

## Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primates: Cebidae: Callitrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeat)

Diego A. Nieto M.<sup>1</sup>, Stella de la Torre<sup>1\*</sup>, Ana Troya<sup>1</sup>, Venancio Arahana<sup>1</sup>, María L. Torres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito  
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador

\*Autor principal/Corresponding author, e-mail: sdelatorre@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 02/08/2010. Aceptado/Accepted: 03/20/2010.

Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

### Abstract

The pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*) is one of the most specialized Ecuadorian primate species. Its high specialization in habitat and diet, and the increase of human activities in the Amazon region may cause pygmy marmosets to go through population bottle necks, losing genetic diversity. To estimate the magnitude of this threat, since 2008 we carried out a pilot study for evaluating the genetic diversity of four wild groups of this species in a population located on the margins of the Aguarico river. For the genetic analyses we used 50 fecal samples collected from September 2008 to February 2009; 50 % of the samples belonged to group P4, groups P1, P2 and P5 provided the remaining 50 %. We extracted DNA from the feces using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). With PCR we amplified 9 microsatellite primers reported for a related species of Callitrichinae. DNA bands were visualized in polyacrylamide (6 %) and urea (5M) gels. Statistical analyses were carried out with GenAlEx 6 software. Three to eight alleles were found per locus. The Hardy-Weinberg equilibrium test suggested that inbreeding may be occurring in group P4. Expected heterocigosity in groups P1 and P2 is 0.5, while in group P4 ranges from 0.5 to 0.836. Nei's genetic distance between groups P1 and P2 is 1.211, whereas group P4 differs 0.612 and 0.485 from groups P2 and P1, respectively. This is the first study of this type for this species in Ecuador and elsewhere, the results point out the need to evaluate human impact on the genetic diversity of Ecuadorian species.

**Keywords.** *Callithrix pygmaea*, genetic diversity, microsatellites (SSR).

### Resumen

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y de dieta. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones del leoncillo atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Con el fin de estimar la magnitud de esta amenaza, desde el año 2008, se realizó un estudio piloto para evaluar el nivel de variabilidad genética de cuatro grupos de esta especie de una población a orillas del río Aguarico. Para la realización del análisis genético se utilizó un total de 50 muestras de heces, colectadas durante el período de septiembre 2008 y febrero 2009; el 50 % de las muestras correspondió al grupo P4, los grupos P1, P2 y P5 aportaron con el restante 50 %. A partir de estas muestras se extrajo ADN con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Mediante la técnica de PCR se amplificaron nueve primers de microsatélites reportados para otra especie de Callitrichinae. La visualización de bandas se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 % y Urea 5M. El análisis estadístico fue realizado con el programa GenAlEx 6. Los resultados obtenidos muestran que existen de 3 a 8 alelos/locus, la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg sugiere que en el grupo P4 puede estar sucediendo endogamia, la heterocigocidad esperada en los grupos P1 y P2 tiene valores de 0.5, mientras que los valores del grupo P4 varían de 0.5 a 0.836. La distancia genética de Nei entre los grupos P1 y P2 es de 1.211, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1. Este estudio es pionero en este campo y evidencia la necesidad de continuar con investigaciones para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

**Palabras Clave.** *Callithrix pygmaea*, diversidad genética, microsatélites (SSR).

## Introducción

La conservación de las especies de primates ecuatorianos es fundamental ya que estas mantienen la estructura y dinámica de los ecosistemas. Estas especies están actualmente amenazadas por la destrucción de hábitats, la cacería y el tráfico de animales. Como consecuencia muchas especies han reducido su número o se han extinguido localmente [1, 2].

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es la especie más pequeña de primate antropoide en el mundo. Estudios sobre su ecología y comportamiento han sido realizados por de la Torre y colaboradores [2] en diferentes poblaciones de la Amazonía ecuatoriana; entre ellas, la población San Pablo, que se encuentra ubicada en las orillas del río Aguarico (coordenadas UTM, Zona 18, Datum PSAD 56 341767 E, 9969737 N, Figura 1), en la que se realizó el presente estudio.

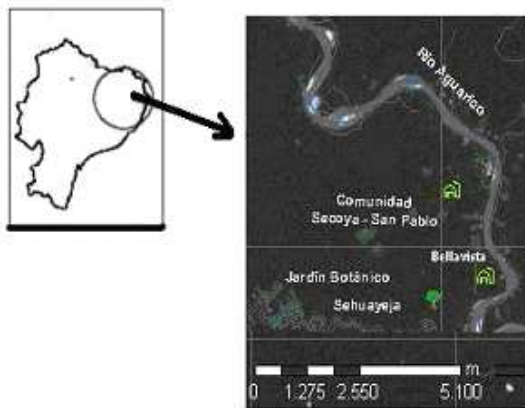


Figura 1: Localización de los grupos de leoncillos P1, P2, P3, P4 y P5 (población San Pablo - sector Bellavista).

La localidad de San Pablo tiene una altitud de 260 msnm y originalmente estuvo cubierta de bosques de varzea, inundados temporalmente por aguas blancas, que en algunas áreas han sido talados para actividades agrícolas [2].

El tamaño de los grupos de leoncillos en Ecuador varía de 2 a 8 individuos incluyendo infantes, siendo el tamaño promedio 6 individuos por grupo. Estos se encuentran conformados por una pareja de adultos (macho y hembra), entre 0 a 3 sub-adultos, entre 0 a 2 juveniles e infantes. El área de vida promedio de los grupos es de 0.9 hectáreas [2]. Su principal fuente de alimento son exudados provenientes de las especies de árboles *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, *Inga marginata* y *Parkia balslevii*, entre otras [3].

El leoncillo es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y dieta [2]. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones de esta especie atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Es

por estos motivos que el presente estudio tiene como fin evaluar en forma preliminar el nivel de variabilidad genética de una población de esta especie, para estimar si esta ha atravesado por un cuello de botella poblacional y/o si la fragmentación de hábitats está afectando a los procesos naturales de dispersión y reproducción de los individuos. La información generada por este estudio, pionero en este campo, es importante para delinear acciones de conservación y manejo de esta especie y para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

## Metodología

### Obtención de muestras

La colección de muestras fecales se realizó entre septiembre de 2008 y febrero de 2009. Cuatro grupos de leoncillos (P1, P2, P4 y P5) de la población San Pablo localizados en las orillas del Río Aguarico fueron observados periódicamente para recolectar las heces de los individuos. La colección consistió en ubicar hojas grandes de plátano (*Musa x paradisiaca*) en la base del principal árbol de exudados de cada grupo. Posteriormente, cada muestra fue colocada en papel filtro y a su vez guardada en un frasco con un desecante (sílica gel). Los frascos con las muestras así conservadas fueron expuestas al sol durante uno o dos días para reducir la proliferación de hongos en las heces. Finalmente, después de ser transportados a Quito, los frascos fueron guardados en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de las muestras de heces fecales fue realizada mediante el protocolo (*QIAamp DNA Stool Handbook*) que se encuentra en el kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN. Una cuantificación aproximada del ADN extraído se realizó en geles de agarosa al 1%. La cuantificación espectrofotométrica de ADN se realizó utilizando el equipo NANODROP 1000.

Primer	Temp. óptima de annealing ( $^{\circ}\text{C}$ )	Total de muestras amplificadas	Rango de peso de bandas obtenidas (pb)
CJ-1	58	11	128-176
CJ-6	58	0	-
CJ-7	50	13	119-127
CJ-10	50	4	217-243
CJ-11	50	14	106-142
CJ-12	58.4	27	132-168
CJ-13	50	0	-
CJ-14	56.2	9	156-184
CJ-15	50	15	124-138

Tabla 1: Temperaturas de annealing, número de muestras amplificadas y pesos de bandas (pb) para los primers transferidos a la especie *C. pygmaea*. Se observa que siete primers fueron transferidos y que sus temperaturas de annealing están entre 50 y 58  $^{\circ}\text{C}$ .

### Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

La amplificación de los microsatélites se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Se utilizó los primers CJ-1, CJ-6, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-13, CJ-14 y CJ-15 establecidos por Nievergelt et al. [4] para la especie *Callithrix jacchus*. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L el cual incluía buffer 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M de dNTP's, 0.24  $\mu$ M de cada primer, 0.5U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5 ng de ADN.

El programa de amplificación consistió en 3 minutos de denaturación inicial a 95 °C; 40 ciclos de denaturación a 94 °C durante 1 minuto, annealing de 50 o 58 °C, según el primer, durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto. La extensión final se hizo a 72 °C durante 5 minutos (Tabla 1).

#### Análisis de microsatélites

La separación de las bandas se realizó mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 % y úrea 5 M, en cámaras verticales Sequi-Gen® (BIO-RAD). Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata [5].

#### Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico no se incluyeron las muestras para las que no se obtuvo amplificación. También se redujo el número de loci a ser analizados (Tabla 2), debido a que en los loci *CJ-10* y *CJ-14* se obtuvo un bajo número de muestras amplificadas por grupo. Además, se descartó el uso del grupo P5 ya que no se obtuvo ninguna amplificación de ningún primer.

El análisis estadístico se realizó con el software GenAlEx 6 para determinar los siguientes parámetros poblacionales: frecuencias alélicas, equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), estadístico *Fst*, distancia genética de Nei y análisis de coordenadas principales (PCoA).

Grupo	Locus	Número de muestras	Número de alelos (Na)	$H_o$	$H_e$
P1	CJ-1	1	1	0.000	0.000
	CJ-7	1	2	1.000	0.500
	CJ-11	0	0	0.000	0.000
	CJ-15	1	1	0.000	0.000
	CJ-12	3	2	1.000	0.500
P2	CJ-1	0	0	0.000	0.000
	CJ-7	1	2	1.000	0.500
	CJ-11	0	0	0.000	0.000
	CJ-15	3	2	1.000	0.500
	CJ-12	3	4	1.000	0.722
P4	CJ-1	9	8	0.556	0.815
	CJ-7	8	3	1.000	0.625
	CJ-11	9	4	0.667	0.512
	CJ-15	8	7	0.750	0.836
	CJ-12	12	2	1.000	0.500

Tabla 2: Heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), número de muestras amplificadas y número de alelos por locus para los grupos de leoncillos P1, P2 y P4.

## Resultados y Discusión

### Muestras obtenidas

Un total de 53 muestras fueron obtenidas para los cuatro grupos de leoncillos, de éstas las que se utilizaron en los

análisis iniciales fueron: 8 para el grupo P1, 13 para el grupo P2, 25 para el grupo P4 y 7 para el grupo P5.

El peso promedio de las muestras de heces para el grupo P1 fue de 0.073 g, para el grupo P2 fue de 0.069 g, para el grupo P4 fue de 0.088 g y para el grupo P5 fue de 0.078 g. El tamaño de las muestras se debe al pequeño tamaño de los animales de la especie en estudio (aprox. 12 cm los individuos adultos, [1]).

### Cuantificación de ADN

Con base en la intensidad de las bandas de los geles de agarosa al 1 % se observó que para ciertas muestras se obtuvo una cantidad moderada de ADN, mientras que para otras hubo cantidades menores (Figura 2).

En la cuantificación espectrofotométrica de ADN las muestras del grupo P1 tuvieron una concentración de ADN promedio de 11.85 ng/uL, las del grupo P2 12.21 ng/uL, grupo P4 18.75 ng/uL y grupo P5 6.46 ng/uL. Las bajas concentraciones de ADN de este último grupo impidieron la posterior amplificación de los primers y determinaron su exclusión de los análisis estadísticos.

Estos resultados son confirmados por otros estudios en los cuales el ADN obtenido a partir de muestras no invasivas, por lo general heces fecales, posee baja calidad (ADN degradado, inhibidores para PCR y contaminación por otro ADN) y cantidad (el ADN que se obtiene se encuentra en el rango de picogramos). Esto trae como consecuencia errores en otras técnicas posteriores como el PCR, ya que puede presentarse la pérdida de alelos o la presencia de alelos falsos y a su vez da como resultado una falsa genotipificación de la especie en estudio [6].

### Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

Siete de los nueve primers establecidos por Nievergelt et al. [4] para la especie *Callithrix jacchus* fueron transferidos a la especie *Callithrix pygmaea*. Los primers que amplificaron bandas del tamaño esperado fueron CJ-1, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-14 y CJ-15, equivalente al 78 % de los primers probados. Esto corrobora lo reportado en otros estudios sobre la posibilidad de que los marcadores moleculares microsatélites (SSR) pueden ser utilizados entre especies del mismo género o hasta de la misma familia [4, 7, 8].

### Estadísticos poblacionales

Para los cinco loci analizados (*CJ-1*, *CJ-7*, *CJ-11*, *CJ-12* y *CJ-15*) el número de alelos por locus varió entre 3 y 8, estos valores son similares a los obtenidos en la especie *Callithrix jacchus* (2-6 alelos/locus) [9]. Con respecto a las frecuencias alélicas en los tres grupos, el locus *CJ-1* posee un rango de 0.056 a 1.00, el locus *CJ-7* de 0.25 a 0.5, el locus *CJ-11* de 0.056 a 0.667, el locus *CJ-12* de 0.167 a 0.5 y el locus *CJ-15* de 0.063 a 1.00. Con base en las frecuencias alélicas de los diferentes loci, el test de equilibrio Hardy-Weinberg sugiere que los grupos P1 y P2 parecen estar reproduciéndose al

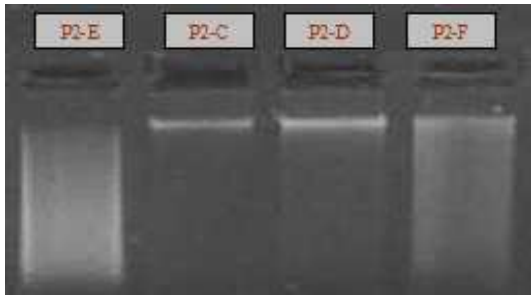


Figura 2: Electroforesis de ADN extraído a partir de heces de *C. pygmaea* del grupo P2 en geles de agarosa al 1%, para evaluar la concentración y calidad de ADN.

azar ( $P=0.083-0.317$ ). Sin embargo, en el grupo P4, tres loci muestran frecuencias alélicas que se desvían significativamente de las esperadas por azar (CJ-7,  $P=0,046$ ; CJ-12,  $P=0,001$  y CJ-15,  $P=0,047$ ). Esto sugiere que en este grupo no se están dando cruces al azar, lo cual sucede cuando individuos emparentados se aparean en una proporción mayor, reduciendo de cierta manera la heterocigocidad y aumentando la homocigocidad. Esto puede producir, a su vez, una reducción en la diversidad genética por depresión endogámica, si los alelos recesivos deletéreos o letales se representan en estado homocigoto [10].

En el grupo P1 la heterocigocidad esperada para el locus CJ-7 fue de 0.5 igual que para el locus CJ-12. En el grupo P2 las heterocigocidades esperadas obtenidas fueron de 0.5 para el loci CJ-7 y CJ-15 y de 0.722 para el locus CJ-12. Las heterocigocidades esperadas en el grupo P4 fueron de 0.815, 0.625, 0.512, 0.836 y 0.5, para los loci CJ-1, CJ-7, CJ-11, CJ-15 y CJ-12, respectivamente (Tabla 2). Estos niveles de heterocigocidad son altos en comparación con la heterocigocidad de 0.35 obtenida en *Callithrix jacchus* [9] pero son necesarios más datos para concluir algo sobre las diferencias genéticas entre las dos especies.

La distancia genética obtenida a partir del índice  $F_{st}$  entre los grupos P1 y P2 es de 0.569; entre los grupos P1 y P4 es de 0.265, y entre los grupos P2 y P4 es de 0.306. Esto indica que existe una diferencia genética moderada entre los grupos P1 y P2, mientras que el grupo P4 no se diferencia mayormente de los grupos P1 y P2.

Estos resultados se corroboran con los cálculos de la distancia genética de Nei que muestran que existe una distancia genética de 1.211 entre el grupo P1 y P2, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1, respectivamente. El PCoA calculado a partir de esta matriz indica que los grupos P1 y P4 difieren en un 93.02 % del grupo P2 (considerando el Eje 1), mientras que los grupos P2 y P1 difieren en un 6.98 % del grupo P4 (considerando el Eje 2) (Figura 3).

Estos patrones parecen estar relacionados con barreras físicas para la dispersión entre los grupos: los grupos P1 y P2, que son los más distantes genéticamente, tienen áreas abiertas, casas y cultivos como barreras entre sus áreas de vida. Los grupos P1 y P4 (que tienen las

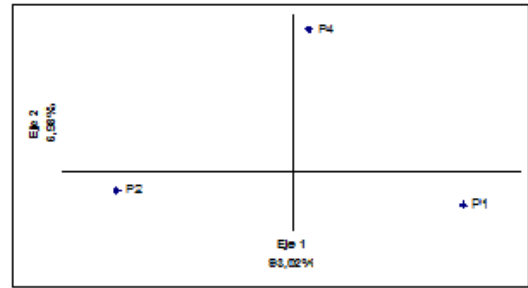


Figura 3: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) entre los grupos de leoncillos P1, P2 y P4 a partir de la distancia genética de Nei. Se observa una diferencia de 93,02 % de los grupos P1 y P4 con el grupo P2, tomando en cuenta el Eje 1.

menores distancias genéticas) hasta hace aproximadamente 2 años tenían un bosque que conectaba las áreas de vida de ambos grupos. Entre las áreas de vida de los grupos P2 y P4 (distancia genética intermedia) existen áreas abiertas con algunos árboles pero no existen viviendas [2, 11]

## Conclusiones

Este estudio piloto demostró que se puede obtener ADN de poblaciones silvestres de leoncillos por métodos no-invasivos, un aporte importante considerando la vulnerabilidad de esta especie a la captura y manipulación [2].

La variabilidad del ADN obtenido de los grupos de leoncillos fue analizado mediante un protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) con cinco pares de primers inicialmente usados en una especie hermana *C. jacchus*. Este estudio es pionero en este campo y evidencia la necesidad de continuar con investigaciones para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

## Agradecimientos

Investigación financiada gracias al programa de becas Small Grants de la USFQ, con apoyo adicional de fundación VIHOMA y University of Wisconsin, Madison, USA. Agradecemos especialmente a Hernán Payaguaje y Pablo Yépez por su ayuda en la recolección de muestras en el campo y a Charles T. Snowdon por su apoyo con materiales para el estudio de laboratorio.

## Referencias

- [1] de la Torre, S. 2000. "Primates de la amazonía ecuatoriana." Proyecto Petramaz/SIMBIOE. Quito.
- [2] de la Torre, S., Yépez, P., and Snowdon, C. 2009. "Conservation status of Pygmy Marmosets *Callithrix (Cebuella) pygmaea* in Ecuador", The smallest anthropoids: The Marmoset/Callimico radiation.
- [3] Yépez, P., de la Torre, S., and Snowdon, C. 2005. "Interpopulation differences in exudate feeding of pygmy marmosets in ecuadorian Amazonia". *American Journal of Primatology*. 145–158.

- [4] Nievergelt, C., Mundy, N., and Woodruff, D. 1998. "Microsatellite primers for genotyping common marmoset (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids". *Molecular Ecology*.
- [5] Benbouza, H., Jacquemin, J., and Baudoin, J. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels", Vol. 10, No. 2.
- [6] Chu, J., Lin, Y., and Wu, H. 2006. "Applicability of non-invasive sampling in population genetic study of taiwanese macaques (*Macaca cyclopis*)". *Taiwania*. 51, 258–265.
- [7] Clisson, M., Lathuilliere, M., and Crouau-Roy, B. 2000. "Conservation and evolution of microsatellite loci in primate taxa". *American Journal of Primatology*. 50, 205–214.
- [8] Muniz, L. and Vigilant, L. 2008. "Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (*Cebus capucinus*) and cross-species amplification in other new world monkeys". *Molecular Ecology Resources*. 402–405.
- [9] Nievergelt, C., Digby, L., Ramakrishnan, U., and Woodruff, D. 2000. "Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population". *International Journal of Primatology*. 21, 1–20
- [10] Frankham, R., Ballou, J., and Briscoe, D. 2003. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press: United Kingdom.
- [11] de la Torre, S., Yépez, P., Snowdon, C., and Payaguaje, A. 2005. "Ecología, comportamiento y conservación del leoncillo *Callithrix (cebuella) pygmaea* en Tierras Secoya". En: Caminando en el sendero, hacia la conservación del ambiente y la cultura Secoya. S. de la Torre y P. Yépez. Fundación VIHOMA. Quito.