

ANALISIS FILOGEOGRAFICO Y GENETICO POBLACIONAL DE LA ESPECIE
DE PECARÍ (*Tayassu pecari* TAYASSUIDAE, ARTIODACTYLA) MEDIANTE
UNA REGION MITOCONDRIAL Y MICROSATELITES

Andrea Lucia Rodriguez Pinto
Manuel Ruiz Garcia. Ph.D.

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al titulo

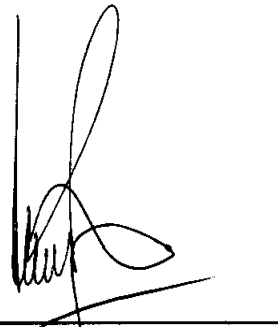
Magister Sc

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO
Bogotá

ANALISIS FILOGEOGRAFICO Y GENETICO POBLACIONAL DE LA ESPECIE
DE PECARÍ (*Tayassu pecari* TAYASSUIDAE, ARTIODACTYLA) MEDIANTE UNA
REGION MITOCONDRIAL Y MICROSATELITES

ANDREA LUCIA RODRIGUEZ PINTO

APROBADO



Manuel Antonio Franco. Ph. D.
Director Posgrado.

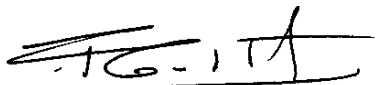
Manuel Ruiz García Ph. D.
Tutor.

Concepción Puerta. B. Ph. D
Decana Facultad

ANALISIS FILOGEOGRAFICO Y GENETICO POBLACIONAL DE LA ESPECIE
DE PECARÍ (*Tayassu pecari* TAYASSUIDAE, ARTIODACTYLA) MEDIANTE UNA
REGION MITOCONDRIAL Y MICROSATELITES

ANDREA LUCIA RODRIGUEZ PINTO

APROBADO



Dario Fernando Gallego Alarcón.
Ph. D. Genética Animal.
U. D. C. A.
Jurado.



Abelardo Rodríguez Bolaños.
M. Sc Ciencias Biológicas.
UNIVERSIDAD DISTRITAL
Jurado.



Maria Ignacia Castillo Amézquita
Ph. D. Ciencias Biológicas.
MEDICINA LEGAL
Jurado.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	9
2.	Marco teórico y revisión de literatura	13
2.1.	Características de la especie	14
2.2.	Importancia económica y de otros ámbitos	15
2.3.	Marcadores Moleculares	16
2.4.	Genes Mitocondriales	17
3.	Objetivos	19
3.1.	Objetivo General	19
3.2.	Objetivos específicos	19
4.	Materiales y Métodos	20
4.1.	Localidades de muestreo	20
4.2.	Métodos	26
4.2.1.	Procesamientos de muestras en el laboratorio	26
4.2.2.	Ampliación por PCR y Secuenciación	26
4.2.2.1.	ADN mitocondrial	26
4.2.2.2.	Microsatélites	27
4.3.	Análisis estadístico de la información	29
4.3.1.	ADN mitocondrial	29
4.3.2.	Análisis Filogenéticos	30
4.3.3.	Cambios Demográficos	31
4.4.	Análisis Genético Poblacional Microsatélites	33

5.	Resultados	34
5.1.	Diversidad genética	34
5.1.1.	ADN mitocondrial	34
5.1.2.	Microsatelites	34
5.2.	Heterogeneidad Genética	35
5.2.1.	ADN mitocondrial	35
5.2.2.	Microsatélites	36
5.3.	Inferencias Filogenéticas ADN mitocondrial	43
5.4.	Genética Demográfica Microsatélites	46
6.	Discusión	48
6.1.	Diversidad genética	48
6.2.	Heterogeneidad Genética y la existencia de subespecies dentro de <i>T. pecari</i> en el noreste de América del sur	49
6.3.	Genética demografica	54
7.	Conclusiones	<u>56</u>
8.	Recomendaciones	<u>57</u>
9	Referencias	<u>58</u>
10.	Anexos	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de Muestreo para ADN mitocondrial (ADNmt).	22
Tabla 2. Localidades de Muestreo para microsatélites.	23
Tabla 3. Localidades de Muestreo <out Group> <i>Tayassu tajacu</i> . Pecari de Collar.	24
Tabla 4. Diversidad Genética para tres microsatélites porcinos (IGF1, SW857, SW951) aplicados a pecari de labio blanco representadas en cuatro subespecies morfológicas.	35
Tabla 5. Estadísticos de diversidad genética, heterogeneidad genética para la región control mitocondrial.	36
Tabla 6. Heterogeneidad Genética. Estadísticos de FST, Rst para microsatélites (IGF1, SW857, SW951) analizados para cuatro subespecies morfológicas de <i>T. pecari</i> .	37
Tabla 7. Porcentajes de clasificación errónea de especímenes de pecari labio blanco dentro de otras subespecies diferentes a las subespecies morfológicas clasificados por software GeneClass 2.0.	38
Tabla 8. Porcentajes de posibles migrantes dentro de otras subespecies morfológicas de <i>Tayassu pecari</i> usando una probabilidad verosimilitud L_{home}/L_{max} software GENECLASS 2.0.	40
Tabla 9. Análisis de Asignación con el programa Structure.	41
Tabla 10. Estadística demográfica aplicada al total de muestras de <i>T. pecari</i> y <i>T. abirostris</i> analizadas para la región control de DNA mitocondrial. *P < 0.05, **P < 0.01.	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa Sur America con localidades de muestreo para *Tayassu pecari*26

FIGURA 2. Analisis de Asignacion con el programa Structure..... 42

FIGURA 3. Arboles Filogeneticos A máxima verosimilitud B Neighbor – joining para *Tayassu pecari* con la región control de DNA mitocondrial.....44

FIGURA 4. Distribuion mismatch con región control mitocondrial para *Tayassu pecari* 47

RESUMEN

En este estudio se secuenciaron 59 pecaríes (44 pecaríes de labios blancos *Tayassu pecari*, y 15 pecaríes de collar, *Pecari tajacu*) para la región control del gen mitocondrial y se genotipificaron 78 pecaríes de labios blancos con tres microsatélites de ADN que representan las cuatro subespecies morfológicas (*Tayassu pecari spiradens*, *T. p. aequatoris*, *T. p. pecari* y *T. p. albirostris*) presente en el noroeste de Suramérica (Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia). Los resultados mostraron que: 1. La diversidad génica estimada en el gen mitocondrial es extremadamente alta para esta población de *T. pecari*, mientras que el promedio de la diversidad de genes para los microsatélites es medio-alto, similar a la observada en las razas de cerdos europeos. 2. No se encontró heterogeneidad genética significativa entre las subespecies morfológicas con el marcador mitocondrial, aunque se observó heterogeneidad genética significativa con microsatélites pero relativamente pequeña con *albirostris* siendo éste el único grupo diferenciado. 3. Los árboles filogenéticos con el ADNmt mostraron que los diferentes haplotipos encontrados están mezclados independientemente de su clasificación "a priori" de subespecies. También los análisis de asignación de microsatélites mostraron bajos porcentajes de clasificación correcta de los individuos analizados en sus respectivas subespecies morfológicas geográficas. Los resultados moleculares no se correlacionan con las subespecies morfológicas descritas hasta el momento de *T. pecari* en el noroccidente de Sudamérica. 4. No hay claros cambios demográficos históricos detectados con las secuencias de ADNmt región control. Estos resultados genéticos se discuten en función de las características de la estructura ecológica y social en *T. pecari*.

1- Introducción

Actualmente hay tres especies reconocidas de pecarís (Familia Dicotylidae, Turner 1849, o tayasuidos, Palmer 1897), todos ellos en Suramérica también viven en Estados Unidos, aunque algunos registros fósiles han sido descubiertos en Europa (Ginsburg, 1973), Asia (Ducrocq, 1994) y África (Hendey, 1976). Según Wrigth (1989, 1993, 1998) y Grubb (2005), estas especies se clasifican en tres géneros, siendo ellos el pecarí de labios blancos (*Tayassu pecari*), el pecarí de collar (*Pecari tajacu*) y el pecarí del Chaco (*Catagonus wagneri*). Se pensó que esta última especie estaba extinta, pero fue encontrado en la región del Chaco (Bolivia, Argentina y Paraguay), en 1974 (Wetzel et al., 1975). Recientemente, Van Roosmalen et al., (2006, 2007) afirmó haber encontrado una nueva especie de pecarí, *Pecari maximus* (pecarí gigante) en la zona de área interfluvial del río Aripuana y los ríos Madeira y Tapajós en la Amazonia central brasileña, a través del estudio de tres cráneos y cinco pieles. Los autores secuenciaron la región control mitocondrial (mtDNA) y dos genes nucleares de una de estas pieles llegando a la conclusión de que esta nueva especie se separó del pecarí de collar alrededor de 1 a 1,2 millones de años atrás. Sin embargo, Góngora et al., (2011) afirmaron que no existen pruebas claras a favor de esta nueva especie de pecarí reportado, ya que el individuo secuenciado por Van Roosmalen et al., (2006, 2007) se agrupó dentro de un linaje mitocondrial brasileño *P. tajacu*. Benirschke et al., (1985) reivindicaron que la reducción en el cromosoma de los pecarís mostró que *P. tajacu* ($2n = 30$) fue la especie de pecarí más primitiva; por su parte *T. pecari* ($2n = 26$) y *C. wagneri* ($2n = 20$) eran especies derivadas, siendo la última, la más reciente. Por el contrario, Todd (1985) determinó que la evolución cromosómica de los pecarís fue a través de la fisión de los cromosomas y, por tanto, *C. wagneri* fue la especie más primitiva y *P. tajacu* la más reciente. Theimer y Keim (1998), analizaron el gen mitocondrial Cyt-b, a partir de las tres especies de pecarí existentes, y determinaron que *wagneri* *C.* y *T. pecari* conformaron un clado, mientras que *P. tajacu* conformado un linaje separado. La separación temporal entre *Catagonus* y *Tayassu* se estimó

alrededor de 1,7 a 2 millones de años atrás (MYA), concomitante con la colonización de los tayasuidos de América del Sur. La divergencia del linaje *Pecari* era mayor, alrededor de 3.02 a 7.04 MYA, durante el Mioceno. Estos dos linajes de pecarí divergieron en América del Norte antes de la colonización de América del Sur. Diversos estudios muestran algunos híbridos naturales entre *T. pecari* y *P. tajacu*. Estudios del 2001 informaron de un híbrido macho ($2n = 28$) capturado en la Reserva Forestal de la Hacienda Monte Alegre en Agudos, Sao Paulo Estado, Brasil. A pesar de bandeo G, muestran que los cariotipos del pecarí de collar y de labio blanco son muy diferentes (Rocha, 1993). Sin embargo, este híbrido presenta túbulos seminíferos con casi todas las células germinales en la etapa de espermatogonia y sólo unas pocas células en la fase de espermatozoides primario y también mostró anomalías graves en el complejo sinaptonémico que puede generar problemas reproductivos y/o la inviabilidad de las células germinales.

Las especies de pecaríes son una de las más importantes fuentes de proteínas de origen animal procedentes de animales de caza silvestre en América Latina ("carne de monte" o "carne do mato") para los indígenas y las poblaciones de "colonos" de esa zona. Por ejemplo, Bodmer et al., (1994) determinó que los pecaríes son las especies de caza más importantes de la Amazonía peruana y que constituye la mayor parte de la biomasa de mamíferos cazados en esa zona de la Amazonía. Bodmer (1995) mostró que el 95% de los pecaríes extraídos anualmente por la actividad humana en el Departamento de Loreto en el Perú se debe a la actividad de caza y sólo el 5% se debió a la destrucción de los bosques. En los mercados de Iquitos (Perú), 64.8% de la carne de caza que se vende es de pecarí de collar y el 19,5% de la carne de caza que se vende es de pecarí de labios blancos (Bendayán, 1990). De hecho, para algunas tribus indígenas locales, la carne *T. pecari* es la más importante (Mundurucú, Brasil, Murphy, 1960; Guayakí, Paraguay, Cadogan, 1973; Mayas Lacandones, Chiapa, México, marzo de 1987). Hvidberg-Hansen (1970) reportó que 125.100 pieles de pecarí llegaron a Alemania, a Francia 5.000, 20.000 a EE.UU. y 5.000 a Japón a partir sólo de Iquitos (Perú) en 1969 para hacer guantes. Así, durante las décadas de los 50, 60

y 70, alrededor de 200.000 pieles de pecarí se exportan cada año sólo desde la Amazonía Peruana (Grimwood, 1980). En los años 80, este valor descendió a alrededor de 50.000 pieles exportadas anualmente. El precio de cada piel de los cazadores es de alrededor de EE.UU. \$ 09.07 para el pecarí de collar y alrededor de EE.UU. \$ 05.03 para el pecarí de labios blancos. En 1988, 160.391 pieles de pecaríes de collar fueron exportados de Argentina, Perú y Bolivia con un comercio anual de EE.UU. \$ 30 millones con sólo 250.000 dólares EE.UU. para los cazadores locales (Bodmer et al., 1997). Argentina exportó, en 1988-1990, un total de 362.745 pieles con el 48% exportado a Alemania, el 26% a EE.UU., el 16% a Italia, 3,2% a Japón, 2,4% para los Países Bajos y el 4% a otros países europeos. Por lo tanto, pecaríes son especies de gran interés económico.

Adicionalmente, la carne de pecarí es muy apetecida por los cazadores, el precio de venta en el mercado, puede representar el doble o triple del valor de la carne del puerco doméstico, incluso, en algunos países, como Estados Unidos se han instalado restaurantes que ofrecen carne de pecarí importada desde México. Las poblaciones de pecarís han disminuido en algunas zonas, como resultado de la cacería y la destrucción de su hábitat. Sin embargo, es un animal relativamente fácil de manejar y criar.

Esta especie vive principalmente en las selvas neotropicales de América Latina, pero habita de manera similar otros hábitos más secos en los Llanos Orientales de Colombia, en la sabana venezolana, así como en el Gran Chaco paraguayo. Las manadas de esta especie son más grandes que en las otras especies de pecarís y están compuestas de 50 a 300 individuos (Kiltie y Terborgh, 1983; SOWLS 1984 y Fragoso, 1994. Mayer y Wentzel (1987) consideran la existencia de cinco subespecies de *T. pecari*: 1.) *T. p. ringens* definido por Merriam en 1901 con el tipo en Azapote localidad en Campeche, México. Esta subespecie está comprendida entre el sur de México (Oaxaca, Chiapas, Campeche y Quintana Roo) hasta el norte de Nicaragua, a través de Guatemala, Belice y Honduras. Actualmente está extinta desde El Salvador, 2.) *T. p. spiradens* descrito por

Goldman en 1912, con localidad tipo en Sipurio, Sixaola, Limón, Costa Rica. Su distribución va desde el sur de Guatemala, Costa Rica, Panamá y el noroeste de Colombia (ambas costas del Atlántico y del Pacífico de este país en el oeste de la Cordillera de los Andes Central). 3) *T. p. aequatoris* fue descrita principalmente por Lonnberg en 1921 con localidad en Gualea, Pichincha, Ecuador. Esta subespecie tiene la distribución geográfica más restringida de todos los pecarís de labios blancos. Su distribución se conoce en el suroeste de Colombia (Cauca y Nariño) y en el noroeste de Ecuador (Esmeraldas, Manabí y las provincias de Pichincha). 4.) *T. p. beebei* descrita por Anthony en 1921 con localidad tipo en Kartabo, Guyana. La distribución de esta sub-especie se extiende en la mayor parte de América del Sur al norte del río Amazonas, desde el sur-este de Colombia, el noreste del Amazonas en Perú, Venezuela, Guyana, Surinam, Guyana Francesa y el norte del Amazonas en Brasil. 5.) *T. p. pecari*, que fue descrito por Link en 1795. La distribución de esta subespecie se produce desde el sur del río Amazonas, incluyendo el sur de la Amazonía peruana, Amazonia boliviana, todo el territorio brasileño en el sur del río Amazonas, Paraguay y norte de Argentina (Santiago del Estero y Entre Ríos, provincias como límite sur). Esta sub-especie estaba presente en Uruguay, pero se considera extinta, ya que se informó en la última vez en 1980. Sin embargo, Grubb y Groves (1996) adoptaron otro esquema clasificatorio. Ellos encontraron que *beebei* es un sinónimo de *pecari* y que la subespecie más del sur (y con la distribución geográfica más amplia) deben ser asignados como *T. p. albirostris* (definido por Illiger en 1815 a partir de un ejemplar de Paraguay). Por lo tanto, consideran cinco sub-especies nombradas como *T. p. ringens*, *T. p. spiradens*, *T. p. aequatoris*, *T. p. pecari* y *T. p. albirostris*. (Grubb y Groves 1996). Esta es la clasificación que hemos empleado en el trabajo actual.

Este trabajo estudia, si desde una perspectiva molecular, algunas de estas subespecies morfológicas de *T. pecari*, corresponden a las subespecies morfológicas, para lo cual se emplearon dos tipos de marcadores moleculares. En primer lugar, la secuencia de la región control mitocondrial (D-loop), que es una porción que evoluciona con particular rapidez y por lo tanto permite la resolución a

escala fina de la estructura de las poblaciones y las divisiones microevolutivas (Rosel et al, 1995; Wang et al, 1996). En segundo lugar, se analizaron algunos STRPs (polimorfismos de repeticiones cortas en tándem), o microsatélites, que se componen de tándems de unidades repetitivas de 2-6 pares de bases de longitud (Lehninger et al 2007). Los microsatélites se distribuyen al azar, son altamente polimórficos y con frecuencia se encuentran dentro de los genomas eucariotas. La pequeña cantidad de ADN necesaria para estos análisis moleculares ha ayudado a los investigadores a una fuerte incorporación de técnicas moleculares en el estudio de la dinámica, sistemática y la biología de las poblaciones (Ferreira y Gratapaglia 2007, Ochoa 2002)

2. Marco teórico y revisión de Literatura

La especie de *T. pecari* presenta un estado muy pobre de conocimiento genético-poblacional lo que crea barreras para el análisis de diferenciación poblacional. En ese sentido estudios que contemplen la diversidad genética, son importantes pues ayudan a establecer algunos de los procesos históricos involucrados en la evolución y especiación de las especies. (Adega, 2006, Ochoa 2002). La diversidad genética corresponde a la variabilidad de alelos y genotipos dentro de una población o especie comprende la variación intra e interpoblacional, ambas importantes desde el punto de vista conservacionista (Ferreira 1998, Darnell et al 2007). Entender ese tipo de variación es fundamental para comprender como las poblaciones naturales están estructuradas genéticamente. (Adega et al, 2006). En la actualidad es muy poca la información que existe a nivel molecular sobre la especie *Tayassu*, sin embargo sobre el pecari de collar existe mayor información que sobre el labio blanco.

Recientemente los individuos pertenecientes a la Familia *Tayassuidae* están siendo objeto de estudios ecológicos y evolutivos principalmente biogeográficos en diferentes escalas, por su importancia económica y amplia distribución (Adega 2006, Theimer, 1998). El estudio de la variabilidad genética constituye un factor

fundamental para entender la forma como se estructuran las poblaciones de especies. (Bosma et al 2004).

Los clados de este género son reorganizados basándose en caracteres morfológicos y etológicos en la actualidad se reconocen tres especies, sin embargo si tomamos las diferentes subpoblaciones de cada especie entonces se hablaría de clado filogeograficos, el primer clado filogeográfico aclara la especiación dentro de un contexto geográfico, mientras los estudios intraespecificos de diversidad genética particularmente con referencia a geografía (filogeografía intra-especifica) pueden además proveer estructura poblacional, flujo genético y especiación, al unir filogenias intra-específicas e inter-específicas el enfoque puede identificar ejemplos de hibridaciones e introgresiones y descubrir especies crípticas y polimórficas (Sowls, 1984). Los datos de las secuencias de ADN proveen información sobre las relaciones filogenéticas y las distancias genéticas entre linajes evolutivos y permite hacer deducciones con respecto a la historia individual de taxos dentro de una región. (Theimer, 1994, Bordmer et al,1996)

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ANIMAL

Los pecaris son de tamaño mediano, con cierto parecido a los cerdos domesticos, pero un poco mas pequeños, se les nota mas esbeltosa y ágiles podria decidirse que se ven que no tienen tanta grasa y que su carne es más compacta. Miden a la altura de la cruz, entre 30 – 50 centímetros y tienen alrededor de 95 centímetros de longitud.

El peso de un adulto está entre 17 – 30 Kilogramos; los machos y las hembras pueden tener el mismo tamaño y peso.

El color predominante del animal adulto es gris oscuro o negro; el cuerpo con excepcion de las patas, la parte del hocico y del vientre, esta recubierto de cerdas muy duras, gruesas y de color negro, salpicadas finamente con blanco; las

hembras son más oscuras, largas y abultadas en el lomo, formando una verdadera crin cuando se eriza. El pecari tajacu tiene una característica banda blanquecina que baja en diagonal desde la mitad del lomo hasta el pecho, debajo de la cabeza. La característica en *Tayassue pecari* la franja es color marron por toda la espalda y su labio blanco que permite diferenciarlo.

Cuando los animales nacen y hasta los tres meses aproximadamente el pelaje es algo café. El collar difuso es característico de los jóvenes. En la especie *T. pecari* los jóvenes no tienen la coloración característica del adulto. (Adega et al 2007)

El tamaño de la cabeza guarda relación con el grosor del cuerpo. El hocico es alargado y en la punta termina con un labio de forma redondeada en el cual se encuentran las fosas nasales algo móviles.

2.2. Importancia económica

Los pecarís representan la carne de monte por excelencia, son los mamíferos más cazados para proveer proteínas a las comunidades indígenas y de colonos a lo largo de toda Sudamérica. Por ejemplo, en cuatro sitios de estudio diferentes (dos de zonas inundables, Várzeas: Malpuco y Saimiria, respectivamente, y dos de tierra firme, Tahuayo/Blanco y Yavarí-Mirí, todos ellos en la Amazonía peruana), las dos especies de pecarís fueron las especies de mamíferos más cazadas (*T. pecari*: 17.2 individuos/km², 14.5/km², 33.2/km², 20.8/km², respectivamente; *T. tajacu*: 3.2/km², 18.5/km², 33.0/km², 12.8/km², respectivamente), siendo únicamente superadas en algunas ocasiones por *Agouti paca*. El beneficio económico por la caza de pecarís en el área de Tahuayo/Blanco, en un solo año, para las familias cazadoras fue de 4980 \$ USA para *T. pecari* (166 animales cazados) y de 4950 \$ USA para *T. tajacu* (165 animales cazados) (Bodmer et al., 1994). Se han realizado estudios intensos sobre este tópico y sobre la ecología alimentaria, uso de hábitat, biología reproductiva y la sustentabilidad de la cosecha de esas dos especies de pecarís en el departamento de Loreto (Perú), concretamente en un área de altura

(Reserva Comunal Tamshiyacu-Tauhayo) y en un área inundable (Parque Nacional Pacaya-Samiria) (Bodmer et al., (1997). Sus pieles (especialmente la de la primera especie) son comercializadas por decenas de miles anualmente. Un único ejemplo es más que diciente. Llellish et al., (2007) reportaron que, tan solo en el año 2001 en Perú, se comercializaron, de forma legal, 27.000 pieles de *T. tajacu* y 7.000 pieles de *T. pecari*. Eso significa que la presión de caza es altísima para esas dos especies y que muchas poblaciones localmente pueden estar en un estado próximo a la desaparición, aunque en el pasado esa presión por las pieles fue todavía mayor. Por ejemplo, solo en 1969, y desde Iquitos, se exportaron 155.000 pieles de pecaríes para Alemania (principalmente), Francia, Estados Unidos y Japón. Estas matanzas originaron una ganancia promedio de 461.000 \$ USA por año, con un valor neto de 12.106.200 \$ USA entre 1946 y 1973 (Hvidverg-Hansen, 1970). Claramente algunas poblaciones de estas especies han desaparecido, o están a punto de hacerlo. Sin embargo, no conocemos a nivel molecular si existen diferentes acervos genéticos en el interior de esas dos especies y si existieran cuál es su distribución geográfica y cuál de ellos puede sentir de forma más intensa la descomunal presión de caza que se está ejerciendo sobre ellos.

En Latinoamérica se incluyen muchos programas de reproducción en cautiverio para cruzamientos. (Sowls, 1984) debido a la importancia económica local (Bodmer et al., 1997). En los años recientes existen programas de manejo y cría en cautiverio y se desarrollan experimentos sostenibles con los recursos (Nogueira-Filho et al., 2004).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellas que presentan rasgos de interés para la conservación (Ochoa, 2002). Las frecuencias génicas y genotípicas de los diferentes marcadores pueden proporcionar información entre otras cosas, sobre la identificación de las especies, la estructura de las

poblaciones, la hibridación y el flujo de genes (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

El uso de técnicas moleculares ha permitido evaluar varios aspectos genéticos de las especies silvestres, algunas en peligro de extinción, como la variación genética de poblaciones disminuidas demográficamente, la existencia de flujo génico entre poblaciones, la estructura genética y la definición de unidades genéticas para conservación (Ochoa et al, 2007 y Hills 2002).

2.4. GENES MITOCONDRIALES

Los genomas de organelos como la mitocondria (involucrada en la degradación de azúcares y grasas importantes en la respiración celular) constituida por genes de una única copia, que codifican solo proteínas necesarias para la manutención de sus funciones en la expresión génica (rara vez poseen regiones no codificadoras). Ciertas características como la herencia uniparental, generalmente materna, la ausencia de recombinación y altas tasas evolutivas comparadas con el genoma nuclear, hacen que sean una herramienta importante en estudios poblacionales (Lehninger, 2007)

El genoma mitocondrial contiene información de 2 ARN ribosomales (ARNr) (12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 ARN mensajero (ARNm), para un total de 37 genes, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa: tres subunidades de la Citocromo c-oxidasa (CO I, II y III) (Complejo IV), una subunidad de la Citocromo b (cyt b) óxido-reductasa (complejo III), siete subunidades (ND-1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6) del complejo NADH deshidrogenasa (Complejo I) y dos subunidades (6 y 8) del complejo ATP sintetasa (Complejo V) (Ferreira y Grattapaglia 2008)

El mtADN se caracteriza por presentar rápidas tasas de evolución lo que permite la detección de diferenciación genética en distancias geográficas relativamente pequeñas y cortas en escala de tiempo evolutivo (Avice 1998). Su estructura es bien conocida, no posee intrones, pseudogenes y transposones por lo tanto la

detección de diferencias entre los haplotipos de mtADN en este nivel taxonómico, posibilita la comparación inter e intrapoblacional (Awise *et al.* 1987).

El mtADN posee herencia materna y normalmente no sufre recombinación, por lo tanto se puede recuperar la misma información histórica a lo largo de toda la molécula (Matioli 2001). Su tasa de mutación media puede ser hasta de un orden de magnitud mayor que la de secuencias nucleares de copia única, lo que puede explicar su alto polimorfismo intra e interespecífico. La mayoría de sus variantes son generadas por substitución o pequeños cambios de longitud originadas por inserciones o deleciones y el orden de genes es altamente conservado a lo largo cortos periodos evolutivos, además dependiendo del tejido, cada célula tiene múltiples copias de un único genoma mitocondrial, lo que ofrece una técnica fácil de obtención. (Awise 2000, Awise *et al.*, 1987, Hill *et al.*, 1996.)

El ADN mitocondrial (mtADN) se usa como una herramienta para inferir la evolución y el pasado demográfico de poblaciones y especies; actualmente en innumerables campos de ecología molecular y dentro de los genes mitocondriales el gen región control es considerado uno de los genes más usados en trabajos filogenéticos probablemente por ser el gen mitocondrial cuya estructura y función de los productos proteicos es mejor conocido (Awise *et al.* 1987). Este gen contiene una región o dominio más conservado y una región más variable (Ochoa 2000, Theimer *et al.* 1998). En este estudio fue determinante, junto a los microsatélites, para hallar los diferentes estadísticos de diversidad y heterogeneidad genética entre y dentro de todas las diferentes poblaciones y regiones de muestreo

3. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la estructura genética y la filogeografía molecular de la especie de *Tayassu pecarí* a través de la región control mitocondrial y con marcadores microsatelites.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la variabilidad genética de poblaciones de labio blanco *Tayasuu pecarí*.
2. Identificar la estructura poblacional del pecari de labio blanco en el Noroeste de Sudamérica.
3. Conocer niveles de flujo génico actual e histórico entre las poblaciones de pecarí de labio blanco.
4. Definir si los ejemplares de pecarí de labio blanco en cada punto de muestreo tienen perfiles multi-genotípicos característicos de cada población mediante métodos de asignación poblacional.
5. Evaluar posibles contracciones o expansiones poblacionales del pecarí de labio blanco mediante métodos de coalescencia
6. Reconstruir la filogenia de las posibles subespecies de pecarí de labio blanco en el noroccidente de Sudamérica, mediante secuencias de un gen mitocondrial y microsatelites, utilizando métodos de distancias genéticas, máxima parsimonia, máxima verosimilitud y bayesianos.

4. Materiales y Metodología

Desde el año 1996, en el laboratorio de Genética de Poblaciones Molecular-Biología Evolutiva de la Pontificia Universidad Javeriana, se han obtenido más de 4.000 muestras de ambas especies de pecaríes en diversos países neotropicales (México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Bolivia, Paraguay). Para este estudio, se seleccionaron aquellas con orígenes geográficos más precisos y con ADN de mejor calidad.

4.1. Localidades de muestreo

Dos conjunto de muestras de *T. pecarí* fueron empleados en este estudio, uno para ADNmt y otra para los microsatélites (Tabla 1, 2, 3. Figura 1). Para el análisis de las secuencias de la región control de ADNmt, se analizaron 44 muestras de *T. pecari.*, procedentes del municipio Riosucio, Chocó (Colombia) fue secuenciada una muestra de *T. p spiradens*. De la provincia de Manabí (Ecuador), un individuo de *T. p. Aequatoris* fue analizado. Como representación de *T. p. pecari*, 14 individuos fueron secuenciados (uno de Tarapacá, departamento del Amazonas, (Colombia), siete del Parque Nacional Amacayacu cerca de Leticia, departamento de Amazonas, Colombia, cuatro del río Nanay, cerca de Iquitos, Perú, y dos de Santa Clotilde, río Curaray , Perú). *Albirostris* fue representado por 28 muestras (17 de tres poblaciones, Exaltación, Puerto Siles, Alejandria, en el río Mamoré, Bolivia; tres de Yurimaguas, río Huallaga, Perú; cuatro de Sierra Escalera, cerca de Tarapoto, departamento de San Martín, Perú y cuatro de Masisea, cerca de Pucallpa, Ucayali, Perú). Como grupo externo, se emplearon 15 muestras de *P. tajacu*. Una secuencia se obtuvo del Genbank (AY546541), una muestra que representa el grupo *tajacu* (Tabatinga, Amazonas, Brasil) y 13 muestras secuenciadas que representan el grupo *patira* (tres de Villavicencio, Meta, Colombia; siete del río Nanay, Perú, una de Yurimaguas, río Huallaga, Perú, una del río Curaray, Perú y una de Moyobamba, Departamento de San Martín en el Perú).

Para los marcadores de microsatélites, se analizaron 78 individuos de *T. pecari* (Figura 1). Tres individuos de *spiradens* (de Riosucio, Chocó, Colombia), dos ejemplares de la provincia de Manabí (Ecuador) representando *aequatoris*, 37 muestras de *pecari* de Colombia y Perú (dos de Florencia, departamento de Caquetá, Colombia, dos de Tarapacá, departamento de Amazonas, Colombia, 10 del Parque Nacional Amacayacu, departamento del Amazonas, Colombia, 2 de Puerto Inírida, departamento del Guainía, Colombia, 10 del río Putumayo, departamento de Putumayo, Colombia, y 11 muestras del río Nanay en el Departamento de Loreto, Perú) . Por último, 36 muestras de *albirostris* fueron genotipificadas procedente todas de las tres localidades bolivianas en el río Mamoré, anteriormente comentadas.

Tabla 1. Localidades de Muestreo para ADN mitocondrial (ADNmt) Pecari de Labio Blanco (*Tayassu pecari*)

Subespecie	Pais	N. muestras
Spiradensis	Colombia (Choco)	1
Aequatoris	Ecuador (Manabi)	1
Pecari		14
	Amazonas, Col	1
	Amacayacu, Col	7
	Iqitos R. Nanay Per	4
	R. Curarey Peru	2
Albirostris		28
	Bolivia: Exaltacion, Puerto Siles, Alejandria Rio Mamore.	17
	Perú: Rio Huallaga Yurimaguas	3
	Perú: Sierra Escalera San Martin	4
	Perú: Masisea, Pucalpa Ucayali	4
Albirostris	Bolivia	17
	Peru	11
Total		44

Tabla 2. Localidades de Muestreo para Microsatelites Labio Blanco (*Tayassu pecari*)

Subespecie	Pais	N. Muestras
Microsatelites Total		78
Spiradensis	Colombia (Riosucio, Choco)	3
Aequatoris	Ecuador (Manabi)	2
Pecari		37
	Colombia Florencia Caqueta	2
	Tarapaca- Amacayacu (Amazonas)	12
	Pto Inirida (Guainia)	2
	Rio Putumayo	10
	Peru Rio Nanay	11
Albirostris	Bolivia	36

Tabla 3. Locidades de Muestreo <out Group> *Tayassu tajacu*. Pecari de Collar

Subespecie	Pais	N. Muestras
Total		15
Genbank	AY546541	1
<i>Pecari tajacu</i>	Tabatinga, Amazonas, Brasil	1
<i>Pecari patira</i>		13
	Villavicencio. Colombia	3
	R. Nanay Perú	7
	Yuimaguas, R. Huallaga Perú	1
	Rio Curaray Perú	1
	Moyamba, Dpto San Martin Perú	1

Figure 1. Mapa de Sur América con localizaciones donde los individuos *Tayassu pecari* fueron muestreados y la distribución de las diferentes subespecies. Los puntos geograficos de muestreo para los análisis de microsatelites señalados designados con letras [A = Río Sucio, Departamento Chocó, Colombia (n = 3); B = Florencia, Departamento Caquetá, Colombia (n = 2); C = Puerto Inírida, Departamento Guainía, Colombia (n = 2); D = Manabí Provincia, Ecuador (n = 2); E = Río Putumayo, Colombia (n = 10); F = Tarapacá, Departamento Amazonas, Colombia (n = 2); Río Nanay, Departamento Loreto, Perú (n = 11); H = Parque Nacional Amacayacu, Departamento Amazonas, Colombia (n = 10); I = Río Mamoré, Departamento Beni, Bolivia (n = 36)]. Los puntos geograficamente muestreados para el gen region control DNA mitochondrial señalados con numeros [1 = Río Sucio, Departamento Chocó, Colombia (n = 1); 2 = Manabí Provincia, Ecuador (n = 1); 3 = Santa Clotilde, Río Curaray, Departamento Loreto, Perú (n = 2); 4 = Tarapacá, Departamento Amazonas, Colombia (n = 1); 5 = Río Nanay, Departamento Loreto, Perú (n = 4); 6 = Parque Nacional Amacayacu, Departamento Amazonas, Colombia (n = 7); 7 = Yurimaguas, Río Huallaga, Perú (n = 3); 8 = Tarapoto, Departamento San Martín, Perú (n = 4); 9 = Río Masisea, Departamento Ucayali, Perú (n = 4); 10 = Río Mamoré, Departamento Beni, Bolivia (n = 17)].



4.2. Métodos.

4.2.1. Procesamiento de muestras en laboratorio: Extracción de DNA

El ADN de músculo y de piel se obtuvo con fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989, Anexo 10), de animales muertos que generalmente se cazan para obtener carne y por su piel que es exportada. Adicionalmente, se extrajo ADN de pelo con bulbos utilizando la resina Chelex 10% (Walsh et al., 1991).

4.2.2. Amplificación por PCR y Secuenciación

4.2.2.1. PCR para ADN mitocondrial (ADN mt)

Se utilizaron primers para amplificar aproximadamente 1.120 pares de bases (pb) de la región de control del ADNmt (Kim et al., 2002) de los pecaríes analizados. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en volúmenes de reacción de 50 μ l, que contiene 50 mM de KCl, 4 μ l de 10 \times tampón, 0,1% de Triton X-100, 3 mM MgCl₂, 1 mM de dNTPs, 1 M de cada cebador, 2 unidades de Taq ADN polimerasa, 13,5 μ l de H₂O, y 2 μ l de ADN. Las condiciones de PCR incluían una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min seguido de 10 ciclos de 1 min a 72 ° C, 1 min a 64 ° C y 2 min a 72 ° C, 25 ciclos de 1 min a 95 ° C, 1 min a 60 ° C y 2 min a 72 ° C con una extensión final de 10 min a 72 ° C.

Se utilizó el marcador de peso molecular ϕ X174 ADN digerido con HindIII y HinfI para comprobar todas las amplificaciones. Se incluyeron controles positivos y negativos, en geles de agarosa al 2%. Las muestras amplificadas fueron enviadas para secuenciación automática a MACROGEN U.S.A.

4.2.2.2. PCR para Microsatélites

Tres pares de primers de microsatélites porcinos (IGF1, SW857 y SW951, Kim 2002) se aplicaron a los 78 *T. pecari* analizados. IGF-1 se encuentra en el cromosoma porcino 5 y el rango de pares de bases (bp) es de 194-210 para el cerdo doméstico. SW857 se encuentra en el cromosoma porcino 14 y el rango de tamaño es de 144 a 162 pb para el cerdo doméstico. SW951 se encuentra en el cromosoma porcino 10 y el rango de tamaño es de 124-133 pb.

El volumen final de la PCR y las concentraciones de reactivos para la reacción fueron 25 μ l, con 2,5 μ l de MgCl₂ 3 mM, 2,5 μ l de tampón 10 X, 0,5 μ l de dNTPs 0,2 mM 1 μ l de cada primer reverse and forward; 4 pmol, 14,5 μ l de H₂O, 2 μ l de ADN y 1 unidad de Taq polimerasa por reacción de (1 μ l). Estas condiciones se modificaron a partir de Góngora et al., (2004). Para las reacciones de PCR con los pelos, el volumen total fue de 50 μ l, con 20 μ l de ADN y cantidades doble de MgCl₂, tampón, dNTP, primers y Taq polimerasa.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer Geneamp PCR System 9600 termociclador durante 5 min a 95 ° C, 30 ciclos de un minuto a 94 ° C, 1 min a 55 ° C, 1 min a 72 ° C y 5 min a 72 ° C. Los productos de amplificación se mantuvieron a 4 ° C hasta que se utilizaron. Los productos de amplificación de PCR se corrieron en condiciones denaturantes en geles al 6% de poliacrilamida en una cámara vertical Hoefer SQ3. Dependiendo del tamaño de los marcadores analizados y con 35 W (Anexo 10) como constante, los geles se tiñeron con AgNO₃ (nitrato de plata) después de 2-3 h de migración. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron ϕ 174 (digerido con Hind III) y Hin f. Las reacciones de PCR se repitieron 3 veces para el ADN extraído de los pelos con el fin de confirmar los genotipos obtenidos de este material.

4.3. Análisis genético poblacional

4.3.1. ADN mitocondrial

Los estadísticos utilizados para determinar la diversidad genética fueron: el número de sitios polimórficos (S), la diversidad haplotípica (Hd), la diversidad nucleotídica (π) y el estadístico θ por secuencia. Varios estadísticos se llevaron a cabo para estimar la heterogeneidad genética, y algunas estimaciones de flujo genético, entre las diversas subespecies morfológicas de *T. pecari* consideradas en este trabajo. Un procedimiento se aplicó a las frecuencias de haplotipos (estadístico G_{ST} ; Nei, 1973) y otras estadísticos de heterogeneidad genética fueron aplicados a las secuencias de nucleótidos (γ estadísticas F_{ST} , y N_{ST} , ver Hudson et al, 1992a.). Además, se realizaron las pruebas de H_{ST} , K_{ST} , K_{ST}^* , Z y Z^* (Hudson et al., 1992a, b), S_{nn} (Hudson, 2000) y chi-cuadrado (en las frecuencias de haplotipos con pruebas de permutación de 10.000 réplicas). Estos estadísticos de diversidad genética y heterogeneidad genética se estimaron con los programas DNAsp 5,1 (Librado y Rozas, 2009) y Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

4.3.2. Los análisis filogenéticos

Los alineamientos de secuencias se llevaron a cabo manualmente y con el programa ADN alignment (Fluxus Technology Ltd.). El software Modeltest (Posada y Crandall, 1998) y el software Mega 5.1 (Tamura et al., 2011) se aplicaron para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica para las 59 secuencias analizadas. Tres criterios se utilizan para determinar el mejor modelo de evolución nucleotídica para el árbol de máxima verosimilitud obtenida: criterio de información bayesiana (BIC; Schwartz, 1978), los criterios de información de Akaike (AIC; Akaike, 1974) y la prueba de razón de verosimilitud jerárquica (LnL; Huelsenbeck y Crandall, 1997).

Se obtuvieron las estimaciones de máxima verosimilitud del cociente de transición / transversion, así como las estimaciones de máxima verosimilitud de los parámetros gamma para las tasas de sustitución para los mejores modelos de sustitución nucleotídica obtenidos (Tamura et al., 2011).

Los árboles filogenéticos se obtuvieron por medio de dos procedimientos diferentes: 1 - Neighbor-joining (NJ; Saitou y Nei, 1987) con la distancia de los tres parámetros de Tamura (Tamura, 1992) y 2 – árbol de máxima verosimilitud (ML; Felsenstein, 1981) con el modelo de tiempo general reversible (GTR). Los árboles se construyeron con el programa PAUP * 4.0b8 (Swofford, 2002) y MEGA 5.1.

4.3.3. Cambios demográficos

Se utilizaron los siguientes procedimientos para determinar posibles cambios históricos de la población de pecarí de labio blanco del noroccidente de Sudamérica: 1) – “mismatch distribution” (diferencias de pares de secuencias) se obtuvo siguiendo el método de Rogers y Harpending (1992) y Rogers et al, (1996). 2) Se utilizó la estadística rg raggedness (Harpending et al., 1993, 1994) y 3) el estadístico R^2 de Ramos-Onsins y Rozas (2002) para determinar la similitud entre las curvas observadas y las curvas teóricas. 4) - Se utilizaron los tests D y F de Fu y Li (Fu y Li, 1993), el estadístico FS de Fu (Fu, 1997) y la prueba de D de Tajima (Tajima 1989) (originalmente creado para detectar la selección natural que afecta a las secuencias de ADN) para determinar los posibles cambios en el tamaño de la población de pecarí de labio blanco del noroccidente de Sudamérica (Simonsen et al, 1995; Ramos-Onsins y Rozas, 2002). La posible significación de estos estadísticos se realizó con 10.000 repeticiones de coalescencia.

4.4. Analisis Genetico Poblacional para Microsatélites

La heterocigosidad esperada (H) (Nei, 1973, 1978), su desviación estándar, el número medio de alelos y su desviación estándar se estimaron para la muestra total de *T. pecari*, así como para las dos muestras que representan *pecari* y *albirostris*.

Se utilizó el programa GeneClass 2 (Piry et al., 2004) para desarrollar análisis de asignación poblacional. Diferentes estrategias se llevaron a cabo mediante el uso de dos procedimientos bayesianos (Rannala y Mountain, 1997; Badouin y Lebrun, 2000), un procedimiento de frecuencia (Paetkau et al, 1995.) y un procedimiento

de distancias genéticas (distancia genética estándar, Nei, 1972; Cavalli-Sforza y Edwards, 1967 y $\delta \mu^2$ distancia genética, Goldstein et al., 1995). Los análisis de asignación se realizaron sin simulaciones para la estimación de las probabilidades de pertenencia o exclusión de los individuos a las supuestas subespecies morfológicas donde estaban "a priori" clasificadas ($P < 0,05$). También algunos análisis de asignación se realizaron con 10.000 simulaciones de remuestreo por medio de la técnica de Monte Carlo, con el procedimiento de Paetkau et al., (2004) y el procedimiento de Rannala y Mountain (1997). Además, se estimó la posible existencia de inmigrantes de primera generación en las diferentes subespecies de *T. pecari* consideradas. Para ello, se utilizaron los procedimientos bayesiano, de frecuencia y de distancias genéticas comentados anteriormente, sin simulaciones. Para determinar esto, se consideró la relación: $L = L_{home} / L_{max}$, que es la relación de la probabilidad calculada a partir de la población en la que se tomaron muestras del individuo (L_{home}) sobre el valor de probabilidad más alta entre todas las muestras de población (L_{max}) (Paetkau et al., 2004).

Por último, otro análisis de asignación se aplicó a los perfiles de genotipos multilocus de los 78 pecaríes analizados. Este análisis de asignación se aplicó por medio del software 2.3 Structure (Pritchard et al, 2000; Falush et al, 2003).

Este método, que emplea cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), utiliza genotipos multilocus para inferir la estructura de la población, y los individuos se asignan simultáneamente a poblaciones específicas. El modelo considera K poblaciones, donde K puede ser desconocido, y los individuos se asignan tentativamente a una población o conjuntamente a dos o más poblaciones si se consideran sus genotipos mezclados. Dos análisis se llevaron a cabo. En el primero de ellos, tenemos en cuenta el modelo de mezcla, donde los individuos pueden tener ascendencia mixta. En este modelo, se considera sin información de la población antes de asignar a la agrupación ($USEPOPINF = 0$), inferir α (parámetro de Dirichlet para grado de mezcla, con un valor inicial de $\alpha = 1$), con el valor de α el mismo para todas las poblaciones, con antecedentes uniforme de α y un valor máximo de este parámetro de 10. Las frecuencias alélicas se

consideraron correlacionadas entre las poblaciones, asumiendo diferentes valores de F_{ST} para cada población diferente y con una media previa de la F_{ST} de 0,09 y un valor constante de $\lambda = 1$. La presencia del número más probable de acervos genéticos en los datos considerados se revela por el valor más elevado de máxima verosimilitud. El segundo análisis se realizó con un modelo con información geográfica y subespecífica previa, que ayuda a agrupar datos estructurados débilmente para determinar los migrantes o para detectar poblaciones ligeramente diferentes (USEPOPINF = 1) (Hubisz et al., 2009). En este caso, introducimos LocPrior = 1, Gensback = 2 y Migprior = 0,05. En cada uno de los análisis, el programa se ejecutó con 1 millón de iteraciones después de un periodo de bur-in de 100.000 iteraciones. Cada análisis se realizó dos veces con resultados convergentes.

5. Resultados

5.1. Diversidad genética

5.1.1. ADNmt

La diversidad genética de la muestra total de *T. pecari* analizada mostró 44 haplotipos diferentes (cada uno mostró un haplotipo diferente). El número de sitios polimórficos fue de 351, la diversidad de haplotipos, $H_d = 1 \pm 0,005$, la diversidad nucleotídica, $\pi = 0,0882 \pm 0,019$ y el θ por secuencia = $80,69 \pm 18,55$. Por lo tanto, los niveles de diversidad genética encontrada para la muestra total de *T. pecari* estudiados fueron muy elevadas. Para las dos subespecies morfológicas, que el número de muestras fue suficiente, los niveles de diversidad genética fueron los siguientes: *pecari pecari* mostró 268 sitios polimórficos segregantes, 14 haplotipos, $H_d = 1 \pm 0,027$, $\pi = 0,0597 \pm 0,0291$ y θ por secuencia = $84,273 \pm 26,50$, por su parte *pecari albirostris* mostraron 312 sitios polimórficos, 28 haplotipos, $H_d = 1 \pm 0,010$, $\pi = 0,1044 \pm 0,0229$ y θ por secuencia = $80,176 \pm 20,603$. Por lo tanto, para ambas subespecies, así como para la muestra total, los niveles de diversidad genética fueron extremadamente altos para este marcador mitocondrial.

5.1.2. Microsatélites

En la Tabla 4 se muestran las diferentes estadísticas de diversidad génica para los tres microsatélites estudiados. A nivel global, en el locus IGFI, se encontraron 10 alelos (224-246 pb), en el locus SW857 (117-167 pb) 21 alelos y se observaron en el locus SW951 (105-131 pb) seis alelos. La heterocigosidad esperada total fue 0.667. Las muestras que representan *pecari pecari* mostraron el mayor número promedio de alelo ($10,667 \pm 3,018$), seguido de *pecari albirostris* ($5,667 \pm 1,155$). Idéntica situación se encontró para la heterocigosidad media esperada con *pecari pecari* que mostró el valor más alto ($H = 0,616 \pm 0,392$), seguido por *pecari albirostris* ($H = 0,528 \pm 0,143$). Los valores *pecari aequatoris* y *spiradens* realmente no son realistas porque no hay suficientes muestras analizadas para

estas taxa putativos. El número promedio de alelos fue significativamente mayor para *pecari pecari* que para *pecari albirostris*, pero no se encontraron diferencias significativas para la heterocigosidad media esperada.

Tabla 4. Diversidad Genética (NA= Numero de alelos; H= Heterocigosidad Esperada; Valores con Desviaciones estándar) con tres microsatelites porcinos (IGF1, SW857 y SW951) aplicados a la especie pecari de labio blanco representando a las 4 subespecies morfológicas presentes en el sur de America

<i>Tayassu pecari</i> subspecies	IGF1	SW857	SW951	Valores Promedio de tres microsatelites para cada una de las subespecies
<i>T. pecari albirostris</i>	N _A = 5 H = 0.639	N _A = 7 H = 0.579	N _A = 5 H = 0.367	N _A = 5.667 ± 1.155 H = 0.528 ± 0.143
<i>T. pecari aequatoris</i>	N _A = 1 H = 0.000	N _A = 2 H = 0.500	N _A = 1 H = 0.000	N _A = 1.000 ± 1.000 H = 0.250 ± 0.273
<i>T. pecari spiradens</i>	N _A = 2 H = 0.533	N _A = 1 H = 0.000	N _A = 2 H = 0.333	N _A = 1.667 ± 0.577 H = 0.289 ± 0.269
<i>T. pecari pecari</i>	N _A = 10 H = 0.798	N _A = 20 H = 0.883	N _A = 2 H = 0.166	N _A = 10.667 ± 9.018 H = 0.616 ± 0.392
Average for the four subspecies at each marker	N _A = 4.5 H = 0.493	N _A = 7.5 H = 0.490	N _A = 2.25 H = 0.289	

5.2. La heterogeneidad genética

5.2.1.mtDNA

Ningún estadístico de heterogeneidad genética (Tabla 5) mostró valores significativos para las secuencias mitocondriales. De hecho, las estimaciones de flujo genético (Nm) para todos ellos fueron elevadas (NmGst = 168; NmNST = 12,51). Por lo tanto, no se encontró evidencia de heterogeneidad genética

molecular significativa, lo cuál no está de acuerdo con las supuestas subespecies morfológicas.

Tabla 5. Estadísticos de Heterogeneidad Genética – Diversidad genética con el gen región control mitocondrial para cuatro subespecies *Tayasuu pecari* estudiadas. GL = Grados de libertad. Flujo genético (Nm) estimado para todo los estadísticos fue alto

Estadísticos	Valor	Prob	Statistics	Nm
χ^2	42.0 41 gl	0.4274	$G_{st} = 0.0029$	168.00
H_{st}	0.0	1.0000	$\gamma_{st} = 0.0355$	13.56
K_{st}	0.01338	0.1005	$N_{st} = 0.0384$	12.51
K_{st}^*	0.00211	0.2512	$F_{st} = 0.0301$	16.12
Z	426.98593	0.2050		
Z^*	5.76165	0.3463		
S_{nn}	0.65476	0.0899		

5.2.2. Microsatélites

Cuando las cuatro subespecies *T. p. pecari*, *T. p. spiradensis*; *T.p. albirostris*, *T. p. aequatoris* fueron analizadas simultáneamente para el test exacto G en los tres microsatélites, todos ellos mostraron una heterogeneidad genética significativa (IGF1: P = 0,0000001; SW857: P = 0,0000001; SW951: P = 0.0074; Todos ellos simultáneamente: infinito, 6 gl). En la Tabla 5, se muestran los valores de F_{ST} y R_{ST} . Por tanto, IGF1 y SW857, arrojaron valores de F_{ST} significativas (IGF1: $F_{ST} = 0,103$, P <0,001; SW857: $F_{ST} = 0,147$, P <0,001), mientras que SW951 no mostró heterogeneidad genética significativa con la corrección de Bonferroni ($\alpha' = 0.016$) ($F_{ST} = 0,019$; NS).

El uso de las pruebas exactas G por pares de subespecies mostró que todos los pares que implican *pecari albirostris* fueron significativas (*pecari albirostris-pecari aequatoris*: $\chi^2 = 33,424$, gl 4, P <0,000001; *pecari albirostris-pecari spiradens*: $\chi^2 =$ infinito, 6 gl, P <0,000000001; *pecari albirostris-pecari pecari*: $\chi^2 =$ infinito, 6 gl, P <0,00000001), mientras que los valores relativos a *pecari pecari*, *pecari aequatoris* y *pecari spiradens* no fueron significativas en ambos casos (*pecari*

pecari-pecari aequatoris : $\chi^2 = 11,746$, df 4, $P < 0,019$; *pecari albirostris-pecari spiradens*: $\chi^2 = 12,319$, df 6, $P < 0,055$; *pecari aequatoris-pecari spiradens* $\chi^2 = 5,279$, gl 4, $P < 0,259$; corrección de Bonferroni , $\alpha' = 0,0083$). Por lo tanto, los tres microsatélites empleados diferencian a *albirostris* de las otras supuestas subespecies, pero no diferenciaron *pecari-aequatoris-spiradens* de manera idéntica como se demostró con las secuencias mitocondriales. De hecho, el nivel de flujo génico entre todas estas supuestas subespecies morfológicas, utilizando el modelo de alelos privados, fue alta ($Nm = 5.14$).

Tabla 6. Valores de Heterogeneidad Genética de FST (y probabilidades) y Estadísticos RST para tres microsatélites (IGF1, SW857 y SW 951) analizados para cuatro subespecies morfológicas de *Tayasu pecari* en el noroeste de Sur América

* Significativa con $\alpha = 0.016$ (Probabilidad con corrección Bonferroni)

Microsatellite	F _{ST}	Probability	R _{ST}
<i>IGF1</i>	0.103	$P < 0.001^*$	0.151
<i>SW857</i>	0.147	$P < 0.001^*$	0.303
<i>SW951</i>	0.019	$P < 0.02$	0.000
Average	0.111	$P < 0.001^*$	Weighted procedure: 0.245 Goodman procedure: 0.156 Unweighted procedure: 0.149

Los resultados con el programa GeneClass 2.0 muestran que sólo entre el 55,13% (distancia genética $\delta\mu^2$) y el 64.10% (distancia de Cavalli-Sforza y Edwards 1967) de los individuos analizados fueron bien clasificados en sus supuestas subespecies morfológicas (Tabla 7). Tomado uno de éstos procedimientos como ejemplo (Rannala y Mountain, 1997; Tabla 7), dentro de *pecari albirostris*, 11,11% (4/36) de los ejemplares fueron clasificados como *pecari pecari*, en *pecari aequatoris*, el 50% (1 / 2) de los individuos se adicionaron a *pecari spiradens*, en *pecari spiradens*, 33,33% (1/3) de los animales estudiados se clasificaron como *pecari albirostris*, mientras que dentro de *pecari pecari*, 16,22% (6/37) de las muestras fueron clasificadas como *pecari spiradens* , 16,22% (6/37) se clasificó

como *pecari aequatoris* y 35,13% (13/37) se determinó como *pecari albirostris*. Al igual, como se determinó con los árboles filogenéticos para el gen mitocondrial, los resultados de microsatélites no mostraron clara consistencia con las subespecies morfológicas propuestas.

Tabla 7. Porcentajes de clasificación errónea de especímenes de pecari labio blanco dentro de otras subespecies diferentes a las subespecies morfológicas clasificados por software GeneClass 2.0

<p>Rannala & Mountain (1997)' s procedure: Correctly assigned 60.3 %</p> <p><i>T. p. albirostris</i> assigned as <i>T. p. pecari</i>: 11. 1 % (4/36)</p> <p><i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 50 % (1/2)</p> <p><i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 33 % (1/3)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 16.22 % (6/37)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i>: 16.22 % (6/37)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 35.13 % (13/37)</p>
<p>Badouin & Lebrun (2000)' s procedure: Correctly assigned 57.7 %</p> <p>1- <i>T. p. albirostris</i> assigned as <i>T. p. pecari</i>: 8.33 % (3/36)</p> <p>2- <i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 50 % (1/2)</p> <p>3- <i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 33 % (1/3)</p> <p>4- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 27.03 % (10/37)</p> <p>5- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i>: 13.51 % (5/37)</p> <p>6- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 35.13 % (13/37)</p>
<p>Paetkau et al., (1995)' s procedure: Correctly assigned 62.8 %</p> <p><i>T. p. albirostris</i> assigned as <i>T. p. pecari</i>: 8.33 % (3/36)</p> <p><i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 50 % (1/2)</p> <p><i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. pecari</i>: 50 % (1/2)</p> <p><i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 33 % (1/3)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 16.22 % (6/37)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i>: 5.4 % (2/37)</p> <p><i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 40.54 % (15/37)</p>
<p>Nei (1972)' s procedure: Correctly assigned 56.4 %</p> <p>1- <i>T. p. albirostris</i> assigned as <i>T. p. pecari</i>: 36.11 % (13/36)</p> <p>2- <i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 50 % (1/2)</p> <p>3- <i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 33 % (1/3)</p> <p>4- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 13.51 % (5/37)</p> <p>5- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i>: 5.41 % (2/37)</p> <p>6- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 32.43 % (12/37)</p>
<p>Cavalli-Sforza & Edwards (1967)' s procedure: Correctly assigned 64.1 %</p> <p>1- <i>T. p aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 50 % (1/2)</p> <p>2- <i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i>: 33 % (1/3)</p> <p>3- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i>: 18.92 % (7/37)</p>

4- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i> : 5.4 % (2/37)
5- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i> : 45.94 % (17/37)
Goldstein et al., (1995)' s procedure: Correctly assigned 55.1 %
1- <i>T. p. albirostris</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i> : 2.78 % (1/36)
2- <i>T. p. aequatoris</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i> : 100 % (2/2)
3- <i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. pecari</i> : 33 % (1/3)
4- <i>T. p. spiradens</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i> : 66.6 % (2/3)
5- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. spiradens</i> : 27.03 % (10/37)
6- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. aequatoris</i> : 5.4 % (2/37)
7- <i>T. pecari pecari</i> assigned as <i>T. p. albirostris</i> : 45.94 % (17/37)

Cuando se calculó el cociente de probabilidad L_{home} / L_{max} para determinar el número de inmigrantes de primera migración, la imagen fue muy similar (Tabla 8) a los resultados descritos anteriormente. Veintisiete individuos migrantes fueron detectados con la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967); por su parte se detectaron 35 individuos migrantes con la distancia $\delta\mu^2$. También, como ejemplo, con el procedimiento de Rannala y Mountain (1997), se mostró un 39,74% (31/78) de los individuos migrantes, con el 11,11% de los migrantes dentro de *pecari albirostris*, 50% dentro de *pecari aequatoris*, 33,33% en *spiradens* y el 67,57% en *pecari pecari*.

Tabla 8. Porcentaje de posibles animales migrantes dentro de otra diferente subespecie morfológica perteneciente a pecari de labio blanco mediante cociente de probabilidad L_{home}/L_{max} con el software GeneClass 2.0

<p>Rannala & Mountain (1997)' s procedure: 31 possible migrants with $P < 0.05$ (39.74 %)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>T. p. albirostris</i>: 11.11 % (4/36) 2. <i>T. p. aequatoris</i>: 50 % (1/2) 3. <i>T. p. spiradens</i>: 33.33 % (1/3) 4. <i>T. p. pecari</i>: 67.57 % (25/37)
<p>Badouin & Lebrun (2000)' s procedure: 33 possible migrants with $P < 0.05$ (42.31 %)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- <i>T. p. albirostris</i>: 5.05 % (2/36) 2- <i>T. p. aequatoris</i>: 50 % (1/2) 3- <i>T. p. spiradens</i>: 33.33 % (1/3) 4- <i>T. p. pecari</i>: 72.97 % (27/37)
<p>Nei (1972)' s procedure: 32 possible migrants with $P < 0.05$ (41.02 %)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>T. p. albirostris</i>: 36.11 % (13/36) 2. <i>T. p. aequatoris</i>: 50 % (1/2) 3. <i>T. p. spiradens</i>: 0 4. <i>T. p. pecari</i>: 48.65 % (18/37)
<p>Cavalli-Sforza & Edwards (1967)' s procedure: 27 possible migrants with $P < 0.05$ (34.61 %)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- <i>T. p. albirostris</i>: 0 2- <i>T. p. aequatoris</i>: 0 3- <i>T. p. spiradens</i>: 33.33 % (1/3) 4- <i>T. p. pecari</i>: 70.27 % (26/37)
<p>Goldstein et al., (1995)' s procedure: 35 possible migrants with $P < 0.05$ (44.87 %)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- <i>T. p. albirostris</i>: 2.78 % (1/36) 2- <i>T. p. aequatoris</i>: 50 % (1/2) 3- <i>T. p. spiradens</i>: 100 % (3/3) 4- <i>T. p. pecari</i>: 81.08 % (30/37)

Los dos análisis con el programa Structure 2.3 (Tabla 9 y Figura 2) mostraron conclusiones idénticas, aunque los resultados fueron mejores para el análisis mediante el uso de la información a priori con respecto a los orígenes geográficos y subespecies (USEPOINFO = 1; LocPrior = 1). En ambos casos, los resultados fueron mejores cuando se consideraron dos poblaciones ($K = 2$) con mezcla y con migración entre ellos (estimado \ln probabilidad de los datos de -583,5 y -571,7, respectivamente). La primera población estuvo conformada por los individuos *pecari albirostris* de Bolivia y sur del Perú, con un alto flujo de genes con la

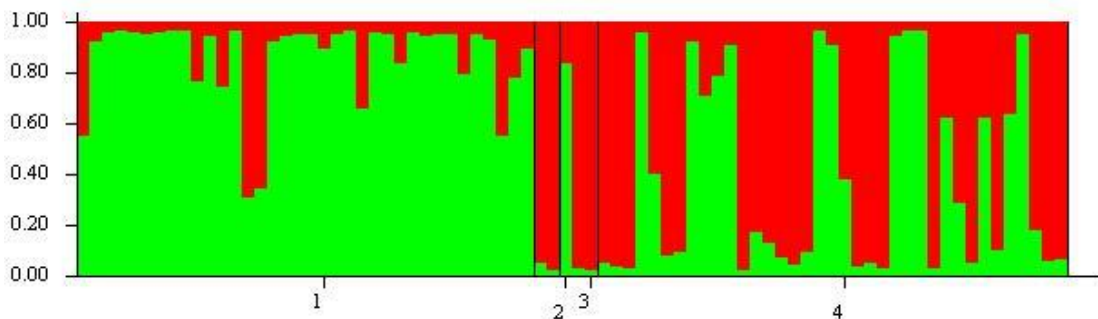
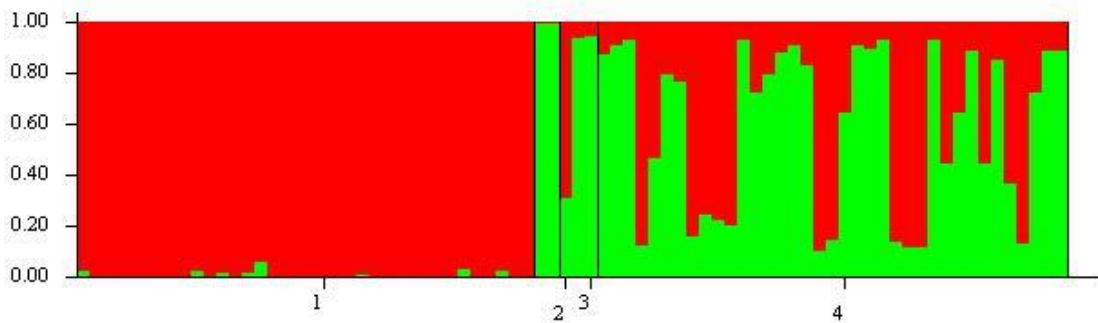
segunda población. Esta última población fue conformada por los individuos de las otras tres subespecies (*aequatoris*, *spiradens* y *pecari*) y también mostró una mezcla muy elevada con la primera población.

Por lo tanto, tanto el ADNmt y los microsatélites no concordaron bien con las subespecies morfológicas determinados para el pecarí de labio blanco en la zona noroccidental de América del Sur para este trabajo.

Tabla 9. Análisis de Asignación con Programa Structure. A. Sin Información previa de la población agrupamiento con asignación (USEPOPINF = 0). Mejores resultados con K = 2 (dos poblaciones diferentes). B Con previa información geográfica y subespecies (USEPOPINF = 1) También los mejores resultados con K = 2 (dos diferentes poblaciones) K = Número de poblaciones; ELn = Probabilidad estimada Ln de los datos.

A	ELn	B	ELn
K = 1	-632.8	K = 1	-632.7
K = 2	-583.5	K = 2	-571.7
K = 3	-586.2	K = 3	-675.1
K = 4	-594.7	K = 4	-575.4
K = 5	-619.0	K = 5	-575.9
K = 6	-634.1	K = 6	-576.5
K = 7	-654.8	K = 7	-576.7

Figura 2. Analisis de Asignación con el programa Structure. A. Sin información previa de la población para asignar agrupamientos (USEPOPINF = 0). Los mejores resultados con K = 2 (dos poblaciones diferentes) B. Con información previa geográfica y de subespecies (USEPOPINF = 1). Tambien los mejores resultados fueron con K = 2 (dos poblaciones diferentes) con migración extensiva dentro ellas, especialmente de la primera población dentro de la segunda población. 1 = *T. pecari albirostris*; 2 = *T pecari aequatoris*; 3 = *T. pecari spiradens*; 4 = *T. pecari pecari*.



5.3. Inferencias Filogeneticas para MtDNA

Las frecuencias de nucleótidos encontradas fueron A = 32.95%, T = 27.12%, C = 27,37%, y G = 12,56%. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue GTR (+ G) (+ I) para los tres criterios utilizados (BIC = 13,394.888; AIC = 12,639.548 y lnL = -6,224.341). El cociente de transición / transversion estimado (R) fue de 5,5, suponiendo un modelo GTR (-7758.673). El valor estimado del parámetro de forma de la distribución Gamma discreta fue 1.536 en el modelo GTR (+ G) (-7602,293).

Tanto los árboles de máxima verosimilitud y NJ mostraron monofilia entre *T. pecari* y *P. tajacu* (Figura 3). También ambos árboles mostraron tres clados robustos dentro de *T. pecari*. Hemos llamado a estos clados I (69 a 94% de bootstrap), II (93-100%) y III (81-82%). Sólo tres individuos cambiaron sus posiciones en ambos grupos de árboles (dos ejemplares bolivianos y un ejemplar peruano de Tarapoto). No hay correlación entre las supuestas subespecies morfológicas y estos tres clados moleculares bien definidos. En el clado I, encontramos individuos de *pecari pecari* de la Amazonia colombiana y peruana y *pecari albirostris* de Bolivia y sur del Perú. En el clado II, tenemos ejemplos de *pecari pecari* de la Amazonía peruana y colombiana, un individuo de *pecari aequatoris* de Ecuador, un individuo de *pecari spiradens* del Chocó colombiano y los individuos de *pecari albirostris* de la Amazonía peruana y boliviana. En el clado III, sólo se encontraron animales peruanos, pero que representa tanto las subespecies *pecari pecari* y *pecari albirostris*. Por lo tanto, no se encontraron subespecies morfológicas a nivel molecular y los tres linajes moleculares se encontraron viviendo en simpatría en diferentes áreas.

Figura 3. Arbol A. Maxima Verosimilitud. B Neighbor – joining (con distancia de Tamura 3P) para secuencias de individuos de Tayasuu pecari con el gen Region Control mitocondrial. En los nodos, porcentajes de bootstrap. En colores diferentes, las diferentes especies de T. pecari analizadas



0.1



0.05

5.4. Genética demográfica para Microsatelites

La distribución mismacht no mostró ningún cambio histórico significativo de la población durante su evolución en zona noroeste de Sudamérica. Los diversos estadísticos empleados tampoco detectan cambios demográficos significativos (Figura 4 y la Tabla 7), con la excepción del estadístico FS de Fu (FS = -9,087, P = 0,0052), que se ajustaría bastante bien con una expansión de la población. Sin embargo, no se encontró evidencia clara de posibles cambios demográficos durante la historia de la población de *T. pecari* en el norte-oeste de América del Sur.

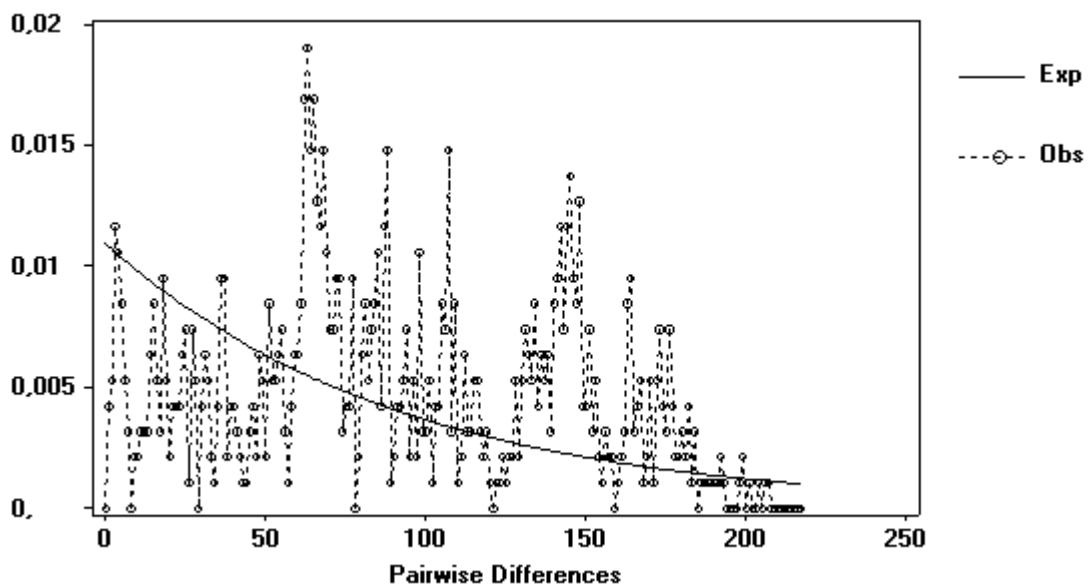
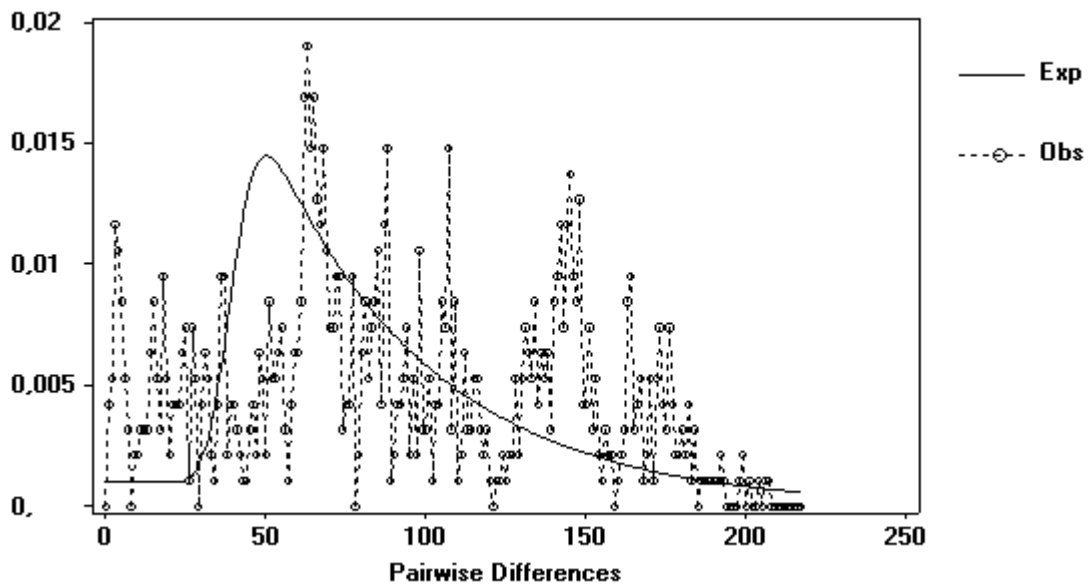
Tabla 10. Estadísticos demográficos aplicados al total de las muestras de *Tayasu pecari* estudiadas y para dos subespecies de *T. pecari* (*T.p pecari* y *T.p albirostris*) analizadas con el gen región controlDNA mitocondrial mtDNA
* P < 0.05; ** P < 0.01.

<i>T. pecari</i>	Tajima D	Fu and Li D*	Fu and Li F*	Fu's Fs	raggedness rg	R2
	P[D ≤ -1.328] = 0.074 [-1.642, 1.766]	P[D* ≤ -1.066] = 0.1257 [-2.536, 1.224]	P[F* ≤ -1.390] = 0.0906 [-2.542, 1.484]	P[Fs ≤ -9.087] = 0.005** [-6.267, 6.345]	P[rg ≤ 0.0065] = 0.8364 [0.0018, 0.0115]	P[R2 ≤ 0.1413] = 0.8868 [0.0628, 0.1661]

<i>T. pecari pecari</i>	Tajima D	Fu and Li D*	Fu and Li F*	Fu's Fs	raggedness rg	R2
	P[D ≤ -1.152] = 0.1138 [-1.755, 1.633]	P[D* ≤ -1.223] = 0.1258 [-2.214, 1.181]	P[F* ≤ -1.384] = 0.1237 [-2.457, 1.385]	P[Fs ≤ -0.726] = 0.291 [-2.251, 4.934]	P[rg ≤ 0.0065] = 0.0005** [0.0101, 0.071]	P[R2 ≤ 0.1413] = 0.5268 [0.0904, 0.2049]

<i>T. pecari albirostris</i>	Tajima D	Fu and Li D*	Fu and Li F*	Fu's Fs	raggedness rg	R2
	P[D ≤ -0.984] = 0.1584 [-1.682, 1.682]	P[D* ≤ -0.837] = 0.176 [-2.549, 1.659]	P[F* ≤ 1.047] = 0.1417 [-2.602, 1.448]	P[Fs ≤ -3.047] = 0.05* [-4.455, 5.336]	P[rg ≤ 0.0065] = 0.4067 [0.0032, 0.0202]	P[R2 ≤ 0.1413] = 0.7945 [0.0724, 0.7874]

Figura 4. Distribución Mismatch (diferencias de par de secuencias) con el gen de Region control mitocondrial de poblaciones de *Tayassu pecari* analizadas del noroeste de Sur América. A Asumiendo un tamaño constante de población; B Asumiendo una expansión poblacional. No evidencias claras sobre cambios demograficos.



6. Discusión

6.1. Diversidad genética

La diversidad genética que se encontró en la región control mitocondrial fue muy alta para la muestra global de *T. pecari*, así como para las dos subespecies morfológicas analizadas. Esto podría explicarse debido a que esta secuencia mitocondrial evoluciona más rápidamente que otros marcadores mitocondriales y nucleares (Pesole et al., 1999). Podría ser también una indicación de que el tamaño efectivo de la población histórica de esta especie ha sido grande.

Por otro lado, nuestro trabajo con microsatélites determinó un mayor número de alelos que en el de Biondi et al, (2011) con *T. pecari* (IGF1, 10 vs tres alelos; SW857, 21 vs tres alelos). Esto es lógico, ya que la muestra que se analizó, se obtuvo en una zona mucho más amplia que el estudio de Biondi et al., (2011).

La heterocigosidad esperada para los microsatélites utilizados en la muestra de *T. pecari* fue de 0.667, que es un nivel medio-alto de diversidad genética, mientras que para las dos subespecies putativas con mayores tamaños muestrales, *pecari pecari* ($H = 0,616 \pm 0,392$) y *pecari albirostris* ($H = 0,528 \pm 0,143$), los valores fueron ligeramente inferiores. Estos niveles de diversidad de genes son muy similares a las dos poblaciones de pecarí estudiados en el Pantanal brasileño por Biondi et al., (2011) ($H = 0,57 \pm 0,25$ y $H = 0,58 \pm 0,26$, respectivamente). La diversidad genética encontrada en la segunda subespecie fue similar a la observada para las diferentes razas de cerdos ibéricos de un panel de 25 microsatélites porcinos (Entrepelado: $H = 0,541$; Retinto Extremeño: $H = 0,503$; Lampiño: $H = 0,561$; Torbiscal: $H = 0,484$; Mamellado porción Silvela: $H = 0,539$; Duroc: $H = 0,534$; Chato puro: $H = 0,290$; Martínez et al, 2000) y en 11 razas de porcino europeo (Vasca, Francia: $H = 0,35$; Pietrain de Bélgica: $H = 0,60$; Laval et al, 2000). La muestra global y la muestra *pecari pecari* mostraron más elevados niveles de diversidad genética con respecto a estas razas de cerdos y una

diversidad genética similar a la determinada para el cerdo Criollo cubano ($H = 0,654$ para un panel de 20 microsatélites; Pérez et al, 2004) . Sin embargo, los niveles de diversidad genética de *T. pecari* encontrados fueron claramente inferiores a los obtenidos para otras razas de cerdos, ya que las 18 razas chinas indígenas estudiadas por Yang et al., (2003), tuvieron valores que oscilaron desde 0,700 hasta 0,876.

6.2. Heterogeneidad genética y la existencia de subespecies dentro de *T. pecari* en el noroeste de América del Sur

La heterogeneidad genética media obtenida con los microsatélites para la muestra de *T. pecari* fue relativamente pequeña ($F_{ST} = 0,09$). Fue similar al grado de heterogeneidad genética encontrado por Yang et al., (2003) para 18 razas de cerdo chino ($F_{ST} = 0,077$) y era significativamente menor que la heterogeneidad genética que fue encontrada por Laval et al., (2000) para 11 razas porcino europeo ($F_{ST} = 0.270$). Así, las diferentes razas porcinas europeas mostraron más heterogeneidad genética que la observada entre las subespecies morfológicas de *T. pecari*, lo cual indica que las subespecies de *T. pecari* descritas en el noroeste de América del Sur no existen desde el punto de vista molecular. La heterogeneidad genética encontrada para mtDNA fue incluso menor que la detectada con microsatélites, lo cuál ratifica esta conclusión. Aunque *T. p. aequatoris*, del sur-oeste de Colombia y el noroeste de Ecuador, ha sido declarada en peligro crítico, ya que es la subespecie con el rango de distribución más pequeño y que habita en una zona de muy altas tasas de deforestación (Oliver,1990), no hemos encontrado evidencia de que esta subespecie molecularmente difiere de otras subespecies de *T. pecari* en el noroeste de América del Sur.

Dos estudios moleculares realizados a nivel micro-geográfico de *T. pecari* coinciden con nuestros resultados: Campero-Gutiérrez (1999) analizó cuatro manadas de esta especie en el Parque Nacional Corcovado, del sector Sirena en Costa Rica y estimó un valor de $F_{ST} = 0.067$ para isoenzimas y de $F_{ST} = 0.058$

para microsatélites, sin probabilidades significativas y también con muy pequeñas distancias genéticas entre estos cuatro poblaciones. Las estimaciones de flujo genético entre estas poblaciones fueron $Nm = 3,41$ (isoenzimas) y $Nm = 3,93$ (microsatélites), lo que indica un alto flujo genético, como los que encontramos en este estudio a nivel geográfico superior ($Nm = 12.51$, región de control mitocondrial; $Nm = 5,14$, microsatélites). Un segundo estudio fue el de Biondo et al., (2011). Estos autores analizaron dos localidades adyacentes de *T. pecari* en el Pantanal (Brasil), separados por 80 km. Se muestrearon 100 individuos y genotiparon siete microsatélites. Se determinó una F_{ST} (= 0.02) muy baja y se estimó con un análisis bayesiano, un patrimonio genético único. Ambos sexos se dispersaron en la misma magnitud entre ambas poblaciones, lo que podría aumentar el flujo de genes entre poblaciones de *T. pecari*. En contraste con la ausencia de dispersión de sexo sesgada de *T. pecari*, la comparación de los niveles de diferenciación genética entre el ADN mitocondrial y microsatélites reveló dispersión sesgada en los machos en las poblaciones de pecaríes de collar de Texas (Cooper et al. 2010a, b), lo que indicó que esta segunda especie podría mostrar niveles más altos de heterogeneidad genética que el pecarí de labio blanco. Así pues, estos dos trabajos de genética de poblaciones a nivel microgeográfico y nuestro estudio, a un nivel geográfico mucho mayor, reveló baja heterogeneidad genética y elevadas estimaciones de flujo genético entre poblaciones separadas geográficamente a cortas y grandes distancias en *T. pecari*.

Las siguientes características ecológicas y sociales de *T. pecari* podrían ayudar a entender los resultados genéticos moleculares que se encontraron. El pecarí de labio blanco prefiere el hábitat húmedo de tierras bajas, mientras el pecarí de collar es más restringido a las tierras altas más secas en la región amazónica, aunque la primera especie está también bien adaptada al segunda ambiente, *T. pecari* puede utilizar los bosques inundados, porque es una especie con un alto rango de tiempo de los movimientos (Bodmer, 1990; Bodmer et al, 1997;. Frago, 1994). Sin embargo, por esta razón, esta última especie es más perseguida que el sajino en los bosques inundados (por ejemplo, en los bosques

altos de Tahuayo-Blanco, Amazonia peruana, la presión de la caza de las dos especies de pecarí fueron 33 animales cazados por cada 100 km² , mientras que en los bosques inundados de Maipuco, fueron cazados 17 pecaríes de labio blanco por cada 100 km² y 3 pecaríes de collar por cada 100 km²; (Bodmer et al, 1997). El pecarí de labio blanco consume una gran cantidad de frutos (66% de su dieta. (Bodmer et al, 1997) y por esta razón tienen desplazamientos grandes diariamente. Altrichter et al., (2002) determinaron desplazamientos de poblaciones de 5 kilómetros diarios en Costa Rica. Kiltie y Terborgh (1983) estimaron, en la Amazonía peruana, que cada población podría viajar todos los días de 10 a 15 km, y tener áreas centrales en torno a 60 -200 km² y extremada capacidad para cruzar ríos anchos sin dificultad. Lo mismo fue descubierto por Fragoso (1999) en el norte de Brasil. Él determinó un área de acción de 109 km² por manadas de *T. pecari*. Por su parte, en la misma zona, manadas de *P. tajacu* tuvieron un área de distribución de sólo 1 km². Grandes migraciones del pecarí de labio blanco, se han observado en Tahuayo (entre los ríos Yavarí y Ucayali), en el Parque Nacional Pacaya-Saimiria (entre los ríos Marañón y Ucayali) y en el Parque Nacional Manu en el sur de Perú (Bodmer et al. , 1997). En los períodos inundados de la Amazonía, los pocos pecaríes de collar que habitan estos bosques ribereños adoptaron la estrategia de vida en pequeños refugios de islas, y cambiaron sus hábitos alimenticios. Por el contrario, *T. pecari* conforman grandes rebaños y migraron a las grandes extensiones de bosques ribereños e inundados en busca de alimento. De la misma manera, Fragoso (1999) determinó una importante diversidad de uso del hábitat por parte del pecarí de labio blanco mientras que fue más restrictiva para el pecarí de collar. Una de la manada pecarí de labio blanco, que estudió, pasó más tiempo en las zonas ribereñas, así como en los humedales de sabana-, mientras que una segunda manada pasó más tiempo en Palmerales húmedos y en los bosques de tierra firme. Por el contrario, los pecaríes de collar pasaban todo el tiempo en los bosques de tierra firme. Además, el tamaño de las poblaciones de *T. pecari* fue considerablemente mayor en los bosques inundados que en las tierras altas en Suriname (Husson, 1978). Por otra parte, las manadas de pecaríes de labio blanco se superponen en áreas de distribución sin un comportamiento territorial (Fragoso, 1994, 1998). Por su

parte, en los pecaríes de collar, se ha observado un comportamiento de territorialidad intraespecífica entre los rebaños y límites del rango de patrullaje (Fragoso, 1994; SOWLS, 1984). Todo esto concuerda bastante bien con el hecho de que los pecaríes de labios blancos tienen cuerpos más grandes y tamaño del rebaño mayores que los pecaríes de collar. Estas dos características podrían ayudar a disuadir a los depredadores, como el jaguar, o desplazarse de los territorios de los depredadores. Pero para ello, se requiere parches grandes de alimentos para sostener a estas grandes rebaños y por ello, éstos tienen capacidad para moverse a grandes distancias a los hábitats estacionales, que contienen abundantes recursos temporales (Fragoso, 1999). Estos movimientos han podido facilitar mezcla genética entre los rebaños de *T. pecari* (Altrichter y Almeida 2002), que podrían reflejarse en los resultados genético moleculares obtenidos. Todos estos hechos podrían explicar por qué la heterogeneidad genética es muy pequeña entre las diferentes poblaciones de pecarí de labio blanco para el marcador de ADNmt, así como una relativamente pequeña heterogeneidad genética y unos bajos porcentajes de asignación que se encontraron con los marcadores microsatélites en esta especie y la inexistencia de ninguna subespecie detectable a nivel molecular. Otra consecuencia de la estructura social del pecarí de labio blanco es que necesita grandes áreas con un mosaico de parches de vegetación (Tuomisto et al., 1995) para sobrevivir y por lo tanto podrían estar más drásticamente en peligro que el sajino, el cuál puede tolerar mayor perturbación del hábitat para los pequeños tamaño de los rebaños, y requisitos de áreas pequeñas (Taber et al., 1994). Este último hecho también puede contribuir a determinar una mayor heterogeneidad genética entre las poblaciones de pecaríes de collar y la posibilidad de un mayor número de subespecies reconocidas molecularmente para el pecarí de collar que para el pecarí de labio blanco. Theimer y Keim (1994) fueron los primeros en investigar la estructura genética de *P. tajacu*. Analizaron 84 ejemplares de Arizona y Texas, respectivamente, mediante el uso de 12 enzimas de restricción aplicadas a ADNmt. Se determinaron cinco haplotipos diferentes (tres en Arizona y dos en Texas) con una secuencia de divergencia oscilando entre 0,2 y 0,8% para las frecuencias de estos haplotipos, diferenciando significativamente entre las regiones

geográficas en el suroeste de EE.UU, mostrando un relativamente bajo flujo genético entre esas subpoblaciones de *P. tajacu*. Además, Theimer y Keim (1994) afirmaron que estos niveles de divergencia fueron comparables a los encontrados entre dos subespecies de venado burro (Carr et al., 1986) y que los animales de Arizona (*P. t. Sonoriensis*) y Texas (*P. t. angulatus*) conformaron dos subespecies diferentes. Un segundo estudio sobre la filogeografía molecular de *P. tajacu* estuvo a cargo de Góngora et al., (2006). Estos autores secuenciaron 31 ejemplares de *P. tajacu* para la región de control mitocondrial y los genes del citocromo b y descubrieron dos grandes clados, uno conformado por individuos del Norte y Centro América (subespecie *angulatus*) y otro por individuos de América del Sur (subespecie *patira*). También encontraron que varios ejemplares colombianos clasificados como *patira* se agruparon con el clado del Norte y Centroamérica: (*angulatus*). Por lo tanto, una zona de hibridación fue puesta de manifiesto en Colombia entre estos dos clados divergentes. Dentro del primer clado, se encontraron otros cuatro sub-clados (N1, N2, N3, N4) y dentro del segundo clado, se determinaron dos sub-clados (S1, S2). Estos dos últimos grupos estaban integrados por ejemplares colombianos y bolivianos y por individuos de Argentina, respectivamente. Todos los ejemplares de *T. pecari* analizados cubren la zona geográfica comprendida por Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, que corresponde a la zona geográfica de S1 de *P. tajacu*. Por lo tanto, no sabemos si otros especímenes de *T. pecari* de otras áreas diferentes (N o S2) se podrían diferenciar molecularmente en un patrón filogeográfico similar al de *P. tajacu* o no, pero se sospecha que el patrón filogeográfico de *T. pecari* está menos desarrollado que en *P. tajacu*.

Nuestros análisis filogenéticos no concordaron con las afirmaciones de Góngora y Moran (2005) quienes en este estudio observaron que la diversidad genética dentro de los pecaríes de collar fue considerablemente mayor que en el pecarí de labio blanco (de dos a tres veces más altos que el nivel de diversidad nucleotídica de la primera especie), aunque es más probable la existencia de subespecies diferenciadas moleculares en la primera que en la segunda especie. De hecho, en los árboles filogenéticos, algunas ramas de algunos individuos pecarí de labios

blancos eran más largos que los observados para los pecaríes de collar. Estos autores estudiaron sólo dos pecaríes de labio blanco y por lo tanto sus conclusiones podrían ser erróneas. Lo mismo ocurrió en Góngora et al., (2003). Estos autores estimaron pares de distancias genéticas entre el clado del Norte y Centroamérica y el de Sur-América, uno con el gen mtCyt-b (0.058) y otro con la región de control (0.047) y dentro de cada uno de estos dos clados (0,025 y 0,023 para el clado N y 0,012 y 0,020 para el clado S, respectivamente), mientras que para *T. pecari*, estos valores fueron considerablemente menores, 0,019 (mtCyt-b) y 0.007 (mtControl-Región), respectivamente. Estos resultados genéticos aparentemente demostraron que *T. pecari* tiene niveles considerablemente más bajos de divergencia genética que *P. tajacu*. Sin embargo, estos autores analizaron sólo cuatro muestras de *T. pecari* contra 31 muestras de *P. tajacu*. En nuestro caso, se utilizaron 44 muestras de *T. pecari* y por lo tanto hemos estimado niveles de divergencia genética mayor entre los haplotipos mitocondriales encontrados para *T. pecari* que lo que hicieron trabajos anteriores.

6.3. Genética demográfica

Los resultados obtenidos en este trabajo no detectaron cambios demográficos históricos notables en la población norte-oeste de América del Sur de *T.pecari*. Sólo una prueba de ADN mitocondrial y varios análisis de microsatélites (no mostrados aquí) ofrecieron algunos indicios de expansión de la población de esta especie. Sin embargo, las poblaciones de *T. pecari* y *P. tajacu* son sometidos a una intensa presión de la caza. Bodmer et al., (1997) estimó que la cuota anual de caza sostenible en el Departamento de Loreto en el Perú fue de 26,040 individuos para el pecarí de collar y de 32.494 individuos para el pecarí de labios blancos. Desde 1992 a 1995 las pieles exportadas del Departamento de Loreto fueron 17.704, 31.577, 14.675 y 19.505 para el pecarí de collar y 12.222, 15.125, 7.360 y 13.351 para el pecarí de labios blancos. En 1996, el gobierno peruano aprobó un cupo de exportación de 25. 000 pieles para el pecarí de collar y 15.000 pieles para el pecarí de labios blancos. Diez años más tarde, en 2006, el gobierno peruano aprobó la siguiente cuota: un total de 70.784 pieles para *P. tajacu*

(29.374 de Loreto, 31.000 de Ucayali, 8.660 de San Martín, 250 de Junín, 100 de Pasco y 1.000 para Madre de Dios) y un total de 48.268 pieles de *T. pecari* (29.168 de Loreto, 15.000 de Ucayali, 2.400 de San Martín, 500 de Junín, 700 de Pasco y 500 de Madre de Dios). A pesar de que el número absoluto de animales cazados es muy alto, algunos estudios han revelado que las poblaciones de pecaríes pueden resistir la presión de la caza. Por ejemplo, Lleellish et al., (2007) analizaron la situación de las dos especies de pecaríes en la zona de Alto Purus-Ucayali (cuenca del río Purus superior en Santa Clara y la desembocadura del río Cocama) y calcularon una densidad media de 2,47 ind/km² para *P. tajacu* y 9.18 ind/km² de *T. pecari*. Las presiones de caza anuales calculados, para esa zona, fueron 0,57 *P. tajacu* cazado por km² y 1,14 de *T. pecari* cazado por km². Estos autores consideran que el modelo de cosecha indicó que estaban siendo cazados sólo el 5% de la población y las dos especies estaban siendo cosechadas de forma sostenible. La presión de la caza del pecarí de collar parece ser mayor que para el pecarí de labios blancos en muchos lugares. Sin embargo, el pecarí de labios blancos tiene tasas más bajas de ovulación, de fecundidad, de crecimiento y de productividad reproductiva que el sajino (Bodmer et al., 1997), por lo que podría ser más susceptible a los efectos de la caza que el pecarí de collar. Una gran parte de las muestras analizadas eran de esta zona del Perú. A pesar de que la presión de caza es alta en esta zona, nuestras estimaciones de diversidad genética molecular fueron muy elevadas para el marcador mitocondrial y medio-elevada para los marcadores microsatélites utilizados. Por lo tanto, no parece que la presión de caza haya reducido drásticamente los niveles de diversidad genética en *T. pecari*, no detectandose cuellos de botella.

7. Conclusiones

- Nuestro trabajo con microsatélites determinó un mayor número de alelos que otros trabajos previos, debido a que se analizó un número muestral mayor y zonas de muestreo más amplias. La diversidad Genética se encontró elevada para ADNmt sin embargo para microsatélites fue media.
- Este estudio reveló Heterogeneidad genética inexistente para ADNmt y relativamente baja para microsatélites, no se correlacionan subespecies moleculares con subespecies morfológicas. Se encontraron elevadas estimaciones de flujo genético entre poblaciones separadas geográficamente a cortas y grandes distancias en *T. pecari*
- Los resultados de este trabajo no detectaron evidencias de cambios demográficos históricos notables en la población noreste de América del Sur de *T. pecari*.
- El pecari consume 66% de su dieta en frutos por esta razón tienen desplazamientos grandes diariamente, determinando un importante uso del hábitat por parte del labio blanco mientras más restrictiva para el pecari de collar, por lo cual la heterogeneidad genética entre poblaciones es pequeña y no se encuentra correlación entre los datos moleculares y la existencia de subespecies morfológicas.
- A pesar que el número absoluto de animales cazados es muy alto, se estima que solo el 5% de la población son cazados, aun sometidos a presiones de caza significativas.

8. Recomendaciones

Se analizó un número muy limitado de microsatélites y, por lo tanto, se necesita analizar un mayor número para tener una estimación más ajustada de la diversidad genética nuclear en la especie estudiada. También es importante que los futuros estudios moleculares contengan muestras representativas de otras subespecies y de otras áreas geográficas, como *p. ringens* del sur de México (en este trabajo no contamos con ninguna muestra), Guatemala, Belice y Honduras, *p. spiradens* de Nicaragua, Costa Rica y Panamá, *p. pecari* del norte de Brasil y Guyanas y *p. albirostris* del sur de Brasil y norte de Argentina, para determinar posibles subespecies moleculares dentro de *T. pecari*, al igual que posibles cuellos de botella y cambios demográficos, que podrían poner en peligro a algunas poblaciones locales de esta especie.

Utilizar genes nucleares para ampliar la información sobre las relaciones filogenéticas entre las especies y subespecies analizadas, utilizando un número mayor de marcadores microsatélites con el fin de detectar con mayor facilidad cambios demográficos. Así mismo, continuar con análisis mitocondriales integrando muestras de otras regiones geográficas con el fin de obtener información molecular que apoye o no la clasificación actual y /o determinar en dónde se encuentra el área geográfica exacta para la diversificación de cada subespecie.

Las autoridades ambientales deben generar lineamientos para la conservación, en conjunto con los países que comparten su distribución.

9. Revision de Literatura

ACOSTA L, N. MANRIQUE, M.E. VARELA, M. RUIZ-GARCIA. 2008. Conectividad y evolución de poblaciones de *Palythoa caribaeorum* en el Caribe colombiano. (submitted).

ADEGA, F, CHAVEZ RAQUEL, HENRIQUE GUEDES PINTO. 2011. Institute for Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Genetics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro (IBB/CGB-UTAD), Apdo 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal. Elsevier

ADEGA, F., CHAVES, R., KOFLER, A., KRAUSMAN, P.R., MASABANDA, J., WIENBERG, J. AND GUEDES-PINTO, H. 2006. High-resolution comparative chromosome painting in the Arizona Collared peccary (*Pecari tajacu*, Tayassuidae): a comparison with the karyotype of pig and sheep. *Chromosome Research* 14: 243-251.

ALTRICHTER, M., AND R. ALMEIDA. 2002. Exploitation of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) on the Osa Peninsula, Costa Rica. *Oryx* 36:126–132.

ALTRICHTER M, SAENZ J, CARRILLO E, FULLER T (2000) Dieta estacional de *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) en el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 48: 689–702.

ALTRICHTER M, CARRILLO E, SAENZ J, FULLER T (2001) White-lipped peccary (*Tayassu pecari*, Artiodactyla: Tayassuidae) diet and fruit availability in a Costa Rican rain forest. *Revista de Biología Tropical* 49: 1183–1192

ALTRICHTER, M. AND BOAGLIO, G. I. 2004. Distribution and relative abundance of peccaries in the Argentine Chaco: associations with human factors. *Biological Conservation* 116: 217-225.

ÁLVAREZ, J.; SOINI, P. 2000. Evaluación de la Fauna Silvestre del Área de Influencia de la Carretera Iquitos Nauta. Informe Final del Sub - Proyecto. Iquitos, Perú. 135 pp

ANDERSON, S., DE BRUIJN, M.H., COULSON, A.R., EPERON, I.C., SANGER, F., YOUNG, I.G., (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683–717

ANDREA MV, OLIVEIRA C, ROCHA GT, FORESTI F (2001) Cytogenetical and histological studies in testis of *Tayassu tajacu* (Cateto), *Tayassu pecari* (Queixada) and a natural interspecific hybrid. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 118: 125–133.

ANTHONY, H. E. 1921. New mammals from British Guiana and Columbia Amer. Mus. Novitates, 19: 1 – 7.

AVISE JC (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York.

BADOUIN L, P LEBRUN (2000). An operational bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers. En: Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in Horticulture (Dore C, Dosba F, Baril C, Eds). Pp 6-9, Montpellier, Francia.

BANGUERA, E., H. CARDENAS, M. RUIZ-GARCIA, M. MARMONTEL., E. GAITAN, R. VASQUEZ, F. GARCIA-VALLEJO. 2002. Genetic differentiation in populations of the river dolphin genus *Inia* (Blainville, 1817) and apports to the taxonomic status with molecular analysis. Revista Academia Colombiana de Ciencias 26 (101): 575-588.

BARTON NH & M SLATKIN. 1986. A quiasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity 56: 409-416.

BEAUMONT, M. A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. Genetics 153: 2013-2029.

BENDAYAN, N. 1991. Influencia Socio- económica de la Fauna Silvestre como recurso alimentario. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNAP. Iquitos – Perú. 115 p

BENIRSCHKE, K., KUMAMOTO, A.T., 1989. Further studies on the chromosomes of three species of peccary. In: Redford, K.H., Eisenberg, J.F. (Eds.), Advances in Neotropical Mammalogy. Sandhill Crane Press, Gainesville, pp. 309–316.

BIONDO, C., KEUROGHLIAN, A., GONGORA, J. AND MIYAKI, C.Y. 2011. Population genetic structure and dispersal in the white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) from the Brazilian Pantanal. *Journal of Mammalogy* 92: 267-274.

BODMER R, R AQUINO, P PUERTAS, C REYES, T FANG, N GOTTDENKER. 1997. Manejo y Uso sustentable de Pecarís en la Amazonía Peruana. Ocasional Paper No. 18 de la Comisión de Supervivencia de Especies. Pp. 102.

BODMER, R. E.; AQUINO, R.; PUERTAS, P.; REYES, C.; FANG, T.; GOTTDENKER, N. 1997. Manejo y Uso Sustentable de Pecaríes en la Amazonía Peruana. UINC. Quito, Ecuador.

BODMER R, TG FANG, L MOYA, R GILL. 1994. Managing wildlife to conserve Amazonian forests: population biology and economic considerations of game hunting. *Biological Conservation* 67:29-35.

BODMER, R. E. 1994. Manejo de Fauna Silvestre con las Comunidades Locales en la Amazonía Peruana: en el caso de la Reserva Comunal Tamshiyacu-Tahuayo. Airlie, Virginia. 19 pp.

BODMER RE (1989) Frugivory in Amazonian ungulates. Ph.D. dissertation, Clare Hall, Cambridge University, England.

BOSMA, A.A., DE HAAN, N.A., ARKESTEIJN, G.J., YANG, F., YERLE, M., ZIJLSTRA, C., 2004. Comparative chromosome painting between the domestic pig (*Sus scrofa*) and two species of peccary, the Collared peccary (*Tayassu tajacu*) and the White-lipped peccary (*T. pecari*): a phylogenetic perspective. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 115–121.

CAMPERO - GUTIERREZ, H. 1999. Variación y estructura genética dentro y entre grupos de chanchos de monte *Tayassu pecari* en el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica. M. Sc. thesis, National University of Costa Rica, Heredia, Costa Rica.

CIOFI, C., M. A. BEAUMONT, L. R. SWINGLAND, M. W. BRUFORD. 1999. Genetic divergence and units for conservation in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. *Proceedings of the Royal Society London B* 266: 2269-2274.

COOPER, J. D., ET AL. 2010a. Quantifying male-biased dispersal among social groups in the collared peccary (*Pecari tajacu*) using analyses based on mtDNA variation. *Heredity* 104:79–87.

COOPER, J. D., P. M. WASER, D. GOPURENKO, E. C. HELLGREN, T. M. GABOR, AND J. A. DEWOODY. 2010b. Measuring sex-biased dispersal in social mammals: comparisons of nuclear and mitochondrial genes in collared peccaries. *Journal of Mammalogy* 91:1413–1424.

CORNUET JM & G LUIKART. 1996. Description of power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

CORNUET JM, S PIRY, G LUIKART, A ESTOUP & M. SOLIGNAC. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.

CROW JF & K AOKI. 1984. Group selection for a polygenic behavioural trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of National Academy of Sciences of United states of America* 81:6073-6077.

DOUZERY, E., CATZEFLIS, F.M., 1995. Molecular evolution of the mitochondrial 12S rRNA in Ungulata (mammalia). *J. Mol. Evol.* 41, 622–636.

DUCROCQ, S., 1994. An Eocene peccary from Thailand and the biogeographical origins of the artiodactyl family Tayassuidae. *Palaeontology* 37, 765–779.

EISENBERG, J.F., 1989. *Mammals of the Neotropics* The Northern Neotropics, vol. 1. The University of Chicago Press, Chicago, IL.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHSRD, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567 - 1587

FERNÁNDEZ-LLARIO, ROSELL, C. P.; HERRERO, J. 2008. El Jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys*, 13(2): 1-25.

FERREIRA M.E., GRATTAPAGLIA D. 1998. *Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en análisis genéticos*. Brasilia, D.F: Embrapa-Cenargen.

FRAGOSO, J. M. V. 1994. Large mammals and the community of an Amazonian rain forest. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville.

FRAGOSO, J. M. V., AND J. HUFFMAN. 2000. Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. *Journal of Tropical Ecology* 16:369–385.

FRAGOSO, J. M. 2000. Home Range and Movement Patterns of White-Lipped Peccary (*Tayassu pecari*) Herds in the Northern Brazilian Amazon. Volume 30 Number 3.

FRAGOSO, J. M. V. 1999. Perception of scale and resource partitioning by peccaries: behavioral causes and ecological implications. *Journal of Mammalogy* 80:993–1003

FRAGOSO, J.M. (1998). Home Range and movement patterns of White-lipped Peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. *Biotropica* 30: 438 - 469.

FRAGOSO, J. M. V. 1997. Tapir-generated seed-shadows: scaledependent patchiness in the Amazon rain forest. *Journal of Ecology* 85:519–529.

FUNK, S, KUMAR, S. LARSON, G, PRASAD K. 2007. The pygmy hog is a unique genus: 19th century taxonomists got it right first time round Reserch Wildlife Conservation Jersey JE3 5BP, 2007. 25 -35.

FU, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

FU, Y-X., LI, W-H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.

GALTIER, N., F. DEPAULIS, N. H. BARTON. 2000. Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics* 155: 981-987.

GARZA JC & EG WILLIAMSON. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305-318.

GHIVIZZANI, S.C., MACKAY, S.L.D., MADSEN, C.S., LAIPIS, P.J., HAUSWIRTH, W.W., 1993. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *J. Mol. Evol.* 37, 36–47.

GINSBURG, L. 1974. Les Tayassuidés des phosphorites du Quercy. *Palaeovertebrata*, 6: 55-85.

GINSBURG, L. 1980. *Xenohyus venitor*, suidé nouveau (Mammalia, Artiodactyla) du Miocène inférieur de France. *Geobios*, 13(6): 561-577.

GIUFFRA, E., KIJAS, J.M.H., AMARGER, V., CARBORG, O" ., JEON, J.-T., ANDERSSON, L., 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154, 1785– 1791.

GOLDSTEIN DB, A RUIZ-LINARES, LL CAVALLI-SFORZA & MW FELDMAN. 1995. An evaluation for genetic distances for use with Microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.

GONGORA, J. C. MORAN. (2005). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34 181–189 187 Hall, E.R., 1981. *The Mammals of North America*. vol. 2. J. Wiley and Sons, New York.

GONGORA, J., FLEMING, P., SPENCER, P.B.S., MASON, M., GARKAVENKO, O., MEYER, J-K., DROEGEMUELLER, C., LEE, J.H., MORAN, C., 2004. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPII genotype. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 339–348.

GONGORA, J., PELTONIEMI, O.A.T., TAMMEN, I., RAADSMA, H., MORAN, C., 2003. Analyses of possible domestic pig contribution in two populations of Finnish farmed Wild Boar. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.*, 53,161–165.

GONGORA, J, K.-I., LEE, J-H., LI, K., ZHANG, Y-P., LEE, S-S., ,., 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* 33, 19–25

GROVES, C.P., GRUBB, P., 1993. The suborder Suiformes. In: Oliver, W.L.R. (Ed.), *Pigs, Peccaries and Hippos*. IUCN, The World Conservation Union, Gland, pp. 1–4.

GRUBB, P., GROVES, C.P., 1993. The neotropical Tayassuids *Tayassu* and *Catagonus*. In: Oliver, W.L.R. (Ed.), *Pigs, Peccaries and Hippos*. IUCN, The World Conservation Union, pp. 5–7.

GREENWOOD, P. J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28:1140–1162.

HARPENDING, H. C. 1994. Signature and ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66:591-600.

HARPENDING, H. C., SHERRY, S. T., ROGERS, A. R., STONEKING, M. 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34: 483-496.

HEDGES, S.B., KUMAR, S., 2003. Genomic clocks and evolutionary timescales. *Trends Genet.* 19, 200–206.

HENDEY Q. B. 1976. Fossil peccary from the pliocene of south Africa. *Sciences, New Series* 192 (4241): 787-789.

HILL, W. G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38: 209-216.

HUDSON, C., GOWRI-SHANKAR, V., JOW, H., RATTRAY, M., HIGGS, P.G., 2003. RNA-based phylogenetic methods: application to mammalian mitochondrial RNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 28, 241–252.

HUSSON, A.M. 1978. *The Mammals of Suriname*. Leiden, The Netherlands.

HVIDBERG-HANSEN H. 1970. Utilization of the collared peccary (*Tayassu tacaju*, Linné) in Peru. FAO Forestry and Training Project UNDP/SF. No 116.

HUBINSZ, M. J. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322 – 1332.

HUELSENBECK, J.P.; CRANDALL, K.A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ecology and Systematics*. Vol 28: 437 - 466

INRENA. 2004. Desarrollo de Lineamientos Técnicos para la Certificación de Pieles de Pecaries en la Amazonia Peruana. Unpublished workshop document.

IRWIN, D.M., KOCHER, T.D., WILSON, A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32, 128–144.

JARAMILLO-CORREA, J. P; G. KEYEUX; M. RUIZ-GARCIA; M.C. RODAS; J. BERNAL. 2001. Population study of the genes APOE, APOB (3'VNTR) and ACE in some black and Amerindian communities from Colombia. *Human Heredity* 52: 14-33.

KEYEUX, G., C. RODAS., M. RUIZ-GARCIA., J. E. BERNAL. 1999. Amerindian mitochondrial DNA haplotype studied in Colombian populations: the turning plate of American migrations. *European Journal of Human Genetics*, 18: 323-324.

KILTIE, R. 1982. Bite force as a basis for Niche differentiation between rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). *Biotropica* 14 (3):188-195.

KILTIE, R., A. Y J. TERBORGH. 1983. Observations on the behavior of rain forest peccaries (*Tayassu pecari*) in Perú: Why do White-lipped peccaries form herds?. *Z. Tierpsychol* 62:214-217.

KILTIE, R. 1985. Craniomandibular Differences between Rain-forest and Desert Collared Peccaries. *American Midland Naturalist* 113 (2): 384-387.

KIM, K.-I., LEE, J.-H., LI, K., ZHANG, Y.-P., LEE, S.-S., GONGORA, J., MORAN, C., 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* 33, 19–25.

KIMMEL, M., R. CHAKRABORTY, J. P. KING, M. BAMSHAD, W. S. WATKINS, L. B. JORDE. 1998. Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. *Genetics* 148: 1921-1930.

KIMURA, M., J. F. CROW. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.

LANGLEY, C. H., D. B. SMITH, F. M. JOHNSON. 1978. Analysis of linkage disequilibrium between allozyme loci in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* 32: 215-229.

LAVAL, G., N. IANNUCELLI, C. LEGAULT, D. MILAN, M. GROENEN, E. GIUFFRA, L. ANDERSSON, P. NISSEN, C. JORGENSEN, P. BEECKMANN, H. GELDERMANN, J.L. FOULLEY, C. CHEVALET AND L. OLLIVIER. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetic Selection Evolution*, 32: 187- 203.

LAVERGNE, A., M. RUIZ-GARCIA, V. LACOSTE, B DE THOISY. 2008. Taxonomía y filogenia del mono ardilla (género, Saimiri) mediante el análisis del gen mitocondrial citocromo b. Libro Asociación Colombiana de Primatología. (in press).

LEGUIZAMON N., M. RUIZ-GARCIA, M. I. CASTILLO. 2008. Aplicaciones de los análisis genético poblacionales a partir de genotipos multilocus y metodologías basadas en modelos bayesianos para la conservación de la especie *Saguinus leucopus*. *Revista del DAMA* (in press).

LEHNINGER, A.L. ; NELSON, D., COX, M. 2007. Bioquímica. OMEGA. Barcelona

LINK, D. H. F. 1795. Beiträge zur Naturgeschichte. Rostock and Leipzig, 2:1 – 126pp

LLELLISH M, J AYALA, J MANZUR, M MATORELA. 2007. El circuito de Comercialización y los procesos de valor agregado de pieles de Pecaríes. Serie de Publicaciones de Flora y Fauna Silvestre. INRENA, Lima, Perú.

LIBRADO, P Y J ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

LÖNNBERG, E. 1921. A second contribution to the mammalogy of Ecuador with some remarks on Caenolestes. *Ark. Zool.*, 14: 1 – 104 + 1 pl

LUIKART, G., J. M. CORNUET. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.

LUIKART, G., F. W. ALLENDORF, B. SHERWIN, J. M. CORNUET. 1998. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-247.

MARCH, I.J., 1993. The White-lipped peccary (*Tayassu pecari*). In: Oliver, W.L.R. (Ed.), *Pigs, Peccaries and Hippos*. IUCN, The World Conservation Union, Gland, pp. 13–22.

MARSHALL, L., 1985. Geochronology and land-mammal biochronology of the transamerican faunal interchange. In: Stehli, F.G., Webb, S.D. (Eds.), *The Great American Biotic Interchange*. Plenum Press, New York, pp. 49–85.

MARSHALL, L.G., BERTA, A., HOFFSTETTER, R., PACUAL, R., REIG, O.A., BOMBIN, M., MONES, A., 1984. Mammals and stratigraphy: geochronology of the continental mammal-bearing Quaternary of South America. *Palaeovertebrata Mem. Extr.* 1984, 1–76.

MARSHALL, L.G., BUTLER, R.F., DRAKE, R.E., CURTIS, G.H., 1982. Geochronology of type Uquian (late Cenozoic) land mammal age, Argentina. *Science* 216, 986–989.

MARTÍNEZ, A.M., J.V. DELGADO, A. RODERO AND J.L. VEGA-PLA. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics*, 31: 295-301.

MATIOLI, C.A., BURZLAFF, J.D., TAYLOR, J.F., DAVID, S.K., 2001. Mining the mammalian genome for artiodactyl systematic. *Syst. Biol.* 50, 367–390.

MAYER, J.J., WETZEL, R.M., 1987. *Tayassu pecari*. Mamm. Species 293, 1–7.

MAYOR, P., LÓPEZ-GATIUS, F. AND LÓPEZ-BÉJAR, M. 2005. Integrating ultrasonography within the reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Theriogenology* 63: 1832–1843.

MERRIAM, C. H. 1901. Descriptions of four new peccaries from Mexico Proc. Biol. Soc. Washington, 14: 119 - 124

MICHALAKIS Y & L EXCOFFIER. 1996. A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061 – 1064.

MORAN, C, KIM, K.-I., LEE, J-H., LI, K., ZHANG, Y-P., LEE, S-S., 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* 33, 19–25

NEI, M., AND KUMAR, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.

NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Ney York. USA.

NEI, M. AND CHESSER, R. K. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genetics* 47: 253-259

NEI, M. 1982. Evolution of human races at the gene level. En: *Human genetics: The unfolding genome*. Alan R. Liss, New York.

NEI M. 1981 Genetic distance between populations. *Am Nat.* 1972;106:238–292.

NIELSEN R. 1997. A likelihood approach to populations samples of Microsatellite alleles. *Genetics* 146: 711-716.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. AND NOGUEIRA, S. S. D. C. 2004 Captive Breeding Programs as an Alternative for Wildlife Conservation in Brazil In: *People in Nature Wildlife Conservation I South and Central America* K. M. Silvius, R. E. Bodmer, and J. M. V. Fragoso (eds), Columbia University Press/New York pp. 123-136

OCHOA, E, GARCIA T. 1997. Identificación de marcadores genéticos asociados a parámetros de producción Bovina. Monografía. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. UDCA.

OKUMURA, N., KUROSAWA, Y., KOBAYASHI, E., WATANOBE, T., ISHIGURO, N., YASSUE, H., MITSUHASHI, T., 2001. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in Wild Boars and several breeds of domesticated pigs. *Anim. Genet.* 32, 139–147.

OLIVER, W. L. R. 1990. Pigs and peccaries group report. *Species Newsletter of IUCN/SSC* No. 13-14: 80-82.

PATTERSON, B., PASCUAL, R., 1972. The fossil mammal fauna of South America. In: Keast, A.F., Erk, F.C., Glass, B. (Eds.), *Evolution, Mammals and Southern Continents*. State University of New York Press, Albany, NY, pp. 247–309.

PESOLE, G., GISSI, C., DE CHIRICO, A., SACCONI, C., 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 48, 427–434.

POSADA, D., CRANDALL, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.

PINEDO, M., D. ALVAREZ., M. RUIZ-GARCIA. 2008. Morphological hereditabilities in Colombian *Drosophila pseudoobscura* populations submitted to artificial selection. *Drosophila Information Service* (submitted).

PIRY S., ALAPETITE A., CORNUET J.M., PAETKAU D., BAUDOUIN L. & ESTOUP A. (2004) GENECLASS 2, a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95, 536–9.

PRITCHARD, J.K; STEPEHENS P; DONELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945 - 959

OHTA, T., M. KIMURA. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical research* 22: 201-204.

O' RYAN, C., E. H. HARLEY, M. W. BRUFORD, M. BEAUMONT, R. K. WAYNE, M. I. CHERRY. 1998. Microsatellite analysis of genetic diversity in fragmented South African buffalo populations. *Animal Conservation* 1: 85-94.

PAETKAU D, W CALVERT, I STIRLING & C STROBECK. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-354.

PATKEAU D, R SLADE, M BARDEN & A ESTOUP. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55-65.

PACHECO, L. F., G. GALLARDO, A. NUÑEZ, M. RUIZ-GARCIA. 2007. Conservación del Puma (*Puma concolor*) en el Parque Nacional Sajama, Bolivia. *Mastozoología Neotropical*. (in press).

PÉREZ, E.; A. MARTÍNEZ; J. DELGADO; F. VELÁSQUEZ; D. SEGURA. 2004. Estudio preliminar de la diferenciación genética entre las dos variedades del cerdo criollo Cubano. *Arch. Zootecnia* 53: 359 – 362.

RAMBAUT, A., BROMHAM, L., 1998. Estimating divergence dates from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 15, 442–448.

RANNALA B & JL MOUNTAIN. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 9197-9201.

RANDI, E., D_HUART, J.P., LUCCHINI, V., AMAN, R., 2002. Evidence of two genetically deeply divergent species of warthog, *Phacochoerus africanus* and *P. aethiopicus* (Artiodactyla: Suiformes) in Africa. *Mamm. Biol.* 67, 91–96.

RANDI, E., LUCCHINI, V., DIONG, C.H., 1996. Evolutionary genetics of the Suiformes as reconstructed using mtDNA sequencing. *J. Mamm. Evol.* 3, 163–194.

REDFORD, K.H., EISENBERG, J.F., 1992. *Mammals of the Neotropics, The Southern Cone*, vol 2. The University of Chicago Press, Chicago, IL.

RAMOS-ONSINS, S. E., ROZAS, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.

RAYMOND M., F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

- REICH DE, MW FELDMAN & DB GOLDSTEIN. 1999. Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. *Molecular Biology and Evolution* 16: 453-466.
- ROBERTSON, A., HILL, W. G. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions, sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.
- ROCHA, T. G. 1993. Aplicações a citogenética na preservação de animais silvestres. Ph.D. Thesis, Instituto de Biosciências, Universidade Estadual Paulista, Brazil.
- ROGERS, A. R., FRALEY, A. E., BAMSHAD, M. J., WATKINS, W. S., JORDE, L. B. 1996. Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Molecular Biology and Evolution* 13: 895-902.
- ROGERS, A. R., HARPENDING, H. C. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- ROBINS JH, ROSS HA, ALLEN MS, MATISOO-SMITH E (2006) *Sus bucculentus* revisited. *Nature* 440: E7
- ROSEL, P.F., HAYGOOD, M.G., PERRIN, W.F., 1995. Phylogenetic relationships among the true porpoises (Cetacea:Phocoenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 463-474.
- SCHWARZ, G. E. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6, 461-464.
- SHOSTELL, J. M., J. STAUDINGER, M. RUIZ-GARCIA. 2005. Mutant Allele Frequencies in Domestic Cat Populations in Arkansas and Tennessee. *Journal of Heredity* 96: 557-565.
- SAITOU, N., NEI, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- SAVAGE, D., RUSSELL, D., 1983. *Mammalian paleofaunas of the world*. Reading, Mass. Addison-Wesley.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L., 2000. ARLEQUIN version 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. SOWLS, L.K., 1984. *The Peccaries*. The University of Arizona Press, Tucson, AZ.

SLATKIN M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39:53-65.

SLATKIN M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetic* 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.

SOWLS. L. K. Collared peccary. Pp 191 – 205, in *Big game of North America: ecology and management* (J. L. Schmidt and D. C. Gilbert, eds). Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania, 494 pp.

SOWLS LK (1997) *Javelinas and other Peccaries: Their Biology, Management, and Use*, 2nd Edition. Texas A&M University Press, College Station, Texas

SOWLS L. K. 1984. *The peccaries*. Tucson: University of Arizona Press;. 251 pp.

STUCKY, R.K., 1992. Mammalian faunas in North America of Bridgerian to early Arikareean “Ages” (Eocene and Oligocene). In: Prothero, D.R., Berggren, W.A. (Eds.), *Eocene–Oligocene Climatic and Biotic Evolution*. Princeton University Press, Princeton, WJ, pp. 464–493.

SWOFFORD, D.L., 2000. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0 beta. Sinauer Associates, Sunderland.

TABER, A. B., DONCASTER, C. P., NERIS, N. N. AND COLMAN, F. 1994. Ranging behaviour and activity patterns of two sympatric peccaries, *Catagonus wagneri* and *Tayassu tajacu*, in the Paraguayan Chaco. *Mammalia* 58: 61-71

TABER AB, DONCASTER CP, NERIS NN, COLMAN FH (1993) Ranging behavior and population-dynamics of the Chacoan peccary, *Catagonus wagneri*. *Journal of Mammalogy* 74: 443–454

TABER AB, DONCASTER CP, NERIS NN, COLMAN F (1994) Ranging behaviour and activity of two sympatric peccaries, *Catagonus wagneri* and *Tayassu tajacu*, in the Paraguayan Chaco. *Mammalia* 58: 61–71

TABER AB (1993) The Chacoan peccary (*Catagonus wagneri*). Pp. 22–29 in *Peccaries, Pigs, and Hippos Action Plan* (W. L. R. Oliver, ed). IUCN, The World Conservation Union, Gland.

THEIMER TC, KEIM P (1994). Geographic patterns of mitochondrial- DNA variation in collared peccaries. *J Mammal* 75: 121–128.

THEIMER TC, KEIM P (1998) Phylogenetic relationships of the peccaries based on cytochrome *b* DNA sequences. *Journal of Mammalogy* 79: 566–572

TAJIMA, F. 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

TAJIMA, F. 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.

TAKAHATA N. 1983. Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. *Genetics* 104: 497-512.

TAMURA, K., KUMAR, S., & NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150–163.

TANAKA, K., SOLIS, C.D., MASANGKAY, J.S., MAEDA, K., KAWAMOTO, Y., NAMIKAWA, T., 1996. Phylogenetic relationship among all living species of the genus *Bubalus* based on DNA sequences of the cytochrome *b* gene. *Biochem. Genet.* 34, 443–452.

TAKEZAKI, N., RZHETSKY, A., NEI, M., 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* 12, 823–833.

THEIMER, T.C., KEIM, K., 1998. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. *J. Mammal.* 79, 566–572.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

TODD, N.B., 1985. Significance of a diploid number of 20 in the peccary *Catagonus wagneri*. *J. Hered.* 76, 310.

TOUGARD, C., DELEFOSSE, T., HANNI, C., MONTGELARD, C., 2001. Phylogenetic relationships of the five extant rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19, 34–44.

TUOMISTO, H. (2010) A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Denying beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography*, 33, 2–22.

TUOMISTO, H, RUOKOLAINEN, K. & YLI-HALLA, M. (2003) Dispersal, environment, and oristic variation of western Amazonian forests. *Science*, 299, 241–24.

TUOMISTO, H., K. RUOKOLAINEN, A. D. POULSEN, R. MORAN, C. QUINTANA, G. CAAS, AND J. CELIS. 2002. Distribution and diversity of pteridophytes and Melastomataceae along edaphic gradients in Yasuní National Park, Ecuadorian Amazonia. *Biotropica* 34:516-533.

TUOMISTO, H., RUOKOLAINEN, K., KALLIOLA, R., LINNA, A., DANJOY, W. & RODRIGUEZ, Z. 1995. Dissecting Amazonian biodiversity. *Science* 269:63–66

TUOMISTO, H., K. RUOKOLAINEN, R. KALLIOLA, A. LINA, W. DANJOY, AND Z. RODRIGUEZ. 1995. Dissecting Amazonian biodiversity. *Science* 269:63–66.

TUOMISTO, H., AND K. RUOKOLAINEN. 1993. Distribution of Pteridophyta and Melastomataceae along an edaphic gradient in an Amazonian rain forest. *Journal of Vegetation Science* 4:25–34.

VAN ROOSMALEN MGM, FRENZ L, VAN HOOFT P, DE IONGH HH, LEIRS H (2007) A new species of living peccary (Mammalia: Tayassuidae) from the Brazilian Amazon. *Bonner zoologische Beiträge* 55: 105–112

VAN ROOSMALEN, M. G. M., VAN ROOSMALEN, T. 2003. The description of a new marmoset genus, *Callibella* (Callitrichinae, Primates), including its molecular phylogenetic status. *Neotropical Primates* 11: 1–10

VAN ROOSMALEN, M. G. M., VAN ROOSMALEN, T., MITTERMEIER, R. A. & DE FONSECA, G. A. B. 1998. A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower Rio Aripuanã, State of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia* 22: 1–27.

VORMISTO, J., PHILLIPS, O.L., RUOKOLAINEN, K., TUOMISTO, H. & VASQUEZ, R. (2000) A comparison of ne-scale distribution patterns of four plant groups in an Amazonian rainforest. *Ecography*, 23, 349–359.

WALSH, J.; GLEN T., 2001. Chelex DNA Preparation Protocol for "Modern Tissue". Laboratory of Molecular Systematics. Smithsonian Institution. Washington.

WANG, JW, BEAD, K. C., TANG, Y.S. 1996. Earliest complete dentition of anthropoid primate from the late middle Eocene of Shan Xi province China *Science* 272 82 85

WIENS, J.A. (1989) Spatial scaling in ecology. *Functional Ecology*, 3, 385–397. Received 4 March 2013; accepted 6 August 2013. Handling Editor: Thomas Kitzberger

VILLARREAL, A.C., BRIEVA, B.J., 1989. Descubrimiento de mamíferos de edad Lujanense (Pleistoceno tardío) en el “desierto” de la Tatacoa (Huila, Colombia). *Caldasia* 16, 119–125.

WEBB, S.D., 1978. A history of savanna vertebrates in the New World. Part II: South America and the Great American Interchange. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 9, 393–426.

WEBB, S.D., 1985. Late Cenozoic mammal dispersals between the Americas. In: Stehli, F.G., Webb, S.D. (Eds.), *The great American Biotic Interchange*. Plenum Press, New York, pp. 357–386.
WETZEL, R.M., 1977a. The extinction of peccaries and new case of survival. *Ann. NY Acad. Sci.* 288, 538–544.

WETZEL RM, CRESPO JA. 2005. Existencia de una tercera especie de pecari, Fam. “Tayassuidae, Mammalia”, en Argentina. *Rev Mus Arg Sci Nat* 1975;12:25e6.

WETZEL, R.M., 1977b. The Chacoan peccary *Catagonus wagneri* (Rusconi). *Bull. Carnegie Mus. Nat. Hist.* 3, 1–36.

WETZEL, R.M., DUBOS, R.E., MARTIN, R.L., MEYERS, P., 1975. *Catagonus*, an “extinct” peccary alive in Paraguay. *Science* 189, 379–381.

WETZEL RM (1977) The extinction of peccaries and new case of survival. *Annals of the New York Academy of Sciences* 288: 538–54

WOODBURNE MO (1968) The cranial myology and osteology of *Dicotyles tajacu*, The Collared peccary, and its bearing on classification. *Memoirs of the Southern California Academy of Science* 7: 1–8

WOODBURNE, M.O., 1969. A late Pleistocene occurrence of collared peccary, *Dicotyles tajacu*, in Guatemala. *J. Mammal.* 50, 121–125.

WRIGHT, D.B., 1998. Tayassuidae. In: Janis, C.M., Scott, K.M., Jacobs, L.L. (Eds.), *Evolution of Tertiary Mammals of North America*. Cambridge University Press, London, pp. 389–401.

WRIGHT, D.B., 1989. Phylogenetic relationships of *Catagonus Wagneri* : sister taxa from the Tertiary of North America. In: Eisenberg, J.F., Redford, K.H. (Eds.), *Advances in Neotropical Mammalogy*. Sandhill Crane Press, Gainesville, FL, pp. 281–308.

WRIGHT DB (1989) Phylogenetic relationships of *Catagonus wagneri*: sister taxa from the Tertiary of North America. Pp. 281–308 in *Advances in Neotropical Mammalogy* (J. F. Eisenberg and K. H. Redford, eds). Sandhill Crane Press, Gainesville
WRIGHT DB (1993) Evolution of sexually dimorphic characters in peccaries (Mammalia, Tayassuidae). *Paleobiology* 19: 52–70

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

XU, X., ARNASON, U., 1997. The complete mitochondrial DNA sequence of the white rhinoceros, *Ceratotherium simum*, and comparison with the mtDNA sequence of the Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 189–194.

XU, H., FU, Y-X. 2004. Estimating effective population size or mutation rate with microsatellites. *Genetics* 166: 555-563.

YANG, H.; C. ZHAO; P. LI; H. JI; S. LI. 2003. Analysis on genetic relationship of Sanjiang White pig and 5 other pig breeds by RAPD. *Yi Chuan* 26:315 – 318.

ZHIVOSTOVSKY, L. A., L. BENNETT, A. M. BOWCOCK, M. W. FELDMAN. 2000. Human population expansion and microsatellite variation. *Molecular Biology and Evolution* 17: 757-767.

10. Anexos:

PROTOCOLO EXTRACCIÓN DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO (MUSCULO, PELOS Y UÑAS) (SAMBROOK 1989).

El fragmento del tejido se lava con etanol (70%) y agua destilada (2 lavados de 20 minutos para cada uno). Se coloca la muestra en un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril, se le agregan 0.5 ml de buffer de digestión (0.05 tris HCL: 0.01 M EDTA; 0.1 M NaCl, pH= 8.0), y 0.04M DTT, 10% de SDS y 2mg/ml de proteinasa K. La muestra se incuba toda la noche a 56 ° C para la digestión del tejido. La muestra es extraída dos veces con igual volumen de fenol-cloroformo- Alcohol isoamilico 25:24:1 y una vez con n- butanol . El ADN se precipita agregando 0.1% del volumen de acetato de sodio saturado (6M) y 1.1 volumen de etanol absoluto (-20°C). La mezcla se coloca a -20°C durante 45 minutos y posteriormente se centrifuga a 13.000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se elimina. El botón se lava con etanol 70% y se seca al vacío por 16 horas. La muestra se resuspende en 100µ de TE 1X y se guarda a 4 OC para su análisis posterior.

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%, CORRIMIENTO DE MUESTRAS Y PROCESO DE TINCIÓN Y REVELADO.

Preparación de los vidrios:

Lavar los vidrios tanto en el que queda el gel como el que esta adherido a la cámara de electroforesis. Teniendo el cuidado de cambiar guantes entre uno y otro vidrio al lavarlos.

Limpia los vidrios con etanol al 95%, teniendo cuidado de cambiar guantes entre uno y otro.

Agregar 40 ul de la solución de Bind Silano al vidrio en que se desea que quede adherido el gel (vidrio individual)

Agregar 100 ul de repel (sigmacote) al vidrio que esta adherido a la cámara de electroforesis. Tener mucho cuidado de cambiar los guantes entre la aplicación de las soluciones a un vidrio y el otro.

Agregar etanol a los vidrios, limpiar y dejar que seque.

Colocar separadores y poner un vidrio frente al otro y asegurarlos

Preparación del gel de poliacrilamida:

A 150 ml de la solución de poliacrilamida al 6% se le agregan 1 ml de solución de persulfato de amonio al 10% y 100 ul de temed.

Cargar la solución anterior entre los dos vidrios, colocar el peine y esperar que polimerice

Corrimiento de muestras en gel de poliacrilamida:

Agregar solución de formamida a las muestras obtenidas da la amplificación selectiva.

Amar el sistema de electroforesis, agregar buffer TBE 5X, poner a funcionar para que caliente a 55 °C (se pone a 100W y tarda aproximadamente 2 horas o 35 W y dura 4 horas)

Cargar las muestras lo más rápido posible sin dejar que el sistema se enfríe mucho (las muestras deben correr a 50°C y en lo que se cargan la °T baja a unos 45°C)

Poner a correr las muestras a 80W (esto permite que la temperatura suba de nuevo a 50°C, tardan de 1:45 a 2 horas en correr)

Apagar el sistema, separar los vidrios.

Tinción y revelado del gel:

Colocar el vidrio en el que quedo adherido el gel en la solución fijadora, hasta que desaparezca la banda azul (de 35 a 40 minutos)

Transferir el vidrio a un recipiente con agua destilada y dejar hasta que se elimine el exceso de ácido acético (de 15 a 20 minutos)

Pasar el gel a un recipiente con la solución de nitrato de plata (40 minutos a 1 hora)

Pasar por agua destilada 10 segundos

Colocar en la solución reveladora (esta solución debe estar fría) hasta observar las bandas (tarda de 5 a 6 minutos)

Pasar rápidamente a la solución fijadora para detener el proceso

Lavar el exceso de ácido acético con agua destilada

Secar el gel por un par de días y leerlo.

EXTRACCION DE DNA

Tipo de muestra	Ejemplares	Técnica	Referencia
Músculo, piel	Muertos	Fenol - cloroformo	Sambrook <i>et al</i> , 1989
Dientes, sangre y pelo	Muertos y Vivos	Chelex al 10%	Walsh <i>et al</i> , 1991
Uña	Muertos	Kit	Blood & tissue (Quiagen)

PRIMERS PCR AND MITOCONDRIAL

L6955	5'-ACCATTTTCATAATTTTGTCAA-3'	Adega,	2002
H7766	5'-TCTTAATCTTTATCTTAAAAG-3'	Vaughn	2000

PROTOCOLO PCR AND MITOCONDRIAL

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	4 μ l
MgCl ₂ 3mM	6 μ l
dNTPs 1Mm	2 μ l c/uno
Primers 8 pmol	2 μ l
Taq polimerasa	2 μ l
Agua miliQ	30 μ l
ADN	2 μ l

CICLOS PCR ADN MITOCONDRIAL

Temperatura	Tiempo	Proceso
95 ° C	5´	
64	60 s	
72	60s	
72	2´	
72	10´	Extensión

CICLOS PCR PARA MICROSATELITES

Temperatura	Tiempo	Proceso
95 ° C	5´	
94	60 s	
55	60s	
72	1´	
72	5´	Extensión

