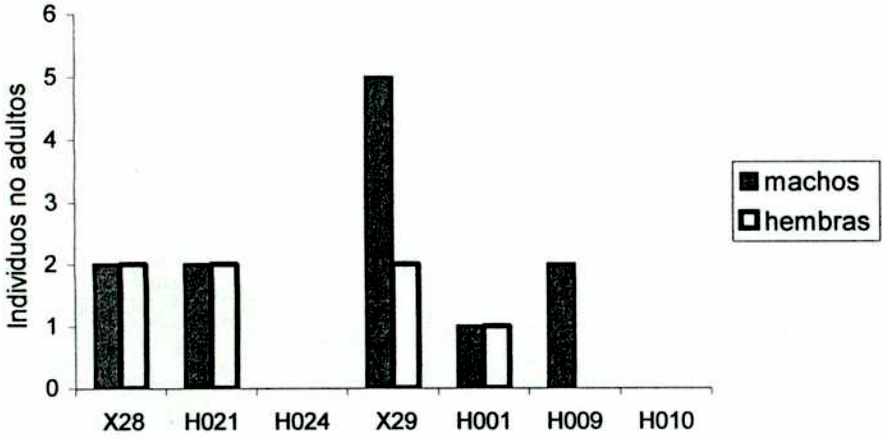


En los gráficos de la Figura 39 se puede observar la presencia de entre 2 y 3 haplotipos distintos entre las hembras adultas de las tropas analizadas y que al menos dos de las hembras adultas por tropa comparten el mismo haplotipo. Por otro lado, el establecimiento de la matrilínea única visto desde el punto de vista genético como la fijación de un haplotipo en una tropa va a estar directamente relacionado con el número de crías que tenga cada hembra y el éxito de las mismas de permanecer en la tropa. Para observar si dentro de las tropas habría algún haplotipo que presentara un mayor número de crías se graficaron el número de crías (subadultos, juveniles e infantes) según el sexo y el haplotipo por tropa (X28 y X29) (Figura 40).

El gráfico permite observar que todos los individuos no adultos analizados de la tropa X28 (2 machos y 2 hembras) presentaron un mismo haplotipo (H021) es decir que pertenecían a la misma matrilínea (Figura 40). Además en esa tropa se describió otra hembra adulta (H024) cuyo haplotipo no está representado en los ejemplares analizados incluyendo los

individuos no adultos. Dado que no se cuenta con datos demográficos de la tropa, sólo se puede inferir que o bien esa hembra no tenía descendencia en el momento del muestreo o bien éstas no fueron muestreadas. Sin embargo, se podría considerar que en la tropa X28 habría al menos una matrilínea predominante (Figura 39 y 40).

Figura 40. Individuos no adultos según los haplotipos de las hembras adultas de las tropas en IB



En la tropa X29, no se observó un patrón tan definido, si bien se muestrearon la mayoría de los individuos, 3 ejemplares no adultos presentaron haplotipos que no pertenecían a ninguno de los adultos de la tropa, por lo cual se podría considerar que X29 se formó recientemente (Figuras 39 y 40).

Estos resultados preliminares permiten observar que en IB las tropas presentarían un haplotipo mayoritario que incluiría también tanto a hembras como machos adultos, reflejando un comportamiento filopátrico en los dos sexos. A su vez, los haplotipos observados en los individuos no adultos de la tropa X28 indicarían que existe una matrilínea con más número de descendientes sugiriendo patrones jerárquicos en las hembras, si bien ese patrón no fue observado claramente en X29. Una posible interpretación para esta diferencia es que probablemente X29 se halla formado recientemente.

Capítulo V

Discusión

Efecto de los eventos históricos y la organización social sobre la variabilidad mitocondrial en *Alouatta caraya*

Parte I. Eventos históricos

1. Patrón filogeográfico en *A. caraya* en relación a cambios climáticos del Período Cuaternario

Tanto la diversidad genética dentro de las poblaciones como el grado en que éstas están diferenciadas genéticamente en el área de su distribución geográfica estudiada estarían determinados por la interacción tanto de factores ecológicos como de procesos evolutivos. Es así como las características de la especie incluyendo los patrones de dispersión, los sistemas de apareamiento, los tiempos generacionales, y los tamaños poblacionales, determinarán el grado en el que los procesos de mutación, deriva genética y selección afectarán la cantidad de variación dentro y entre las poblaciones. A su vez, diferentes combinaciones de procesos demográficos históricos y actuales pueden conducir a la observación de patrones de estructuración de la variabilidad genética similares permitiendo la formulación de hipótesis biogeográficas para su evaluación. Dentro de la biogeografía, la filogeografía analiza la variabilidad genética en los organismos considerando procesos actuales como pasados, dando un marco integrador para la formulación de hipótesis biogeográficas.

En este trabajo, el patrón de variabilidad nucleotídica a nivel del mtADN observado en *A. caraya* permitió la estimación de los tiempos de expansión poblacional de cada clado y del total de la muestra, así como también estimar el N_e de hembras. Dado que la estructura genética de una población es el resultado tanto de procesos actuales como pasados, la interpretación de los tiempos de coalescencia y tamaños efectivos poblacionales se realizó desde una perspectiva filogeográfica considerando los procesos biogeográficos que pudieron afectar la historia demográfica de las poblaciones de *A. caraya*.

Los análisis filogenéticos de redes y Neighbor-Joining no mostraron una estructuración geográfica de la variabilidad mitocondrial general, sino que permitieron

evidenciar la presencia de dos clados principales de linajes mitocondriales denominados A y B, que al analizar la distribución de las diferencias entre las secuencias mostraron una curva bimodal característica de un patrón filogeográfico de clase II (Avise, 2000). Este patrón se caracteriza por presentar brechas filogéneticas en las genealogías y con los linajes principales en simpatría en una región. Teóricamente, este patrón podría observarse en especies con grandes N_e y alto flujo génico, donde algunos linajes ancestrales divergentes perdurarían en la población por azar mientras que la mayoría de los genotipos intermedios se perderían a lo largo del tiempo por 'sorting' (Avise, 2000). Un proceso de selección balanceadora también podría presentar una topología similar en la genealogía (Avise, 2000). Sin embargo, la mayoría de los patrones filogeográficos observados en la naturaleza corresponden a zonas de contacto secundario entre dos poblaciones que habían divergido en alopatría (*e.g.*, Taberlet *et al.*, 1992; Vilà *et al.*, 1997). En estos casos, evidencia geológica o morfológica permitieron proponer que la divergencia de cada linaje mitocondrial en alopatría.

Si bien las estimaciones de divergencia entre los dos clados observados son diferentes en función de la tasa de mutación empleada, muestran un rango que varía entre los 13.600 y 6.500 años. Este marco temporal coincide con el fin de las glaciaciones del Pleistoceno y el comienzo del calentamiento de la Tierra durante el Período Cuaternario (*e.g.*, Haffer, 1969; Vrba, 1993).

1.1. Breve reseña de las características del Período Cuaternario

Durante el Terciario temprano (hace 65 millones de años), la mayor parte de América del Sur estaba cubierta por bosques tropicales húmedos o templados (Wolfe, 1971). Durante la segunda mitad del Terciario cuando ocurre la elevación de los Andes, los bosques comenzaron a retraerse lentamente hacia el norte en la Patagonia y el clima comienzó a ser cada vez más frío y seco hasta llegar al Cuaternario, caracterizado por glaciaciones cíclicas (Haffer, 1979).

El Período Cuaternario abarca los últimos 1,8 millones de años de la Era Cenozoica y comprende las épocas del Pleistoceno y el Holoceno, considerando la finalización del Pleistoceno en 10.000 años antes del presente. Climáticamente, el Cuaternario se caracterizó por una sucesión de períodos glaciales, en los cuales se produjeron importantes

descensos de las temperaturas globales y un avance de los hielos continentales, más notable en la parte septentrional del Hemisferio Norte; e interglaciales como el actual, con condiciones más benignas (Tonni & Pasquali, 2002).

Las glaciaciones del Pleistoceno mostraron fluctuaciones importantes de temperaturas principalmente hace unos 900.000 años donde la glaciación fue máxima y a partir de la cual se desarrollaron ciclos de glaciaciones - interglaciaciones de manera periódica con lapsos de 400.000 a 100.000 años (*e.g.*, Hooghiemstra *et al.*, 1993). Esta periodicidad fue explicada a través de la teoría de Croll-Milankovich considerando que las variaciones regulares en la órbita de la Tierra alrededor del sol determinarían variaciones en las corrientes oceánicas afectando de manera significativa el clima global y definiendo esos ciclos (Hewitt, 2000).

Durante la última gran glaciación ocurrida entre 20.000 y 13.000 años, la temperatura en las selvas neotropicales bajas fue estimada en 3-9 °C menos que las actuales, llegando a 12 °C menos en regiones de mayor altitud. A su vez, el período de transición entre el Pleistoceno y el Holoceno (14.000-10.000 años) denominado Younger Dryas, se caracterizó por un ambiente sumamente seco luego del cual aumentó la humedad del planeta y en particular, se estima que durante este período la cuenca del Amazonas se redujo en un 40% (Maslin & Burns, 2000).

Las condiciones áridas del final del Pleistoceno se continuaron hasta el inicio del Holoceno, hace unos 7.000-6.000 años donde se registró un episodio cálido y húmedo, denominado óptimo climático, durante el cual las temperaturas globales alcanzaron el máximo registrado durante el Holoceno (Tonni & Pasquali, 2002). Este máximo térmico coincidió con un importante avance de los mares sobre las tierras firmes, el máximo de introgresión holocena, donde por ejemplo en la provincia de Buenos Aires, el nivel del mar era 2,5 metros mayor del actual (Tonni & Pasquali, 2002).

Si bien las temperaturas en las tierras bajas neotropicales se mantuvieron "tropicales" durante los periodos glaciares (+/- 3 °C menores a las actuales), los períodos secos y húmedos del Cuaternario produjeron cambios en la distribución de la vegetación (Haffer, 1979). Durante los períodos glaciares, fríos y secos, los bosques se fraccionaron en remanentes aislados que se expandieron en la fase interglaciar caracterizada por una mayor temperatura y humedad (Haffer, 1979). Hace 6.000 años se considera que el patrón

general de distribución de la vegetación actual ya se había establecido y se mantuvo aproximadamente constante (Hewitt, 1999).

Utilizando los patrones de distribución de las precipitaciones actuales y los centros de endemismo de aves neotropicales, Haffer (1969) reconstruyó y propuso la localización de los refugios pleistocénicos en América del Sur. Brown (1982) propuso la localización de "refugios paleoecológicos de bosques" en base a los centros de endemismos de mariposas. Estas hipótesis biogeográficas fueron planteadas por sus autores como modelos de especiación en vertebrados en el Neotrópico. También existen otra teorías propuestas como la hipótesis de barrera de ríos, de gradiente, de vicarianza, y a su vez modelos que relacionan dos hipótesis como ríos-refugios (*e.g.*, Endler, 1982, Ayres & Clutton-Brock, 1992; Haffer, 1997).

En particular, en los Primates del Nuevo Mundo los principales eventos de especiación no se ajustarían al modelo de Refugios Pleistocénicos ya que parecen haber ocurrido antes del período Pleistoceno, entre 6 y 2 millones de años como en *Alouatta* y *Ateles* (Collins & Dubach, 2000; Cortés-Ortíz *et al.*, 2002).

1.2. Legado genético de las fluctuaciones climáticas sobre las especies

Estas oscilaciones climáticas produjeron grandes cambios en la distribución de las especies, los cuales han sido descriptos particularmente en Europa y en América del Norte (Coope, 1994; Barnes *et al.*, 2002). Las evidencias sugerirían que las oscilaciones climáticas afectaron de manera diferente a las especies de cada región del planeta debido a la topología de la región, las corrientes oceánicas y la latitud, es así que las especies presentaron respuestas particulares donde los cambios en las distribuciones estaban relacionados a condiciones locales (Hewitt, 2000).

Las fluctuaciones climáticas han sido correlacionadas con diversos procesos evolutivos en numerosos grupos de organismos (*e.g.*, extinciones, especiaciones, *e.g.*, Vrba, 1993). Durante los períodos fríos, las especies se extinguían en una gran parte de su distribución sobreviviendo en los refugios, mientras que en los períodos interglaciares las especies se expandían hacia latitudes mayores, repitiendo estos procesos de manera cíclica (Hewitt, 2000).

Los efectos de los eventos glaciares han dejado una impronta en el ADN que permite observar en la actualidad patrones filogeográficos concordantes entre numerosos organismos (Hewitt, 1999). Asimismo la genética de poblaciones predice que procesos asociados con cambios en el rango de las especies durante el Pleistoceno como la fragmentación, expansiones-retracciones de la distribución, y disminución del tamaño poblacional, dejarían una huella en la variabilidad genética.

En los períodos postglaciales, a medida que el clima aumentaba la temperatura, las poblaciones expandían sus límites hacia latitudes mayores, marcando un límite en la distribución, donde individuos migrantes colonizaban rápidamente nuevas áreas (Hewitt, 1999). Estos pioneros aumentaban rápidamente en número, constituyendo eventos fundadores, con la consecuente pérdida de la variabilidad genética y el aumento de la homocigosis (deriva y endogamia) (Hewitt, 1999). Los grandes núcleos fundadores pudieron haber persistido a lo largo del tiempo y las oscilaciones climáticas pudieron haber llevado a repetidos cuellos de botella (Hewitt, 1999).

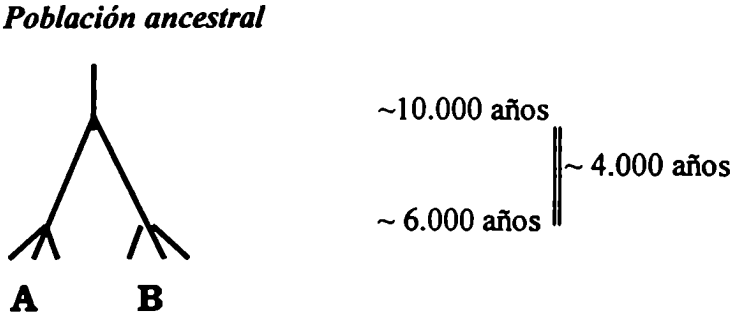
Basados en la hipótesis del reloj molecular, se ha datado la divergencia de *Alouatta caraya* dentro del género en aproximadamente 4 millones de años que coincide con el fin de la elevación de los Andes que ha sido considerado como el evento vicariante que habría afectado un gran número de especies (Cracraft & Prum, 1988; Cortés-Ortiz *et al.*, 2002). Posteriormente ha esto, subsecuentes expansiones a partir de refugios habrían estado relacionadas con características ecológicas específicas de los organismos (Cracraft & Prum, 1988).

La divergencia de las poblaciones a partir de un población ancestral se definiría por el cese del flujo génico, sin embargo si ese aislamiento coincide con un evento geológico particular en general constituye una hipótesis (Knowlton *et al.*, 1993). Si se considera un modelo neutral, el tiempo de coalescencia para un conjunto de linajes mitocondriales es aproximadamente de N_e generaciones, cuando se compara este valor teórico con los reales obtenidos en este trabajo, se observa que no se cumple la igualdad. En este trabajo, el tiempo de coalescencia para todos los linajes fue de 10.200 años, y el valor teórico es de 20.000 años. Un factor que afecta la estructura de las genealogías podría estar dado por fluctuaciones en el N_e, en este caso, considerando las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y el período de Younger Dryas, los tiempos de coalescencia tan tempranos

estarían reflejando reducciones importantes en el N_e probablemente asociados a estas fluctuaciones climáticas.

A su vez, tiempos de coalescencia tempranos también fueron observados dentro de cada clado, lo cual sugiere fluctuaciones importantes en el N_e. Esto podría estar indicando dispersiones sucesivas de las poblaciones hacia el sur, siguiendo un patrón de migración por saltos de piedras, sin embargo es necesario un muestreo más amplio de poblaciones a lo largo de los ríos Paraná y Paraguay para verificar esta hipótesis.

Entre el tiempo de coalescencia estimado para el antecesor común más reciente de ambos clados (MRCA) y el MRCA de cada clado (hace aproximadamente 5.700-5.200 años, μ_2) se observa una brecha temporal de unos 4.000 años.



Este patrón genealógico podría indicar un proceso de subdivisión de la población o bien, otra explicación alternativa es que podría deberse al mantenimiento de los linajes por un proceso de selección equilibradora. Sin embargo, el análisis de 27 ejemplares de *Alouatta caraya* para 8 loci de microsatélite mostró una ausencia total de variabilidad en el tamaño de los mismos hecho que se ajustaría al modelo de subdivisión poblacional y no a un proceso selectivo como factor causante del patrón de variabilidad observado a nivel mitocondrial. Si bien, los loci analizados podrían ser poco polimorficos a nivel del linaje de los atélidos o bien algunos loci presentaron algún alelo nulo, la ausencia o poca variabilidad también fue puesta en evidencia en la especie en base a otros estudios.

A. caraya a nivel regional en su distribución sur o bien a nivel de cada clado presenta valores relativamente altos de diversidad haplotípica pero bajos de diversidad nucleotídica. Estos resultados se esperan en el caso de una rápida expansión poblacional a partir de una población de tamaño efectivo pequeño (*e.g.*, Excoffier & Schneider, 1999).

Un gran número de trabajos, donde se analizan la variabilidad genética empleando marcadores moleculares, han sido publicados recientemente donde analizan los patrones filogeográficos asociados a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y el fin de las glaciaciones junto con el calentamiento global de numerosos organismos, principalmente en el Hemisferio Norte, como peces (*e.g.*, Bernatchez & Wilson, 1998), alces (Hundertmark *et al.*, 2001), y osos (Barnes *et al.*, 2002), entre otros. En *Gorilla gorilla graueri* y *G. g. beringei* se estimaron expansiones poblacionales datadas en 20.000 años que fueron precedidas por cuellos de botellas asociados a reducciones de la selva ocurrida durante la última glaciación (Jensen-Seaman & Kidd, 2001). Una rápida expansión poblacional durante períodos postglaciales habría ocurrido en *Canis lupus* en América del Norte (Vilà *et al.*, 1999). La expansión inicial del rango de distribución en *Phyllotis xanthopygus* en Patagonia fue estimada hace 12.000 años asociada a el desarrollo del clima moderno en Patagonia y la distribución de la vegetación (Irondo & García, 1993; Kim *et al.*, 1998).

En este trabajo las estimaciones de N_e en las poblaciones ancestrales que originaron cada clado A y B fueron de 500 y 800 hembras respectivamente (según μ_2) que caen dentro del rango observado para otros organismos como *Alces alces* que se propone sufrió un importante cuello de botella hace unos 13.000 años seguido de una expansión poblacional (Hundertmark *et al.*, 2001).

Estudios previos en *A. caraya* han concordado en considerarla como especie monotípica en toda su distribución en base a características cariotípicas y morfológicas (*e.g.*, Mudry, 1990; Hirsch *et al.*, 1991; Mudry *et al.*, 1998). Además, estudios de variabilidad genética a nivel de proteínas sanguíneas mostraron que sólo 4 loci fueron polimórficos de un total de 15 analizados que presentaron un valor de heterocigosis promedio (H = 0,05 +/- 0,03) dentro del orden de los valores descriptos en la literatura para otros aulladores (Szapkievich, 2001).

En el presente trabajo, la hipótesis propuesta para explicar el patrón de variabilidad observado en *A. caraya* considera que la baja variabilidad genética encontrada en la especie en comparación con su grupo hermano '*seniculus*' podría explicarse considerando que las poblaciones de *A. caraya* fueron más afectadas por las fluctuaciones climáticas del pleistoceno produciendo disminuciones importantes del N_e, con un cuello de botella hace 10.000 años llevando a una pérdida significativa de la variabilidad genética. Asimismo, las

diferencias entre los dos grupos podría reflejar en parte a la diferente distribución geográfica, dado el grupo '*seniculus*' habría ocupado una distribución central, mientras que carayá tiene una distribución marginal (*e.g.*, Hirsch *et al.*, 1991).

La historia evolutiva en *Alouatta caraya*, como en otros grupos de organismos, habría estado influenciada por las fluctuaciones climáticas globales. Además las características propias del grupo como sus hábitos generalistas y el hecho de ocupar un amplio rango de ambientes, habrían limitado su diversificación intraespecífica, ajustándose a la categoría propuesta por Vrab de persistencia de la especie con estásis dentro de su hipótesis de 'turnover pulse' asociada a los cambios climáticos del Pleistoceno (1983, 1993, 1995).

2. Rutas de colonización de la distribución marginal sur

Para explicar la presencia de dos linajes mitocondriales divergentes en una misma región, se consideraron las características particulares de la región geográfica que ocupa *Alouatta caraya*, considerando las consecuencias de las distribución de la biota como uno de los factores limitantes en la expansión del rango de la especie.

La presencia del haplotipo CB1 (CB: citocromo *b*), perteneciente al linaje A de los haplotipos para la región control, en dos localidades distantes geográficamente una del Mato Grosso y otra en Corrientes (Argentina), permitiría proponer un patrón de migración desde esa región hacia el sur probablemente empleando al río Paraguay como ruta de migración. Esta población ancestral que dio origen al clado A probablemente haya ocupado la región del Refugio Pleistocénico Madeira que se describió para aves (Haffer, 1969, 1979), mariposas (Brown *et al.*, 1974) y árboles (Prance, 1973) (Figura 41).

El haplotipo CB5, observado en dos ejemplares también de Corrientes, fue el más divergente de todas las secuencias analizadas para el citocromo *b*. En este caso, dada la cercanía con el río Paraná, la hipótesis propuesta es que los individuos de Loreto provendrían de una región probablemente cercana a la región de Goiás y que la ruta de migración podría haber sido el río Paraná. En este caso la población ancestral que habría originado al clado B habría ocupado la región del Refugio Pleistocénico de Araguaia

(Goiás) propuesto en base a distribuciones de aves (Haffer, 1979), lagartijas (Vanzolini & Williams, 1970) y mariposas (Brown *et al.*, 1974) (Figura 41).

Figura 41. Hipótesis de rutas de migración hacia el sur en *Alouatta caraya*

Esta hipótesis de rutas de migración en *Alouatta caraya* permite considerar la propuesta de que la región marginal sur fue colonizada por individuos provenientes de al menos dos poblaciones de distribución central. Una migración proveniente de la región del Mato Grosso donde se habría originado el clado A, para esta propuesta también se consideró que el haplotipo H008 (clado A) del individuo de Paraguay está más cercanamente relacionado con el H001, y alejado del H018 y H033 (clado B). Otro proceso de migración a partir de la región de Goiás por el río Paraná, habría permitido la colonización de la región sur por el linaje B.

Los resultados obtenidos en base a la región control, permiten proponer que los eventos de expansión del rango de la especie podrían haber ocurrido hace unos 6.000 años que es cuando habría tenido lugar la expansión dentro de cada clado y cuando se considera que la distribución de la flora era aproximadamente la observada en la actualidad (Webb & Marshall, 1982).

Otros autores han propuesto diferentes rutas migratorias para la expansión del rango de distribución de las especies postpleistocénico en la región sur subtropical. Por ejemplo, en algunos grupos de aves se ha propuesto que los ríos Bermejo y Pilcomayo habrían constituido rutas de migración entre la selva Paranaense y la Yungas (Nores, 1994). En *Cebus apella* la hipótesis propuesta de expansión del rango de la especie consideró la "ruta orófila" que conecta Brasil meridional-Yungas (Brown, 1987). Incluso en *Cebus apella* se consideró que estas reducciones drásticas de los ambientes durante el Pleistoceno podrían haber favorecido la diversificación de las tres subespecies de distribución sur *C. a. pallidus*, *paraguayanus* y *nigritus* (Brown, 1987). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo acerca de la divergencia reciente entre las dos subespecies analizadas *C. a. paraguayanus* y *C. a. nigritus* en base a la secuencia mitocondrial de COII apoyarían la hipótesis biogeográfica propuesta por Brown (1987) junto con otras líneas de evidencia genética (*e.g.*, Mudry, 1990; Martinez *et al.*, 2002).

Actualmente, un gran número de estudios abordan trabajos integradores de variadas disciplinas constituyendo un nuevo modelo para comprender de manera más acabada los procesos actuales y pasados que originaron nuestro mundo natural (Wilson, 1998). A su vez, el análisis de un grupo de especies permite inferir la efectividad relativa de los eventos históricos y los procesos ambientales actuales marcando los patrones biogeográficos regionales (Avise, 2000). En este trabajo, se observó que la variabilidad genética en la actualidad en *Alouatta caraya* en su distribución marginal sur está signada de manera significativa por eventos demográficos históricos, donde la caracterización de la variabilidad genética constituye una pieza más para armar el rompecabezas que conforma la historia evolutiva de la especie. Futuros trabajos que incluyan muestras de localidades geográficas que abarquen toda su distribución, y un mayor número de loci, podrían confirmar la hipótesis propuesta. A su vez, cuando numerosos trabajos abordan el estudio filogeográfico de expansiones del rango de las especies hacia latitudes mayores en el hemisferio norte empleando marcadores moleculares (*e.g.*, Wares, 2002), en base a la bibliografía disponible, no se encontraron trabajos que analicen esta problemática en mamíferos de América del Sur. Contando con este trabajo como precedente, nuevas investigaciones ya sea en primates o en otros mamíferos permitirían comparar los patrones filogeográficos en otros grupos. En estos casos el conocimiento de un marco biogeográfico común permitirá una visión integradora de los efectos paleoclimáticos sobre la distribución de las especies.

Parte II. Consecuencia genética de la estructura social en primates

1.1. Diversidad mitocondrial en *Alouatta caraya* en relación a su organización social

Las investigaciones en comportamiento de primates han enfocado sus estudios principalmente en los patrones de organización social considerando la socialidad como una característica fundamental en su evolución (Crockett, 1987). La radiación adaptativa de este orden que se verifica en una gran diversidad de tamaño corporal, habitats, dieta y organización social, ha permitido un amplio espectro de comparaciones, como por ejemplo la entre especies filogenéticamente cercanas con estructuras sociales similares o distintas, hasta especies lejanamente emparentadas y con estructuras sociales similares (Crockett, 1987; Fleagle, 1998). A su vez, los modelos de organización social en primates se han utilizado para inferir posibles estructuras sociales en los homínidos ancestrales y de este modo su posible influencia en su evolución del grupo (Crockett, 1987; Lewin, 1993).

Las investigaciones de la organización social en primates han abordado el estudio de factores ecológicos que incluyen las estrategias reproductivas, la disponibilidad de los recursos, la presencia de predadores, la selección por parentesco, la competencia intra-sexual así como factores filogenéticos (*e.g.*, Clutton-Brock & Harvey, 1977; Di Fiore & Rendall, 1994; Janson, 1992, 2000).

La caracterización genética de las relaciones entre y dentro de los grupos sociales provee una herramienta muy poderosa para poner a prueba estas hipótesis. Entre los puntos específicos que pueden ser analizados, desde el punto de vista genético, estarían la correlación entre el estatus de dominancia y el éxito reproductivo, los niveles de endogamia, el grado de parentesco, flujo génico entre poblaciones, y la variación intrapoblacional, entre otros (Morin & Woodruff, 1992).

La estructuración genética de una población está influenciada, entre otros aspectos, por la migración de los individuos en función del sexo como así también por la permanencia de los individuos en su grupo natal (filopatría). Ambos factores permiten caracterizar la estructura social de los grupos (Storz, 1999). Si bien, la estructuración social conlleva a una reducción del tamaño efectivo (N_e) de los demos locales, con un aumento de la diferenciación genética entre los grupos por efectos de la deriva, la migración tendería a

homogeneizar la variabilidad genética (Crow & Kimura, 1970; Chesser *et al.*, 1993; Nunney, 1993; Storz, 1999). En animales que presentan organización social, la filopatría en las hembras dará como resultado que los grupos sociales representen sólo una pequeña muestra no aleatoria del total del acervo génico de la población de hembras, a su vez, la permanencia o reemplazo de hembras reproductivas de o por sus hijas, produciría la diferenciación de los grupos sociales según las matrilíneas (Storz, 1999).

Si bien no se cuenta con datos basados en observaciones directas, estudios por simulación han mostrado que la estructura jerárquica observada en algunos grupos sociales también afectaría la diferenciación (Hoelzer *et al.*, 1998). Esos estudios analizaron cómo la estructuración de la población en grupos sociales filopátricos y poligínicos en los que las hembras ocupan distintas jerarquías en el grupo social y distintos niveles de migración, afectaban el tiempo medio de coalescencia de haplotipos y la tasa de sustitución en el mtADN (Hoelzer *et al.*, 1998).

En la mayoría de las especies poligínicas de primates, los machos se dispersan mientras que las hembras muetran comportamientos filopátricos, este es, también, el patrón más frecuente en otros mamíferos (Greenwood, 1980). Por eso, los primates con estructuras poligínicas se espera que las hijas permanezcan en sus grupos natales (filopatría) y que los hijos -machos- se transfieran a otras tropas (Wrangham, 1980). En cambio en los grupos de primates donde no se observa asociación grupal entre hembras emparentadas se espera que estas también se transfieran a otras tropas, en ese caso los hijos -machos- permanecerían en su grupo natal (Wrangham, 1980). Pusey y Packer (1987) dividen el término dispersión en dos componentes: emigración y transferencia, emigración natal correspondería a la emigración del grupo natal o del área de ese grupo, mientras que transferencia natal es la emigración del grupo natal seguida de la inmigración en un grupo en el cual hay individuos del sexo opuesto reproductores. Esto permite considerar los casos en que los individuos emigran pero no ocurre transferencia, es así que los individuos inmigrantes constituirían animales que se han transferido a este grupo (Pusey & Packer, 1987).

Cuando existe una dispersión sexo-específica en poblaciones estructuradas, se esperaría que el genotipo del sexo que más se dispersa se distribuyera de manera más aleatoria entre las poblaciones que los genotipos del otro sexo, en el caso de la dispersión seguida de inmigración (*e.g.*, Avise, 2000). Este fenómeno genera una estructuración sexo-

específica de la variabilidad genética que puede ser analizada a partir de los marcadores moleculares (*e.g.*, Prugnolle *et al.*, 2002).

Los estudios genéticos han confirmado estas propuestas, observándose que en especies donde los machos son filopátricos y las hembras se transfieren entre los grupos, no existirían una estructuración geográfica de la variabilidad a nivel del ADN mitocondrial, por ejemplo en *Papio* y *Pan* (*e.g.* Hashimoto *et al.*, 1996; Gagneux *et al.*, 1999; Hapke *et al.*, 2001). En *Papio hamadryas* se ha observado la emigración de ambos sexos, pero sólo la transferencia de hembras, en *Pan troglodytes*, el patrón es más complejo pero presentaría el mismo comportamiento que los mandriles en general (Pusey & Packer, 1987). A su vez, por ejemplo en *Macaca*, donde se observaron comportamientos filopátricos en las hembras y dispersión en machos, los estudios genéticos han mostrado una estructuración geográfica de la variabilidad a nivel mitocondrial y una homogeneidad (es decir ausencia de estructuración geográfica) a nivel nuclear (*e.g.*, Melnick & Kidd, 1985; Melnick & Hoelzer, 1996). De hecho, existen numerosos trabajos en monos catarrinos que, empleando diversas metodologías de análisis genéticos, investigan la influencia de la estructura social en la diferenciación genética de las poblaciones de macacos y mandriles, y también en las especies de monos antropomorfos chimpancé, gorila y orangután (*e.g.*, Melnick, 1987; Melnick & Kidd, 1985; Melnick & Hoelzer, 1996; Gagneux *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2000; Vigilant *et al.*, 2001; Gagneux, 2002). Sin embargo, está temática ha sido poco estudiada en platirrinos, donde dos especies de monos aulladores: *Alouatta pigra* y *A. seniculus* se han estudiado mediante técnicas de electroforesis de isoenzimas y mtADN (Pope, 1990, 1992, 1998, 2000; James *et al.*, 1997).

En *Alouatta caraya*, los estudios ecológicos muestran que ambos sexos emigran (se dispersan) de sus grupos natales (*e.g.*, Zunino, 1986; Rumiz, 1990). A su vez, en ambiente de tierra firme, se observaron comportamientos asociados a la presencia de una jerarquía en hembras donde las hembras de mayor rango tendrían un mayor éxito reproductivo (Zunino, 1986; Rumiz, 1990). En otra especie de aullador, *Alouatta seniculus*, la presencia de un único haplotipo en las tropas (con excepción de los machos adultos) parece ser el producto del comportamiento filopátrico de las hembras asociado una jerarquía entre las mismas, en condiciones de estabilidad poblacional (Pope, 2000). En base a estos estudios, en *A. caraya* como modelo de primate polígínico, se esperaría observar una estructuración

geográfica de la variabilidad genética a nivel mitocondrial dada por la filopatría y la jerarquía en hembras.

En *Papio hamadryas*, que presenta filopatría en machos y transferencia de hembras entre grupos, el valor de Π fue mayor (Hapke *et al.*, 2001) al observado en *A. caraya*. El estudio en *P. hamadryas* se realizó sobre 74 individuos procedentes de 10 localidades que se ubicaban a un máximo de 200 km de distancia (Hapke *et al.*, 2001). En este se describieron 35 haplotipos diferentes con Π de 13,3 (± 7,1), y al igual que en la población de *A. caraya*, los autores observaron la presencia de dos linajes mitocondriales principales con una distribución bimodal del número de diferencias entre las secuencias (Hapke *et al.*, 2001). Las comparaciones dentro de los linajes mostraron una moda de 5 sustituciones (Hapke *et al.*, 2001) frente a las 3 sustituciones dentro de cada clado A y B observadas en este trabajo en *A. caraya*.

En orangután (*Pongo pygmaeus*) que es considerada como una especie solitaria, las hijas permanecen en un área de acción cercana a su madre, en este caso un estudio de ADN mitocondrial mostró una estructuración geográfica de la variabilidad mitocondrial (Warren *et al.*, 2001). En ese estudio los autores analizaron 43 ejemplares de *P. pygmaeus* procedentes de 6 localidades de Borneo observándose 40 haplotipos con 3 a 10 sitios diferentes pero no indican los valores de Π (Warren *et al.*, 2001).

En los macacos (*Macaca*), las hembras son filopátricas y machos se transfieren a otros grupos. Es el género más estudiado en cuanto a la influencia de la organización social en la estructura genética de la población, empleando metodologías como electroforesis de isoenzimas y de RFLPs mitocondriales (*e.g.*, Melnick & Hoelzer, 1996), pero no secuenciación de la RC del mtADN. En estos estudios se observó una marcada estructuración geográfica de la variabilidad mitocondrial frente a una homogeneidad, a nivel nuclear (*e.g.*, Hoelzer *et al.*, 1994).

En *Alouatta seniculus*, donde las hembras muestran comportamientos filopátricos, sobre un total de 52 ejemplares provenientes de dos poblaciones ubicadas a 200 km de distancia aproximadamente, se observaron 12 haplotipos distintos para al RC, con un valor de Π de 7 (± 4) (Pope, 2000). Si bien el número de haplotipos encontrado fue

prácticamente la mitad del encontrado en el presente trabajo para *A. caraya*, el valor de Π sería el más similar respecto a los datos referidos anteriormente en primates.

El número de haplotipos observados en *A. caraya* es similar al observado en *Papio*, un primate con machos filopátricos, pero con un valor de diversidad nucleotídica más cercano al publicado para *Alouatta seniculus* (dos poblaciones), que se caracteriza por hembras filopátricas. Sin embargo, hay que destacar que la información provista en la literatura dista mucho de ser completa lo cual impide profundizar en las comparaciones.

En *A. caraya*, como un indicador de la migración de individuos, se analizaron los haplotipos compartidos entre las poblaciones. La frecuencia de haplotipos compartidos entre localidades fue baja mostrando un único haplotipo, H001 que es le haplotipo de mayor frecuencia en este estudio, en 3 de las 7 localidades consideradas sugiriendo un comportamiento filopátrico en las hembras en concordancia con los trabajos de campo (Zunino, 1986; Rumiz, 1990). A su vez, en *Papio* se observaron 5 haplotipos presentes en 2 localidades distintas y un haplotipo compartido por 4 localidades (Hapke *et al.*, 2001), mostrando justamente el patrón opuesto al observado en *A. caraya*.

En *A. caraya*, el análisis de la divergencia genética a nivel del mtADN, en función de la distancia geográfica considerando ambos sexos, mostró el patrón esperado para especies de primates con hembras filopátricas y machos que se dispersan como en *Macaca* (*e.g.*, Hoelzer *et al.*, 1994). Asimismo la ausencia de aislamiento genético por distancia a nivel del mtADN se observó en especies con machos filopátricos como *Papio* (Hapke et al., 2001). En otros organismos con organización social como ocurre en roedores, por ejemplo en *Proechimys steerei* y en *P. simonsi* que se caracterizan por filopatría en hembras, se describió un patrón de aislamiento por distancia a nivel del mtADN (Matocq *et al.*, 2000). Por otro lado, en otro roedor como *Phyllotis xanthopygus* no se observó evidencia de aislamiento por distancia sugiriendo que los parches ambientales constituirían nichos de colonización y extinción constituyendo en su conjunto una metapoblación (Kim *et al.*, 1998).

La divergencia genética mitocondrial en función de la distancia geográfica en *A. caraya* también fue significativa considerando sólo a las hembras, mientras que no lo fue al considerar sólo machos. Estos resultados apoyan las propuestas realizadas en base a datos comportamentales que consideran un patrón diferencial de dispersión entre machos y

hembras, donde si bien ambos sexos emigran del grupo natal, sólo los machos tendrían éxito en incorporarse a una tropa ya establecida por eventos de recambio de machos (transferencia de machos), mientras que las hembras fuera de su grupo natal sólo podrían reproducirse en un nuevo grupo formando parte de las hembras fundadoras o bien formando una pareja con un macho solitario (ausencia de transferencia en hembras) (*e.g.*, Zunino, 1986; Rumiz, 1990).

El por qué de la dispersión de un sexo en particular es un tema de debate. En la mayoría de las especies poligínicas se observa que el éxito reproductivo en las hembras está influenciado por las restricciones nutricionales, a su vez la eficiencia de forrajeo aumenta con el conocimiento del área y la fenología de las fuentes de alimento, esta familiaridad se ve favorecida permaneciendo en su área natal (Pusey & Packer, 1987). Como resultado las hembras se verán más favorecidas de permanecer en su área natal que los machos (Wrangham, 1980). Por otro lado, la competencia intrasexual entre machos para acceder a cópulas sería mayor que entre hembras, por lo tanto los machos se dispersarían para aparearse (Greenwood, 1980).

1.1. Las matrilíneas y las relaciones sociales entre hembras

Los primates presentan una gran diversidad de sistemas sociales que han evolucionado independientemente en distintos linajes (Kappeler, 1999). Los costos y beneficios de vivir en grupo han sido un tema de gran interés para los primatólogos dedicados a la ecología (*e.g.*, Crook & Gartlan, 1966).

El tipo de estructura social se define por el número y sexo de los individuos asociados (Struhsaker, 1969). Entro los Monos de Nuevo Mundo, existe una amplia variedad de tipos de organización social, con géneros que presentan estructuras de pareja desde el punto de vista reproductivo -si bien puede haber más hembras en la tropa existiría sólo una reproductiva- como se presenta en *Callithrix*, *Cebuella*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Aotus* y *Callicebus*. En *Saimiri*, *S. oerstedii* y *S. sciureus* se describen grupos poligínicos - multimachos, mientras que en *S. boliviensis* se observan grupos formados sólo por hembras y sus crías donde los machos adultos forman grupos separados (Boinski, 1999). *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Brachyteles* y *Ateles*, presentarían grupos fisión-fusión mientras que

Cebus, *Callimico*, *Lagothrix* y *Alouatta* grupos poligínicos (unimachos y/o multimachos) (Fleagle, 1998).

Esto es una mera generalización de las estructuras reproductivas en los diferentes géneros de monos platirrinos ya que al aumentar el número de trabajos de campo se observa una amplia variedad de estructuras sociales que reflejarían una gran plasticidad en función de la disponibilidad de recursos (Kinzey & Cunningham, 1994). Kinzey & Cunningham (1994) proponen que las tradicionales distinciones entre organizaciones de fusión-fisión y cohesivas representan los extremos de un continuo de diferentes formas de organización social y que en platirrinos la fragmentación de las tropas representaría un ajuste facultativo a condiciones ambientales y demográficas y que sería un evento común en este grupo de primates.

Dentro de los grupos los factores que afectan a cada sexo serían distintos (Trivers, 1972). El paradigma de la socioecología considera que: la distribución espacial y social de las hembras refleja condiciones ecológicas en relación a la predación y distribución y cantidad de recursos, mientras que la distribución espacial de los machos y sus relaciones sociales estarían determinadas por sus oportunidades de apareamiento (Emlen & Oring, 1977). Las especies que presentan asociación entre hembras ('female-bonded, FB) se definen como aquéllas en las que las hembras mantienen lazos filiativos con otras hembras de su grupo y usualmente, pasan su vida en el grupo donde nacieron (Wrangham, 1980). A su vez, la evolución de jerarquías de dominancia y la formación de alianzas entre hembras emparentadas asociada a comportamientos filopátricos, se puede explicar en base a la competencia por recursos entre ellas (*e.g.*, van Schaik, 1996). En aquellos grupos donde hubiese competencia intra-grupal por los recursos, las hembras presentarían asociaciones por parentesco (*e.g.*, Altmann, 1980).

De acuerdo a modelos ecológicos de patrones de agrupamiento en primates, los grupos grandes se consideran que tienen ventajas competitivas sobre grupos pequeños en la defensa los recursos (Wrangham, 1980; van Schaik, 1989). La competencia entre grupos e intra grupos plantea una controversia al paradigma inicial, permitiendo el planteo de modelos alternativos de estructura social en hembras (Tabla 45) (van Schaik, 1989)

Tabla 45. Efectos de la competencia por recursos limitantes en las relaciones entre hembras y su dispersión

Competencia de grupos		Respuesta social		Asociación entre
Dentro	Entre	Filopatría	Dominancia	Hembras
Baja	Baja	No	No	No
Baja	Alta	Si	No	Residentes
Alta	Baja	Si	Si	Si (emparentadas)
alta	alta	si	tolerante	tolerancia

Estos modelos proponen una plasticidad en el establecimiento de las relaciones sociales en los grupos, un ejemplo analizado fue *Saimiri* considerando dos de sus especies *S. boliviensis* y *S. oerstedii* (van Schaik, 1989). En la primera se observan alianzas entre hembras emparentadas, con una jerarquía marcada y comportamientos filopátricos, mientras que en *S. oerstedii* las hembras no forman alianzas. A su vez la distribución de los recursos serían muy distintas, ya que en el área que ocupa *S. boliviensis* los parches de frutos son grandes y de una densidad media, en tanto que en la de *S. oerstedii* los parches son pequeños y de baja densidad (Boinski, 1999).

Alouatta seniculus constituiría un modelo donde existen asociaciones de hembras emparentadas junto con una jerarquía de dominancia en el que las hembras de mayor jerarquía darían un mayor número de descendientes (*e.g.*, Crockett, 1984; Pope, 2000). En esta especie ambos sexos emigran y también ambos sexos son filopátricos con una marcada diferencia en la proporción de individuos de cada sexo, ya que el 20 al 30% de las hembras se reproducirían en su grupo natal frente a sólo el 2 % de los machos (Crockett, 1996). La emigración de hembras fue considerada como consecuencia de la competencia entre ellas por el número limitado de posiciones como reproductoras, observándose como máximo 4 hembras reproductoras por tropa (Crockett, 1984, 1996). El tamaño de la tropa estaría directamente relacionado al número de hembras reproductoras que a su vez estaría limitado por la competencia por recursos, lo cual daría como resultado tropas pequeñas (Crockett, 1984). Un factor asociado a el número limitante de hembras reproductoras es el infanticidio, ya que tropas grandes con muchas hembras adultas tendrían una mayor probabilidad de ser atacadas por otros machos que al desplazar al macho de la tropa matarían a las crías de estas hembras, de esta manera, la emigración de hembras evitaría el infanticidio (Crockett & Janson, 1993).

La población de carayás analizada en este trabajo habita la Isla Brasilera (IB) (Chaco, Argentina) que presenta un hábitat correspondiente a selva de inundación y tiene una superficie de 292 ha, la población de 'carayá' que la habita y su composición y estructura florística ha sido estudiada por 5 años (Zunino *et al.*, 2001). En este trabajo, se consideraron, de manera general, dos tipos de ambientes en la isla: Albardón principal (AP) caracterizado por ser un terreno elevado y con baja frecuencia de inundación, y Monte (que incluye las regiones Punta Sur, Punta Norte y montes periféricos de la isla) que forma parte de tierras más bajas y con mayor frecuencia de inundación (Zunino *et al.*, 2001). En AP que es un área más rica en recursos para los aulladores, la densidad de aulladores fue de 3,02 ind/ha con un tamaño grupal promedio de 11,25 individuos por grupo, mientras que en los Montes los valores fueron de 1,8 ind/ha y 6,13 individuos por grupo (Zunino *et al.*, 2001).

La ausencia de datos en la literatura de variablidad nucleotídica en estudios de poblaciones de monos platirrinos tanto a nivel de secuencias nucleotídicas nucleares como mitocondriales, no permitieron la comparación con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis. El único trabajo en donde se analizó la variabilidad nucleotídica mitocondrial fue realizado en poblaciones de *A. seniculus* de Venezuela, sin embargo la autora no refiere parámetros de variabilidad haplotípica ya que sólo describe el número de haplotipos observados en las hembras de ciertas tropas (Pope, 2000) por lo cual no es posible realizar la comparación adecuada.

Las estructuras genéticas de la población de *Alouatta caraya* en Isla Brasilera y de las tropas son complejas y se hace necesario un análisis considerando numerosos parámetros ecológicos tales como la disponibilidad y calidad de los recursos alimenticios y especialmente demográficos como el número de nacimientos, mortalidad, migración de hembras y machos de cada tropa. Dado que no se contó con esta información se trató de interpretar los datos genéticos obtenidos en el presente trabajo de manera comparativa con estudios demográficos en *A. caraya* en Isla Guáscara (Rumiz, 1990), Isla Brasilera -datos generales- (Zunino *et al.*, 2001) y tierra firme (parches de bosques) (Zunino, 1986; Rumiz, 1990).

La correlación positiva entre calidad del ambiente y la densidad de 'carayá' ha sido ampliamente confirmada, esto muestra que en ambientes más pobres en recursos alimentarios donde los recursos son más limitados (tierra firme y la zona de monte en

islas), la densidad de 'carayá' es significativamente menor que en hábitats como los albardones principales en las islas (Rumiz, 1990; Zunino *et al.*, 2001). A su vez, en ambientes de tierra firme los grupos presentan áreas de acción no superpuestas indicando un comportamiento territorial de los grupos (Zunino, 1986). También en ambientes de tierra firme, la jerarquía en hembras ha sido comprobada mediante observación de comportamientos agonísticos entre hembras de una misma tropa, asímismo esta jerarquía fue asociada a una prioridad en el acceso a recursos alimentarios más beneficiosos y un mayor éxito reproductivo de las hembras de mayor rango (Zunino, 1986). Las tropas del Albardón Principal de Isla Brasilera, un hábitat de alta calidad, presentan grupos multimachos y superposición al menos de los límites de las áreas de acción de las tropas, mostrando ausencia de un marcado comportamiento territorial probablemente debido a una alta disponibilidad de recursos (Zunino *et al.*, 2001). En Isla Brasilera, la estructura jerárquica en hembras aún no ha sido descripta mientras que en machos constituye un proyecto de Tesis doctoral en curso (Oklander, comunicación personal). Observaciones personales cualitativas en el sitio de estudio tales como presencia de hembras periféricas a una tropa del albardón principal y comportamientos de agresividad hacia ellas, por parte de las hembras adultas de la tropa, podrían reflejar un comportamiento de defensa de los recursos por parte de estas últimas.

Si por un lado, en IB los grupos son multimachos-no territoriales, y en TF son unimachos-territoriales (Zunino *et al.*, 2001), la presencia de hembras periféricas podría deberse a que el grupo de IB llegó a un tamaño máximo, luego del cual el costo de la competencia dentro del grupo podría superar el beneficio de vivir en él, conduciendo o bien a la emigración de individuos o a la fisión del grupo (Pope, 2000). De hecho la tropa en la que se obtuvieron esas observaciones presentaba en ese momento 13 individuos, y ocupaba el límite sur del albardón de IB, luego de esa campaña no se volvieron a tener registros de la misma y como no había individuos marcados, no se pudo saber si se habían integrado a otra tropa, se habían desplazado hacia otra parte de la Isla, o habían muerto (Zunino, comunicación personal).

Los resultados obtenidos en este trabajo en base al ADN mitocondrial muestran que en los grupos, tanto machos como hembras, mantienen una cierta cohesión genética asociada a la presencia de haplotipos de uno u otro linaje mitocondrial A ó B (Figura 36). En las tropas de donde se obtuvieron más número de muestras se observan haplotipos

mayoritarios, por ejemplo en la tropa X28 la frecuencia del haplotipo H021 fue de 0,69 mientras que los 4 restantes haplotipos presentaron frecuencias de 0,09 (Tabla 42). Cuando se analizaron las relaciones entre las tropas (Figura 37) se observó diferenciación de dos grupos principales que al compararlo con el fenograma de la Figura 36, coinciden con los dos linajes mitocondriales principales A y B. En el grupo superior, el 100% de los haplotipos descriptos en cada tropa pertenecen al linaje A, mientras que en el grupo inferior, los haplotipos pertenecen en su mayoría al grupo B aún cuando en las tropas X10, X28 y X30 se observó un individuo con haplotipo del linaje A en cada una (Figura 36 y 37). En particular, en las tropas X10 y X30, se observó un macho adulto en cada una con haplotipos del clado A, mientras que en la tropa X28 el ejemplar fue una hembra juvenil.

La tendencia a mantener una cohesión matrilineal de grupo en las tropas de IB de *A. caraya* reflejaría el mismo patrón observado en *A. seniculus* (Pope, 2000). En IB la organización social en tropas conduce a la diferenciación a nivel del ADN mitocondrial de la población en base a valores significativos de F_{ST} entre tropas del linaje A y B, e incluso entre tropas del linaje A con una distribución geográfica disyunta (Tabla 44).

Las tropas del linaje B empleadas en el análisis de estructuración no mostraron valores significativos y al tener distribuciones geográficas adyacentes o cercanas en el albardón principal de la isla, la hipótesis propuesta es que la ausencia de estructuración significativa reflejaría una divergencia reciente pudiendo estar asociada a la formación de grupos por fisión de matrilíneas.

La formación de nuevos grupos por fisión de matrilíneas ha sido estudiado en macacos. El grupo que se escinde del principal, pequeño o bien de menor jerarquía, se dispersa del área de acción original, mientras que el grupo de mayor tamaño o de mayor jerarquía permanece (Chepko-Sade & Olivier, 1979). Por otro lado, el parentesco en los nuevos grupos sería mayor que en el grupo mayor original, y a lo largo del tiempo este parentesco disminuirá en cada subgrupo hasta que ocurriera otro evento de fisión (Chepko-Sade & Olivier, 1979). En monos platirrinos se han confirmado casos de formación de nuevos grupos por fisión en *Alouatta palliata* (Carpenter, 1965) confirmado por análisis de isoenzimas (Froehlich & Thorington, 1991) y en *Brachyteles arachnoides* (Strier *et al.*, 1993). En *Alouatta seniculus* la formación de nuevos grupos no parece ocurrir por eventos de fisión sino que se daría por la asociación de individuos no emparentados provenientes de diferentes grupos (Crockett, 1984) o bien grupos de hembras periféricas que se

mantienen al margen de los grupos sociales hasta que se integra un macho adulto y establecen un territorio (Pope, 2000).

Como se comentó anteriormente, en IB también se observó la presencia de hembras periféricas, si bien no se conoce cuál fue el destino de ese grupo, deja abierta la posibilidad de que en *A. caraya* se observe un patrón similar en la formación de nuevos grupos, al descripto en *A. seniculus* (Rumiz, 1990). En ambientes de tierra firme en *A. caraya* se han reportado asociaciones de hembras solitarias sin embargo debido a la estructura en parches del ambiente, aquellos de mejor calidad estarían ocupados por los grupos más numerosos y los nuevos grupos se observarían en ambientes pobres con menor éxito reproductivo (Rumiz, 1990). De hecho, en este trabajo, se muestreó un grupo de tierra firme formado sólo por un macho adulto, una hembra adulta y su cría que ocupaban un parche de monte (Tropa CAPRIM) en concordancia con lo observado en otros estudios (Zunino, 1986; Rumiz, 1990). En *A. seniculus*, la formación de nuevos grupos esta dada por la asociación de hembras no emparentadas (2 o más hembras) que se mantienen por 6 meses o más en un área que luego formará parte del área de acción de la nueva tropa que se constituye cuando un macho se les une (Crockett, 1984; Pope, 1992). En esta especie, las asociaciones de hembras no eligirían las áreas defendidas por machos, sino que estos se unirían a los grupos de hembras (Crockett, 1984; Pope, 1992).

Considerando la flexibilidad en la organización social en *A. caraya* donde incluso dentro de IB los ambientes determinarían la estructura de los grupos con grupos pequeños en los montes periféricos y grupos grandes en el albardón principal, se podría proponer que también la formación de nuevos grupos podrían seguir patrones flexibles en función de los recursos. Los resultados obtenidos del análisis del ADN mitocodrial en las tropas del albardón principal podrían reflejar orígenes de las tropas -considerando cada linaje A o B- por eventos de fisión. Sin embargo, luego del evento de fisión la nueva tropa permitiría la incorporación de individuos no emparentados. A su vez, la similitud genética entre las tropas del albardón y los ambientes de monte en IB dentro de cada linaje A o B, no mostraron patrones definidos en función de la distribución geográfica. Esto permitiría considerar que los ambientes más ricos de la isla es decir el albardón principal fue colonizado por los primeros grupos de aulladores que llegaron a la misma (fundadores), mientras que los grupos que se ubican en los montes serían el resultado de la formación de

nuevos grupos ya sea por dispersión o fisión de los grupos fundadores o bien por nuevos eventos de colonización de IB.

1.2. Distribución de los haplotipos dentro de las tropas

Bajo el modelo propuesto para *A. caraya* con un asociación entre hembras emparentadas y filopatría, la presencia de hembras con diferentes haplotipos en las tropas podría reflejar una formación reciente del grupo como así también una relajación de la competencia entre hembras por los recursos, o bien ambas.

En los machos, las hipótesis socio-ecológicas proponen que el número de machos en un grupo estaría determinado por la capacidad de monopolizar los apareamientos con las hembras (van Schaik, 1996). Por otro lado, se considera que los machos disminuyen el riesgo de predación para la hembra y sus crías, a la vez que en un grupo multimacho se esperaría un menor riesgo de infanticidios (van Schaik, 1996). Esta propuesta supone que, en general, las hembras se verán favorecidas de vivir en grupos multimacho a excepción que la competencia por recursos fuera muy alta (van Schaik, 1996). Asimismo, una compilación de estudios en primates indicó que los grupos multimachos presentarían menos conflictos con sus grupos vecinos (van Schaik, 1996). En este estudio se observaron machos adultos con los mismos haplotipos que las hembras adultas dentro de una misma tropa. Esto reflejaría cierto grado de filopatría en los machos, sin embargo como la población analizada habita una isla, no se podría generalizar acerca del patrón observado, ya que la isla en sí podría constituir una barrera geográfica para la dispersión de los individuos de la isla. Como se mencionó anteriormente, la filopatría en machos también se observó en *A. seniculus* donde el 2 % de los machos permanecían en el grupo natal frente al 20 al 30 % de las hembras (Crockett, 1996).

En *Pan troglodytes* caracterizado por grupos multimachos, asociación entre machos y migración de hembras, se observó que las hembras si bien seguirían una estrategia comportamental de promiscuidad, los estudios de paternidad por microsatélites muestran que las hembras se aparean con machos fuera de su grupo dando como resultado que el 50% de las crías del grupo presentan padres fuera del grupo (Gagneaux *et al.*, 1999). Esta estrategia reproductiva le permitiría a las hembras la elección de pareja sin perder el acceso a los recursos provisto por los machos de su grupo social (Gagneaux *et al.*, 1999). Esto

también fue observado en *Macaca sinica*, con filopatría de hembras (Keane *et al.*, 1997). Así, se podría proponer que la estrategia reproductiva de las hembras en *A. caraya* podrían incluir apareamientos fuera de su grupo probablemente para evitar la endogamia o bien por elección de pareja.

La realización de trabajos cuyo objetivo sea el estudio del comportamiento en conjunción con el uso de marcadores genéticos permitirán demostrar cuán flexible son los sistemas de apareamiento en los primates, donde la organización social discreta en grupos podría representar la parte más visible del sistema social, que en realidad sería un continuo, y donde los grupos sociales y los grupos reproductores no serían necesariamente idénticos.

2. Eventos históricos a una microescala temporal

Finalmente para comprender la estructura genética de la población también se deberían considerar los eventos históricos definidos principalmente por los procesos de colonización de nuevas áreas y las fluctuaciones en el tamaño poblacional (por ej. debido a epidemias de ura y fiebre amarilla).

En aulladores se han documentado numerosos casos de mortalidad por enfermedades como la fiebre amarilla (Collias & Southmwick, 1952), aumento del número de infanticidios (Rudran, 1979), deficiencias en la dieta (Milton, 1982), huracanes y presión antrópica (Crockett & Eisenberg, 1987) los cuales llevarían a limitar o reducir la población.

En la distribución sur de *A. caraya*, se han descripto epidemias de fiebre amarilla que produjeron la reducción del tamaño poblacional en la década del 60 afectando el NE de Argentina, Paraguay y SE de Brasil (di Bitetti *et al.*, 1994). Mas recientemente en los 80, una proliferación de *Dermatobia sp.* (ura), parásito que afectó el ganado en Formosa (Argentina), produjo una disminución poblacional importante en esa región, que incluso produjo un cambio en el patrón de actividades en los grupos remanentes de *A. caraya* en la localidad de Riacho Pilagá (Arditi, 1992). Si bien no se cuenta con datos demográficos, se podría considerar como una aproximación, que la población de 'carayás' de Isla Brasilera también se vio afectada por las epidemias citadas. Esto, sumado a las inundaciones periódicas de la isla, permitirían considerar fluctuaciones en la población de 'carayás'.

La historia demográfica de la isla y la región, también estarían signadas por eventos de colonización de `carayás´ de otras regiones, que justamente durante épocas de inundaciones podrían migrar sobre balsas naturales a través de los ríos Paraná y Paraguay, donde incluso durante una inundación se observó una hembra y su cría sobre un tronco en el río Paraná (Zunino, comunicación personal). Brown & Zunino (1994) basados en estudios de distribución geográfica y ambiente, propusieron que el río Paraná actuaría como corredor biológico y centro dispersor en *A. caraya*, hipótesis apoyada por estudios isoenzimáticos (Szapkievich, 2001).

A diferencia de los trabajos anteriores, en este trabajo, se propone al río Paraguay también como ruta de migración para el `carayá´. En base a la hipótesis filogeográfica propuesta, la presencia de los dos clados mitocondriales serían el resultado de la colonización a través de las selvas asociadas a los ríos Paraná y Paraguay, indicando el papel histórico de ambos ríos como rutas de migración en *A. caraya*.

Parte III. Aplicación a la conservación

A medida que las selvas tropicales desaparecen, también lo hacen los primates que viven en ellas. Las consecuencias de la deforestación para los primates son la reducción del tamaño poblacional y la fragmentación en poblaciones locales entre las cuales habría poco o nulo flujo génico (Pope, 1996). Esto podría llevar a la pérdida de la variabilidad genética por deriva génica, y a la acumulación de efectos de endogamia. La pérdida de la diversidad genética daría como resultado un aumento de la susceptibilidad en los remanentes de las poblaciones a perturbaciones demográficas y ambientales que podrían conducir a la extinción del grupo (Shaffer, 1987).

Si bien *A. caraya* no presenta riesgos para su conservación, y se distribuye en ambientes naturalmente fragmentados, la disminución y degradación de su hábitat por actividades madereras y agrícolo-ganaderas no controladas y abusivas podrían desembocar en un aislamiento de las distintas poblaciones.

En aulladores, la capacidad colonizadora y la adaptabilidad a cambios ambientales han sido confirmados por Kowalewski & Zunino (1999) en parches de selva en galería en el norte de Argentina, donde los niveles actuales de deforestación por tala selectiva parecerían no afectar a la población, la cual ha mantenido, e incluso ha incrementado, su densidad poblacional y el tamaño de los grupos. Sin embargo, dadas las fluctuaciones periódicas de su población debido a epidemias o inundaciones, el aumento en su densidad poblacional también podría ser interpretado como una recuperación de una disminución previa, sin representar un aumento neto en su población.

Según el modelo de colonización a través de los ríos, estos ambientes constituirían un corredor para la migración de los 'carayás' permitiendo la colonización de la región sur de su distribución. Estos están siendo alterados por la interrupción de la continuidad de las selvas en galería y de inundación debido al desmonte y a la construcción de represas, representando potenciales barreras de flujo génico para el 'carayá'.

Al evaluar los procesos evolutivos dentro de la biología de la conservación, se definieron las unidades evolutivas significativas ('evolutionary significant unit', ESU) como la unidad de población que se debe considerar independiente para su conservación considerando su acervo genético y características ecológicas distintivos (Ryder, 1986;

Moritz, 1994). Si bien el concepto de ESU está en continua revisión, Crandall *et al.* (2000) proponen un criterio operacional para determinar la particularidad ecológica y genética de una población, en función de refutar el criterio de intercambio genético y ecológico, donde las implicancias de manejo se centrarían en preservar la divergencia adaptativa y el proceso evolutivo en las especies y poblaciones.

A. caraya en el NE de Argentina representaría el contacto secundario de dos poblaciones divergentes donde cada población debería ser considerada como unidades (ESU) de conservación conectadas por flujo génico. El objetivo de el manejo sería mantener el flujo génico según se infiriese a partir de los datos moleculares, haciéndose necesario complementar el presente trabajo con marcadores nucleares informativos, ya que el comportamiento filopátrico de las hembras limita la utilidad del mtADN en estas estimaciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan las observaciones ecológicas mostrando la necesidad de evaluar aspectos genéticos en las poblaciones de primates para la elaboración de programas de conservación generando un marco integrador para un mejor conocimiento de la biología de los organismos. Un mejor entendimiento de los modos y patrones de los procesos que operaron en el pasado y en la actualidad considerando las características intrínsecas de cada grupo, se revela como fundamental a la hora de considerar su manejo y conservación.

Capítulo VI

Conclusiones

1. La tasa de sustitución nucleotídica a nivel del mtADN en *Saimiri* estaría influenciada por características específicas de su estructura social

2. El gen COII es un marcador molecular de utilidad en estudios sistemáticos a nivel intragenérico.

3. En base la gen COII, las especies de *Saimiri boliviensis* y *S. sciureus* presentarían niveles de divergencia del orden de especies, mientras que las subespecies de *Cebus apella paraguayanus* y *C. a. nigritus* reflejarían divergencias recientes.

4. *Alouatta caraya* no presentara diferenciación morfológica ni cariotípica en un amplio rango de su distribución probablemente debido a una divergencia reciente de sus poblaciones junto con un alto flujo génico por parte de los machos

5. La variabilidad nucleotídica mitocondrial *A. caraya* de distribución marginal sur está caracterizada por la presencia de dos clados mitocondriales principales divergentes mostrando un patrón filogeográfico de clase II.

6. *A. caraya* presentaría cierto grado de estructuración geográfica de la variabilidad mitocondrial a nivel de cada clado corroborando el comportamiento filopátrico en las hembras.

7. La estructura genética observada tanto a nivel de los grupos sociales como regional en *A. caraya* muestran patrones complejos resultantes de la interacción de factores ecológicos como históricos.

8. Tanto en el pasado como en la actualidad, los ríos Paraná y Paraguay servirían como rutas de migración para *A. caraya* y, probablemente otros organismos, marcando la importancia de la evaluación adecuada en la construcción de represas o desmonte a lo largo de estos ríos.

BIBLIOGRAFÍA

A

Adkins, R.M. & R.L. Honeycutt, 1994. Evolution of the primate cytochrome *c* oxidase subunit II gene. *Journal of Molecular Evolution, 38*(3), 512-231.

Adkins, R.M., Honeycutt, R.L. & T.R. Disotell, 1996. Evolution of eutherian cytochrome *c* oxidase subunit II: Heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. *Molecular Biology and Evolution, 13*(9), 1393-1404.

Altmann, J., 1980. *Baboon mothers and infants*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Anderson, S.G.E. & P.M. Sharp, 1996. Condon usage and base composition in *Rickettsia prowazekii*. *Journal of Molecular Evolution, 42*, 525-536.

Anderson, S., 1997. Mammals of Bolivia, taxonomy and distribution. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 231*, 1-127.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B., de Brujin, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Ro, B.A., Sange, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Standen, R., & I.G. Young, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature, 290*, 457-465.

Arditi, S.I., 1992. Variaciones estacionales en la actividad y dieta de *Aotus azarae* y *Alouatta caraya* en Formosa, Argentina. *Boletín Primatológico Latinoamericano, 3*(1), 11-30.

Armada, J.L.A., Barroso, C.M.L., Lima, M.M.C., Muniz, J.A.P.C. & H.N. Seuánez, 1987. Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. *American Journal of Primatology, 13*, 283-296.

Arnason, U., gullberg, A., Johnsson, E. & C. Ledje, 1993. The nucleotide sequence of the mitochondrial DNA molecule of the grey seal *Halichcrus grupus*, and a comparison with mitochondrial sequences of other true seals. *Journal of Molecular Evolution, 37*, 323-330.

Arnason, U., Xu, X., Gullberg, A. & D. Graur, 1996. The "*Phoca* standard" An external molecular reference for calibrating recent evolutionary divergences. *Journal of Molecular Evolution, 43*, 41-45.

Arnason,U., Gullberg, A. & A. Janke, 1998. Molecular timing of primate divergences as estimated by two nonprimate calibration points. *Journal of Molecular Evolution, 47* (6), 718-727.

Arnason, U., Gullberg, A., Burguete, A.S. & A. Janke, 2000. Molecular estimates of primate divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas, 133* (3), 217-228.

Arnason, U., Adegoke, J.A., Bodin, K., Born, E.W., Esa, Y.B., Gullberg, A., Nilsson, M., Short, R.V., Xu, X. & A. Janke. 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 99* (12), 8151-8156.

Ascunce, M.S., Hasson, E. & Mudry, M.D., 2002. Description of the *cytochrome oxidase* subunit II gene in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini). *Genetica, 114*, 253-267.

Ashley, M.V. & J.L Vaughn, 1995. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COII) sequences. *International Journal of Primatology, 16*(5), 793-806.

Avise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, B312*, 325-342.

Avise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Pp. 511. Chapman & Hall, N.Y.-London.

Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, M.R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., C.A. Reeb & N.C. Saunder, 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst., 18*, 489-522.

Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., A.B. Meylan & E. Bermingham, 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution*, *9* (3), 457-73.

Ayres, J.M. & T.H. Clutton-Brock, 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *Am. Nat.*, *140*, 531-537.

B

Bailey, W.J., Fitch, D.H.A., D.A. Tagle & J. Czelusniak, 1991. Molecular evolution of the psi-eta-globin gene locus: gibbon phylogeny and the molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, *8*, 155-184.

Barnes, I., Matheus, P., Shapiro, B., Jensen, D. & A. Cooper, 2002. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian Brown Bears. *Science*, 2267-2270.

Bearder, S.K., 1987. Lorises, bushhbabies, and tarsiers, diverse societies in solitary forangers. Pp.11-24. En *Primate Societies* (B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R. W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). University of Chicago Press, Chicago.

Bermingham, E., & A.P. Martín, 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to inter the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, *7*, 499-518.

Bernardi, G.B., Olofsso, J. Filipski, M. Zerial, J. Salinas, G. Cuny et *al.*, 1985. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science*, *228*, 953- 958.

Bertorelle, G. & L.Excoffier, 1998. Inferring admixture proportions from molecular data. *Mol. Biol. Evol.*, *10*, 1298-1311.

Bicca-Marques, J.C., 1990. A new souther limit for the distribution of *Alouatta caraya* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Primates*, *31*(3), 449-451.

Bicca-Marques, J.C. & C. Calegaro-Marques, 1994. Feeding behavior of the black howler monkey (*Alouatta caraya*) in a seminatural forest. *Acta Biol. Leopold*, *16*, 69-84.

Birky Jr., C.W., Maruyama, T. & Fuerst P., 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondrial and chloroplasts, and some results. *Genetics*, *103*, 513-527.

Boinski, S., 1999. The Social Organizations of Squirrel Monkeys: Implications for Ecological Models of Social Evolution. *Evolutionary Anthropology*, *8*(3), 101-113.

Boinski, S. & S. Cropp, 1999. Disparate data sets resolve squirrel monkey (*Saimiri*) taxonomy: Implications for behavioral, ecology and biochemical usage. *International Journal of Primatology*, *20*, 237-256.

Bonvicino, C.R., Lemos, B. & H.N. Seuánez, 2001. Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). *Chromosoma*, *110*, 241-246.

Bravo, S.P. & G.E. Zunino, 1998. Effects of black howler monkey (*Alouatta caraya*) seed ingestion on insect larvae. *American Journal of Primatology*, *45*, 411-415.

Britten, R.J., 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, *231*, 1393-1398.

Bromham, L., Rambaut, A., P.H. Harvey, 1996. Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution. *Journal of Molecular Evolution*, *43*, 610-621.

Brown, A.D., 1984. La protección de los primates en la Argentina. *Bol. Primatol. Latinoamericano*, *2*, 21-33.

Brown, A.D.,1987. Biogeografía histórica y la diversificación de los Primates. Pp. 27-60. En *Primates de Argentina: biogeografía, Citogenética, Ecología y Protección*. Secretaría de Cultura. Premio Regional a la Producción Científica en Ciencias Naturales (Zona I).

Brown, A.D. & G.E. Zunino, 1994. Hábitat, densidad y problemas de conservación de los primates de Argentina. *Vida Silvestre Neotropical*, *3*(1), 30-40.

Brown, G.G. & Simpson, M.V., 1982. Novel features of animal mt DNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 79*, 3246-3250.

Brown, K.S. Jr., Shepard, P.M. & J.R.G. Turner, 1974. Quaternary refugia in tropical America: Evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proc. Roy. Scot. London B, 187*, 369-378.

Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. Pp. 62-88. En *Evolution of Genes and Proteins* (M. Nei & R.K. Koehn, Eds.). Sinauer Press, Sunderland, MA.

Brown, W.M., 1985. The mitochondrial genome of animals. Pp. 95-130. En *Molecular evolutionary genetics* (R.J. MacIntyre, Ed.). Plenum, N.Y.

Brown, W.M., George Jr., M. & A.C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 76*, 1967-1971.

Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & A.C. Wilson, 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4), 225-39.

Bush, G.L., 1975. Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6, 339-364.

Bush, G.L., 1981. Stasipatric speciation and rapid evolution in animals. Pp. 201-218. En *Evolution and speciation: Essays in honor of M.J.D. White* (W.R. Atchley & D.S. Woodruff, Eds.). Cambridge University Press, London, UK. *

Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C. & J.L. Patton, 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 74* (9), 3942-3946.

C

Cabrera, A., 1958. Catalogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, 4, 1-307.

Canavez, F.C., Moreira, M.A.M., Ladasky, J.J., Pissinatti, A., Parham, P. & H.N. Seuánez, 1999. Molecular phylogeny of New World primates (Platyrrhini) based on β_2-microglobulin DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 12*(1), 74-82.

Cann, R.L., 2001.Genetic clues to dispersal in human populations: Retracing the past from the present. *Science*, 291, 1738-1742.

Cann, R.L., 2002. Tangled genetic routes. *Nature, 416*, 32-33.

Cann, R.L., Stoneking, M. & A.C. Wilson, 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature, 325*, 31-36.

Cao, Y., Adachi, J., Janke, A, Pääbo, S. & M. Hasegawa, 1994. Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: Instability of a tree based on a single gene. *Journal of Molecular Evolution, 39*, 519-527.

Capaldi, R.A., 1990. Structure and function of cytochorme c oxidase. *Biochem. Biophys. Acta, 726*, 135-148.

Carpenter, C.R., 1934. A field study of the behavior and social relations of howling monkeys (*Alouatta palliata*). *Comp. Physchol. Monogr., 10*, 1-168.

Carpenter, C.R., 1954. Grouping behavior of howling monkeys. *Extrait des Archives Neerlandaises de Zoologie, 10*, 45-50.

Carpenter, C.R., 1962. Field studies of a primate population. Pp. 286-294. En *Roots of Behavior* (E.L. Bliss, Ed.). Harper and Row, New York.

Carpenter, C.R. 1965. The howlers of Barro Colorado Island. Pp. 250-291. En Primate Behavior (I. Devore, Ed.). Holt, Rinehart and Winston, New York.

Cartmill, M., 1980. Basic primatology and prosimian evolution. Pp. 147-186. En *Fifty years of physical anthropology in North America*. (F. Spencer, Ed.). Academic Press, N.Y.

Castresana, J., 2001. Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution, 18*(4), 465-471.

Chang, B.H.J., Shimmin, L.C., Shyue, S.K. & D. Hewett-Emmett., 1994. Weak male-driven molecular evolution in rodents. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 91*, 827-831.

Chapman, C.A. & L.J. Chapman, 1990. Reproductive biology of captive and free-ranging monkeys. *Zoo Biology, 9*, 1-9.

Chapman, C.A., & S.R. Balcomb 1998. Population Characteristics of Howlers: Ecological Conditions or Group History. *International Journal of Primatology, 19*, 385-404.

Chepko-Sade, B.D. & T.J. Olivier, 1979. Coefficient of genetic relationship and the probability of intragenealogical fisión in Macaca mulata. *Behavioral Ecology and Sociobiology, 5*, 263-278.

Chesser, R.K., 1991. Gene diversity and female philopatry. *Genetics, 127*, 437-447.

Chesser, R.K., Rhodes, O.E., Sugg, D.W. & A. Schnabel, 1993. Effective sizes for subdivided populations. *Genetics, 135*, 1221-1232.

Chu, E.H.Y. & M.A. Bender, 1961 Chromosome cytology and evolution in primates. *Science, 133*, 1399-1405.

Clarke, M.R., & K.E. Glander, 1984. Female reproductive success in a group of free-ranging howling monkeys (*Alouatta palliata*) in Costa Rica. Pp. 111-126. En *Female Primates: Studies by Women Primatologists* (M.F Small, Ed.). Alan R. Liss, N. Y.

Clegg, M.T, 2000. Limits to knowledge in Populations Genetics. Pp. 35-70. En *Limits to knowledge in evolutionary genetics* (M.T. Clegg, M.K. Hecht & R.J. MacIntyre, Eds.). Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Clemente, M., Posada, D. & K.A. Crandall, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology, 9*(10), 1657-1660.

Clemente, M., Derington, J. & D. Posada, 2001. TCS: estimating gene genealogies ver. 1.13. Universidad de Brigham Young, Provo, UT 84602, U. S. Programa de computación. http://bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/programs.htm

Clisson, I., Lathuilliere, M. & B. Crouau-Roy, 2000. Conservation and evolution of microsatellite loci in Primate taxa. *American Journal of Primatology, 50*, 205-214.

Clutton-Brock, T.H. & P.H. Harvey, 1977. Primate ecology and social organization. *Journal of Zoology London, 183*, 1-39.

Cockerham, C.C., 1973. Analysis of gene frequencies. *Evolution, 23*, 72-84.

Collias, N. & C. Southmwick, 1952. A field study of population density and social organization in howling monkeys. *Proc. Am. Phil Soc., 96*, 143-156.

Collins, A.C. & J.M. Dubach, 2000. Biogeographic and Ecological Forces Responsible for Speciation in *Ateles*. *International Journal of Primatology, 21*, 421-444.

Consiglieri, S., Stanyon, R., Koehler, U., Arnold, N. & J. Wienberg, 1998. In situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes. *American Journal of Primatology, 46*, 119-133.

Cooper, C.E., Nicholla, P. & J.A. Freedman, 1991. Cytochrome c oxidase: structure, funtion, and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochem. Cell. Biol., 69*, 586-607.

Coppe, G.R., 1994. The response of insect fauna to glacial-interglacial climatic fluctuations. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, B344*, 19-26.

Coppo, J.A. & E.H. Resoagli, 1978. Etapas del crecimiento en monos carayá (*Alouatta caraya*). *Facena, 2*, 29-39.

Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I. & M. Ruiz-García, 2002. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en consideración.

Costello, R.K., Dickinson, C., Rosenberger, A.L., S. Boinski & F.S. Szalay, 1993. Pp. 177-237. Squirrel monkey (Genus *Saimiri*) Taxonomy: A multidisciplinary study of the biology of species. En Species, Species Concepts, and Primate Evolution (W.H. Kimbel & L.B. Martin, Eds.). Plenum Press, N.Y.

Cracraft, J. & R. Prum, 1988. Patterns and processes of diversification: Speciation and Historical Congruence in Some Neotropical Birds. *Evolution, 42*(3), 603-620.

Crandall, K.A. & A. Templeton, 1993. Empirical test of some predictions from the coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics, 134*, 959-969.

Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M. & R.K. Wayne, 2000. Considering evolutionary process in conservation biology. *Trends Ecol. Evol., 15*, 290-295.

Crespo, J.A., 1950. Notas sobre el hábitat de "Caí"en el norte de Salta. *Boletín de la Oficina Panamericana*, 29(7), 711-714.

Crespo, J.A., 1974. Comentarios sobre nuevas localidades de mamíferos de Argentina y de Bolivia. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", 11*(1), 1-31.

Crockett, C.M., 1984. Emigration by female red howler monkeys and the case for female competition. Pp. 159-173. En *Female primates: Studies by women primatologists* (M.F. Small, Ed.). Alan R. Liss, Inc., New York.

Crockett, C.M., 1996. The relation between red howler monkey (*Alouatta seniculus*) troop size and population growth in two habitats. Pp. 489-510. En *Adaptive radiations of neotropical primates* (M.A. Norconk, A.L. Rosenberger & P.A. Garber, Eds.). Plenum Press, New York.

Crockett, C.M., 1998. Conservation Biology of the Genus Alouatta. *International Journal of Primatology*, 19, 549-576.

Crockett, C.M. & R. Sekulic, 1982. Gestation length in red howler monkeys. *American Journal of Primatology, 3*, 291-294.

Crocket, C.M. & J.F. Eisenberg, 1987. Howlers: variations in group size and demography. Pp. 54-68. En *Primate Societies* (B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). University of Chicago Press, Chicago.

Crockett, C.M. & R. Rudran, 1987. Red howler monkey birth data1: Seasonal variation. *American Journal of Primatology, 13*, 347-368.

Crockett, C.M. & C.H. Janson, 1993. The costs of sociality in red howler monkeys: Infanticide or food competition?. *American Journal of Primatology*, 30, 306.

Crook, J.H. & J.S. Gartlan, 1966. Evolution of primate societies. *Nature, 210*, 1200-1203.

Cropp, S.J. & S. Boinski, 2001. The Central America squirrel monkey (*Saimir oerstedii*): Introduced by hybrid or endemic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 4*, 52-59.

Cropp, S.J., Larson, A. & J.M. Cheverud, 1999. Historical biogeography of tamarins, genus *Saguinus*: The molecular phylogenetic evidence. *American Journal of Physical Anthropology, 108*, 65-89.

Crow, J.F. & M. Kimura, 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row. New York.

Cummings, M.P., Otto, P. & J. Wakeley, 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution, 12*, 814-822.

D

Darwin, C., 1859. *El Origen de las Especies.* Pp. 304. Traducción J. Ròs (1983). Ediciones del Serbal, S.A., Barcelona. España.

De Olivera, E.H.C., 1996. Estudios citogeneticos e evolutivos nas especies brasileiras e argentinas do genero *Alouatta* Lacepede 1799 (Primates, Atelidae). MSc Dissertation, Universidade Federal do Parana, Curitiba, Brasil.

Di Benedetto, G., Nasidze, I., Stenico, S.M., Nigro, L., Krings, M., Lanzinger, M., Vigilant, L., Stoneking, M., Pääbo, S. & G. Barbujani, 2000. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *European Journal of Human Genetics*, *8*, 669-677.

Di Bitetti, M.S., Placci, G., Brown, A.D. & D.I. Rode, 1994. Conservation and population status of the brown howling monkey (*Alouatta fusca clamitans*) in Argentina. *Neotropical Primates*, *2*, 1-4.

Di Fiore, A. & D. Rendall, 1994. Evolution of social organization: a reappraisal for primates by using phylogenetic methods. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*, *91*, 9941-9945.

Disotell, T.R., Honeycutt, R.L. & M. Ruvolo, 1992. Mitochondrial DNA phylogeny of the Old-World Monkey Tribe Papionini. *Molecular Biology and Evolution*, *9*(1), 1-13.

Dobzhnasky, T., 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.

E

Easteal, S., 1991. The relative rate of DNA evolution in Primates. *Molecular Biology and Evolution*, *8*(1), 115-127.

Eisenberg, J.F., 1979. Habitat, economy, and society, Some corretarions and hypotheses for the neotropical primates. In Bernstein IS, Smith EO (eds): "Primate Ecology and Human Origins." New York: STPM. Pp 215-262 *.

Eisenberg, J.F., 1991. Mammalian social organization and the case of *Alouatta*. Pp. 127-138. En *Man and Beast revisted* (M. H. Robinson, L. Tiger, Eds.). Smithsonian Institution Press, Washington.

Eisenberg, J.F., Muckenhirn, N.A. & R. Rudran, 1972. The relation between ecology and social structure in primates. *Science*, *176*, 863-874.

Eldredge, N. & S.J. Gould, 1972. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. Pp.: 82-115. En: *Models in Paleobiology* (T.J.M. Schopf, Ed.). Freeman, Cooper & Co., San Francisco, CA.

Ellsworth, J.A. & G.A. Hoelzer, 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Molecular Ecology*, *7*, 657-658.

Elser, J.J., Sterner R.W., E. Gorokhova, et al. 2000. Biological stoichio-metry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, *3*, 540-550.

Emlen, S.T. & L.W. Oring, 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems, *Science*, 197, 215-23.

Emmons, L.H., 1990. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*. Pp. 281.The University of Chicago Press, Chicago.

Endler, J.A., 1982. Pleistocene refuges: Fact or fancy? Pp. 641-657. En *Biological Diversification in the Tropics* (G.T. Prance, Ed.). Columbia University Press, New York.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & J.M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*, 479-491.

Excoffier, L. & S. Schneider, 1999. Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*, *96*, 10597-10602.

Ewens, W.J., 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Pop. Biol.*, *3*, 87-112.

F

Farris, J.S., 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pp. 7-36. En *Advances in Cladistics* (N.W. Platnick & V.A. Funk, Eds.). Columbia Univ. Press, N.Y.

Felsenstein, J., 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, *27*, 401-410.

Fernandez-Duque, E., Rotundo, M. & C. Sloan, 2001. Density and population structure of owl monkeys (*Aotus azarai*) in the Argentinean Chaco. *American Journal of Primatology*, *53*(3), 99-108.

Figueiredo, W.B., Carvalho-Filho, N.M., Schneider, H. & I. Sampaio, 1998. Mitochondrial DNA sequences and the taxonomic status of *Alouatta seniculus* populations in northeastern Amazonia. *Neotropical Primates, 6*(3), 73-77.

Fisher, R.A., 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection.* Clarendon Press, Oxford.

Fleagle, J.G., 1998. *Primate Adaptation and Evolution.* Pp. 596. Academic Press, California.

Fleagle, J.G., 2000. The Century of the Past: One Hundred Years in the Study of Primate Evolution. *Evolutionary Anthropology*, 87-100.

Fleagle, J.G. & R.F. Kay, 1997. Platyrrhines, Catarrhines and the fossil records. En *New World Primates: Ecology, Evolution and Behavior* (W.G. Kinzey, Ed.). Aldine de Gruyter. New York.

Fontdevila, A. & A. Moya, 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Pp. 349. Editorial Síntesis S.A., Madrid, España.

Ford, S., 1986. Systematics of the New World monkeys. Pp. 73-135. En *Comparative Primate Biology Vol. 1: Systematics, Evolution and Anatomy* (D.R. Swindler & J. Erwin, Eds.). Alan R. Liss, New York.

Ford, S. & L.C. Davis, 1992. Systematics and body size: Implications for feeding adaptations in New World monkeys. *American Journal of Physical Anthropology, 88*, 415-468.

Froehlich, J.W., Supriatana, J. & P.H. Froehlich, 1991. Morphometric analyses of *Ateles*: systematic and biogeographic implications. *American Journal of Primatology, 25*, 1-22.

Fu, Y.-X., 1997. Statistical tests of neutrality against population growh, hitchhiking and background selection. *Genetics, 147*, 915-925.

G

Gagneux, P., 2002. The genus *Pan*: population genetics of an endangered group. *Trends in Genetics, 18*, 327-330.

Gagneux, P., Wills, C., Gerlof, U., Tautz, D., Morin, P.A., Boesch, C., Fruth, B., Hohmann, G., Ryder O.A. & D.S. Woodruff, 1999. Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoids. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*, 96, 5077-5082.

Garber, P.A. & S.R. Leigh, 1997. Ontogenetic variation in small-bodied New World primates: implications for patterns of reproduction and infant care. *Folia Primatol* (Basel), *68*(1), 1-22.

Garner, K.J. & O.A. Ryder, 1996. Mitochondrial DNA diversity in gorillas. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 6*, 39-48.

Gary B. Nunn & S.E. Stanley, 1998. Body size effects and rates of cytochrome b evolution in Tube-nosed seabirds. *Molecular Biology and Evolution, 5*(10), 1360-1371.

Gemmel, N.J., Western, P.S., Watson, J.M. & J.A. Marshall Graves, 1996. Evolution of the mammalian mitochond rial control region-Comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. *Molecular Biology and Evolution, 13*(6), 798-808.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M. & D.C. Wallace, 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 77*, 6715-6719.

Givnish, T.J., 1997. Adaptive radiation and molecular systematics: Issues and approaches. Pp. 1-54. En *Molecular Evolution and Adaptive Radiation* (T.J. Givnish & K.J. Sytsma, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Glander, K.E., 1980. Reproduction and population growth in free-ranging mantled howling monkeys. *American Journal of Physical Anthropology, 53*, 25-36.

Goodman, M., 1961. The role of immunological differences in the phyletic development of human behavior. *Human Biologic, 33*, 131-162.

Goodman, M., 1981. Decoding the pattern of protein evolution. *Progr. Biophys. Mol. Biol., 37*, 105-164.

Goodman, M., 1985. Rates of molecular evolution: the hominoid slowdown. *BioEssays, 3*, 9-14.

Goodman, M., C.A., Porter, Czelusniak, J., Page, S.L., Schneider, H., Shoshani, J., Gunnell, G. & C.P. Groves, 1998. Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 9*, 585-598.

Gould, S.J., 1983. Hen's Teeth and Horse's Toes. W.W. Norton, New York. Traducción española: Dientes de gallina y dedos de caballo. Reflexiones sobre historia natural, 1995, Crítica, Barcelona.

Gould, S.J., 1998. La evolución de la vida en la Tierra. *Investigación y Ciencia, diciembre*, 55-61.

Gould, S.J. & E.S. Vrba, 1982. Exaptation - a missing term in the science of form. *Paleobiology, 8*, 4-15.

Graur, D. & W.H. Li, 2000. Genes, Genetic codes, and mutation. Pp. 5-38. En Fundamentals of Molecular Evolution (A.D. Sinauer, Ed.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Greenwood, P.J., 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behavior, 28*,1140-1162.

Grossman, L.I., Schmidt, T.R., Wildman, D.E. & M. Goodman, 2001. Molecular evolution of aerobic energy metabolism in Primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 18*(1), 26-36.

Groves, C. P., 1989. *A Theory of Human and Primate Evolution*. Clarendon Press, Oxford.

Groves, C.P., 1993. *Order Primates*. Pp. 243-277. En Mammals species of the World: A taxonomic and geographic reference, 2nd edition (D.E. Wilson & D.M. Reeder, Eds.). Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

Groves, C.P., 2001. *The taxonomy of Primates*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

H

Haavie, J., Saetre, G.-P. & T. Moum, 2000. Discrepancies in population differentation at microsatellites, mitochondrial Dna and plumaje colour. *Molecular Ecology, 9*, 1137-1148.

Haffer, J., 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science, 165*, 131-137.

Haffer, J., 1979. Quaternary Biogeography of Tropical Lowland South America. Pp. 107-140. En: *Monograph Museum of Natural History, N° 7*. N.Y.

Haffer, J., 1996. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. En *Biodiversity and Conservation*, Vol. 6 nro. 3. Chapman & Hall.

Haldane, J.B.S., 1932. *The Causes of Evolution*. Longmans and Green, London, U.K.

Hapke, A., Zinner, D. & H. Zischler, 2001. mitochondrial DNA variation in Eritrean hamdryas baboons (*Papio hamadryas hamadryas*): life history influences population genetic structure. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, artículo obtenido por internet.

Harada, M. L., Schneider, H., Schneider M. P. C., Sampaio, I., Czelusniak, J. & Goodman, M. (1995). DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: Support for the sister-grouping of *Cebus* and *Saimiri* from two unlinked nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 4* (3), 331-349.

Harpending, H., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol., 66*, 591-600.

Harris, H., 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. Lond. B., 164*, 298-310.

Hartl, D.L. & A.G. Clark, 1989. *Principles of population genetics* (2nd. Ed.). Sinauer, Sunderland.

Hasegawa, M.H., H. Kishino & T. Yano, 1989. Estimation of branching dates among primates by molecular clocks of nuclear DNA which slowed down in Hominidae. *J. Hum. Evol., 18*, 461-476.

Hashimoto Ch., Furuichi T. & O. Takenaka, 1996. Matrilineal kin relationship and social behavior of wild bonobos (*Pan paniscus*): Sequencing the D-loop region of mitochondrial DNA. *Primates, 37*(3), 305-318.

Hedrick, P.W., 1997. *Genetics of Populations*, 2nd Edition, Jones and Bartlett, Boston.

Hedrick, P.W., 1999. Perpective: Highly variable loci and their interpretion in evolution and conservation. *Evolution, 53*, 313-318.

Hendry, A.P., Taylor, E.B. & D. McPhail, 2002. Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution, 56*(6), 1199-1216.

Hennig, W., 1968. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.

Hershkovitz, P., 1949. Mammals of Northern Colombia. Preliminary report n° 4 (Primates) with taxonomic revisions of some forms. *Proceedings of the United States Natural Museum, 98*, 323-427.

Hershkovitz, P., 1955.Notes on the American monkeys of the genus *Cebus*. *J. Mammal, 36*, 449-452.

Hershkovitz, P., 1975.Comments on the taxonomy of Brazilian marmosets *Callithrix* (Callitrichidae). *Folia Primatologica, 24*, 137-172.

Hershkovitz, P., 1983. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report on *Aotus* taxonomy. *American Journal of Primatology, 4*, 209-243.

Hershkovitz, P., 1984. Taxonomy of squirrel monkeys genus *Saimiri* (Cebidae: Platyrrhini): A preliminary report with description of a hitherto unnamed form. *American Journal of Primatology, 7*, 155-210.

Hewitt, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota: Molecular genetics in animal ecology. *Biological Journal of the Linnean Society, 68*, 87-112.

Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature, 405*, 907-913.

Hill, W.C.O., 1960. *Primates: Comparative anatomy and taxonomy Vol. 4 Cebidae, Part A*. Edinburgh. University Press, Edinburgh.

Hill, W.C.O., 1962. *Primates: Comparative anatomy and taxonomy Vol. 5 Cebidae, Part B*. Edinburgh University Press, Edinburgh.

Hillis, D.M. & Dixon, M.T., 1989. Vertebrate phylogeny: evidence from 28S ribosomal DNA sequences. Pp. 355-367. En *The hierarchy of life: molecules and morphology in phylogenetic analysis* (B. Fernholm, K. Bremer & H. Jörnvall, Eds.). Elsevier, Amsterdam.

Hillis, D.M. & J.P. Huelsenbeck, 1992. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *Journal of Heredity, 83*, 189-195.

Hirsch, A., Landau, E.C., Tedeschi, A.C.M., & J.O. Menegheti, 1991. Estudo comparativo das espécies do gênero *Alouatta* Lacèpéde, 1799 (Platyrrhini, Atelidae) e sua distribuição goegráfica na América do Sul. *A Primatol. no Brasil, 3*, 239-262.

Hoelzer, G.A., Hoelzer, M.A. & D.J. Melnick, 1992. The evolutionary history of the sinica group of macaque monkeys as revealed by mtDNA restriction site analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 1*(3), 215-222.

Hoelzer, G.A., Dittus, W.P., Ashley M.V. & D.J. Melnick, 1994. The local distribution of highly divergent mitochondrial DNA haplotypes in toque *Macaca sinica* at Polonnaruwa, Sri Lanka. *Molecular Ecology, 3*, 451-458.

Hoelzer, G.A., Wallman, J. & D.J. Melnick, 1998. The effects of social structure, geographical structure, and population size on the evolution of mitochondrial DNA: II. Molecular Clocks and the Lineage Sorting Period. *Journal of Molecular Evolution, 47*, 21-31.

Hoffstetter, R., 1977. Primates: Filogenia e Historia Biogeográfica. *STVDIA GEOLÓGICA*, XIII: 211-253.

Hoffman, A.A. & P.A. Parson, 1997. *Extreme Environmental Change and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Honeycutt, R.L., Nedbal, M.A., Adkins, R.M., & L.L. Janecek, 1995. Mammalian mitochondrial DNA evolution: A comparison of the cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase II genes. *Journal of Molecular Evolution, 40*, 260-272.

Hooghiemstra, H., Melice, J.L., Berger, A. & N.J. Shackleton, 1993. Frequency spectra and paleoclimatic variability of hte high-resolution 30-1450 kyr Funza I pollen record (Eastern cordillera, Colombia). *Quat. Sci. Rev., 12*, 141-156.

Horai, S., Hayasaka, K., Kondo, R., Tsugane, K. & N. Takahata, 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 92*(2), 532-536.

Horovitz, I., 1999. A phylogenetic study of living and fossil platyrrhines. *American Museum Novitates, 3269*, 1-40.

Horovitz, I. & A. Meyer, 1997. Evolutionary trends in the ecology of New World monkeys inferred from a combined analysis of nuclear, mitochondrial, and morphological data. Pp. 189-224. En *Molecular Evolution and Adaptive Radiation* (T.J. Givnish & K.J. Sytsma, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge.

Horovitz, I., Zardoya, R. & A. Meyer, 1998. Platyrrhine Systematics: A simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Am. J. Phys Anthropol., 106*, 261-281.

Hubby, J.L. & R.C. Lewontin, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura. Genetics, 54*, 577-594.

Hudson, R.R., 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Ox. Surv. Evol. Biol., 7*, 1-44.

Hudson, R.R., 1993. The how and why of generating gene genealogies. Pp. 23-36. En *Mechanisms of Molecular Evolution* (N. Takahata & A.G. Clark, Eds.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Hudson, R.R.,. 1998. Island models and the coalescent process. *Molecular Ecology, 7*, 413-418.

Hundertmark, K.J., Shields, G.F., Udina, I.G., Bowyer, R.T., Danilkin, A.A. & C.C. Schwartz, 2002. Mitochondrial Philogeography of Moose (*Alces alces*): Late Pleistocene Divergence and Population Expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1-13.

I

Idani, G., 1991. Social relationships between immigrant and resident bonobo (*Pan paniscus*) females at Wamba. *Folia Primatologica, 57*, 83-95.

Irondo, M.H. & N.O. García, 1993. Climatic variation in the Argentine plains during the last 18.000 years. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology, 101*, 299-310.

Irwin, D.M., Kocher, T.D. & A.C. Wilson, 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol., 32*, 128-144.

J

Jacobs S.C., Larson, A. & J.M. Cheverud. 1995. Phylogenetic realionships and orthogenetic evolution of coat color among tamarins (genus *Saguinus*). *Systematic Biology, 44*, 515-532.

James, R.A., Leberg, P.L., Quattro, J.M. & R.C. Vrijenhoek, 1997. Genetic diversity in Black howler monkeys (*Alouatta pigra*) from Belize. *American Journal of Physical Anthropology, 102*, 329-336.

Janson, C.H., 1992. Evolutionary ecology of primate social structure. Pp. 95-130. En *Evolutionary Ecology and Human Behavior* (E.A. Smith & B. Winterhalder, Eds.). Aldine de Gruyter, New York.

Janson, C.H., 2000. Primate socio-ecology: The end of a golden age. *Evolutionary Antrhopology, 9*, 100-110.

Jensen-Seaman, M.I. & K.K. Kidd, 2001. Mitochondrial DNA variation and biogeography of eastern gorillas. *Mol. Ecol., 10*(9), 2241-2247.

Jukes, T.H. & C.R. Cantor, 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-132. En *Mammalian Protein Metabolism* (H.N. Munro, Ed.). Academic Press, N.Y.

K

Kappeler, P.M., 1997. Determinants of primate social organization: Comparative evidence and new insights from Malagasy lemurs. *Biological Reviews, 72*, 111-51.

Kappeler, P.M., 1999. Convergence and divergence in primate social system. Pp.158-170. En *Primates communities* (J.G. Fleale, C. Janson & K.E. Reed, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Kay, R.F., 1990. The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropoidea). *Journal of Human Evolution, 19*, 175-208.

Kay, R.F., Thorington Jr., R.W. & P. Houde, 1990. Eocene plesiadapiform shows affinities with flying lemurs not primates. *Nature, 345*(6273), 342-344.

Kay, R.F., Ross, C. & B.A. Williams, 1997. Anthropoid origins. *Science, 275*, 797-804.

Keane, B., dittus, W.P.J. & D.J. Melnick, 1997. Paternity assessment in wild groups of toque machaques Macaca cínica at Polonnaruwa, Sri Lanka, using molecular markers. *Molecular Ecology, 6*, 267-282.

Kimura, M. 1953. Stepping-stone model of population. *Annu. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan, 3*, 62-63.

Kimura, M., 1969. The rate of molecular evolution considered from the stand point of population genetics. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 63*, 1181-1188.

Kimura, M., 1970.The lengh of time required for a selectively neutral mutant to reach fixation through randon frequency drift in a finite population. *Genet. Res., 15*, 131-133.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution, 16*, 111-120.

Kimura, M. 1983 The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Kimura, M., 1986.DNA and the neutral theory. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 312 343-354.-

Kimura, M. & T. Ohta, 1971. On some principles governing molecular evolution. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 71*, 2848-2852.

Kimura, M. & G.H. Weiss, 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics, 49*, 561-576.

King, T.L. & E.G. Zimmerman, 1993. Clinal variation at aspartate aminotransferase-2 in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Cuvier), Inhabiting the north western Gulf of Mexico. *Anim. Gen., 24*, 59-61.

Kinzey, W.G., 1979. Distribution of Primates and Forest Refuges. Pp. 8-13. En *Biological diversification in the Tropics*, Proceeding of the Fifth International Symposium of the Association for Tropical Biology.

Kinzey, W.G., 1980. Distribution of some neotropical primates and the model of Pleistocene forest refugia. En *Proceedings of the Vth International Symposium Association of Tropical Biology*. Columbia University Press. New York.

Kinzey, W.G. & E.P. Cunningham, 1994. Variability in platyrrhine social organization. *American Journal of Primatology, 34*, 185-98.

Kocher, T.D., Thomas, W.K. & A. Meyer, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86*, 6196–6200.

Kohne, D.E. 1970.Evolution of higher-organism DNA.. *Quart. Rev. Biophys., 3*, 327-375.

Kowalewski, M., Bravo, S. & G. Zunino, 1995. Aggression between *Alouatta caraya* males in forest patches in northern Argenitina. *Neotropical Primates, 3*(4), 179-181.

Kowalewski, M.M. & G.E. Zunino, 1999. Impact of deforestation on a population of *Alouatta caraya* in Northern Argentina. *Folia Primatologica, 70*(3), 163-166.

Knowlton, N., Weigt, L.A., Solórzano, L.A., Mills, D.K. & E. Bermingham, 1993. Divergence in proteins, mitochondrial Dna, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science, 260*, 1629-1632.

Kreitman, M. & M. Aguadé, 1986. Excess polymorphism at the Adh locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics, 114*, 93-110.

Kumar, S., Tamura, K. & M. Nei, 1993. MEGA-Molecular Evolutionary Genetics Analysis (version 1.0). Computer program distributed by the Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen I. B. & Nei, M. (2001). MEGA2 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Ver. 2.* [Computer software]. *Bioinformatics,* submitted for consideration.

Kumar, S. & S. Subramanian, 2002. Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 99,* 803-808.

L

Lamarck, J.B., 1809. Philosophie Zoologique. Editorial Mateu. Barcelona. Editada en 1971.

Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A., Sbisà, E. & C. Saccone, 2002. Lineages specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *Journal of Molecular Evolution, 54,* 145-155.

Leighton, D.R., 1987. Gibbons: territoriality and monogamy. Pp. 135-145. En *Primates Societies* (B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). Chicago Press University, Chicago.

Lewin, R., 1993. *Evolución Humana.* Salvat Editores, S.A. Barceloma.

Li, W.-H., 1997. *Molecular evolution.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Li, W.-H., M. Tanimura & P.M. Sharp, 1987. An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian DNA sequences. *Journal of Molecular Evolution, 25,* 330-342.

Li, W.-H., Gouy, M., Sharp, P., O'Huigin, C. & Y.-W. Yang, 1990. Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Artiodactyla and Carnivora and molecular clocks. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 87,* 6703-6707.

Li, W.-H., Ellsworth, D.L., Krushkal, J., Chang, B.H.-J. & D. Hewett-Emmett, 1996. Rates of nucleotide substitution in Primates and Rodents and the generation-time effect hypothesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 5,* 182-187.

Lima, M.M.C. & Seuánez, H.N., 1991. Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): Description of an $X_1X_2Y_1Y_2/X_1X_1X_2X_2$ sex chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. *Cytogenetic and Cell Genetics, 57,* 151-156.

Linneo, C., 1758. Systema Naturae. Stockholm: Laurentius Galvius.

Lockhart, P.J., Steel, M.A., Hendy, M.D. & D. Penny, 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequences evolution. *Molecular Biology and Evolution, 11,* 605-612.

M

Mantel, N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research, 27,* 209-220.

Martin, A.P., 1995. Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution, 12,* 1124-1131.

Martin, A.P., G. Naylor & S.R. Palumbi, 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature, 357,* 153-155.

Martin, A.P. & S.R. Palumbi, 1993. Body size, metabolic rate, generation time and the molecular clock. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 90,* 4087-4091.

Martin, R.D., 1993. Primate origins: Plugging the gaps. *Nature,* 363, 223-234.

Martinez, R., Aguilera, M. & C. Ferreira, 1999. The karyotype and C-banding of *Cebus nigrivittatus* from the coastal cordillera, Venezuela. *Folia Primatol., 70,* 37-40.

Martinez, R., Giudice, A., Szapkievich, V., Ascunce. M., Nieves. M., Zunino, G. & M.D. Mudry, 2002. Phenotypic, Behavioral and Genetic Parameters Modeling Speciation in *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini). *Mastozoologia Neotropical.* En consideración.

Maslin, M.A. & S.J. Bunns, 2000. Reconstruction of the Amazon Basin effective moisture availability over the past 14,000 years. *Science, 290*, 2285-2287.

Matocq, M.D., Patton, J.L. & M.N.F. Da Silva, 2000. Population genetic structure of two ecological distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution, 54*(4), 1423-1432.

Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press. New York.

Mayr, E., 1963. Animal species and evolution. Harvard University Press. Cambridge, MA.

McDonald, J.H. & M. Kreitman, 1991 Adaptive protein evolution at the Adh locus in Drosophila. *Nature, 351*, 652-654.

Meireles, C.M., Schneider, M.P.C., Sampaio, M.I.C., Schneider, H., Slightom, J.L., Chiu, C.H., Neiswanger, K., Gumucio, D.L., Czelusniak, J. & M. Goodman, 1995. Fate of a redundant γ-globin gene in the atelid clade of New World monkeys: Implications concerning fetal globin gene expression. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 92*, 2607-2611.

Meireles, C.M., Czelusniak, J., Schneider, M.P.C., Muniz, J.A.P.C., Brigido, M.C., Ferreira, H.S. & M. Goodman, 1999a. Molecular phylogeny of ateline New World monkeys (Platyrrhini, Atelinae) based on γ-globin gene sequences: Evidence that *Brachyteles* is the sister group of *Lagothrix*. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 12*(1), 10-30.

Meireles, C.M., Czelusniak, J., Ferrari, S.F., Schneider, M.P.C. & M. Goodman, 1999b. Phylogenetic relationships among brazilian howler monkeys, genus *Alouatta* (Platyrrhini, Atelidae), based on γ^1-globin pseudogene sequences. *Genetics and Molecular Biology, 22* (3), 337-344.

Melnick, D.J., 1987. The genetic consequence of primate social organization: a review of macaques, baboons and vervet monkeys. *Genetica, 73*, 117-135.

Melnick, D.J. & K.K. Kidd, 1985. Genetic and evolutionary relationships among Asian macaques. *International Journal of Primatology, 6*, 123-160.

Melnick, D.J. & G.A. Hoelzer, 1996. The population genetic consequences of macaque social organization and behavior. En *Evolutionary and Ecology of macaque societies* (J.E. Fa & D.G. Lindburg, Eds.). Cambridge University Press, N.Y.

Meyer, A., 1994. Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution, 9*, 278-280.

Milton, K., 1978. Behavioral adaptations to lef eating by mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). En *The ecology of arboreal folivores* (G.G. Montgomery, Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

Milton, K., 1980. *The Foraging Strategy of Howler Monkeys*, New York: Columbia University Press.

Milton, K., 1982. Dietary quality and demographic regulation in a howler monkey population, pp. 273-290. En *The Ecology of a Tropical Forest Seasonal Rhythms and Long Term Changes* (E.G. Leigh, Jr., A.S. Rand & D.M. Windsor, Eds.). Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

Mindell, D.P., Knight, A., Baer, C. & C.J. Huddleston, 1996. Slow rates of molecular evolution in birds and the metabolic rate of body temperature hiypotheses. *Mol. Biol. Evol., 13*, 422-426.

Mittermeier, R.A. & Coimbra Filho, A.F., 1981. *Ecology and behavior of neotropical primates Vol I.* Pp. 496. Academia Brasileira de Ciencias, Río de Janeiro.

Mittermeier, R.A., Rylands,A.B. & A.F. Coimbra-Filho, 1988 .Systematics: species and subspecies - an update. Pp. 13-75. En *Ecology and Behavior of Neotropical Primates, Vol. 2* (R.A. Mittermeier, A.B.Rylands, A.F.Coimbra-Filho & G.A.B. da Fonseca, Eds.). World Wildlife Fund. Washington, D.C.

Mittermeier, R.A. & W. Konstant, 1996/1997. Primate Conservation: A retrospective and a Look into the 21st Century. *Primate Conservation, 17*, 7-17.

Miyamoto, M.M. & S.M. Boyle, 1989. The potential importance of mitochondrial DNA sequence data to eutherian mammal phylogeny. Pp.437-450. En *The hierarchy of life: molecules and morphology in phylogenetic analysis* (B. Fernholm, K. Bremer & H. Jörnvall, Eds.). Elsevier. Amsterdan.

Mooers, A. & P.H. Harvey, 1994. Metabolic rate, generation time and the rate of molecular evolution in birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 3*, 344-350.

Morin P.A. & D.S. Woodruff, 1992. Paternity Exclusion using Multiple Hypervariable Microsatellite Loci Amplifiel from Nuclear DNA of Hair Cells. Pp. 63-81. En *Paternity in Primates: Genetic Tests and Theories* (R.D. Martin, A.F Dixson. & E.J. Wicking, Eds.). Karger, Basel.

Morin, P.A., Moore, J.J., Chakraborty, R., Jin, L., Goodall, J. & D.S. Woodruff, 1994. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. *Science, 265*, 1193-1201.

Moritz, C., 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends Ecol. Evol., 9*, 373-375.

Morton, B.R., 1993. Chloroplast DNA codon use: Evidence for selection at the psb a locus based on tRNA availability. *J. Mol. Evol., 37*, 273-280.

Mudry, M.D., 1990. Cytogenetic variability within and across populations of *Cebus apella* in Argentina. *Folia Primatol. 54*, 206-216.

Mudry de Pargament, M.D., Brieux de Salum, S. & O. Colillas, 1981. Citogenética en *Alouatta caraya, Physis, 40*(98), 63-70.

Mudry de Pargament, M.D., Slavutsky, I. & S. Brieux de Salum, 1982. Estudios citogenéticos en *Saimiri sciureus* de Bolivia. *Mendeliana, 5*(2), 81-90.

Mudry, M.D., Slavutsky, I. & M. Labal de Vinuesa, 1990. Chromosome comparison among five species of Platyrrhini (*Alouatta caraya, Aotus azarae, Callithrix jacchus, Cebus apella*, and *Saimiri sciureus*). *Primates, 31*(3), 415-420.

Mudry, M.D., Rahn, M., Gorostiaga, M., Hick, A., Merani, M.S. & A.J. Solari, 1998. Revised karyotype of *Alouatta caraya* (Primates: Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas, 128*, 9-16.

Mudry, M.D., Rahn, I. M. & A.J. Solari, 2001. Meiosis and chromosome painting of sex chromosome systems in Ceboidea. *American Journal of Primatology, 54*, 65-78.

N

Napier, J.R. & P.H. Napier, 1967. *A Handbook of Living Primates*. Academic Press, London.

Neel, J.V. & F.M. Salzano, 1967. Citado en Salzano, F.M. & S.M. Callegari-Jacques, 1988. *South American Indians: A Case Study in Evolution*. Clarendon, Oxford.

Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subsivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70*, 3321-3323.

Nei, M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics, 41*, 25-233.

Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.

Nei, M., Maruyama, T. & R. Chakraborty, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution, 29*, 1-10.

Nei, M. & W.H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76*, 5269-5273.

Nei, M. & S. Kumar, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York.

Nores, M., 1994. Quaternary vegetational changes and bird differentation in subtropical south America. *Auk, 111*, 499-503.

Nunney, L., 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution, 47*(5), 1329-1341.

O

Ochman, H. & A.C. Wilson, 1987. Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.*, *26*, 74-86.

Ohta, T., 1972. Population size and rate of evolution. *J. Mol. Evol.*, *1*, 305-314.

Ohta, T., 1993. An examination of the generation time effect on molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*, 10676-10680.

Ohta, T., 1995. Synonymous and nonsynoymous substitutions in mammalian genes d the nearly neutral theory. *J.Mol. Evol.*, *40*, 56-63.

Ohta, T., 1996. The current significance and standing of neutral theories. *Bioessays*, *18*(8), 673-677.

P

Pages, R.D. & E.C. Holmes, 1998. *Molecular evolution: A phylogenetic approach.* Blackwell Science, Oxford, U.K.

Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reation. Pp. 205-247. En *Molecular Systematics* (D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable, Eds.). Sinauer, Sunderland, Mass.

Pastorini, J., Forstner, M.R.J., Martin, R.D. & D.J. Melnick, 1998. A reexamination of the phylogenetic position of *Callimico* (Primates) incorporating new mitochondrial DNA sequences data. *J. Mol. Evol.*, *47*, 32-41.

Peres, C.A., J.L. Patton & M.N.F. da Silva, 1996. Riverine Barriers and Gene Flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatologica*, *67*, 113-124.

Pesole G., Gissi, C., De Chirico, A. & C. Saccone, 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, *48*, 427-434.

Piantanida, M., Puig, S., Nanni, N., Rossi, F., Cabaña, L. Mazzuchelli, S. & A. Gil, 1984. Introducción al estudio de la ecología y etología del mono aullador (*Alouatta caraya*) en condiciones naturales. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales*, *3*(3), 163-191.

Pocock, R.I., 1918. On the external characters of the lemur and of *Tarsius*. *Proceedings Zoological Society of London*, 19-53.

Ponsà, M., García, M., Borell, A., García, F., Egozcue, J., Gorostiaga, M. A., Delprat, A. & M. Mudry, 1995. Heterochromatin and cytogenetic polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). *American Journal of Primatology*, *37*, 325-331.

Pope, B.L., 1968. Population characteristics. Pp. 13-20. En *Biology of the howler monkey Alouatta caraya.* (M. Malinow Ed.) Bibliotheca Primatologica 7, New York, Karger Basel.

Pope, T.R., 1990. The reproductive consequences of cooperation in the red howler monkey: paternity exclusion in multi-male and single-male troops using genetic markers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *27*, 439-446.

Pope, T.R., 1992. The influence of dispersal patterns and mating system on genetic differentation within and between populations of the red howler monkey (*Alouatta seniculus*). *Evolution*, *46*(2), 1112-1128.

Pope T.R., 1996. Socioecology, Population Fragmentation, and Patterns of Genetic Loss in Endangered Primates. En *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (J. Avise & J. Hamrick, Eds.) Chapman and Hall Books, New York, USA.

Pope, T.R., 1998. Effects of demographic change on group kin structure and gene dynamics of populations of red howling monkeys. *Journal of Mammalogy*, *79*(3), 696-712.

Pope, T.R., 2000. Reproductive success increase with degree of kinship in cooperative coalitions of female red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). *Behavior Ecology and sociobiology*, *48*, 253-267.

Posada, D. & K.A. Crandall, 2001. Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, *16*(1), 37-45.

Pough, F.H., Janis, C.M. & J.B. Heiser, 1999. *Vertebrate Life*. Pp. 733. (Simon & Schuster, Eds.) Prentice-Hall, Inc. A Viacom Company. Upper Saddle River, New Jersey 07458.

Prance, G.T., 1973. Phytogoegraphic support for the theory of Pleistocene forest refuges in the Amazon basin, based on evidence from distribution patterns in *Caryocaraceae*. *Acta Amazonica*, *3*, 5-28.

Printes, R.C., Liesenfeld, M.V.A. & L. Jerusalinsky, 2001. *Alouatta guariba claimtans* Cabrera, 1940: A new southern limti for the species and for neotropical primates. *Neotropical Primates*, *9*(3), 118-121.

Pruess, K.P., Adams, B.J., Parsons, T.J., Zhu, X. & T.O. Powers, 2000. Utility of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among black flies (Diptera: Simulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(2), 286-295.

Prugnolle, F., De Meeus, T., Durand, P.,Sire C. & A. Theron, 2002. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Molecular Ecology*, *11*, 1231-1238.

Pussey A.E. & C. Packer, 1987. Dispersal and Philopatry. Pp. 250-266. En *Primate Societies* (B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). Chicago Press University, Chicago.

R

Rahn, M.I., Mudry, M., Merani, M.S. & A.J. Solari, 1996. Meiotic behavior of the $X_1X_2Y_1Y_2$ quadrivalent of the primate *Alouatta caraya*. *Chromosome Research*, *4*, 350-356.

Ramos-Onsins, S. & J. Rozas, 2002. Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biology and Evolution*. En prensa.

Reig, O., 1979. El significado biológico-poblacional y evolutivo de los cambios en el sistema cromosómico, con especial referencia a los vertebrados. Pp. 87-110. En tópicos de Ecología contemporánea. (J. Rabinovich & G. Halffter, Eds.). Fondo de cultura Económica, México.

Reig, O., 1983. Estado actual de la Teoría de la Formación de las Especies Animales. *Informe final IX Claz Perú*. Pp. 37-57. Conferencia General, IX Congreso Latinoamericano de Zoología, 9-15 de Octubre 1983, Arequipa, Perú.

Reig, O.A., 1984. La teoria de la evolucion a los ciento veinticinco anos de la aparicion de "El origen de las especies". Academina Naciona de Medicina. Separata Buenos Aires.

Reynolds, J., Weir, B.S. & C.C. Cockerham, 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, *105*, 767-779.

Robinson, J.G. & C.H. Janson, 1986. Capuchins, Squirrel Monkeys, and Atelines: socioecological convergence with Old World Primates. Pp. 69-82. En *Primate Societies* (B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). Chicago Press University, Chicago.

Rodriguez-Luna, E., Cortés-Ortiz, L., Ellis, S. & E. MacCance, 1996. Taller de conservación, análisis y manejo planificado para primates mexicanos. *Neotropical Primates*, *4*(suppl.), 113-118.

Rogers, A.R., 1995. Genetic evidence for a pleistocene population explosion. *Evolution*, *49*, 608-615.

Rogers, A.R. & H.Harpending, 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.*, *9*, 552-569.

Rogers, J. & K.K. Kidd, 1996. Nucleotide polymorphism, effective population size, and dispersal distances in the yellow baboons (*Papio hamadryas cynocephalus*) of Mikuni National Park, Tanzania. *American Journal of Primatology*, *38*, 157-168.

Rosenberger, A.L., 1979. *Phylogeny, Evolution, and Classification of New World Monkey* (Platyrrhini, Primates). Tesis de Doctorado. Universidad de la ciudad de Nueva York, University Microfilms, Ann. Arbor. Mich.

Rosenberger, A.L., 1981. Systematics: The higher Taxa. Pp. 9-27. En *Ecology and behavior of the Neotropical Primates Vol 1* (A.F. Coimbra-Filho & R.A. Mittermmeier, Eds.). Academia Brasilera de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil.

Rosenberger, A.L. & K.B. Strier, 1989. Adaptive radiation of the ateline primates. *Journal of Human Evolution, 18*, 717-750.

Rosenberg, N.A. & M. Nordborg, 2002. Genealogical Trees, Coalescent Theory and the Analysis of Genetic Polymorphisms. *Natura Reviews Genetics, 3*, 380-390.

Rozas, J. & R. Rozas, 1999. DnaSP versión 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics Applications Note, 15*(2), 174-175.

Rudran, R., 1979. The demography and social mobility of red howler (*Alouatta seniculus*) population in Venezuela. Pp 107-126. En *Vertebrate Ecology in the Northern Neotropics* (Eisenberg J.F., Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington.

Ruiz-García, M., 2002. The use of several microsatellite loci applied to eight neotropical primates (*Cebus albifrons, Cebus apella, Cebus capucinus, Saimiri sciureus, Aotus nancymae, Alouatta seniculus, Lagothrix lagotricha*, and *Ateles fusciceps*) revealed a strong recent bottleneck event in the wooly monkey (*Lagothrix lagotricha*) in Colombia. *Folia Primatologica*. En consideración.

Rumiz, D.I., 1990. *Alouatta caraya*: population density and demography in northern Argentina. *American Journal of Primatology, 2* (4), 279-294.

Ruvolo, M., Disotell, T.R., Allard, M.W., W.M. Brown & R.L. Honeycutt, 1991. Resolution of the African hominoid trichotomy by use of a mitochondrial gene sequence. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 88*, 1570-1574.

Ruvolo, M., Zehr, S., von Dormun, M., Pan, D., B. Chang & J. Lin, 1993. Mitochondrial COII sequences and modern human origins. *Molecular Biology and Evolution, 10*(6), 1115-1135.

Ryder, O.A., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol. Evol., 1*, 9-10.

Rylands, A.B., Coimbra-Filho, A.F. & R.A. Mittermeier., 1993. Systematics, distributions, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. Pp. 11-77. En: *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour and Ecolology* (A.B. Rylands, Ed.). Oxford University Press, Oxford.

Rylands, A.B., Rodríguez Luna, E. & L. Cortés-Ortiz, 1997. Neotropical primate conservation - The species and the IUCN/SSC Primate specialist group network. *Primate Conservation, 17*, 46-69.

Rylands, A.B., Schneider, H., Langguth, A., Mittermeier, R.A., Groves, C.P. & E. Rodríguez-Luna, 2000. An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotropical Primates, 8* (2), 61-93.

S

Saccone, C., Pesole, G. & E. Sbisà, 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure–function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution, 33*, 83–91.

Saccone, C., Gissi, C., Reyes, A., Larizza, A., Sbisá, E. & G. Pesole, 2002. Mitochondrial DNA in metazoa: degree of freedom in a frozen event. *Gene, 286*(1), 3-12.

Saitou, N. & M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution, 4*, 406-425.

Saltonstall, K., Amato, G. & J. Powell, 1998. Mitochondrial DNA variability in Grauer's Gorillas of Kahuzi-Biega National Park. *Journal of. Heredity, 89*, 129-135.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. & A.R. Coulson, 1981. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 74*, 5463-5466.

Sbisà, E., Tanzariello, R., Reyes, A. Pesole, G. & C. Saccone, 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene, 205*, 125-140.

Schmitz, J., Ohme, M. & H. Zischler, 2000. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders. *Molecular Biology and Evolution, 17*(9), 1334-43.

Schmitz, J., Ohme, M. & H. Zischler, 2002. The Complete Mitochondrial Sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence for an Extensive Nucleotide Compositional Plasticity of Primate Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution, 19*(4), 544-553.

Schneider, H., Schneider M.P.C., Sampaio, I., Harada, M.L., Stanhope, M., Czelusniak, J. & M. Goodman, 1993. Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 2*, 225-242.

Schneider, H., Sampaio, I., Harada, M.L., Barroso, C.M.L., Schneider, M.P.C., Czelusniak, J. & M. Goodman, 1996. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP Intron 1 and e-globin sequences. *American Journal of Physical Anthropology, 100*, 153-79.

Schneider, S., Roessli D. & L. Excoffier, 2000. Arlequin, Version 2.000: A Sftware for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Bio-metry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

Seino, S., Bell, G.I. & W.-H. Li, 1992. Sequences of primate insulin genes support the hypothesis of a slower rate of molecular evolution in humans and apes than in monkeys. *Molecular Biology and Evolution, 9*,193-203.

Shaffer, M., 1987. Minimum viable populations: coping with uncertainty. Pp. 69-86. En *Viable Populations for Conservation* (M.E. Soulé, Ed.). Cambridge Universtiy Press, Cambridge, U.K.

Sharp, P.M., Tuohy, T.M.F. & K.R. Mosurski, 1986. Codon usage in yeast: Cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research, 14*, 5125-5143.

Shields, D.C., Sharp, P.M., Higgins, D.G. & F. Wright, 1988. "Silent" Sites in *Drosophila* genes are not neutral: Evidence of selection among synonymous codons. *Molecular Biology and Evolution, 5*, 704-716.

Sibley, C.G. & J.E. Ahlquist, 1984. the phylogeny of the hominoid Primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. *Journal of Molecular Evolution, 20*, 2-15.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A.T., Crespi, B., Liu, H. & P. Flook, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America, 87*, 651-701.

Simons, E.L., 1972. *Primate evolution: an introduction to man's place in nature*. Macmillan, New York.

Slatkin, M., 1976. The rate of spread of an advantageous allele in a subdivided population, Pp. 767-780. En Population Genetics and Ecology (S. Karlin & E. Nevo, Eds.). Academic Press, New York.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science, 236*, 787-792.

Slatkin, M., 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res., 58*, 167-175.

Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics, 139*, 457-462.

Slatkin, M. & R.R. Hudson, 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics, 129*, 555-562.

Sokal, R.R., & F.J. Rohlf, 1981. Biometry, 2nd. Ed. Pp. 796-797. Freeman, New York.

Solari, A.J., Rahn, M.I. & D. Canales, 2002. Sistemas sexuales múltiples en monos aulladores. *I Congress "Osvaldo Reig" of Basic and Evolutive Vertebrate and Science History*. March, 13 - 17, 2002, Buenos Aires, Argentina, 58-59.

Sommer J.A., Barber, R.C., Huebinger, R.M., Grassi, C., Williamson, J.E. & E.E. Louis Jr., 2002. Characterization of 14 microsatellite marker loci in the grey bamboo lemur (*Hapalemur griseus*). *Molecular Ecology Notes, 2*, 161-163.

Stone, A. C., *et al.*, 2002. High levels of Y-chromosome nucleotide diversity in the genus Pan. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 43-48.

Storz, J.F., 1999. Genetic Consequences of Mammalian Social Structure. *Journal of Mammalogy*, 80(2), 553-569.

Strier, K.B., 1996. Reproductive ecology of female muriquis. Pp. 511-532. En *Adaptative Radiations of Neotropical Primates* (M. Norconk, A. Rosenberger & P. Garber, Eds.). Plenum Press, N.Y.

Strier, K.B., Mendes, F.D.D., Rímoli, J. & A.O. Rímoli, 1993. Demography and social structure in one group of muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *International Journal of Primatology, 14*, 513-526.

Struhsaker, T.T., 1969. Correlates of ecology and social organization among African cercopithecines. *Folia Primatologica, 11*, 80-118.

Struhsaker, T.T., 1975.The Red Colobus Monkey. Pp. 260. The University of Chicago.

Struhsaker, T.T. & L. Leland, 1987. Colobines: Infanticide by adult males. Pp. 83-97. En *Primate Societies* (B.B. Smuts, D.L. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, Eds.). Chicago Press University, Chicago.

Swofford, D. L. 1998. PAUP* - *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Ver. 4. b8.* [Computer software and manual]. Sutherland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell P.J. & D.M. Hillis., 1996. Phylogenetic inference. Pp. 407-514. En *Molecular systematics*, 2nd. ed. (D.M. Hillis, C. Moritz &B.K. Mable, Eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Szalay, F.S. & E. Delson, 1979. New fossil materials of the earliest new world monkey, *Branisella boliviana*, and the problem of platyrrhine origins. Evolutionary History of the Primates, Academic, New York. NY.

Szapkievich, V.B., 2001. El río Paraná como modelador del ambiente de la distribución marginal sur de *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

T

Taberlet, P., Swenson, J.E., Sandegren, F. & A. Bjarvall, 1995. Localization of a contact zone between two highly divergent mitochondrial DNA lineages of the brown bear *Ursus arctos* in Scandinavia. *Conservation Biology, 9*(5), 1255-1261.

Tagliaro, C.H., Schneider M.P.C., Schneider, H., Sampaio, I.C. & M.J. Stanhope, 1997. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of mtDNA control region. *Molecular Biology and Evolution, 14*, 674-684.*

Tajima, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics, 105*, 437-460.*

Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism, *Genetics, 123*, 585-595.

Tajima, F., 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics, 135*, 599-607.

Tajima, F., 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. Genetics 143 1457-1465.

Takai, M., Anaya, F., Shigehara, N. & T. Setoguchi, 2000. *American Journal of Physical Anthropology, 111*(2), 263-281.

Takezaki, N., A. Rzhetsky & M. Nei, 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. Mol. Biol. Evol. 12: 823-833.

Tejedor, M.F., 1998. The evolutionary history of platyrrhines: Old controversies and new interpretations. *Neotropical Primates*, 6(3), 77-82.

Templeton, A.R., 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics, 94*, 1011-1038.

Templeton, A.R., 1981. Mechanisms of speciation-a population genetic approach. *Annual Review of Ecology and Systematics, 12*, 23-48.

Templeton, A.R., 2002. Out of Africa again and again. *Nature, 416*, 45-51.

Terborgh, J., 1983. Five New World Primates: A study. En *Comparative Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Thomas, C.D., Bodsworth, E.J., Wilson, R.J., Simmons, A.D., Davies, Z.G., Musche, M. & L. Conradt, 2001. Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature, 411*, 577-581.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research, 22*, 4673-4680.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin F. & D.G. Higgins, 1997. The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies For Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research, 24*, 4876-4882.

Thorington, R.W., Ruiz, J.C. & J.F. Eisenberg, 1984. A study of a black howling monkey (*Alouatta caraya*) population in northern Argentina. *American Journal of Primatology, 6*, 357-366.

Tonni, E. P. & R. C. Pasquali. 2002. Los inmigrantes africanos. Pp. 47-55. En *Los que sobrevivieron a los dinosaurios: La Historia de los mamíferos de América del Sur*. Naturaleza Austral.

Tosi, A.J., Morales, J.C. & D.J. Melnick, 2000. Comparison on Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Molecular Phylognetics and Evolution, 17* (2), 133-144. *

Torres, c., 1988. Resultados preliminaries de revaliacion das racas do macaco-prego *Cebus apella* (Primates, Cebidae). *Revista Nordestina de Biología, 6*(1), 15-28.

Trivers, R.L., 1972. Parental investment and sexual selection. Pp. 136-179. En *Sexual Selection and the Descent of Man* (B. Campbell, Ed.). Chicago, Aldine.

V

van Schaik, C.P., 1989. The ecology of social relationships amongst female primates. Pp. 195-218. En *Comparative Socioecology* (V. Standen & R.A. Foley, Eds.). Blackwell Scientific, Oxford.

van Schaik, C.P., 1996. Social evolution in primates: the role of ecological factors and male behavior. *Proceeding of the British Academy, 88*, 9-31.

Vanzolini, P.E. & E.E. Williams, 1970. South American anoles: geographic differentatiation and evolution of *Anolis* chrysolepis species group (Sauria, Iguanidae). *Arquiv. Zool.*, Sao Paulo, *19*, 1-128.

Vigilant, L., Hofreiter, M., Siedel, H. & C. Boesch, 2001. Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 98*(23), 12890-12895.

Vilà, C., Savolainen, P., J.E. Maldonado, Amorin, I.R., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., Crandall, K.A., Lundeberg, J. & R.K. Wayne, 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science, 276*, 1687-1689.

Vilà, C., Amorin, I.R., Leonard,J.A., Posadas, D., Castroviejo, S.J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, A., Ellegren, S.H. & R.K. Wayne, 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology, 8*, 2089-2103.

von Dornum, M. & Ruvolo, M., 1999. Phylogenetic relationships of the New World monkeys (Primates, Platyrrhini) based on nuclear G6PD DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 11*(3), 459-476.

Vrba, E.S., 1983. Environment and evolution: alternative causes of temporal distribution of evolutionary events. *S. Afr. Tydskrif. Vir. Wetenskap., 81*, 229-236.

Vrba, E.S., 1993. Turnover-pulses, the red queen, and related topics. *Am. J. Sci. A, 293*, 418-452.

Vrba, E.S.., 1993. Mammal Evolution in the African Neogene and a New Look at the Great American Interchange. Pp. 393-432. En *Biological Relationships between Africa and South America* (P. Goldblatt, Ed.), Yale Uversity Press, New Haven and London.

Vrba, E.S., 1995. On the connections between paleoclimate and evolution. Pp. 24-45. En *Paleoclimate and evolution, with emphasis on human origins* (E.S. Vrba, G.H. Denton, C.T. Partridge & L.H. Burckle, Eds.). Yale University Press. New Haven, CT & London.

W

Wallace, D.C., 1986. Mitochondrial genes and disease. *Hospital Practice, 21*, 77-92.

Walsh, P.S., Metzger, D.A. & R. Higuchi, 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Technique, 10*(4), 506-513.

Walther, G-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesani, C., Beedee, T.J.C., Frometin, J-M., Hoegh-Guldberg, O. & F. Bairlein, 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature, 416*, 389-395.

Ward, R.H., Frazier, B.L., Dew-Jager, K., & Pääbo, 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 88*, 8720-8724.

Wares, J.P., 2002. Community Genetics in the Northwestern Atlantic Intertidal. *Molecular Ecology, 11*, 1131-1144.

Warren, K.S., Nijman, I.J., Lenstra, J.A., Swan, R.A., Heriyanto & Den Boer, M.H., 2000. Microsatellite DNA variation in Bornean orang-utans (*Pongo pygmaeus*). *Journal of Medical Primatology, 29*, 57-62.

Warren, K.S., Verschoor, E.J., Langenhuijzen, S., Heriyanto, Swan, R.A., Vigilant, L. & J.L. Heeney, 2001. Speciation and intrasubspecific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus. Molecular Biology and Evolution, 18*(4), 472-480.

Watterson, G.A., 1975. On the number of segregating sites in genetical models withouth recombination. *Theor Pop Biol, 7*, 256-276.

Webb, S.D. & L.G. Marshall, 1982. Historical biogeography of recent south American land mammals. Pp. 39-52. En *Mammalian biology in South America Vol. 6.* Special Publication Series. Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pitsburgh.

Wheeler, W.C., 1995. Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Sys. Biol., 44*(3), 321-331.

Wiegand *et al.*, 2000.

Wilson, A.C., 1974. Sarich, V.M. & L.R. Maxson, 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 71*, 3028-3030.

Wilson, A.C., Bush, G.L., Case, S.M. & M.C. King, 1975. Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 72*(12), 5061-5.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., *et al.*,1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. Linn. Soc., 26*, 375-400. *

Wilson, E.O., 1975. *Sociobiology*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wilson, E.O., 1998. Consilience: The Unity of Knowledge. Randon House, New York.

Wolfe, J.A., 1971. Tertiary climatic fluctations and methods of análisis of Tertiary floras. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol., 9*, 27-57.

Wolfheim, J., 1983. *Primates of the world: Distribution, abundance, and conservation*. Pp. 831. University of Chicago Press, Seattle & London.

Wolpoff, M.H., Hawks, J. & R. Caspari, 2000. Multiregional, not multiple origins. *American Journal of Physical Anthropology*, 112, 129-136.

Wrangham, R.W., 1980. An ecological model of female-bonded primate groups. *Behaviour, 75*, 262-300.

Wright, F., 1990. The Effective number of codons Used In A Gene. *Gene, 87*, 23-29

Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics, 16*, 67-159.

Wright, S., 1940. The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. Pp. 161-183. En *The new systematics* (J.S. Huxley, Ed.). Belknap Press, Cambridge, MA.

Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics, 28*, 114-138.

Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics, 15*, 323-354.

Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution, 19*, 95-420.

Wright, S., 1969. Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, *2*, 1-511.

Wright, S., 1980. Genic and organismic selection. *Evolution*, 34: 825-842.

Wu, C.-I. & W.-H Li, 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA, 82*, 1741-1745.

X

Xu, X. & U. Arnason, 1996. The mitochondrial DNA molecule of Sumatran orangutan and a molecular proposal for two (Bornean and Sumatran) species of orangutan. *Journal of Molecular Evolution, 43*, 431-437.

Y

Yoder, A.D., Vilgalys, R. & M. Ruvolo, 1996. Molecular Evolutionary Dynamics of Cytochrome *b* in Strepsirrhine Primates: The Phylogenetic Significance of Third-Position Transversions. *Molecular Biology and Evolution, 13*(10), 1339-1350.

Z

Zardoya, R. & Meyer, A., 1996. Phylogenetic performance of the mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology and Evolution, 13* (7), 933-942.

Zuckerkandl, E. & L. Paulig, 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Pp. 97-166. En: *Evolving Genes and Proteins* (V. Bryson & H.J. Vogel, Eds.). Academic Press, New York.

Zunino, G.E., 1986. Algunos aspectos de la ecología y etología del mono aullador negro (*Alouatta caraya*) en habitats fragmentados. Pp. 152. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Zunino G.E., 1989. Hábitat, dieta y actividad del mono aullador negro (*Alouatta caraya*) en el noreste de Argentina. *Boletín de Primatología Latinoamericano, 1*, 74–97.

Zunino, G.E., 1996. Análisis de nacimientos en *Alouatta caraya* (Primates, Cebidae) en el noreste de la Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*. Extra, Nueva Serie, 133, 1-10.

Zunino G.E., González V., Kowalewski M. & S. Bravo, 2001. *Alouatta caraya*. Relations among habitat, density and social organization. *Primate Reports, 61*, 37-46.

Anexo I

Secuencia nucleotídica de los haplotipos analizados en el presente trabajo correspondiente a la región control mitocondrial en *A. caraya*

H001
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H002
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTACAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H003
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ACCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H004
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAACCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H005
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGGCACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG

H006
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H007
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTACTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H009
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAAGAAAAG
H010
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H011
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H012
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCCTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAAGAAAAG

H013
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAAGAAAAG
H014
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H015
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAACCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTCACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGTACATTAACCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H016
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAACCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H017
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACTTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGTACATTAACCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H018
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTGCAGCACATAAGATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG

H019
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTA?GTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H020
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
021
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAAAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H022
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAAAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATACCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H023
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAAAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H024
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAAAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTTAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG

H025
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAGACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H026
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H027
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H028
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGGTCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAGGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H029
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H030
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATATATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCATAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCAGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACGTAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG

H031
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCACAAACATGCATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCATGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAACAGTACAT
AGCACATTAACCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCTCA
GGTATTGTTTAGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H032
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCACAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAGCAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTGGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGG??TTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG
H033
TATTTAACCAACCTATATTATTGAAAGCCCTACCATAAAGTACCTCACAGGTAAATTAAACATCCCACCCGTATG
TAATTAGTGCATTATTGCTTGTCCCCATGAATAATACATAGTACTGAGAATGCTTGATCATACATAGTACATCAC
CCACAAACATACATTAAAACATCCTCAACATGCTTACAAGCACGGATTATAGATCTACAAGCAACCATAGCACAT
ATAATGTAGAAAGTACTACAAACACCTACCCGGGACACGGATATTGTACAGCACATAA?ATCCATAGCAGTACAT
AGCACATTAATCTATTGATCGTACATAAACAGCATACAGCACTCGGTAAGTTCTCTTCAATACGGATATCCCCCA
GGTATTGTTTGGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGAAACCAACAACCCGCCCACATTTTGCCGCTCTTCTCGCT
CCGGGCCCATATAGACAGGGCTTGGTTATACTGAAACTATATCTGGCATTTGGTTCCTACCTCAGGGCCATACCT
TCAAAACTGTGCATATGTTCCTCTTAAATAAGACATCACGATGGTGTGGCGCTATCACCCTCTTAACCTGGTCAG
GAAT?GCACGCGGAGGGCCTCCATGGGGGAGGGTATTATGTACTCCTCAGCATTGCCGTAGGCTGGAGGAAAAG