

**ANÁLISIS FILOGENETICO DE DIFERENTES ESPECIES DEL
GÉNERO *Aotus* UTILIZANDO EL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO II OXIDASA.**

EMILY CAMARGO ACOSTA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

BIOLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá D.C.
JUNIO 23 2009**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

**ANÁLISIS FILOGENETICO DE DIFERENTES ESPECIES DEL
GÉNERO Aotus UTILIZANDO EL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO II OXIDASA.**

EMILY CAMARGO ACOSTA

APROBADO:

Manuel Ruiz-García, Ph.D.
Director

Diana Álvarez Ph.D
Par Académico

**ANÁLISIS FILOGENETICO DE DIFERENTES ESPECIES DEL
GÉNERO Aotus UTILIZANDO EL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO II OXIDASA.**

EMILY CAMARGO ACOSTA

APROBADO:

Angela Umaña Muñoz, Mphil
Decana académica
Facultad de Ciencias

Andrea Ruiz Forero
Directora (E) Carrera de Biología

: A Dios por ser mi motivación, alegría y esperanza

A mis padres y abuelita por la gran confianza y las virtudes enseñadas

Agradecimientos

En esta ocasión agradezco con gran entusiasmo a todos aquellos que colaboraron en mi proceso de formación, especialmente aquellas personas que quisieron entregarme parte de su conocimiento, habilidad y destreza, por supuesto agradezco aquellas personas que en los momentos difíciles me dieron ánimo y aliento para nunca desfallecer en el intento y convertirme en una persona perseverante y muy feliz.

Agradezco a mis padres Mauricio H Camargo y Ana Isabel Acosta, por enseñarme sobre la responsabilidad, ética, honestidad y todas esas maravillosas virtudes que permiten hacer del mundo un lugar prospero y tranquilo, gracias muchas gracias a ustedes porque con esta enseñanza no pasará una sola noche en la que yo no duerma tranquila. Mi responsabilidad y altruismo nace de ustedes. A mi abuelita agradezco rotundamente por ser mi motor y lucecita en el camino hacia los saberes.

A mi director de tesis Manuel Ruiz García por permitirme aprender y entrar en el mundo de la genética, es un placer para mí poder haber trabajado con alguien tan excepcional.

A mi par académico Diana Álvarez por trasmitirme sus conocimientos, enseñarme e instruir de manera objetiva mi trabajo, realmente es un honor para mí recibir estas sugerencias de una persona tan admirable

Muchas gracias a Catalinas Vásquez por ser mi amiga, enseñarme y escucharme en todos los momentos que pase en el laboratorio, realmente este trabajo es un logro para mí gracias a tu ayuda.

Agradezco a mis hermanitos Diego y Hernán por interrumpir mi labor llenándola de risas y de momentos de descanso. Espero poder ser un ejemplo para ustedes.

A mis amigas, amigos y compañeros de la Universidad por entregarme momentos tan eufóricos en este proceso. A Natalia Naranjo una amiga incondicional, ¡lo logramos! María Camila Mejía y Laura Muñoz por ser mis buenas consejeras y acompañarme siempre.

A mi “miquitos” Aotus, sin ustedes evidentemente esto no sería posible, seguiré trabajando.

Finalmente agradezco a Dios por ser mi motivación alegría y esperanza.

Tabla de contenidos.

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 PRIMATES NEOTROPICALES.....	3
2.2 DESCRIPCIÓN DEL GENERO AOTUS	4
3 MATERIALES Y METODOS.....	16
3.1 MATERIAL GENÉTICO	16
3.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	16
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	17
3.4 ANÁLISIS DE FILOGENIA	18
4 RESULTADOS.....	20
4.1 DIVERSIDAD GENETICA	20
4.2 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	20
4.3 HETEROGENEIDAD GENÉTICA	21
4.4 MODELOS EVOLUTIVOS	21
4.5 HOMOGENEIDAD (ID PRUEBA)	22
4.6 ARBOLES FILOGENÉTICOS.....	22
4.7 MÁXIMA PARSIMONIA.....	23
4.8 ÁRBOL BAYESIANO.....	25
4.9 MEDIAN JOINING NETWORK	25
5. DISCUSION.....	28
6. CONCLUSIONES	39
7. RECOMENDACIONES.....	40
8. LITERATURA CITADA.....	41

Tabla de Tablas y Figuras.

Figura I. Distribución de 9 especies y 4 subespecies de Aotus	8
TABLA I. CARIOTIPOS CONOCIDOS DE LAS ESPECIES DE AOTUS (FORD, 1994)	13
TABLA II. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS ESPECIES DE AOTUS.....	20
TABLA III.DIVERSIDAD GENTICA DE LAS ESPECIES DE AOTUS	21
FIGURA II. ÁRBOL OBTENIDO POR MÁXIMA PARSIMONIA.....	24
FIGURA IV. RED DE HAPLOTIPOS.....	27

RESUMEN

El género *Aotus* es un conjunto de primates Neotropicales que incluye nueve especies alopátricas diferenciadas en dos grandes grupos (poblaciones de cuello rojo al sur de la Amazonia y poblaciones de cuello gris al norte de la amazonia) por patrones morfológicos, cariotipos, moleculares y citogenéticos. Aun así las relaciones filogenéticas del género son motivo de controversia debido a las incongruencias entre los análisis realizados previamente.

En el presente trabajo se analizaron y determinaron los niveles de variabilidad genética y se reconstruyeron las posibles relaciones filogenéticas utilizando como marcador molecular el gen mitocondrial citocromo II oxidasa (mt COII) y 69 secuencias del género *Aotus*. Las especies estudiadas fueron *Aotus lemurinus griseimembra*, *Aotus nancymae*, *Aotus vociferans*, *Aotus miconax*, *Aotus azarae*, *Aotus nigriceps*, y *Aotus azarae boliviensis*.

Como resultados destacados se tiene 1) el grupo de especies de cuello rojo es un grupo polifilético, y posiblemente el grupo de cuello gris uno Monofilético. 2) *A. griseimembra* o *A. vociferans* son las especies con haplotipos característicos para dar posiblemente origen a las actuales especies del género. 3) Los procesos geológicos y climatológicos ocurridos durante el Pleistoceno así como los refugios forestales son una posible causa de la gran variabilidad genética del grupo. 4) las especies del género *Aotus* analizadas sufrieron procesos de deriva genética y especiación estasiopátrica. 5) los procesos de evolución cariotípica y molecular ocurren de manera independiente.

SUMMARY

The genus *Aotus* is a set of Neotropical primates, which includes nine species allopatric differentiated into two major groups (populations of red neck south of the Amazon and gray-collar towns north of the Amazon) by morphological patterns, karyotypes, cytogenetic and molecular. Yet the phylogenetic relationships of gender are a matter of controversy due to inconsistencies between the analysis done previously.

In this paper analyze and assess levels of genetic variability and the possible phylogenetic relationships reconstructed using the molecular marker of mitochondrial gene cytochrome oxidase II (COII mt) and 69 sequences of the genus *Aotus*. *Aotus* species studied were *lemurinus griseimembra*, *Aotus nancymae*, *Aotus Aotus vociferans miconax*, *azarae Aotus*. *Aotus nigriceps*, and *Aotus boliviensis azarae*.

Highlighted results are 1) the species of red neck is a polyphyletic group, and possibly a group of gray neck Monophyletic. 2) *A. griseimembra* or *A. vociferans* haplotypes are characteristic for species with possibly give rise to Current species genero. 3) The climatic and geological processes that occurred during the Pleistocene forest refuges as well as a possible cause of the high genetic variability of grupo. 4) species of the genus *Aotus* processes were analyzed genetic drift and staspatric speciation. 5) The processes of molecular and karyotypic evolution occurs independently.

1. INTRODUCCION.

Los primates Neotropicales ocupan un tercio de la riqueza en todo el planeta, con 16 géneros, 98 especies y 204 subespecies reconocidas. Se extienden por Colombia, Bolivia, Ecuador, Brasil, Perú y Argentina. Estos primates están organizados dentro del infraorden Platyrrhini. (Fernández, 1993). Sin embargo, el origen, biogeografía, taxonomía y sistemática de algunos géneros se encuentra incompleta y es aun cuestionable (Horovitz, et al, 1998).

Las especies del genero *Aotus* pertenecientes a la familia Ceibidae, habitan principalmente los bosques húmedos en el sur de América. Se caracterizan por tener hábitos nocturnos y ser de gran interés biomédico al ser los únicos ceibidos que naturalmente son susceptibles a contraer Malaria por infección con parásitos (Baer, et al, 1994).

Aun así, siendo una especie sometida a diversos estudios como modelo biológico, no presenta una filogenia totalmente esclarecida o solucionada y su taxonomía sigue siendo cuestionable a partir de las parciales inconsistencias en estudios que incluyen características morfológicas, citológicas, genéticas, etológicas entre otras (Horovitz, et al, 1998).

A la fecha se reconocen los estudios con hipótesis filogenéticas realizados por Ma(1981) utilizando patrones citogeneticos y las investigaciones realizadas por Ashley & Vaught (1995) y Plautz et al (2009) en donde se utilizaron seis y 12 secuencias de ADN mitocondrial respectivamente.

El uso de marcadores moleculares en los análisis genéticos poblacionales ha permitido en las últimas décadas esclarecer filogenias, fitogeografías y patrones evolutivos. Por lo tanto su uso como herramienta para determinar estructura genética en las poblaciones es muy útil ya que precisan información verificable y concreta (Ashley & Down, 1994).

Es por esta razón que con este estudio filogenético se pretende realizar una reconstrucción filogenética y un análisis de la estructura genética de las poblaciones del genero *Aotus*, específicamente de las siguientes especies *Aotus lemurinus griseimembra* (Elliot 1912), *Aotus nancymae* (HersHKovitz, 1983), *Aotus vociferans* (Spix, 1823), *Aotus miconax* (Thomas, 1927), *Aotus azarae* (Humboldt, 1811) *Aotus nigriceps* (Thomas, 1927), *Aotus azarae* (Humboldt, 1811).

Con los resultados obtenidos se propondrá una filogenia para el género en donde esta aportara mayor información para formular o apoyar alguna de las hipótesis anteriormente mencionadas. Así mismo, será posible analizar el estado genético en el que se encuentran las poblaciones de Aotus, y de esta manera determinar en qué estado de conservación se encuentran las especies del género, teniendo en cuenta que estas especies han sido sometidas a exhaustivas investigaciones en la biomedicina como modelo experimental en la evaluación de fármacos en estudios oftalmológicos, en la enfermedad Epstein-Barr, enfermedades producidas por polyomavirus y sobre todo en estudios contra la Malaria, también está sometida al tráfico ilegal al ser utilizadas como mascotas o como subproductos por su carne y finalmente pueden estar amenazadas ya que la pérdida de su hábitat es una gran amenaza(Defler,2003).

A partir del uso de marcadores moleculares como el gen mitocondrial citocromo oxidasa II, en donde, se tiene como objetivos principales: determinar los niveles de variabilidad genética de COII en el género Aotus y entre cada una de las especies analizadas., determinar el grado de heterogeneidad genética entre las especies de Aotus para detectar si existe aislamiento genético entre ellos, así mismo, detectar posibles cambios demográficos en la historia natural de Aotus y finalmente reconstruir las posibles relaciones filogenéticas entre el género Aotus por medio de distintos procedimientos, estimar el posible tiempo de divergencia entre las especies de Aotus y encontrar las relaciones que dividen al género con respecto a los cambios geológicos y climáticos durante el Pleistoceno.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 PRIMATES NEOTROPICALES.

Los primates neotropicales o del nuevo mundo, se encuentran organizados dentro del infraorden de Platyrrhini. Para este infraorden se han descrito entre 14 y 15 géneros a partir de marcadores moleculares (Opazo et al, 2006). En donde se conoce que dentro de los primates neotropicales o Platyrrhini se pueden establecer tres linajes evolutivos organizados de la siguiente manera, Atelinos, Pithecinos y Ceibidos, los cuales presentan alta plasticidad morfológica.

Según estudios realizados por Schneider (2000) es necesario realizar nuevas investigaciones que permitan construir y esclarecer la relación filogenética entre estos tres linajes la cual a la fecha es aun cuestionable y no del todo clara.

Teniendo en cuenta las conclusiones en estudios anteriormente realizados por Schneider & *et al* (1996), y otros análisis realizados con genes moleculares, Ruiz-García & Álvarez (2002) con ADN nuclear y microsatélites en donde encontraron una filogenia que encierra siete géneros para los Primates del Neotrópico; se encuentra incongruencia en la taxonomía. Los autores antes mencionados proponen diferentes hipótesis que conllevan a no establecer una única filogenia, sin embargo se mantiene la conclusión de la presencia de tres linajes.

En relación con lo anterior y para establecer la filogenia de los grupos actuales, se han desarrollado análisis mediante técnicas relacionadas con análisis cladísticos, en donde se han estudiado diversos caracteres a partir de variables morfológicas cariotípicas y moleculares (Defler, 1994).

Sin embargo la conclusión en la filogenia derivada de estos estudios no es precisamente la más concordante cuando se pretende proponer una hipótesis que incluya las características tanto morfológicas como moleculares. Debido a que, en si estos caracteres no representan necesariamente relaciones de concordancia con respecto al proceso de evolución.

Esta inconsistencia se puede observar de igual manera a nivel de géneros. Así para el género *Aotus* no se han encontrado pautas que unifiquen estas hipótesis de evolución por lo tanto no se encuentra evidente una filogenia que reúna todos los parámetros de estudios previos, de esta manera la información que se conoce sobre el género *Aotus* es suficiente para encontrar y describir aspectos biológicos, ecológicos y etológicos pero no filogenéticos. Se conocen diversos estudios relacionados con factores morfológicos, bioacústicos, genéticos y ecológicos para este género, sin embargo hoy en día estos estudios no relacionan la filogenia del taxón de una manera concreta presentado confusión entre las descripciones y la sistemática de las especies con sus respectivas subespecies

2.2 DESCRIPCIÓN DEL GENERO AOTUS

Las especies del género *Aotus* son denominadas según su lugar de distribución de diferentes maneras como, mico nocturno, martica, martejas, entre otros nombres. Su nombre *Aotus* se refiere a *Aotes*, que quiere decir "sin orejas", debido a su aspecto que no hace evidente las orejas (Hernández-Camacho & Cooper, 1975).

Son primates de un tamaño medio entre 24 y 47 cm, la cola tiene una longitud que varía entre 22 a 41,8 cm, con un peso corporal entre 700 y 1100 g, (Defler 2003). Son fácilmente reconocibles por las vocalizaciones que presentan o por su morfología típica (Emmos&Feer 1999).

Aun así reconocer las especies dentro del género se hace complicado si solo se tienen en cuenta aspectos morfológicos y su coloración típica, ya que se considera que es un complejo de especies gemelas(Defler 2003). Debido a sus hábitos nocturnos presentan ojos grandes, pero su visión es policromática, presentan también un pelaje denso, suave y corto.

El estudio más aceptado a la fecha es el presentado por Ma (1981) en el cual se analizaron variables morfológicas, citológicas, etológicas y patrones geográficos obteniendo un complejo de 9 especies, las cuales están separadas básicamente por la coloración de su cuello que puede ser gris o roja dependiendo de su distribución geográfica. Las especies de cuello gris se encuentran ubicadas al norte del río Amazonas, estas cuatro especies son susceptibles a la malaria, se incluyen, *Aotus lemurinus* con tres subespecies, *Aotus lemurinus lemurinus*, *Aotus*

lemurinus zonalis y *Aotus lemurinus griseimembra*, *Aotus herskovitzi*, *Aotus trivirgatus*, *Aotus brumbacki*, y *Aotus vociferans* (Herskovitz, 1983). Estas especies presentan pelos con una tonalidad gris-agouti que se ubican hacia los lados del cuello y alrededor de las orejas. Este es considerado como un carácter ancestral en el género.

Las especies de cuello rojo se encuentran ubicadas al sur del río Amazonas, con un complejo de cinco especies que no presentan susceptibilidad a la malaria, en donde se incluyen *Aotus nancymae*, *Aotus miconax*, *Aotus azarae*, *Aotus nigriceps* y *Aotus infulatus* (Herskovitz, 1983). Presentan pelos con tonalidad naranja que varía de rojo anaranjado oscuro a brillante, ubicados a los lados del cuello y alrededor de las orejas.

Para las especies del género, se considera que su color dorsal difiere según la ubicación de las especies siendo del norte o sur del río Amazonas, en donde, el color puede ser gris o vino tinto respectivamente, el color del vientre suele ser blanco o variar hasta naranja según la especie, debajo de cada ojo presentan un parche de color blanco que da una forma de media luna, presentan una línea media y dos laterales que se unen en la cima y son de color negro (Redford, 1992). En la cola se evidencia un mechón terminal (Defler, 2003).

Estas especies se caracterizan por presentar en su región genital una glándula que es más desarrollada en machos que en hembras, esta glándula genera una sustancia desde la pubertad que posee un olor fuerte y que permite o es utilizada como un estímulo para la interacción social, en esta glándula se da el crecimiento de pelos que son más gruesos distalmente que en su origen o raíz, estos pelos se enredan y forman un cumulo, generalmente se asocia la consistencia y el color de la sustancia producida con el de la brea (May, 1960; Dixon et al., 1980). Estas características dan identidad específica si se analizan en compañía de otras como el origen geográfico y datos relacionados con el cariotipo del animal (Defler, 2003).

2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Aotus* se caracteriza por habitar en los bosques tropicales de Sudamérica y parte de Centroamérica, entre las latitudes 10°N y 17°S, sin embargo no en todo este rango de distribución se encuentran presentes las especies del género, no se cuentan con registros para los llanos orientales de Venezuela, y países como las Guayanas (Fernández, 1993),

generalmente frecuentan las zonas boscosas húmedas y subhúmedas, en donde, solo descienden al suelo en busca de alimento (Redford, 1992),

Según, Ford (1994), (Fig.I), en cuanto a las especies de cuello gris presentes hacia el norte del Río Amazonas, se incluye *A. lemurinus* (Geoffroy, 1843) del norte de Colombia y Venezuela, incluye *A. l. lemurinus* se encuentra en Panamá y occidente y suroccidente de Colombia incluyendo una porción del oriente de los Andes, y *A. l. griseimembra* (Eliot, 1912) se extiende desde la costa norte de Colombia hasta el extremo noroccidental de Venezuela, y muy posiblemente una porción muy estrecha en el sur a lo largo del valle del río Magdalena dividiendo este rango en dos por sus subespecies hermanas.(Ford, 1994)

Representantes de la especie *A. brumbacki* (Hershkovitz, 1983) se presentan en un enclave hacia la cuesta oriental de los Andes alrededor de Villavicencio y Fusagasuga, Colombia. (Ford, 1994) *A. trivirgatus* (Humboldt, 1811) se extiende desde el occidente del Río Trombetas hasta el Río Negro y desde el norte del banco del Río Amazonas dentro de el área del Río Cauca-Río Orinoco en Venezuela, aparentemente restringida al banco sur del Río Orinoco. (Ford, 1994) *A. vociferans* (Spix, 1823) bordea a *A. trivirgatus* hacia el occidente, extendiéndose desde el banco occidental del Río Negro hasta el Río Cenepa en las altas montañas Andinas de Ecuador y Perú, y desde en banco norte del norte del Amazonas hasta una distancia indeterminada. Allí también hay un enclave, posiblemente de origen reciente en el sur del Río Amazonas a lo largo del Río Purus.

Las especies del banco sur del Río Amazonas incluyen: *A. infulatus* (Kuhl, 1820) en el oriente, extendiéndose desde la boca del occidente del Río Tapajos y Río Jurena y dentro de Rondonia (Pieczarka et al., 1993), y el sur en Mato Grosso de Brasil hasta el Río Paraguay. La extensión de su distribución al occidente del Río Tocantins es desconocida, pero existe en el banco oriental (Sampaio et al., 1991; Scheneider et al., 1989). Esta especie está limitada hacia el occidente por *A. nigriceps* (Dollman, 1909), desde el occidente del Río Huallaga y el sur desde el Amazonas posiblemente hasta el Río Guapore y Río Madre de Dios. (Ford, 1994)

A. nancymae (Hershkovitz, 1983) se encuentra en el norte de Perú y occidente de Brasil, en un rango ligeramente más grande que lo originalmente descrito por Hershkovitz, *A. nancymae* se expande por el sur desde el Río Amazonas/Marañón cerca de los 7 grados latitud sur, bordeado allí por *A. nigriceps*, y desde el occidente del Río Huallaga (posiblemente arriba de la vertiente

oriental de los Andes) hasta el Río Yavari (Aquino y Encarnación, 1988) o en el Río Jutai (HersHKovitz, 1983). Allí también hay un pequeño enclave en el norte del Río Marañon, desde la parte baja del Río Tigre hasta la parte baja del Río Pastaza. Los especímenes desde el occidente y sur del Río Huallaga cerca de los 10 grados sur en la vertiente oriental de la cordillera de los Andes son *A.miconax* (Thomas, 1927). La mayoría de los representantes del sur de Aotus pertenecen a la especie *A. azarae* (Humboldt, 1811) extendiéndose en el sur desde el Río Madre de Dios y Río Guapote en Bolivia entre de Paraguay y en el norte de Argentina hacia el sur del Río Bermejo, y al occidente desde el Río Paraguay hasta los Andes en el Norte de su rango. Estas especies se encuentran divididas por un arco que se extiende aproximadamente desde el Lago Uberaba en el occidente de Sucre, Bolivia, en el occidente presentando hacia el norte la subespecie *A. a. boliviensis* (Elliot, 1907) y hacia el sur a *A. a. azarae* (Ford, 1994, citado en Baer, 1994).



Figura I. Distribución de 9 especies y 4 subespecies de *Aotus* reconocidas Plautz et al (2009)

2.4 HISTORIA NATURAL DEL GÉNERO

Teniendo en cuenta que el género de Aotus presenta un cuerpo delgado y frágil, los individuos del género Aotus se desplaza dentro del bosque por medio de lianas y sobre ramas delgadas. Las especies del genero habitan bosques húmedos y subhúmedos de tipo remanente, continuos o secundarios, o fragmentos de bosque (Baldwin 1985). Se encuentran desde los 0 m.s.n.m hasta los 3200 m.s.n.m en bosques montañosos (Aquino y Encarnación, citado por Baer, 1994).

Cuando se encuentra en el dosel utiliza una posición cuadrúpeda al igual que cuando se alimenta, pero dan saltos cuando está en las partes bajas, en ocasiones se ha descrito que también trepan para obtener frutos y algunos insectos aunque son primordialmente frugívoros (Feagle 1999).

Las especies de este género se caracterizan por forman grupos pequeños los cuales se basan en la formación de parejas monógamas que se alimentan primordialmente de insectos y frutos, en donde, pueden compartir un árbol mientras forrajean con otras parejas, cuando el habitat ha sido muy intervenido, los monos permanecen en huecos de árboles, pero en ambientes óptimos presentan densidades de hasta 40 individuos por Km² (Wright 1981 (citado por Redford, 1992).

Habitan casi todos los tipos de bosques a excepción de las tierras inundadas por manglares, el género Aotus frecuenta bosques secundarios, al igual que las plantaciones sombreadas de café y bosques degradados. También frecuentan bosques de crecimiento primario y bosques de galería. Presentan funciones ecológicas importantes como dispersores de semillas, y muestran preferencias por diferentes variedades de comunidades y formaciones de plantas, las cuales difieren de acuerdo a la altitud y latitud de su rango geográfico (Aquino y Encarnación, citado por Baer, 1994)

En vida libre ocupan la mayor parte de su tiempo buscando frutas y artrópodos como orugas, ortópteros, larvas en ocasiones comen, flores y vertebrados, por lo tanto pasan la mayor parte de la noche recorriendo el bosque (Feagle 1999),

Su periodo de actividad se da en la noche, en la mañana desciende la actividad. En horas de la mañana prefieren la mitad del bosque debido a la intensidad solar, y hacia el medio día mantienen un periodo de una hora de quietud, principalmente porque la temperatura asciende hasta los 35°C (Baldwin 1985).

Las especies que se distribuyen en Panamá son estrictamente nocturnas, emergen de los huecos de los arboles luego del anochecer y retornan al amanecer, las especies que se distribuyen al norte de la Argentina son un poco mas diurnas, donde también el rango de hogar por familia se reduce, a menos de cuatro hectáreas (Ford 1994).

En estas especies los machos cuidan y transportan a las crías, solo son dados a la madre para la alimentación durante las primeras dos semanas de vida, luego de este periodo el macho transporta y cuida la mayoría del tiempo al infante.

Algunas interacciones de competencia y otros comportamientos entre grupos de *Aotus* fueron observados por Moynihan (1964) en Panamá y por Rathburn y Gache (1980) en Argentina, estos ocurren más frecuentemente en rangos de hogar que están sobrelapados y donde los frutos son escasos.

Así mismo, se puede presentar competencia con otros mamíferos nocturnos con patrones comportamentales similares a los de *Aotus* y que ocupan los mismos estratos del bosque. Se ha observado en muchos casos competencia entre *A. vociferans* y *Potos flavus* en varias localidades. (Aquino y Encarnación, citado por Baer, 1994).

Según Thorington et al., (1975). la estrategia principal de *Aotus* es localizar un árbol como resguardo que se encuentre cerca de un área con buenas reservas de alimento, de igual manera para conseguirlo se mueven silenciosamente entre los árboles y no articulan ninguna clase de sonido .

Por lo general los individuos del genero *Aotus* vocalizan en las noches y al amanecer para iniciar la partida del grupo o como señal de alerta el cual ha sido determinado como un gruñido-estornudo, suena como un clic metálico, usualmente producido en secuencias de dos a tres y sirve como una señal de advertencia. (Moynihan, 1964 (citado en Redford, 1992)), producen

sonidos similares a “gulp”, en secuencias de dos a cinco, como señal de contacto, los juveniles en sus juegos vocalizan muy poco y simulan mordidas, correteos y balanceos sobre las patas siempre en el dosel o en el medio de los arboles (Barbosa & Romero 1982). Por lo general en los grupos se mantiene una proporción de sexos similar (Baldwin 1985).

Esta especie ha sido custodiada en cautiverio desde hace varios años ya que se le considera una especie llamativa y también ha sido utilizada para estudios biomédicos, en donde también se ha estudiado su vocalización, reproducción, etología, fisiología, entre otros (Baldwin 1985).

Cuando la especie se encuentra en cautiverio su estructura poblacional depende del área, del agrupamiento social y del lugar que la especie tenga para desarrollarse, los machos en cautiverio presentan comportamientos estereotipados y suelen ser agresivos razón por la cual solo permanecen pocos individuos (Ford 1994).

2.5 CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS Y FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Aotus*

La taxonomía y sistemática de los primates neotropicales es aun controversial y se encuentran muchos interrogantes cada vez que se aborda mas el tema, como por ejemplo, no se tiene claro ¿cuál es el patrón de ramificación exacto de *Aotus*, *Cebus*, *Saimiri* y *Callitrichide*? O ¿cuál es la relación entre *Pithecinos*, *Atelinos* y *Cébidos*? (Schneider, 2000).

Esto ha llevado a que hoy se utilicen diferentes marcadores moleculares como el gen Eosin - globina con el cual se determino las relaciones entre los 16 géneros de primates neotropicales entre los que se encuentra *Aotus* (Shneider; *et al*, 1993), sin embargo para el infraorden *Platyrrhini* se encuentra una incongruencia ya que no se establece totalmente la relación de este con la familia *Ceibidae*.

Es por esta razón que se han realizado diferentes investigaciones dentro de las cuales se han utilizado diversos marcadores moleculares como por ejemplo el estudio realizado con ADN mitocondrial por (Horovitz & Meyer, 1995), y las investigaciones con intrones de E-globina y genes nucleares realizados por (Shneider *et al*, 1996).

Los estudios realizados para establecer la filogenia mas parsimoniosa para el género *Aotus* han estado basados en variables morfológicas, citológicas, moleculares, etológicas , patrones geográficos y evolutivos; sin embargo las conclusiones de estos trabajos han demostrado que no existe una relación entre las variables y la topología de las especies, en los arboles filogenéticos, es decir los arreglos taxonómicos no son congruentes, porque la evolución de caracteres morfológicos no está necesariamente relacionada con la evolución de caracteres moleculares (Canavez, *et al*,1999).

Humboldt (1812), describió el género *Aotus* como un género que habitaba todo el centro y sur de América y le otorgo una sola especie *Aotus trivirgatus*, Hershkovitz, (1983) duda sobre la monoespecificidad del genero propuesta por Humboldt, ya que a partir de diferentes hallazgos se demostraban otras formas para el género, a partir del análisis de variables morfológicas, distribución geográfica y sobre todo por el análisis de los cariotipos.

Los cariotipos se encontraron polimórficos según estudios de Brumback et al (1971), dados como $2N=52$, $2N=53$ de Colombia y $2N=54$ de Perú y se asumen diferencias citológicas y también de coloración bien diferenciadas; es así como Brumback (1973) define a la población Colombiana como *Aotus grisseimembra* y a la población Peruana como *Aotus trivirgatus*. En posteriores estudios realizados también por Brumback se demuestra el descubrimiento de una tercera forma cariotípica perteneciente a Paraguay, sin embargo más adelante se reportó perteneciente a Villavicencio (Meta-Colombia), aunque, Hershkovitz (1983) la cataloga como una nueva especie denominada *Aotus brumbacki*.

Es así como se evidencia que la filogenia del género presenta múltiples incongruencias, y por lo tanto investigaciones realizadas por Ma et al., (1976a, 1976b, 1977, 1978, 1980), demuestran que existen diferencias cromosómicas para los individuos de Colombia y Panamá. Esta autora también propone que posiblemente existieron diferentes proceros de especiación y que debido a esto es posible reportar 9 especies, con diferentes formas cariotipicas, pero partiendo de cuatro fenotipos concretos (Ma 1981).

Los eventos de subespeciación para el género *Aotus*, parten desde la idea que afirma que posiblemente grupos aislados ancestrales los cuales habitaban áreas aisladas confinadas pero separadas con el pasar del tiempo fueron acumulando procesos de fusión y/o inversiones al

darse entrecruzamiento entre los individuos. Al pasar el tiempo pudo ocurrir una reasociación subsecuente de la progenie de tales individuos, dejando así la formación de descendientes con mezclas de las fusiones o inversiones producidas en sus complementos. Es así que posiblemente se dio la radiación en diferentes hábitats que al estar determinados por los cambios genéticos produjo un aumento en las formas del género *Aotus*, las cuales no son posibles de identificar con criterios taxonómicos básicos.

En años recientes se ha propuesto que posiblemente los arreglos cromosómicos del género *Aotus*, se dieron no por fusión sino por fisión, debido a que generaron diploides que son más elevados en su estado más primitivo. Donde *Aotus lemurinus* ($2n=58$) del norte serían los más primitivos siguiendo hacia el sur con *Aotus vociferans* ($2n=46-48$) y *Aotus azarae* ($2n=49-50$). (Defler et al., 2001) Tabla I. Para el género *Aotus* entonces se encuentran formas cariotípicas que van desde 46 a 58 pares de cromosomas, esta variedad es posible sustentarla como consecuencia de la subespeciación ocurrida a lo largo de las áreas geográficas limitadas.

Esta hipótesis también dice que posiblemente con la movilidad o migración de estas formas de *Aotus* se pudo producir una selección aleatoria que se fue adaptando a los nuevos hábitats, en donde la evolución y la selección produjeron cambios genéticos a nivel local produciendo así las formas cromosómicas que se conocen actualmente (Ma, 1981).

Tabla I. Cariotipos conocidos de las especies de *Aotus* (Ford, 1994)

Taxon	Cariotipo según Ma(1981)	2N	
		Machos	Hembras
<i>A. lemurinus lemurinus</i>	VIII, IX	55,56	55,56
<i>A. lemurinus griseimembra</i>	IV, III, II	52,53,54	52,53,54
<i>A. brumbachi</i>		50	50
<i>A. trivergatus</i>		46,47,48	46,47,48
<i>A. vociferans</i>	V	51	52
<i>A. nigreps</i>	VII	54	54
<i>A. nancymae</i>	I		
<i>A. miconax</i>		49	50
<i>A. infulatus</i>	XII	49	50
<i>A. azarae azarae</i>		49	50
<i>A. azarae boliviensis</i>	VI	49	50

A partir de estos estudios se definen nueve especies alopátricas para el género *Aotus*, en donde se dividen en dos grupos naturales que se hacen diferentes por su morfología, color y estructura del pelaje como también por su cariotipo Hershkovitz (1983).

Las especies de cuello gris las cuales se distribuyen al norte del río Amazonas se caracterizan por presentar en su cariotipo dos cromosomas discretos, los cuales son el número seis y siete Hershkovitz (1983). Para las especies de cuello rojo que se distribuyen al sur del río Amazonas se hace evidente en los cariotipos una traslocación en los brazos de los cromosomas Hershkovitz (1983). La estructura genética de algunas de las especies y subespecies del género *Aotus* muestran heterocigosis, sin embargo algunas especies están en peligro y otras son vulnerables según la IUCN.

Es importante considerar los resultados de un análisis genético poblacional para la totalidad del género *Aotus*, empleando marcadores moleculares de segunda generación como lo es el gen mitocondrial citocromo *b* y confirmar apoyando alguna de las hipótesis la estructura genética del género.

2.6 ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial es muy útil dependiendo de los resultados que se esperan y del tipo de marcador molecular que se emplea en estudios filogeográficos, algunas ventajas que ofrece son, las tasas de evolución para esos genes son altas y no se produce recombinación, el modo de herencia materna permite que los polimorfismos que ocurrieron miles de años atrás se presenten todavía en altas frecuencias y, finalmente, se presenta un alto número de copias dentro de la célula, aunque no sea muy variable como otros marcadores (Hwang & Kim, 1999).

Específicamente el gen mitocondrial citocromo II oxidasa, es un componente obligatorio de la cadena respiratoria, la región control del ADN_m se considera importante por contener el origen de la replicación.

El citocromo c oxidasa es el componente terminal de la cadena de transporte de electrones, su función es reducir el oxígeno molecular, transformándolo en agua, se caracteriza por ser un complejo oligomérico, en donde, tres subunidades están codificadas en el genoma nuclear y son sintetizadas en el citoplasma e importadas al interior de la mitocondria.

Como se menciono anteriormente los estudios filogenéticos realizados anteriormente con este gen han permitido elucidar información filogenéticos para los géneros *Cebus* y *Ateles*, por lo tanto su uso como marcador molecular es confiable.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Material Genético

El material genético de los primates del género *Aotus* provenientes de Colombia, Perú, Brasil, Ecuador y Bolivia se obtuvo a partir de muestras de sangre, manchas de sangre, tejido, pelos con bulbo, pieles, cráneos y dientes; las muestras se localizaban en el laboratorio de genética de poblaciones de la Pontificia Universidad Javeriana y fueron obtenidas en diferentes salidas de campo realizadas por Manuel Ruiz García Ph.D y colaboradores. El tamaño muestral fue de 69 individuos con sus respectivas secuencias para el gen mtCOII.

De las muestras que se encuentran actualmente en el laboratorio de Genética de poblaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, se escogieron las que presentan orígenes geográficos representando 7 taxones de *Aotus* mencionados anteriormente.

3.2 Procedimientos de Laboratorio

El ADN fue extraído de sangre, manchas de sangre, dientes, piel, músculos o de pelos con folículos. (Protocolos de extracción ver Anexos) Las muestras de sangre fueron preservadas en EDTA disódico, las manchas de sangre fueron preservadas en bolsas plásticas, al igual que las muestras de dientes y pelos, las muestras de piel y músculos se preservaron en etanol absoluto, todas las muestras se mantienen a -20° C, hasta el momento de su extracción.

El ADN procedente de sangre, piel, tejido y medula de diente, fue extraído por medio de solventes orgánicos con fenol cloroformo (Sambrock et al., 1989). Las muestras de pelo y mancha de sangre fueron extraídas con un 10% de resina Chelex®100 (Sean et al., 1991).

Los primers empleados para amplificar en el PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) el gen mitocondrial COII fueron L6955 (5'-AACCATTTTCATAACTTTGTCAA-3') y H7766 (5'-CTCTTAATCTTTAACTTAAAAG-3') (Ashley y Vaughn, 1995; Collins & Dubach, 2000)

El PCR se realizó en un volumen de 50 μl con mezclas de reacción que incluye 4 μl de 10x Buffer, 6 μl de 3mM MgCl_2 , 2 μl de 1 mM dNTPs, 2 μl (8 pmol) del primer primer, 2 unidades de Taq DNA polimerasa, 13.5 μl de H_2O y 2 μl de DNA

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un sistema de PCR Termociclador icyclerTM Biorad. Las temperaturas empleadas fueron las siguientes: 95 ° C durante 5 minutos, 35 ciclos de 45 s a 95 ° C, 30 s, a 50 ° C y 30 s a 72 ° C y una extensión de tiempo durante 5 minutos a 72 ° C. Todas las amplificaciones, incluidos los casos positivos y controles negativos, se verificaron en geles de agarosa al 2%, utilizando como marcador de peso hyperladder IV y con tinción de bromuro de etidio.

Las muestras fueron secuenciadas y purificadas en una sola dirección de la cadena por Macrogen Inc. Estas secuencias fueron alineadas utilizando el editor de ED opción DEBE (Philippe, 1993) y el programa de alineación de ADN, estas alineaciones fueron revisadas manualmente.

Para corroborar o verificar que las secuencias pertenecen al gen de estudio se llevaron a Blastn para de esta manera por homología confirmar que se trata de secuencias mitocondriales. Seguidamente las secuencias serán editadas manualmente utilizando el programa BioEdit (Hall, 1997), y de esta manera se realizó el alineamiento de todas las secuencias de Aotus y de las secuencias homólogas que serán utilizadas como grupos externos de manera manual y utilizando Clustal -X (Thompson *et al.*, 1997).

3.3 Análisis Estadísticos.

El primer análisis estadístico genético poblacional que se realizó refleja los niveles de diversidad genética. Estos estadísticos fueron la diversidad haplotípica (H_d), la diversidad nucleotídica (π) el número medio de diferencia de nucleótidos (k) (Tajima, 1983). Los cuales fueron calculados utilizando el software DNAsp4.10.6 (Rozas *et al.*, 1999).

Para medir la heterogeneidad genética y el posible flujo de genes entre todos los taxones de Aotus, se llevaron a cabo diferentes pruebas. Estas pruebas serán las de Hudson *et al.*, (1992a, b) (H_{ST} , K_{ST} , K_{ST}), Hudson (2000) SNN y la prueba de ji cuadrado de la frecuencia con

permutación haplotípica, con 10.000 réplicas, así como el estadístico G_{ST} para las frecuencias de los haplotipos y los estadísticos y_{ST} , N_{ST} y F_{ST} (Hudson et al., 1992a) para calcular las frecuencias nucleotídicas.

3.4 Análisis de Filogenia

Para obtener una perspectiva evolutiva filogenética del género *Aotus*, se llevaron a cabo varios análisis. El primero será la aplicación del programa FindModel para determinar entre 28 diferentes modelos de evolución de nucleótidos, cual es el más probable para los organismos de *Aotus* y esta secuencia junto con las secuencias externas (*Cebus albifrons*, *Ateles paniscus*, *Ateles chamek*, *Ateles geoffroyi*, *Alouatta seniculus*, *Alouatta caraya* y *Alouatta palliata*).

En la aplicación de FindModel, se emplearon dos estrategias. El primer árbol fue construido utilizando PAUP y la distancia Jukes-Cantor el algoritmo neighbor-joining así como el uso del programa de Weighbor. (Saitou & Nei, 1987; Sokal & Michener, 1958) Se aplicó el Patrón de prueba de homogeneidad (ID de prueba), a todos los pares de secuencias de *Aotus* para determinar si la tasa evolutiva de cada uno de los especímenes estudiados se mantuvo constante o no.

Los árboles filogenéticos se obtuvieron por medio de las distancias genéticas de Kimura, distancia de 2 parámetros y entre diferentes tipos de sitios, Kimura, 1980; Tamura 3 parámetros, distancia con uniforme y entre los diferentes tipos de sitios y el mismo patrón y la heterogeneidad entre los diferentes linajes, Tamura, 1992; y el inicio de sesión con el método Det patrón de heterogeneidad entre los diferentes linajes; (Nei y Kumar, 2000) y vecino a participar y algoritmos UPGMA (Saitou y Nei, 1987; Sokal y Michener, 1958), compuesto por el máximo riesgo con y sin gamma de diferentes tipos y modelos heterogéneos (Tamura et al., 2004), por el análisis de máxima verosimilitud, por el análisis de máxima parsimonia y con los procedimientos bayesianos (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

En esta última técnica, las siguientes condiciones se emplearon: $nst = 6$, las tasas = invgamma (GTR modelo gamma-distribuido con tasa de variación a través de los sitios), 800.000 generaciones y una muestra de frecuencias de 10, que garantiza al menos 80,000 muestras de la parte posterior de probabilidad distribución. Esto arrojará un promedio de desviación estándar de división de frecuencias. Burning fue de 25% y el potencial de reducción de factor de escala (FRSP) para detener la marcha será cuando esta estaba cerca de la unidad de todos los

parámetros. Los programas utilizados para estas tareas serán Mega 4.0, PAUP * 4.0b8, y MrBayes 3.1.

Finalmente, para estimar la divergencia entre los haplotipos en los taxones de *Aotus* estudiados, Median Joining network (MJ; Bandelt et al., 1999) se aplicó por medio del software de Network 4.2.0.1 (Fluxus Technology Ltd.). Una vez que el haplotipo de Network (Morral et al., 1994) fue estimado. El estadístico ρ (Morral *et al.*, 1994) fue estimado, este estadístico mide la edad de un nodo de unidades en mutaciones ancestrales. Este valor se transforma en años por la multiplicación de la tasa de mutación. Además, el estadístico de desviación estándar (σ) se calcula (Saillard et al., 2000).

El estadístico σ es objetivo y muy independiente de los últimos acontecimientos demográficos. Estos acontecimientos podrían haber influido en la forma de un árbol evolutivo, pero sólo influye en el error de la estimación de ρ , se ha estimado una mutación cada 191,000 años en el gen mitocondrial COII. Aunque algunos tipos de aceleración podrían haber cambiado durante la evolución de los haplotipos, sin embargo, no debería tener una influencia notable sobre la divergencia en el tiempo, ya que se divide entre los haplotipos de *Aotus* que serán obtenidos (Saillard et al., 2000).

4 RESULTADOS.

Se secuenciaron 69 individuos del genero *Aotus*, en donde se representan 7 especies *Aotus nancyame*, *Aotus vociferans*, *Aotus griseimembra*, *Aotus brumbacki*, *Aotus azarae*, *Aotus azarae azarae*, *Aotus azarae boliviensis*.

4.1 Diversidad genética

La diversidad genética encontrada estadísticamente se presenta en la tabla II. En su totalidad para los individuos analizados se encontraron 252 sitios segregantes (S), 34 haplotipos(h), una diversidad haplotípica (hd) total de 0,95048, un numero medio de diferencias nucleotidas (kt) de 33,41250 y una diversidad nucleotídica total(π) de 0,05663. en donde el mayor numero de haplotipos lo presento *A.vociferans* con 16 y *A.nancymae* con 10.

Asi mismo *A.vociferans* también presento el mayor numero de sitios segregantes (SS) con 101.y valores altos para la diversidad nucleotida ($\pi= 0.02235$)y para el numero de diferencias nucleotídicas ($k=13,18$) con el mayor numero de haplotipos (H) aun asi *Aotus azarae boliviensis* con tres secuencias estudiadas, ostenta valores altos para k y π , 16 y 0.02712 respectivamente. Algunos valores bajos para este análisis los evidenciaron *A.griseimembra* con (S=0; k=0; $\pi=0$)

Tabla II. Diversidad Genética de las Especies de *Aotus*.

Especies	NS	SS	H	H α	K	π
<i>A.griseimembra</i>	9	0	1	0	0	0
<i>A.brumabacki</i>	4	1	2	0,5	0,5	0,00085
<i>A.vociferans</i>	32	101	16	0,8851	13,185	0,02235
<i>A.nancymae</i>	15	19	10	0,9333	4,705	0,000797
<i>A.nigriceps</i>	2	6	2	1	6	0,01017
<i>A.a.boliviensis</i>	3	24	3	1	16	0,02712
total	65	252	34	0,9505	33,412	0,05663

4.2 Diferenciación genética

Los resultados estadísticos para la diferenciación genética analizando en conjunto todas las secuencias de *Aotus* se muestran en la tabla II, se encontró que el análisis es estadísticamente

significativo y que las secuencias del gen COII son una fuente confiable y rigurosa para discriminar y diferenciar entre los taxones analizados. Teniendo como referencia los siguientes resultados, $\chi^2=325$; $gl=165$; $P=0.000001$.

En relación con la secuencia general de Aotus se encontraron los siguientes resultados; k_{ST} (= 0.7596; $Nm = 0.16$), N_{ST} (= 0.9183; $Nm = 0.04$) y F_{ST} (=0.9045; $Nm = 0.05$). Como se evidencia estos valores son altos y corroboran las claras diferencias entre los taxones de Aotus que fueron comparados.

4.3 Heterogeneidad genética

La alta heterogeneidad genética entre pares de taxones de Aotus es mostrada en la tabla III. De esta tabla es posible concluir con los valores elevados al cuadrado que todos los individuos estudiados son realmente especies. En donde, algunas de las parejas formadas con *A.vociferans*, y ente *A.brumbacki* y *A.griseimembra* presentan valores bajos de heterogeneidad.

Tabla III. Diversidad Genética de las Especies de Aotus.

Estadísticos	Probabilidad	Estadísticos2	Flujo genético(Nm)
χ^2 325 $gl=165$	0	$G_{ST}=0,21212$	1,86
Hst = 19235	0	$\Gamma_{st}=0,75958$	0,16
Kst =0,74468	0	$N_{ST}=0,91834$	0,04
Z =438,75	0	$F_{ST}=0,90447$	0,05
Z* =5,5159	0		
Smm =1	0		

4.4 Modelos Evolutivos

Los modelos evolutivos incluidos para desarrollar los análisis filogenéticos son los siguientes. El modelo evolutivo seleccionado fue Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa et al., 1985) Gamma usando AIC (Akaike Information Criterium; Akaike, 1974) ($AIC = 8260.910454$) por medio del programa FindModel; y el modelo evolutivo con mayor probabilidad para las secuencias en general de Aotus fue el General Time Reversible (GTR) plus Gamma LnL = - 4123.573334), utilizando el coeficiente de máxima verosimilitud.

4.5 Homogeneidad (ID prueba)

La prueba de patrón de homogeneidad determino que la mayoría de pares de Aotus analizados presentan la misma tasa de evolución para el gen mtCOII esto será analizado en la discusión.,

4.6 Arboles filogenéticos

Los arboles que se obtuvieron para la filogenia de este trabajo presentan resultados idénticos con algunas diferencias en los bootstrap.

El árbol obtenido por las distancias neighbor-joining con el método log-Det de Tamura & Kumar con diferentes patrones entre linajes. Se evidencio que los individuos se agruparon fenotípicamente y geográficamente en el árbol como inicialmente se habían clasificado.

Se hacen evidentes 3 grupos, en donde los individuos de *A.vociferans* se agrupan de manera solida con un bootstrap de 75%, a excepción de un individuo que será analizado posteriormente. El primer subgrupo contiene 17 individuos de *Aotus vociferans* procedentes de Fidic (Fundación Instituto de Inmunología de Colombia) en Leticia. El segundo subgrupo contiene nueve individuos de *Aotus vociferans* procedentes de Fidic en Leticia, un individuo procedente de la SDA (Secretaria Distrital Ambiental) en Bogotá y tres individuos con origen geográfico del rio Nanay en el amazonas Peruano. En el tercer subgrupo se encuentran tres individuos de *Aotus vociferans* procedentes del rio Tambortacu y tres más en el rio Santa María siendo estos afluentes del rio Napo en la amazonia peruana.

El grupo que se encuentra más relacionado con *A.vociferans* se encuentra conformado por dos taxones, los cuales están altamente relacionados con un bootstrap de 97% entre ellos, pero con una clara diferencia entre ellos con un bootstrap de 99% para *Aotus Brumbacki* y *Aotus griseimembra*.

El siguiente grupo se encuentra conformado fuertemente por *A. nancymae* y la totalidad de sus individuos se agruparon en el. Para este grupo también se formaron dos subgrupos, el primero con individuos procedentes del rio Tahuayo y un bootstrap de 61% y el segundo con individuos procedentes de la quebrada Yanayacu y dos individuos de Fidic en Leticia con un bootstarp de 91%.

El siguiente grupo formado, con un bootstrap de 99%, está constituido con las dos secuencias de *A.nigriceps*, para las cuales se tiene un origen geográfico definido Yarinacocha,

Departamento de Ucayali y Tarapoto, San Martín, y teniendo claras las características físicas, geográficas típicas de esta especie.

El siguiente grupo que se forma agrupa a los individuos como totalmente diferentes de los demás grupos de *Aotus* y contiene dos subgrupos, el primero con un bootstrap de 78% se encuentra conformado por tres individuos procedentes de Paraguay siendo *Aotus azarae azarae* y dos individuos procedentes por decomisos de la SDA pero sin una especie asignada. El segundo con un bootstrap del 100% se conforma por *Aotus azarae boliviensis*, procedente de Bolivia, una muestra de *A.vociferans* de la amazonia Colombiana en el río Igara. Finalmente una muestra procedente de un animal en cautiverio del laboratorio de Cali la cual se clasifico como *Aotus azarae boliviensis* luego de un análisis morfológico la cual fue importada desde Bolivia en los años 90.

Y son muy diferentes de los individuos clasificados como *A.vociferans*, *A.griseimembra*, *A.nancyame*, *A. nigriceps*, y *A.brumbacki* los cuales pertenecen a el sur de la amazonia es decir, representan el grupo con cuello rojo.

4.7 Máxima Parsimonia.

El árbol filogenético construido con máxima parsimonia se muestra en la Figura II, y presenta similitudes considerables, en donde los porcentajes de los bootstrap para la formación de los grupos son similares con el primer árbol, así mismo se evidencian diferencias las cuales son: la primera es la formación de cuatro subgrupos con porcentajes bajos para los bootstrap dentro del conjunto de individuos clasificados como *A. vociferans*. Así mismo, para este árbol, las especies de cuello rojo y los haplotipos controversiales presentan más divergencia entre los *Aotus*, pero son menos divergentes con respecto a los haplotipos del grupo externo que para este caso son secuencias del genero *Cebus* y *Ateles*. En este árbol *A. azarae* y *A. azarae boliviensis* forman un único grupo. En este grupo también se encuentran los dos individuos provenientes del río Igara *A. vociferans* y el proveniente del laboratorio de Cali *A.azarae boliviensis*.

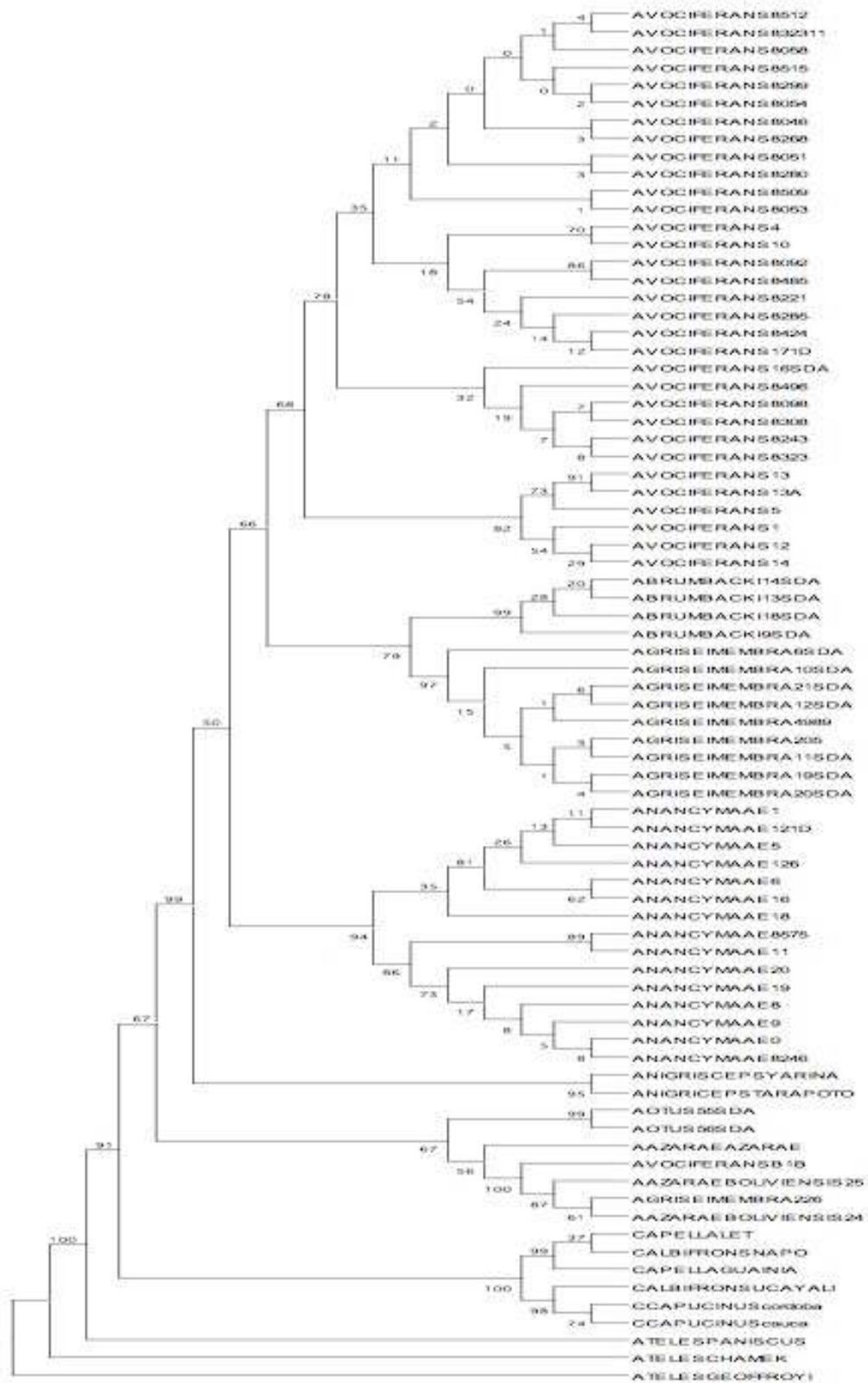


Figura II. Árbol Obtenido por Máxima Parsimonia.

4.8 Árbol Bayesiano.

El árbol de la figura III, muestra el 99% de consenso entre la probabilidad de densidad entre 224.755 árboles construidos por métodos bayesianos, en donde se empleo el modelo evolutivo GTR, con distribución gamma, se utilizo la tasa de variación entre los sitios. En promedio el 99% de consenso para la construcción del árbol bayesiano (incluidos 224.776 árboles) mostraron elevación de la parte posterior de la media de densidad de probabilidad (Figura 3).

El modelo evolutivo GTR gamma distribuido con la tasa de variación fue empleado a través de los sitios. Para este análisis es válido el promedio de desviación estándar de división de frecuencias el cual debe ser inferior a 0,01. Para llegar a este límite mínimo, 2,1 millones de generaciones fueron ejecutadas en el régimen de MCMC (sd = 0,007194).

El árbol Bayesiano mostró que el haplotipo de *A. griseimembra* era el más divergente de todos y por lo tanto, probablemente con este método *A. brumbacki* diverge de *A. griseimembra*. En una manera muy similar al igual que los demás árboles comentados, *A. vociferans* mostró cuatro grupos principales, *A. nancymae* presentó dos grupos principales y el mencionado grupo de *A. azarae azarae*, *A. azarae boliviensis*, los individuos erróneamente clasificados *A. griseimembra* y *A. vociferans* y el haplotipo del individuo de Rio Igará- Paraná, y los dos individuos decomisados de la SDA en Bogotá de dos especímenes de origen geográfico indeterminado siendo el más divergente de los taxones *A. griseimembra*. La mayoría de los clados posterior mostraron una probabilidad media de densidad superior al 90%. Por lo tanto, la mayor parte de estos clados son estadísticamente relevantes.

4.9 Median Joining Network

Los resultados de median joining network (MJN), Figura IV muestran similitudes con los anteriores resultados. Para este caso los haplotipos de *A. vociferans*, *A. nancymae*, *A. griseimembra* y *A. brumbacki* se encuentran más o menos relacionadas entre ellos.

Los demás taxones de *Aotus* se diferencian de este grupo y se distribuyen de la siguiente manera, *A. nigriceps* se encuentra bien diferenciado de este conjunto de haplotipos. *Aotus azarae azarae* y otros dos individuos con origen geográfico desconocido provenientes de Colombia, y el tercero y bien diferenciado del primer grupo son las muestras correspondientes a *A. azarae boliviensis* y *A. vociferans* proveniente del rio Igará de las cuales ya se ha comentado con anterioridad.

Cuando el estadístico ρ se ha aplicado a MJN, se estimaron varios tiempos de divergencia. Del haplotipo principal de *A.vociferans* divergen los haplotipos principales de *A. brumbacki*, *A. griseimembra*, *A. nancymae*, *A. nigriceps* y *A. azarae azarae boliviensis*, respectivamente, en alrededor de 2,17, 0,97, 1,93, 0,74, 2,1 y 4,44 millones de años atrás. Este haplotipo principal de *A. vociferans* mostro un tiempo de divergencia con otros importantes haplotipos de *A. vociferans* dados como 57,000 a 598,000 años atrás ver la figura IV.

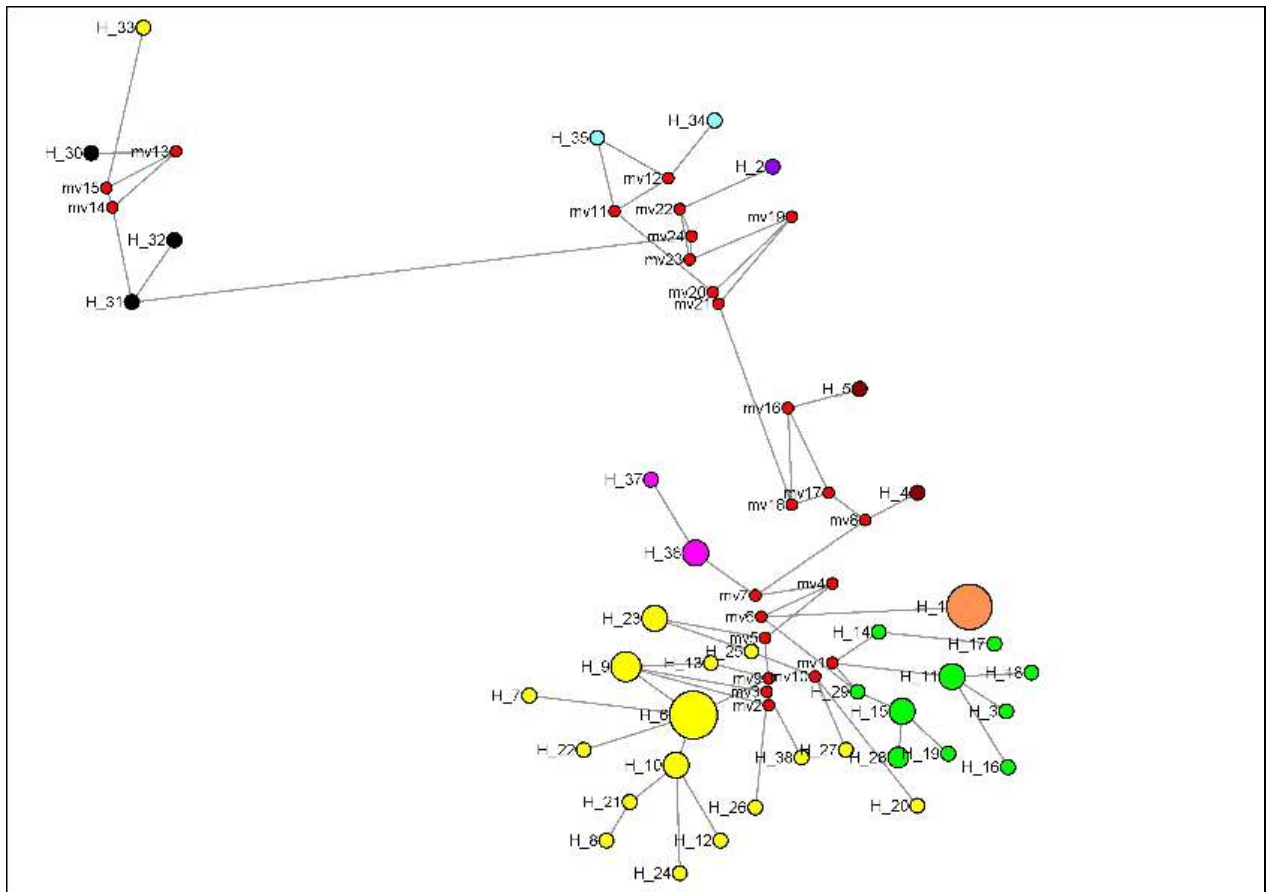


Figura IV. Red de Haplotipos.

En la figura IV, se muestran las especies estudiadas de al siguiente manera *A.vociferans* como los haplotipos amarillos, *A.nancymae* con verde, *A.griseimembra* Con naranja, *A.brumbacki* con Fucsia, *A.nigriceps* con Rojo Oscuro, *A.a.boliviensis* con negro, *A.a.azarae* con purpura, Y se evidencian algunos haplotipos con color rojo los cuales son teóricos y se supone se encuentran en la naturaleza.

5. DISCUSION

En relación con los resultados obtenidos en este trabajo se encontraron similitudes y diferencias con respecto a la filogenia molecular del genero *Aotus* encontrada en los últimos análisis (Ashley & Vaughn, 1995; Plautz et al, 2009) utilizando como marcador molecular el gen mitocondrial citocromo II oxidasa.

Para este trabajo se encontró que las especies de cuello gris *A. griseimembra*, *A. brumbacki* y *A. vociferans* están genéticamente más relacionadas que las especies de cuello rojo, *A. nancymae*, *A. nigriceps*, *A. azarae azarae* y *A. azarae boliviensis*.

Sin embargo, en algunos estudios la relación entre *A.nancymae* y *A.nigriceps* es más alta con el grupo de cuello gris que con los *Aotus* de cuello rojo y especialmente con *A.azarae bolivinesis*. En un estudio previo Ashley& Vaughn (1995) concluyeron que *A. nancymae* y *A. azarare bolviensis* eran totalmente diferentes con 6.2% de diferencias genéticas entre las secuencias de estos taxones como para considerar que el grupo de cuello rojo es un grupo natural.

Para este trabajo se encontró que *A.nancymae* es la especie de cuello rojo que más se relaciona con los *Aotus* del norte o de cuello gris. Plautz et al. (2009) llegó a la misma conclusión. Así mismo en su estudio encontró diferencias genéticas entre los individuos de cuello rojo como *A.nigriceps* y *Aotus* de cuello gris como *A. griseimembra* en donde la diferencia es del 10.4% y entre individuos de cuello rojo con una diferencia de 7.2% entre *A.infulatus* y *A.nancymae*.

Es así como entonces la construcción del grupo de cuello rojo formado por Herhkovitz, pasa a ser un grupo artificial y deja de ser uno monofilético. Lo cual se concluye al utilizar y analizar 69 secuencias del gen mtCOII. Por lo tanto en este trabajo se apoyan las conclusiones sugeridas por Ashley& Vaughn (1995) y Plautz et al. (2009) con seis y 12 secuencias respectivamente en el análisis sobre la existencia de un grupo artificial.

Finalmente para responder a la pregunta sobre si existe o no un grupo monofilético entre los *Aotus*, es posible concluir que los individuos pertenecientes al norte de la amazonia (los individuos de cuello gris) probablemente son un grupo monofilético.

RELACIONES ENTRE LAS ESPECIES DE AOTUS SEGÚN LAS DIFERENCIAS GENÉTICAS.

A partir del uso y análisis de las secuencias del gen mtCOII, se encontraron diferencias marcadas entre varios taxones de Aotus. La primera es la clara diferencia genética (29%) entre *Aotus azarae* y *Aotus azarae boliviensis*. Como entre *A.a.boliviensis* con 4% de diferencias genéticas. Plautz et al (2009) en su estudio sugiere que existe una diferencia genética mucho menor de 1.7% entre *A.a.azarae* y *A. infulatus*

En este estudio no se incluyen secuencias de *A.infulatus* por lo tanto con respecto a este taxón no es posible concluir como se relaciona este taxón con las secuencias utilizadas para el análisis. Por lo tanto, según los resultados obtenidos por Plautz et al (2009), es posible que *A.a azarae* y *A. infulatus* sean dos subespecies de una especie.

DIFERENCIAS CON ESTUDIOS CARIOTÍPICOS.

Partiendo de los resultados obtenidos y de lo discutido en los anteriores puntos, para este trabajo se encontraron algunas diferencias con respecto a los resultados anteriormente obtenidos en estudios cariotípicos, morfológicos, moleculares y citogenéticos.

Según estudios cariotípicos realizados por Ma (1981) en donde se efectuaron análisis y comparaciones entre *A.a.boliviensis* y *A. nigriceps* se identificó que en las dos especies ocurría un fusión en el cromosoma Y en el brazo corto, Así mismo las bandas G evidencian que los autosomas son igual en las dos especies, sin embargo estas especies difieren en tres reordenamientos autosómicos Ma (1980).

Aun así se demostró en un estudio realizado por Mudry et al. (1984), que no ocurría una fusión en el cromosoma Y, en los autosomas acrocentricos, y para los demás cromosomas se encontró que eran idénticos en cuanto a las bandas G y C para *A.a. boliviensis*.

Gallbreath (1983) también afirmó que la relación genética de *A. infulatus*, *A. nigriceps*, *A. a. azarae* y *A. a. boliviensis* debe ser muy importante teniendo en cuenta características en las pieles y en los cariotipos.

Aun así, en este trabajo se encontró que utilizando las secuencias del gen mtCOII, *A.nigriceps* se relaciona más con *A.nancynae* que con *A.a.azarae* y *A.a.boliviensis*. Sin embargo, aunque estos dos últimos taxones muestran estar relacionados no se encuentran muy cercanos y no es

totalmente estrecha la relación que presentan, lo cual confirma que se trata de dos entidades biológicas diferentes.

Como se ha discutido anteriormente en este trabajo se encontraron diferencias contundentes entre *A. a. azarae* y *A. a. boliviensis*, con respecto a las otras especies de *Aotus*. Es por esto que se considera que estos haplotipos y algunos provenientes del sur y norte de la amazonia, sufrieron procesos relacionados con la deriva genética, en donde, actúa un modelo de especiación que es compatible con el modelo de especiación estasiopátrica propuesto por White (1968, 1973, 1978, véase también el de Bush, 1981).

Este modelo de especiación se caracteriza por ocurrir en pocas generaciones dos o tres, produciéndose nuevos cariotipos, que se pueden fijar en las poblaciones, así mismo, las barreras reproductivas permiten y podrían ser la explicación del surgimiento de la aparición de algunas de las especies del género *Aotus* que se ubican en el sur de la amazonia, como sustento se tiene los fenotipos semejantes entre especies y la variabilidad en los cariotipos.

HAPLOTIPOS ANCESTRALES Y DIVERGENTES ANALIZADOS.

Una de las muestras analizadas de *A. vociferans* proveniente de la Amazonia colombiana muestra un haplotipo que se relaciona y muestra mayor similitud con *A.a. boliviensis*, que con los haplotipos restantes de *A.vociferans*. Lo anterior podría sugerir que el origen de *A.a.boliviensis* puede estar ligado con algunos haplotipos poco frecuentes de *A.vociferans*. Si esta idea es cierta sería posible afirmar que las poblaciones de *A.vociferans* pudieron haber sido las forjadoras de la aparición de algunas especies de *Aotus* de cuello rojo. Es posible concluir a partir de este estudio molecular que las especies de cuello rojo derivan del grupo de las especies de cuello gris.

Esto también lo afirmó Hershkovitz (1983) en sus estudios morfológicos así como también la presencia de verticilo interscapular, en *A.a. boliviensis* y *A.infulatus*, el cual también lo presenta únicamente *A.vociferans* dentro del grupo de cuello gris. Es este otro argumento que sustenta lo encontrado en este trabajo en donde se cree que algunos haplotipos de *A.vociferans* pudieron dar origen a *A.a.boliviensi*

RELACION ENTRE *Aotus griseimembra* y *A.a.boliviensis*.

Ashley & Vaughn (1995) en su estudio encontraron que estas dos especies se relacionaban con un bootstrap de 71%, con individuos procedentes del Museo Nacional de Brasil. Como

resultado en este estudio no se encontró este tipo de relación entre estos taxones. Aun así la mayoría de los individuos de este estudio tienen un origen geográfico definido y casi todas las muestras fueron colectadas en vida silvestre. Aunque no se encontró una relación entre estos taxones, en este trabajo y en el realizado por Plautz (2009) se encontró que *A.brumbacki* y *A.griseimembra* se encuentran fuertemente relacionados. Finalmente fue posible esclarecer que el individuo considerado en el estudio de Ashley & Vaughn (1995) como *A.a.boliviensis* en realidad es un *A.brumbacki*, lo cual permite concluir que *A.brumbacki* y *A.griseimembra* se encuentran fuertemente relacionados.

DIFERENCIAS CON OTROS ESTUDIOS REALIZADOS.

El presente trabajo también concluye que la sistemática formulada por Ford (1994) usando los datos de Thoringthon y la formulada por Vorek (1976), no comparten semejanzas con los resultados y la filogenia planteada en este trabajo.

En estos estudios se encontraron las siguientes consideraciones, la primera es la no existencia de *A.miconax*, con respecto a esto no es posible discutir en este trabajo si esto podría ser falseado ya que no se contó con ninguna secuencia de este taxón para la elaboración de este análisis. También se negaba la existencia de *A.a.azarae*, para lo cual con este trabajo se encontró que existen marcadas diferencias genéticas entre *A.a.azarae* y *A.a.boliviensis* de otros taxones de *Aotus* incluido *A.nigriceps*.

Así mismo es posible concluir que los individuos de cuello gris *A. griseimembra*, *A. brumbacki* y *A. vociferans* están soportados con un alto porcentaje bootstrap y no se evidencia mezcla de haplotipos, lo cual es significativo para demostrar que no se trata de una única especie como se creía en algún tiempo.

Plautz et al (2009), en su estudio encontró que *A.nigriceps* podría ser la forma más relacionada con el *Aotus* ancestral, lo cual no se evidencio con los resultados de este estudio y los datos cariotípicos mencionados anteriormente.

En el estudio realizado por Plautz et al (2009) no se especifica totalmente el origen geográfico de la muestra de *A.nigriceps*, por lo tanto, es posible considerar que no sea un *A.nigriceps* debido a la extrema diferencia con los demás *Aotus* sino un *A.a.boliviensis*.

Si esta hipótesis es cierta, la distribución geográfica de este taxón sería mucho más amplia, otra posible hipótesis es que posiblemente existen acervos genéticos o aun no se han descrito

algunas especies teniendo en cuenta los diferentes focos de endemismo secundario que se dan entre los ríos Huallaga y Ucayali.

ARBOLES FILOGENETICOS Y BARRERAS GEOGRAFICAS.

Si una población o alguna especie han pasado por procesos de deriva genética fuerte a partir de especiación estasiopátrica, estas poblaciones podrían ubicarse en las ramas más divergentes, sin ser necesario que las ramas sean las de las poblaciones originales.

Por esta razón es posible considerar como lo han hecho los autores ya citados y como se concluye en este trabajo que es muy seguro que la forma ancestral de *Aotus* apareciera en el grupo de cuello gris, como también lo afirma Ruz - Herrera *et al* (2005) en su estudio.

En este trabajo se encontró que probablemente el papel de los grandes ríos de Amazonas no es representativo como lo ha sido para otros géneros de primates. Aun así *A.nancymaae* aparece entre el rango de distribución de *A.vociferans* entre el río Tigre y el islote Tigrillo. Esto demuestra que la pasiva dispersión de poblaciones pequeñas sufriendo deriva genética por pocos números efectivos cuando ocurren cambios cariotípicos producidos por la especiación estasiopátrica, puede producir diferencias genéticas contundentes en las poblaciones de *Aotus* sin ser necesario que exista una barrera amplia, que para este caso sería alguno de los ríos (Hershkovitz 1983).

TIEMPOS DE DIVERGENCIA

A continuación se discutirán los resultados obtenidos a partir de MJN. Entre todos los taxones las especies que mostraron tiempos de divergencia más conservados fueron *A.vociferans* y *A.griseimembra*. Las demás especies mostraron tiempos de divergencia muy altos en relación con el registro fósil y los tiempos de divergencia de otras especies del género, por lo tanto poco probables como por ejemplo *A. brumbacki*- *A. a. boliviensis*: 11.3 MA; *A. nigriceps* - *A.a boliviensis*: 20,5 MA o *A. a. azarae*- *A.a boliviensis*: 14 MA .las siguientes especies también mostraron resultados similares especialmente *A.a boliviensis* y *A.a.azarae*, *A.nancymaae*, *A. brumbacki*, *A.nigriceps*.

Posiblemente estos tiempos de divergencia se den por los procesos de deriva genética en los procesos de especiación estasiopátrica a los cuales se vieron enfrentados los taxones y de esta

manera al calcular los tiempos de divergencia los resultados son poco reales y se encuentran sesgados.

Para este trabajo se encontró que *A.nancymae* y *A.griseimembra* tuvieron un tiempo de separación hace 3,44 millones de años, en el periodo de plioceno, lo cual también es un resultado en los estudios realizados por Ashley&Vaughn (1995), con 3,6 MA, en donde se utilizó la tasa de mutación de Ruvolo et al (1993). Para *A.nancymae* y *A.azarae* se estimó un tiempo de divergencia de hace 6 MA, lo cual no coincide con los resultados encontrados por Barroso et al (1997) con una separación de 2,7 MA.

Los tiempos de divergencia de *A.vociferans* y *A.griseimembra* al ser los más conservados y posiblemente reales, pudieron verse dado porque estas especies fueron las que mejor constituidas en cuanto a sus números efectivos, razón por la cual, este es otro argumento para elucidar y afirmar que posiblemente estas especies pueden ser el origen de las especies actuales de *Aotus*. Los tiempos de divergencia obtenidos mediante MJN, y el árbol Bayesiano obtenido por consenso, son equivalentes. Lo cual evidencia que posiblemente *A.griseimembra* es la especie original o ancestral de las especies actuales del género *Aotus*.

A.vociferans COMO ESPECIE ANCESTRAL DEL GENERO *Aotus*.

Aun teniendo en cuenta que el árbol bayesiano y los resultados de tiempos de divergencia, señalan a *A.griseimembra* como la especie más ancestral, a continuación se discutirán algunos resultados que podrían elucidar como *A.vociferans* demuestra mas resultados contundentes para ser la especie ancestral del género *Aotus*.

El taxón mas diferenciado *A.a.boliviensis* se mostro altamente relacionado con el haplotipo de *A.vociferans* proveniente del Rio Paraná en la amazonia Colombiana el cual también se encuentra bien diferenciado. Este resultado se evidencio en la totalidad de los análisis filogenéticos realizados.

Esta idea sustenta el hecho de que *A.vociferans* fue el taxón que mayor número de haplotipos presento y también fue la especie con mayor diversidad nucleotida con $\pi=0,022535$, así mismo, fue el taxón con mas secuencias analizadas excluyendo el haplotipo proveniente del rio

Igara-Parana. Así mismo, la prueba de (ID) demostró que *A.a.boliviensis* presenta varias tazas de evolución para el gen mtCOII con respecto a otros taxones estudiados en este trabajo, mas no con respecto a algunos individuos de *A.vociferans*.

Este resultado podría ser una prueba más de la estrecha relación que existe entre *A.a.boliviensis* y la muestra de *A.vociferans* encontrada en el rio Igara-Parana, en donde es acertado pensar que *A.a.boliviensis* tiene su origen en algunos individuos de la población de *A.vociferans* que seguramente sufrieron una fuerte deriva génica en algunos de sus genes lo cual pudo cambiar sus tazas de evolución, en el carácter originario de las poblaciones de *A.vociferans* como en las descendientes de *A.a.boliviensis*. Con respecto a la relación que presenta entonces *A.a.azarae* y *A.a.boliviensis*, de acuerdo con este resultado, se demuestra que estos taxones se relacionan entre sí, aun así el primero se relaciona de una mejor manera con otros taxones.

POLIMORFISMO CROMOSOMICO.

A.griseimembra y *A.vociferans* son las dos especies del genero *Aotus* con un polimorfismo cromosómico no relacionado al sexo más desarrollado ($2n = 52, 53, 54$) ($2n = 46, 47, 48$) respectivamente, podría sugerir que estas especies son las dos especies más ancestrales del grupo actual de *Aotus*. Pero los siguientes resultados podrían sugerir que posiblemente sea *A.vociferans*, al solo presentar un único haplotipo *A.griseimebra* para suficientes secuencias.

Otra idea que sustenta el hecho de que *A.vociferans* puede ser la especie original del genero es que la especie con menos números de cromosomas dentro del género *Aotus*. Por lo tanto la evolución cromosómica se debe relacionar mas con eventos de fisión y no de fusión como se ha descrito hasta ahora según los estudios de (Defler&Bueno, 2007).

AMAZONIA OCCIDENTAL COMO PUNTO DE DISPERSION

Al distribirse *A.vociferans* en la amazonia occidental se encuentra en uno de los supuestos puntos de origen y dispersión de algunos mamíferos neotropicales, como ha sucedido con otras especies es el caso de *Saimiri boliviensis* o *Saimiri sciureus macrodon*, provenientes del

occidente de la amazonia, podrían ser el taxón original del genero Saimiri (Lavergne et al., 2008), esto mismo fue encontrado para *Cebus apella* (Ruiz-García y Castillo, 2009) o como lo ocurrido para el género Ateles (Ruiz-García et al., 2006).

Es por esto y por otros estudios realizados que se considera que la parte superior del Amazonas es un punto clave de dispersión para muchas especies, y esto se debe a la gran diversidad de flora y arboles que de hecho es mayor que la que se presenta en la amazonia occidental y en el escudo de la Guayana (Gentry, 1988). Es así, como también se encontró según estudios realizados por Ayres (1986) que existe una relación directa entre la diversidad florística y la diversidad en los primates.

Finalmente es posible concluir que la amazonia norte y occidental puede ser un punto de dispersión de algunos mamíferos neotropicales y entre estos algunas especies de Aotus. Es posible entonces discernir que *A.griseimembra* puede ser la especie original de los actuales taxones de Aotus, como lo es *Lagothrix lagotricha* al haber aparecido en las montañas colombianas y luego haberse dispersado por toda la amazonia colombiana como lo encontraron (Ruiz-García y Pinedo, 2009) en su estudio.

Aunque el grupo de cuello gris contiene también otras especies como *A.nancymae* y *A.nigriceps* no son evidentemente las especies que dieron origen a las actuales especies del genero Aotus, ya que estas especies presentan haplotipos que son derivados y que fueron afectados por la deriva genética.

En este trabajo tampoco se encontró un resultado que sustente la idea formulada por Ma et al (1985), en donde se afirma que *A.vociferans* es una especie derivada de *A.brumabacki* al verse una fusión y catalogarse como una especie intermedia entre *A.vociferans* y *A.griseimembra*.

También se descarta la posibilidad de que *A.nancymae* sea una especie ancestral debido a la baja diversidad genética que presenta y a los altos efectos de la deriva genética en los genes con respecto a otros taxones de esta zona del amazonas. Por lo cual en este trabajo tampoco se está de acuerdo con los resultados entregados por Ma (1981) en donde se afirmaba que la especie ancestral e Aotus era $2n=54$ y solo dos taxones presentan este cariotipo *A.nancymae* y *A.griseiemembra*.

A.griseimembra COMO ESPECIE ANCESTRAL DEL GENERO Aotus.

Al considerar que la forma ancestral de Aotus debe tener un cariotipo $2n=54$ según lo sugerido por Ma et al (1981) y Gallbreath(1983), como ya se dijo anteriormente entonces el segundo y único cariotipo lo presenta *A.griseimembra* Aunque *A.lemurinus* según Defler & Bueno (2007) podría ser un claro candidato de especies ancestral al estar bien adaptado a alturas de hasta 3200 msnm, y con un cariotipo de $2n=58$ lo cual puede responder a una adaptación selectiva para aumentar la capacidad de recombinación genética(Martin, 1990). Pero esto mismo es una desventaja ya que es una especie muy especializada como para dar origen a los demás taxones de Aotus. Es necesario realizar nuevos estudios para determinar qué papel juega *A.lemurinus* dentro de la dispersión de todas las especies del genero Aotus.

FACTORES GEOLOGICOS Y CLIMATOLOGICOS.

Al considerar que *A.vociferans* o *A.griseimebra* son las especies más ancestrales se podría relacionar los tiempos de divergencias con algunos factores geológicos y climáticos para obtener una conclusión.

El taxón mas diferenciado *A.azarae boliviensis* diverge de dos posibles taxones hace alrededor de 4.4 o 4.6 MA. Esta fecha coincide con el periodo de Pleistoceno tardío, en donde se encuentra relación con el rio Amazonas durante el Mioceno Tardío hace 5.0 MA (Lundberg et al., 1998). En donde, un tiempo después de la formación del rio en la parte norte un haplotipo no común de *A.vociferans* genero el taxón *A.a boliviensis*. Asi mismo, posiblemente hace 2 MA, se genero en el costado norte una población ancestral de *A.vociferans* y poblaciones a la ribera sur de *A.a.azarae* y *A.nancymae* según los resultados obtenidos en este trabajo.

Teniendo en cuenta que según estudios de Renford (2002), el periodo de pleistoceno comenzó entre hace 1.6-2 MA, es claro identificar que estas dos especies se originaron en los inicios del Pleistoceno, y también se generaron cambios en el occidente Amazónico.

Como ya se menciona *A.vociferans* y *A.griseimembra* se separaron hace un MA, en esta época el periodo glacial pre-pastonian ocurría hace 0.8-1,3 MA, el cual se caracterizo por ser el

primer periodo de glaciación fuerte, y uno de los picos dentro de las glaciaciones del Cuaternario. Conocida como glaciación nebrasquiense, seguida de un periodo seco que coincide con la fragmentación de los bosques y la aparición de estas especies ancestrales.

En cuanto a *A.nigriceps* se evidenció que esta especie divergió hace 0.6 -0,75 MA, en donde, hacia los 6,5 MA el más alto pico de la segunda glaciación conocida como Kansaniense ocurrió, provocando un alto porcentaje de extinción. Luego volvió otro periodo seco en donde los bosques se fragmentaron de nuevo.

A.nigriceps es una especie que habita hacia la orilla derecha del río Purús (Ford, 1994), conjuntamente con *A.nancymaee*, lo cual indica que es posible que coincidan geográficamente y fenotípicamente son muy similares. Aun así como ya se ha discutido las dos especies presentan procesos de especiación diferente e independiente seguramente a partir de un haplotipo de *A.vociferans*. Es posible sugerir que la segunda glaciación ocurrida hace 0,65MA, podría haber causado la separación entre los haplotipos de *A.vociferans*, *A.nancyamae* y *A.nigriceps*

A.brumabacki por su parte divergió hace aproximadamente 0.4 MA, de *A.griseimembra*, posiblemente esta separación se dio al ocurrir otro pico en la glaciación producida hace 0,45 MA y por otro pico de glaciación ocurrido hace 0,35 MA.

Para las especies que presentaron haplotipos diferentes, los tiempos de divergencia se dieron entre 0,057 Y 0,6 MA, con respecto a *A.vociferans*, 0,5 MA entre *A.nancyamae* y *A.nigriceps* y 0,05 MA para *A.brumabacki*. Durante el último periodo de la glaciación, conocido como Wisconciense, ocurrida hace 120.000 a 10.000 años atrás, se pudo haber dado en el pico más alto hace 18.000 años la separación de los haplotipos de *A.brumabacki* y se diferenciaron algunos haplotipos de *A.vociferans*

También es posible concluir que los refugios forestales del pleistoceno propuestos por Haffer (1969,1982) podrían ser los responsables de la diversificación de los taxones de *Aotus*. Es así, como en esta investigación se encontró que existe una relación con los resultados obtenidos por Ma (1981), Ashley & Vaughn (1995) y Plautz et al (2009). Las observaciones de Ma (1981) concluyen que la evolución de un gran número de individuos de *Aotus*, fue inducida por los

cambios geográficos y climáticos ya discutidos, y los ciclos de milankovitch cada 19.000-24.000 años, cada 43.000 años, y cada 90.000-100.000 durante el Cenozoico incluyendo el Pleistoceno) En donde durante todo el periodo Cuaternario se alterno con épocas frías y secas, generándose refugios en el Amazonas (Haffer, 1997; Whitmore y Prance, 1987).

Como conclusión final, para este trabajo se tomaron los tiempos de divergencia de *A.vociferans* y *A.griseimembra* como posibles especies ancestrales, al estos estar mayormente representados en variabilidad genética, numero de haplotipos , mayor numero efectivo dentro de las poblaciones y al ser los menos afectados por la deriva genética y finalmente muestran datos más acertados y estimaciones más prudentes.

Aun así de acuerdo con el registro fósil de *Aotus* el primer registro fósil para este género es de la época del Mioceno medio y se encontró en Huila Colombia, y data de hace aproximadamente 11,8 y 13,5 MA (Setoguchi y Rosenberger, 1987; Rosenberger et al., 1990), si esto es así, la hipótesis de los refugios forestales planteada por Haffer (1969,1982) podría no ser la explicación para la gran diversidad genética del genero *Aotus*. En este trabajo no se descarta la idea de encontrar tiempos de divergencia mayores, como los dados entre *A.nancymae* y *A.brumabacki* en relación a *A.a.azarae* y *A.a.boliviensis*.

6. CONCLUSIONES.

Los niveles de variabilidad genética del gen mitocondrial citocromo II oxidasa para el género *Aotus* y para cada uno de los taxones analizados es alto confirmando que todas son reales entidades biológicas persistentes en la naturaleza.

A partir de los resultados de este trabajo es posible concluir que el grupo de cuello rojo nombrado por Hershkovitz, (1983) es un grupo polifiletico, originado a partir de flujo genético y especiación estasiopatríca, mientras que el grupo de cuello gris probablemente represente un grupo monofiletico.

Se propone un análisis del género *Aotus* que apoya en casi todos los aspectos la filogenia propuesta por Ashley & Vaughn (1995) y Plautz et al (2009) reconstruyendo las relaciones filogenéticas entre siete taxones pertenecientes al género *Aotus* y corroborando que posiblemente *A.vociferans* o *A.griseimembra* sean la especie ancestral del género.

Es posible que el origen y la diversificación de las poblaciones ancestrales del género *Aotus* se halla dado a partir de la hipótesis de las glaciaciones ocurridas durante el Cuaternario en el pleistoceno propuestas por Ma (1981) y posiblemente como consecuencia de los refugios forestales propuestos por Haffer (1969,1982).

7. RECOMENDACIONES.

Es importante realizar un estudio que incluya todas las posibles especies y subespecies del género *Aotus* para elucidar totalmente la filogenia del género y corroborar si en realidad los resultados filogenéticos obtenidos hasta el momento con el gen mitocondrial citocromo II oxidasa se mantienen o si posibles nuevas conclusiones se pueden obtener.

En este trabajo no se encontró la totalidad de la filogenia debido a la ausencia de secuencias de algunas especies y subespecies, como lo son *Aotus lemurinus zonalis*, *Aotus miconax*, *Aotus infulatus* *Aotus trivergatus* y algunas muestras que podrían mostrar nuevos resultados que permitirían elucidar totalmente la filogenia del género por lo menos con la información aportada por el gen mitocondrial citocromo II oxidasa.

8. LITERATURA CITADA.

Ashley, M & B, Down, 1994. The use of microsatellite análisis in population biology: Background methods and potenital applications. PG: 185-210 en: b. Schierwater, B. Streit, G.P. Wagner & R. DeSalle (Eds). Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Birkhauser Verlag. Basel. Suiza.

Ashley, Mary, and Vaughn, Jeffrey. 1995. Owl Monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial Cytochrome c Oxidasa (COII) sequences. International Journal of Primatology. Vol. 16. N°5. pp. 793806

Amos, B., C. Schlotterer., D. Tautz. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. Science 260: 670-672

Baer, Janet; Weller, Richard & Kakoma, Ibulaimu. 1994. AOTUS: The Owl Monkey. Academic Press Inc. USA. Pp 22-110.

Cortes-Ortiz L, Bermingham E, Rico C, Rodriguez-Luna E, Sampaio I, and Ruiz-García M.2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*.Mol Phyl Evol 26:64-81

Cropp S. 1998. Evolutionary diversification among tamarins (genus *Saguinus*). DissertationAbstract International, B58, 6433

Cropp SJ, Larson A, and Cheverud JM. 1999. Historical biogeography of tamarins, genus *Saguinus*: the molecular phylogenetic evidence. Am J Phys Anthropol 108:65-89.

Crow, J. & K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of populatoin subdivision. Proceedings of the National Academy of Siciences 81:6073-6077

Deffler, Thomas Richard. 2003. Primates de Colombia. Edti. Conservación Internacional. Colombia. Pp 225-274

Deffler, Thomas R. 1994. La conservación de primates en Colombia. Trianea. 5:255-287.

Delson E, and Rosenberger L. 1984. Are there any anthropoid primate “living fossils”?. In Eldridge N, Stanley S editors. Casebook on Living Fossils, Plenum, New York. p. 50-61.

Egozcue, J., E.M. Perkins, F. Hegemenas & D.M. Ford. 1969. The chromosomes of some Platyrrhini (*Callicebus*, *Ateles* and *Saimiri*). *Folia Primatologica* 11: 17-27.

Eisenberg, J.F. 1989. *Mammals of the Neotropics: The northern Neotropics. Volumen 1. Panamá, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana*. Univ. Chicago Press 449pp, 21 pls.

Emmons, L.H. 1990. *Neotropical rainforest Mammals: A field guide*. The University of Chicago Press, Chicago. 281 pp.

Endler JA. 1982. Pleistocene forest refuges: fact or fancy ? In Prance GT editor. Biological diversification in the Tropics. Columbia University Press, New York. p. 641-657

Fernandez, Marcus. 1993. New field records of Night monkeys, Genus *Aotus*, in Northern Brazil. *Neotropical Primates*. 1(4). December.

Fleagle JC, and Brown TM. 1983. New primate fossils from late Oligocene (Colhuehuapian) localities of Chubut Province, Argentina. *Folia Primatol* 41:240-266.

Fu Y. & Li W. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.

Griffith R. & Tavaré S. 1994. Ancestral inference in population genetics. *Statistical Science* 9:307-319.

Hall T. 2004. Bioedit sequence alignment editor. Version 7.0.0.

Hudson R., Boos D. & Kaplan N. 1992. A statistical test for detecting population subdivision. *Molecular Biology Evolution* 9: 138-151.

Hwang U. & Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mtDNA commonly used in Molecular Systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 215-228.

Jukes T. & Cantor C. 1969. Evolution of protein molecules. p. 21-132 en: Munro H. (ed.). Mammalian Protein Metabolism. Academic Press. New York. Kelly J. (1997). A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics* 146:1197-1206.

Kim J., Antunes A., Luo S., Menninger J., nNash W., O'Brien S. and Johnson W. 2006. Evolutionary analysis of a large mtDNA traslocation (numt) into the nuclear genome of the Panthera genus species. *Gene* 366:292-302.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Knowles L. & Madison W. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.

Kumar S., Tamura K. & Nei M. 2004 MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

García, M., A. Borrell, M.D. Mudry, J. Egozcue & M. Ponsá .1995 Prometaphase karyotype and restriction-enzyme banding in Squirrel monkeys *Saimiri boliviensis boliviensis*(Primates: Platyrrhini). *Journal of Mammalogy* 76: 497-503.

García, M., R. Miró, A. Estorp, M. Ponsá & J. Egozcue. 1983. Constitutive heterocromatin polymorphism in *Lagothis lagothricha cana*, *Cebus apella* and *Cebus capucinus*. *Am. J. of Primatology* 4: 117-126

García, M., M. Ponsá & J. Egozcue.1979. Chromosomal polimorphism and somatic segregation in *Saimiri sciureus*. *Folia Primatologica* 31: 312-323.

Goodpasture, C. & S.E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar Organizer Regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chomosome (Berl)*, 53: 37-50.

Hernandez-Camacho, J. & R.W. Cooper. 1976. The Nonhuman Primates of Colombia. In; Neotropical primates: *Field studies and Conservation*, RW Thorington, Jr & P.G. Heltne (eds), National Academy of Sciences, Washington, D:C. pp 35-69

Herskovitz, P. 1984. Taxonomy of squirrel monkeys genus *Saimiri* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report with description of a hitherto unnamed form. *American Journal of Primatology* **6**: 257-312.

Herskovitz, P., 1983. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report on *Aotus* taxonomy. *American Journal of Primatology* **4**: 209-243.

Hudson R., Boos D. & Kaplan N. 1992. A statistical test for detecting population subdivision. *Molecular Biology Evolution* **9**: 138-151.

Ma, N.S.F., 1981a. Chromosome evolution in the owl monkey, *Aotus*. *American Journal of Physical Anthropology* **54**: 293-302.

Ma, N.S.F., 1981b. Errata: Chromosome evolution in the owl monkey, *Aotus*. *American Journal of Physical Anthropology*, **54**: 326.

Ma, N.S.F., T.C. Jones, A. Miller, L. Morgan & E. Adams 1976. Chromosome polymorphism and banding patterns in the owl monkey (*Aotus*). *Laboratory Animal Science* **26**:1022-1036.

Ma, N.S.F., T.C. Jones, R.W. Thorington & R.W. Cooper 1974. Chromosome banding patterns in squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Journal Medical Primatol* **3**: 120-137.

Pieczarka, Julio Cesas & Yoshiko Cleusa. 1988. Cytogenetic studies of *Aotus* Easter Amazonia_ Y/autosome rearrangement. *American Journal of Primatology*. **14**:255-263

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **70**(12): 3321-3323.

Nei, M. 1982. Evolution of human races at the gene level. p. 167-181 en: Bonne-Tamir

B., Cohen T., & Goodman R. (eds.). Human genetics part A: The unfolding genome. Alan R. Liss. New York.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512p.

Nei, M. & S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 336 p.

Nei M., Maruyama T. and Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.

Pieczarka, J.C.; deSouza, R.M., de Faria, F.M. & Nagamachi, C.Y. 1993. Aotus from Southwestern Amazon Region is geographically and chromosomally intermediate between *A. azarae boliviensis* and *A. infulatus*. *Primates*. 34(2):197-204

Pritchard, J., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Redford, k.h. & J.F. Eisenberg. 1992. Mammals of the Neotropics. The University Chicago Press. Chicago.

Rozas J. & Rozas R. 1999. DnaSP version3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analyses. *Bioinformatics* 15 (2): 174-175.

Rozas J., Gullaud M., Blandin G. & Aguade M. 2001. DNA variation at the rp49 gene region of *Drosophila simulans*: Evolutionary inferences from an unusual haplotype structure. *Genetics* 158: 1147-1155.

Rosenberger, A.L. 1981. Systematics: The higher taxa. In A.F. Coimbra Filho & R.A Mittermeier, *Ecology and behavior of Neotropical Primates*. 1st ed. Vol.1. (Eds.). Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro. pp 9-27

Ruíz-García & Alvarez, D. 2002. RFLP Analysis of mtDNA from six platyrrhine genera: Phylogenetic inference. *Folia Primatológica* (En prensa).

Schneider, H; Sampaio, I; Harada, M.L; Barroso, M.P.C; Schneider, M.P.C; Stanhope, M; Czelusniak, J; and Goodman, M. 1996. Molecular Phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates) Based on Two Unlinked Nuclear Genes: IRBP intron 1 and ϵ -globin sequences. *American Journal of Physical Anthropology*. 100:153-179.

Schneider, Horacio. 2000. The current Status of the New World Monkey Phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. Vol. 72. No. 2 Junio.

Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.

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

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

Tajima F. & Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1: 269-285.

Tamura K. & Kumar S. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages *Molecular Biology and Evolution* 19:1727-1736.

Tamura, K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882

Thorington, R; Muckenhirn, NB & Montgomery, G. 1975. Movements of a wild night monkey (*Aotus trivirgatus*). *Neotropical Primates: Field studies and conservation*.

Thorington, R & Vorek Robert. 1976. Observations on the geographic variation and skeletal development of *Aotus*. *Laboratory Animal Science*. 26(6):1006-1040