

**ESTUDIO PILOTO PARA LA EVALUACIÓN DEL USO DE MUESTRAS
FECALES EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES
NATURALES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*) EMPLEANDO
HERRAMIENTAS MOLECULARES, EN COLOSÓ (SUCRE), COLOMBIA**

JUAN SEBASTIAN ARCINIEGAS VACARES

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de

BIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D. C.
26 de Noviembre de 2010

Nota de advertencia

Artículo 23 de la Resolución N 13 e Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará por lo que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que los trabajos no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**ESTUDIO PILOTO PARA LA EVALUACIÓN DEL USO DE MUESTRAS
FECALES EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES
NATURALES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*) EMPLEANDO
HERRAMIENTAS MOLECULARES, EN COLOSÓ (SUCRE), COLOMBIA**

JUAN SEBASTIAN ARCINIEGAS VACARES

APROBADO

**Paul Blour, PhD
Director**

**Ursula Ramirez, PhD (e)
Codirectora**

**Juan Ricardo Gómez, PhD
Jurado**

**ESTUDIO PILOTO PARA LA EVALUACIÓN DEL USO DE MUESTRAS
FECALES EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES
NATURALES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*) EMPLEANDO
HERRAMIENTAS MOLECULARES, EN COLOSÓ (SUCRE), COLOMBIA**

JUAN SEBASTIAN ARCINIEGAS VACARES

APROBADO

Ingrid Schuller
Decana Académica

Andrea Forero
Directora de carrera

*A Álvaro y Paulina, mis padres por su apoyo financiero
y emocional a lo largo de toda mi carrera.
A Leda por creer y confiar en mí.*

Agradecimientos

Antes que nada a Dios.

Este proyecto fue realizado gracias al convenio de cooperación científica entre el Ministerio de Ambiente de Vivienda y Desarrollo Territorial y la Universidad Nacional de Colombia, bajo la dirección del Dr. Paul Bloor y la codirección de la Dra. Úrsula Ramírez, a quienes agradezco por abrirme las puertas del Laboratorio de Biología y Ecología Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, y por brindarme su apoyo, colaboración y paciencia para enseñarme tantas cosas nuevas y guiarme en la elaboración de este trabajo de grado. A mis compañeros de laboratorio por el apoyo, la colaboración y tiempo que me brindaron para enseñarme diferentes cosas. A Leda Carolina Restrepo por su incondicional apoyo en el trabajo de campo, el laboratorio y escritura de este trabajo de grado, la cual me permitió salir adelante en los momentos más difíciles; del mismo modo quiero agradecerle por su paciencia y sabiduría para aguantarme todo el tiempo, sin su apoyo la elaboración de este documento no hubiera sido posible.

A los responsables de todo este proceso, mis Padres; por los cuales todo fue posible gracias a su esfuerzo y entereza, y quienes siempre me alentaron y apoyaron y me hicieron creer que yo era capaz de terminar este proceso. A mis hermanos por su apoyo. A mis amiga Angélica por acompañarme y apoyarme.

Finalmente, quiere expresar mi gratitud a Alexandra Pineda por contactarme con PROCAT, y a todos los miembros de PROCAT (Especialmente a Diego Zarrate, a Sergio Valaguera y a Cristian) por permitirme realizar el trabajo de campo en Colosó y por su colaboración para realizar la búsqueda de las muestras en campo.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Resumen | 10 |
| Abstract | |
| 1. Introducción | 11 |
| 2. Planteamiento del problema | 12 |
| 3. Referentes conceptuales | 15 |
| 3.1. Descripción de la especie | 15 |
| 3.2. Historia natural | 15 |
| 3.3. Distribución | 16 |
| 3.4. Genética y <i>Leopardus pardalis</i> | 17 |
| 3.5. Identificación de individuos de <i>L. pardalis</i> a partir de métodos no invasivos | 18 |
| 3.6. Alcance de las técnicas no invasivas con <i>L. pardalis</i> | 19 |
| 4. Objetivos | 20 |
| 4.1 Objetivo general | 20 |
| 4.2 Objetivos específicos | 20 |
| 5. Metodología | 20 |
| 5.1. Área de estudio | 20 |
| 5.2 Muestreos en campo | 22 |
| 5.3 Extracción de ADN | 24 |
| 5.4 Amplificación de ADN | 24 |
| 5.5 Secuenciación | 25 |
| 5.6 Análisis de datos | 26 |
| 6. Resultados | 27 |
| 6.1 Muestreo en Campo | 27 |
| 6.2 Cantidad, pureza y calidad del ADN | 28 |
| 6.3 Secuencias | 31 |
| 7. Discusión y Conclusiones | 32 |
| 7.1. Conclusiones | 36 |
| 8. Recomendaciones | 37 |
| 9. Bibliografía | 38 |
| 10. Anexos | 43 |
| Anexo 1 Protocolo de extracción de ADN para heces con QIAamp DNA Stool Mini Kit | 43 |
| Anexo 2. Metodología para el muestreo de heces para análisis moleculares de <i>Leopardus pardalis</i> | 45 |

I. LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1. <i>Leopardus pardalis</i> | 15 |
| 2. Localización geográfica del área de estudio | 21 |
| 3. Sitio 1 de muestreo | 27 |
| 4. Sitio 2 de muestreo | 27 |
| 5. Amplificación por PCR de un fragmento (135 pb) de gen mitocondrial | 29 |
| 6. Amplificación por PCR de un fragmento (535 pb) de la región control hipervariable I (HSV-I) | 30 |
| 7. Alineamiento de secuencias mediante el programa Bioedit. | 31 |

II. LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Oligonucleótidos generados para amplificar 16S | 25 |
| 2. Valores obtenidos para concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y pureza (relación A260/A280) | 28 |
| 3. Datos de cada amplificación por PCR realizada con el gen mitocondrial 16S | 30 |
| 4. Datos de cada amplificación por PCR realizada de la región control hipervariable I (HSV-I) | 31 |

Resumen

El Ocelote (*Leopardus pardalis*) es una de las especies de felinos menos estudiadas en Colombia, ya que las metodologías invasivas no son lo suficientemente eficientes para la obtención de información sobre sus poblaciones, impidiendo la realización de planes eficaces que permitan la conservación de esta especie en Colombia. Los estudios con muestreos no invasivos proporcionan una herramienta para el estudio de carnívoros con comportamiento evasivo, que ocupan zonas inaccesibles y de difícil captura como los felinos. Sin embargo, las técnicas moleculares usadas para el análisis de las muestras no invasivas deben ser probadas en campo. Mediante la realización de un estudio piloto usando muestras fecales de poblaciones naturales de *L. pardalis*, el presente trabajo evaluó la viabilidad del uso de materia fecal como fuente de ADN para la identificación de esta especie. A partir de las técnicas de laboratorio previamente estandarizadas por Restrepo (2010) y el uso de dos marcadores moleculares diferentes, se estimó el éxito y la replicabilidad de la amplificación por PCR, así como también la producción de perfiles confiables de genotipo al menos para un extracto de ADN fecal. La cantidad, pureza y calidad del ADN obtenido de heces de individuos de poblaciones naturales fue comparado con los obtenidos de individuos en cautiverio, encontrando diferencias significativas en la calidad del ADN obtenido. Las muestras analizadas se contrastaron con las secuencias registradas para el fragmento 16S en GenBank junto con secuencias de *L. pardalis*, logrando identificar una muestra que probablemente pertenece a *L. pardalis*. A pesar de las limitaciones para trabajar con muestras no invasivas de individuos de poblaciones naturales, el uso de muestras fecales es una herramienta viable para la identificación de *Leopardus pardalis* en Colombia.

Abstract

The Ocelot (*Leopardus pardalis*) is one of the species of felines less studied in Colombia, since the invasive methodologies are not efficient enough to obtain information on their populations, preventing the effective implementation of plans that allow the conservation of this species in Colombia. The studies with noninvasive samples provide a tool for the study of carnivores with evasive behavior, which occupy inaccessible areas and difficult of capture the felines. However, molecular techniques used for the analysis of noninvasive samples must be proven in field. By conducting a pilot study using faecal samples of natural populations of *L. pardalis*, the present work evaluated the viability of the use of stool matter like DNA source for identification of this species. From the laboratory techniques previously standardized by Restrepo (2010) and the use of two different molecular markers, we estimate the success and replicability of the amplification by PCR, as well as production of reliable profiles genotype for at least one faecal DNA extract. The quantity, purity and quality of DNA obtained from faeces of individuals of natural populations were compared with obtained from individuals captivity, finding significant differences in DNA quality obtained. The samples were compared with sequences reported for the 16S fragment sequences from GenBank along with *L. pardalis*, managing to identify a sample that probably belongs to *L. pardalis*. In spite of the limitations to work with noninvasive samples of individuals from natural populations, the use of stool samples is a viable tool for identification of *Leopardus pardalis* in Colombia.

1. Introducción

Para establecer el estado de conservación de una especie, es necesario identificar en primer lugar la dispersión que dicha especie muestra a lo largo de su área de distribución, es decir, se debe saber qué hay antes de determinar qué queremos conservar (Muñoz 2010). Del mismo modo, la presencia de poblaciones de felinos medianos y grandes en un área determinada puede ser usada como indicador del estado de conservación de los ecosistemas, debido a que estos carnívoros se encuentran en la cima de la cadena trófica y a que requieren de grandes áreas y numerosas presas para su supervivencia (IAVH 2010). Sin embargo, la dificultad para obtener suficientes registros de las poblaciones de felinos tropicales no ha permitido obtener datos certeros sobre su distribución, ecología básica y demografía; información crucial en la

elaboración de planes de conservación efectivos para fauna en peligro de extinción (Waits & Paetkau 2005; Beja-Pereira *et al.* 2009).

El ocelote (*Leopardus pardalis*) es el tercer felino silvestre más grande de Colombia después del jaguar (*Panthera onca*) y el puma (*Puma concolor*) (IAvH 2010), debido a sus requerimientos, es especialmente vulnerable a los cambios ambientales, y en las últimas décadas sus poblaciones se han reducido como resultado del tráfico ilegal (Riveros *et al.* 2005). La dificultad para obtener datos de las poblaciones naturales de ocelote en Colombia, ha limitado el trabajo con esta especie en el país.

Mediante la aplicación de protocolos previamente estandarizados, se evaluó la viabilidad del uso de muestras fecales colectadas en campo en términos de cantidad, calidad y pureza del ADN obtenido. Encontrando que a pesar de las limitaciones que tiene el uso de este tipo de muestras, la información que se obtiene permite realizar un acercamiento a los especímenes de *Leopardus pardalis* en Colombia.

2. Planteamiento del problema

El ocelote (*Leopardus pardalis*), en la última década se ha visto afectado por la caza y el tráfico ilegal para la comercialización de animales vivos y de sus pieles (listado en el Apéndice I de CITES desde el 2001), al igual que por la fragmentación y destrucción de su hábitat y la confrontación con humanos por predación de animales domésticos (Riveros *et al.* 2005). A pesar que esta especie ha sido clasificada internacionalmente como de preocupación menor (UICN, 2009), en Colombia sus poblaciones se han reducido hasta casi llevar a esta especie a la extinción (Riveros *et al.* 2005), generando un desconocimiento de la distribución, abundancia y estado actual de esta especie en el país, información necesaria para el desarrollo y orientación de los programas de conservación.

Leopardus pardalis con frecuencia ocupa zonas inaccesibles para los investigadores, tiene una amplia distribución (Weaver *et al.* 2005), presenta bajas densidades poblacionales y comportamiento evasivo (Navarro & Muñoz 2000), lo que dificulta la obtención de información a través de metodologías que requieren de la observación directa, la captura y la manipulación de sus individuos para el estudio de las poblaciones naturales de este felino (Kohn & Wayne 1997; Palomares *et al.* 2002; Mondo *et al.*

2009). Del mismo modo, el trabajo mediante estrategias no invasivas como las trampas de huella y cámaras trampa (Palomares *et al.* 2002; Trolle and Kery, 2003), utilizan las marcas naturales como el patrón de huellas, el tamaño y la coloración, para la identificación de los individuos (Gros *et al.* 1996). Sin embargo, la ambigüedad entre los caracteres morfológicos de especies muy parecidas, los pequeños detalles que presentan gran variación entre individuos (Eizirik *et al.* 1998), junto con los altos costos, el riesgo de robo, el esfuerzo de instalación y mantenimiento, dificultan el uso de éstas estrategias para la identificación de felinos tropicales (Weaver *et al.* 2005).

Debido a que el conocer la distribución de las especies es de vital importancia para establecer las bases de planes de conservación y manejo exitosos para especies amenazadas (Palomares *et al.* 2002; Alda *et al.* 2008), recientemente se han desarrollado técnicas moleculares que facilitan el uso de muestras no invasivas para la obtención de ADN, permitiendo el aprovechamiento de heces, pelos, plumas, orinas y mudas como fuente de información de especies amenazadas y de difícil estudio (Palomares *et al.* 2002; Bhagavatula & Singh 2006; Alda *et al.* 2008) puesto que permiten realizar una identificación inequívoca, conocer la dieta del animal, el estado hormonal y la presencia de enfermedades sin necesidad de perturbar a los individuos (Beja-Pereira *et al.* 2009).

Una de las muestras de colecta no invasiva más comúnmente utilizada en estudios de carnívoros son las heces (Beja-Pereira *et al.* 2009). Sin embargo el trabajo con heces presenta inconvenientes al momento de identificar las muestras en campo, ya que no es posible diferenciar la materia fecal entre algunas especies de felinos, e inclusive diferenciarla entre algunas especies de carnívoros (Foran *et al.* 1997; Davison *et al.* 2002; Piggott & Taylor 2003). Por esto, en la última década varios estudios han utilizado herramientas moleculares para la identificación de varias especies de mamíferos a partir de materia fecal (Wasser *et al.* 1997; Kohn *et al.* 1999; Morin *et al.* 2001; Palomares *et al.* 2002; Eggert *et al.* 2003; Bhagavatula & Singh 2006). Sin embargo, el uso de muestras fecales como fuente de ADN para realizar estudios de especies amenazadas en Colombia es un campo poco explorado debido a las limitaciones para colectar muestras fecales en campo, la diversidad de ecosistemas que afectan el estado de degradación de la muestra y la dificultades metodológicas para

extraer y amplificar el ADN provenientes de este tipo de muestras con bajo número de copias.

Usualmente, el ADN extraído de muestras fecales tiene un baja calidad (ADN parcialmente degradado, con presencia inhibidores de PCR y con alta contaminación) y se obtiene poca cantidad (Albaugh et al. 1992; Palomares *et al.* 2002; Waits & Paetkau 2005; Chu *et al.* 2006), factor que puede dificultar el uso de este tipo de muestra como fuente de ADN ya que la mayoría de errores han sido asociados con la calidad y cantidad del material extraído (Bhagavatula & Singh 2006; Janečka 2008; Spiring 2009). Por esta razón, un aspecto crítico de cualquier estudio no invasivo es la estandarización y optimización de las metodologías moleculares para la extracción de ADN de buena calidad (Janečka 2008). No obstante para que el análisis de ADN a partir de muestras fecales sea considerado una herramienta útil para el estudio de poblaciones naturales, es necesario probar la fiabilidad y utilidad de las técnicas de laboratorio en estudios realizados en campo (Palomares *et al.* 2002). Es por esto, que algunos autores recomiendan que cualquier estudio que requieren el uso de metodologías no invasivas debe ser precedido por un estudio piloto para evaluar la aplicabilidad y replicabilidad de esta técnica en la especie de interés y en la región geográfica, antes de realizar estudios a gran escala (Taberlet *et al.* 1999; Taberlet & Luikart 1999 Waits & Paetkau 2005; Bhagavatula & Singh 2006; Janečka 2008).

La importancia del desarrollo de un estudio piloto radica en el hecho de evaluar la pertinencia y factibilidad de las técnicas de laboratorio, mediante el uso de muestras provenientes de poblaciones naturales a través de pruebas de amplificación de ADN, la evaluación de los marcadores genéticos para las especies de interés y el análisis de datos (Chu *et al.* 2006; Valiére *et al.* 2007), ya que las muestras colectadas de especímenes silvestres no solo son importantes por el hecho de conocer la presencia de las especies en una zona específica, sino que también permitirían estudiar diferentes individuos al mismo tiempo (Chu *et al.* 2006).

La presente investigación evaluó la aplicabilidad de las muestras fecales como fuente de ADN para la identificación de especímenes de *L. pardalis* de una población natural, mediante heces colectadas en zonas conservadas a los alrededores del municipio de Colosó (Sucre).

3. Referentes conceptuales

3.1. Descripción de la especie

Dentro de los félicos del continente americano el ocelote (*Leopardus pardalis*, Linneo 1758) es de tamaño mediano con una longitud total entre 980 a 1300 mm y un peso que varía entre 8.8 a 11.5 kg (Sunquist 1994). Se caracteriza por presentar un pelaje corto amarillo mate, manchas y líneas irregulares, las más grandes pueden ser cuadrangulares, pardas muy oscuras, en el cuello estas manchas se transforman en franjas anchas longitudinales (Riveros *et al.* 2005). Su cabeza es pequeña, similar en coloración al dorso, con dos rayas a cada lado de la quijada encerrando un área completamente blanca (Riveros *et al.* 2005).



Fig. 1 Descripción del *Leopardus pardalis*

3.2. Historia natural

En condiciones naturales son solitarios, terrestres crepusculares y nocturnos (Wong *et al.* 1999). Las asociaciones con el hábitat están dadas por las preferencias alimenticias, y el tamaño de rango de hogar resulta de la densidad de sus presas y la densidad de sus competidores (Navarro y Muñoz 2000). Generalmente los machos ocupan territorios más amplios que los de las hembras, y suele coincidir con el territorio de una o varias

hembras; mientras que los territorios de las hembras casi nunca coinciden entre sí (Wong *et al.* 1999).

Los individuos de esta especie prefieren lugares tupidos por vegetación tanto para dormir como para cazar (Nowak 1999); por esta razón se ven afectados significativamente por los disturbios ambientales y la fragmentación de su hábitat (Linares 1998). En cuanto a la dieta del ocelote, el soporte principal son roedores nocturnos, aunque también se alimentan de iguanas, armadillos, pecaríes, marsupiales y peces (Konecny 1989). Aunque también se alimenta de presas más grandes como el Agouti, *Dasyprocta*, *Hidrochaeris* (Emmons *et al.* 1987).

3.3. Distribución

El rango de distribución del ocelote (*Leopardus pardalis*) va desde el extremo sur de Texas a través de México y América Central pasando por Ecuador hasta el norte de Argentina a excepción de Chile (Murray & Gardner 1997).

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida, es capaz de habitar zonas áridas y bosques tropicales, incluyendo manglar y bosque mesófilo de montaña (Redford & Eisenberg 1992). En Colombia se distribuye por todo el país, en bosques húmedos nublados y subxerofíticos de 0 hasta los 2400 m.s.n.m. (Navarro y Muñoz 2000). De las once subespecies reconocidas de *Leopardus pardalis*, para Colombia han sido reportadas tres: *L. pardalis pseudopardalis*, *L. pardalis aequatorialis* y *L. pardalis melanurus* (Clavijo y Ramírez 2007). Sin embargo, actualmente se desconoce la distribución exacta de *L. pardalis* en Colombia debido a que existen pocos estudios, además los reportes con los que se cuentan han sido realizados a través de avistamientos y ataques informados por la población, los cuales pueden llegar a ser poco verídicos (Weaver *et al.* 2005). Del mismo modo, las referencias geográficas de las muestras biológicas encontradas en las colecciones del Instituto Alexander von Humboldt y el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia son registros que datan desde 1965, reportando esta especie en sitios que han sido deforestados y fragmentados productos de la expansión de las poblaciones humanas en los últimos años; y al tratarse de una especie sensible a los cambios en el medio ambiente específico en el cual se desenvuelven, las presiones antrópicas han provocado el paulatino aislamiento

de las poblaciones de *L. pardalis*, provocando una disminución de su tamaño efectivo (Clavijo y Ramírez 2007).

3.4. Genética y *Leopardus pardalis*

La genética de poblaciones, la filogenia, y la filogeografía son áreas del conocimiento que permiten obtener indicadores de la historia natural y evolutiva de una población, proporcionando información valiosa para el desarrollo de planes de conservación para especies en peligro de extinción. La genética proporciona la base conceptual para la comprensión de la historia natural y la situación actual de las poblaciones, y en base a esto se puede realizar un acercamiento a las especies en vía de extinción (O'Brien 1994).

En la última década los investigadores han optado por trabajar con técnicas no invasivas, y así poder obtener ADN de poblaciones naturales mediante la colecta de pelos y heces en campo (Waits & Paetkau 2005). Inicialmente, estos métodos no tuvieron gran acogida por la comunidad científica debido a la dificultad de obtener ADN a partir de este tipo de muestras; no obstante, con el desarrollo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite obtener un elevado número de copias de una región concreta de ADN, incluso partiendo de una mínima cantidad inicial, facilitando el estudio con muestras que contienen poco ADN o ADN parcialmente degradado (como las heces) permitiendo realizar con éxito la caracterización genética de poblaciones de especies amenazadas sin interferencia alguna con los animales (Echegaray *et al.* 2005). De esta forma las técnicas no invasivas se han consolidado como una alternativa confiable al trabajar con carnívoros. Foran *et al.* (1997) empezaron a trabajar con muestras fecales, desarrollando un método para la identificación de especies a partir de las variaciones en regiones específicas del genoma, usando ADN extraído de células epiteliales intestinales descamadas de las heces. Este trabajo fue la base para el desarrollo de investigaciones que utilizan las heces como fuente de ADN para la obtención de información ecológica de diferentes especies. Posteriormente, Davison *et al.* (2002) compararon la efectividad de los métodos morfológicos con los métodos moleculares para la identificación de diferentes especies de carnívoros, los investigadores encontraron que los métodos moleculares son más acertados que los morfológicos para identificar la procedencia de las heces. Uno de los proyectos más notables debido a que muestra la importancia del ADN degradado como

fuentes de información poblacional, es el realizado por Palomares *et al.* (2002) en donde se demuestra la importancia de los métodos no invasivos en la búsqueda de especies difíciles de muestrear; en esta investigación evaluaron como las técnicas moleculares son una herramienta inequívoca para la identificación mediante las heces de lince ibérico (*Lynx pardinus*). Otros trabajos utilizan las heces para realizar análisis genéticos con diferentes clases de felinos, como los de Kurose *et al.* (2005) en los que identificaron diferentes especies de felinos a partir de ADN fecal en un proyecto para la conservación de seis islas de Tsushima, Japón. Para Sur América, Miotto *et al.* (2007) analizaron el estado de la población de Puma (*Puma concolor*) en una reserva natural en Brasil, mediante el ADN extraído de materia fecal; mientras Napolitano *et al.* (2008) usaron ADN fecal para realizar la identificación genética de gato andino (*Leopardus jacobita*) y el gato de las pampas (*Leopardus colocolo*) para conocer su ecología y biogeografía.

A nivel mundial se ha visto un incremento en las iniciativas para la realización de estudios poblacionales, filogenéticos, filogeográficos empleando herramientas moleculares; con respecto a *L. pardalis* al ser una especie propia del continente americano, se han realizado variedad de estudios principalmente en Estados Unidos y México (donde las poblaciones de esta especie se encuentran en mayor estado de amenaza). Con respecto a Sur América, Brasil es el país que ha empezado a implementar la genética como una herramienta para el estudio de esta especie.

Para Colombia no existe información en las principales bases de datos. La información donde se encuentra registrada esta especie es en trabajos de grado (sin publicaciones), los cuales son realizados a través de marcaje con huellas, y solo existe un trabajo donde se trabaja la especie de *L. pardalis* con análisis moleculares y craneológicos (Corrales 2005).

3.5. Identificación de individuos de *L. pardalis* a partir de métodos no invasivos

Dentro de las seis especies nativas de félidos silvestres confirmadas para Colombia, del género *Leopardus* se encuentran reportadas tres: el ocelote (*Leopardus pardalis*), el margay (*Leopardus wiedii*) y el tigrillo (*Leopardus tigrinus*), morfológicamente estas especies son muy parecidas y se confunden fácilmente ya que se diferencia por pequeños detalles que presentan gran variación entre individuos (Eizirik *et al.* 1998).

Por otro lado, para *Leopardus pardalis* se encuentran reportadas once subespecies, las cuales fueron determinadas morfológicamente por Pocock (1941) y Weigel (1961). Estas subespecies deberían presentar distribución geográfica, características genéticas, moleculares, morfológicas e historias naturales propias e independientes una de la otra. Actualmente, existe una constante revisión taxonómica de esta clasificación, ya que la asignación de subespecies fueron determinadas a partir de pocos especímenes, basándose en muestreos geográficos restringidos y usando caracteres morfológicos que muestran gran variabilidad individual como la coloración del pelaje y la distribución de manchas (Eizirik *et al.* 1998; O'Brien 2003). Debido a la dificultad para realizar la diferenciación morfológica tanto en especies de *Leopardus* como en las subespecies de *Leopardus pardalis* se ha obstaculizado el conocimiento de estos felinos, lo cual hace necesario la implementación de herramientas moleculares, que permitan realizar una identificación utilizando aspectos diferentes a los morfológicos los cuales permitan realizar un acercamiento al conocimiento de esta especie (Kohn *et al.* 1999).

Inicialmente, la mayoría de estudios que realizaban estudios poblacionales se llevaban a cabo mediante técnicas invasivas que frecuentemente implicaban la captura de las diferentes especies (Bosch *et al.* 2005). Por esta razón, se inició el trabajo mediante estrategias no invasivas que no implicaran entrar en contacto con el animal en estudio; por lo cual se comenzaron a realizar estudios poblacionales a través de la identificación de los individuos usando marcas naturales como lo son el patrón de manchas, el tamaño, la coloración y las huellas (Navarro y Muñoz 2000). Sin embargo, la identificación individual de carnívoros dentro de una población algunas veces requiere del uso de caracteres morfológicos difíciles de determinar a través de los registros fotograficos (Weaver *et al.* 2005). Por esta razón, se ha desarrollado otra línea de técnicas no invasivas que busca complementar los estudios con estos mamíferos mediante el uso de material traza (ej.: heces y pelo) y herramientas moleculares (Weaver *et al.* 2005).

3.6. Alcance de las técnicas no invasivas con *L. pardalis*

El conocimiento de la distribución de *Leopardus pardalis* no sólo permitiría recuperar las poblaciones de esta especie mediante la implementación de programas de conservación, sino que también permitiría realizar un seguimiento y monitoreo de esta especie en el país. Aportando información acerca de los patrones geográficos de

subdivisión, la historia demográfica y la diferenciación genética que presenta la especie, para la toma de decisiones en la conservación de esta especie.

Del mismo modo, al tener la información geográfica de una población amenazada como lo es *Leopardus pardalis* (Avice 1998); se podrían realizar estudios biogeográficos a través de los cuales se pueden conocer las diferenciación genómica y la disminución del flujo genético entre las poblaciones que están siendo analizadas, y los efectos producidos por barreras geográficas (Avice 1998).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la viabilidad del uso de muestras fecales para la identificación genética de individuos de poblaciones naturales de *Leopardus pardalis* empleando herramientas moleculares de ADN.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar tres métodos de colecta de muestras fecales de individuos de poblaciones naturales que potencialmente pertenezcan a *Leopardus pardalis* en Colosó (Sucre)-Colombia.
2. Evaluar el protocolo de extracción estandarizado por Restrepo (2010) para poblaciones naturales de *L. pardalis*.
3. Analizar la eficiencia del gen mitocondrial 16S para la identificación de la especie *L. pardalis* usando ADN extraído de muestras fecales.

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El trabajo se desarrolló en tres áreas ubicadas en la serranía de San Jacinto, en la vereda Ricaurte, municipio de Colosó, departamento de Sucre, Colombia. El primer lugar fue el bosque alrededor de la estación primatológica de CAR-Sucre primatológica (9° 32' 32,4" N 75° 20' 48,8" W), la cual se caracteriza por ser una de las únicas reservas forestales del departamento. El segundo sitio de muestreo fue un bosque de galería conocido como "Ojos de agua" (9° 30' N 75° 22' W), este lugar se encontraba cerca del

perímetro urbano de Colosó. El último sitio fue en el cerro “las torres” (9° 30′ 52,7″ N 75° 20′ 44,8″ W) ubicado en el trayecto de Colosó hacia Chalan. Estas zonas se encuentran definidas como bosque seco tropical (Fig. 2) (IAVH 1998).

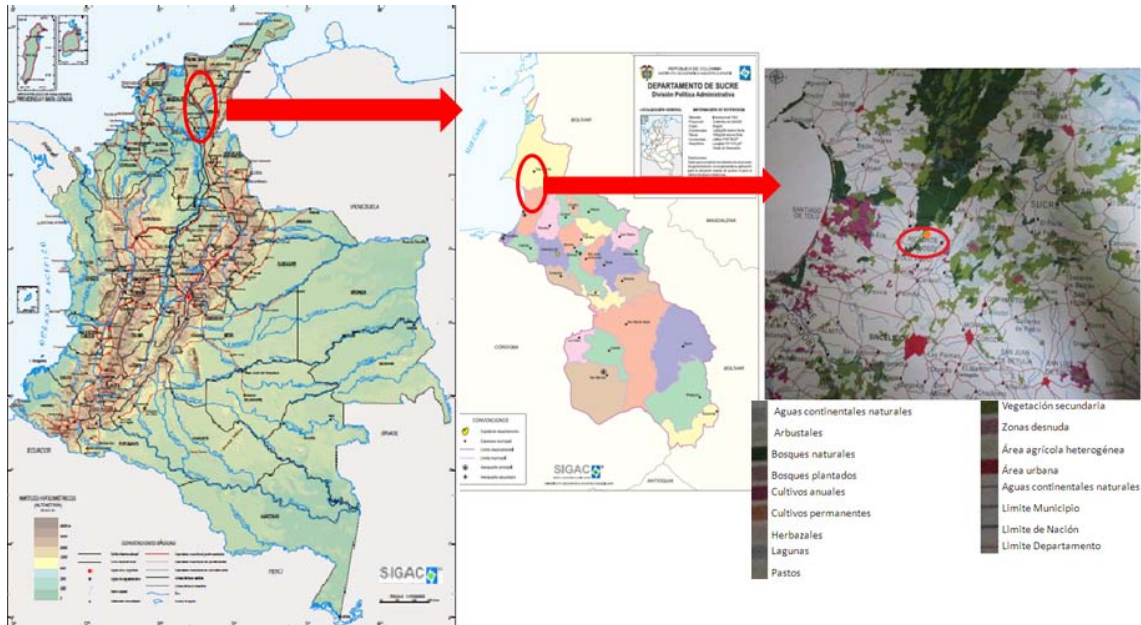


Fig. 2 Localización geográfica del área de estudio en Colosó (Sucre) donde se muestran los tres sitios de muestreo: Estación Primatológica, “Ojos de agua” y “Cerro de las torres” [tomado pagina web Municipio de Colosó y]

La zona de estudio se caracteriza por presentar una cobertura boscosa que se distribuye entre los 200-1000 m.s.n.m. Presenta temperaturas entre los 25° C y 36° C, precipitaciones entre los 700 y 2000 mm anuales, con un periodo de sequía al año. Aunque esta zona presenta una vegetación transicional entre zona húmedas y secas, es considerada dentro de la formación bosque seco tropical dado que sus condiciones climáticas son similares a otras zonas seca con éste tipo de vegetación (IAVH 1998).

En la actualidad el bosque seco tropical se constituye en uno de los ecosistemas más amenazados en el Neotrópico, debido a la fertilidad de sus suelos ha sido punto de desarrollo de poblaciones humanas y objeto de una intensa transformación (IAVH 1998). Esto fue evidente en los tres sitios donde se realizó el estudio, debido a que se encuentran rodeados por un paisaje altamente intervenido y degradado, a causa del constante uso del suelo para ganado y aves de corral, y para cultivos, principalmente: maíz, ñame, ají y frutales. A pesar de esto, los remanentes que se encuentran el Colosó son considerados como relictuales en comparación con otros sitios de Colombia (IAVH

1998). Según Ceballos (1996) gran parte de la riqueza de vertebrados del bosque seco tropical depende directamente de la presencia de bosques húmedos o riparios que se encuentren cercanos, dado que las especies migran durante las épocas de sequía y estas zonas se encuentran conectadas hacia el noreste con el Santuario de Fauna y Flora Los Colorados.

Aunque para Sucre, y especialmente Colosó, no existen reportes de *L. pardalis* ni en el Programa Nacional para la Conservación de Felinos en Colombia (2005), ni en las colecciones biológicas del Instituto Alexander von Humboldt y ni el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional. Se eligió esta zona como área de estudio debido a que en el primer lugar de muestreo (estación primatológica de CAR-Sucre) se tenía confirmada la presencia de *L. pardalis* por medio de registros de huellas y cámara trampa. Los otros dos sitios de muestreo fueron elegidos, debido a los reportes de avistamientos y ataques a animales domésticos por parte de los habitantes de la región.

5.2. Muestreos en campo

Debido al tiempo disponible para realizar la investigación, la colecta de muestras fecales en el área de estudio se realizó entre los meses de Septiembre y Octubre de 2010, esta época se caracterizó por tener un periodo inusual de lluvias los datos del Sistema de Información del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) del punto de medición que se encuentra en la estación primatológica de CAR-Sucre.

Con base en la bibliografía, los muestreos inicialmente se realizaron siguiendo la metodología usada por Echegaray *et al.* (2005) por medio de transectos lineales ubicados en unidades de paisaje regulares, que permitieran buscar las heces a lado y lado del transecto. Sin embargo a partir de los resultados obtenidos a medida que se llevaba a cabo el muestreo se fueron realizando modificaciones y se realizaron búsqueda a través del seguimiento de rastros (Palomares *et al.* 2002) y el uso de perros utilizados para la caza en la región (Modificado de Wultsch 2008).

Las heces colectadas fueron discriminadas inicialmente a partir de caracteres morfométricos básicos descritos por Chame (2003) para identificar excrementos de *Leopardus pardalis* frente a los de los otros felinos, como lo son:

- a. Heces en forma cilíndrica con forma de salchicha.
- b. Presencia de sub-divisiones.
- c. Ahusadas en uno de sus extremos terminales.
- d. Forma compacta.
- e. Diámetro del excremento entre 1.3cm y 1.6cm.
- f. Largo del excremento de 12.7cm aprox. y ancho del excremento 1.6cm aprox.

Debido a la dificultad que se tiene para encontrar muestras fecales en perfecto estado en condiciones naturales, se colectaron aquellas muestras que estuvieran en buen estado para la realización de los análisis genéticos necesarios y que presentaran algún carácter morfométrico similar a los de *L. pardalis*. Esta decisión se tomó, ya que en ocasiones se encontraron heces incompletas, las cuales no podían ser identificadas a partir de los rasgos descritos anteriormente. Del mismo modo las muestras que no tenían una buena consistencia no fueron almacenadas, ya que no se podían secar y las células epiteliales se mezclaban con los restos alimenticios; imposibilitando la extracción de ADN.

La preservación de las muestras colectadas se realizó siguiendo los protocolos previamente estandarizados por Restrepo (2010), se colectaron las muestras en bolsas de papel y fueron transportadas hacia la estación primatológica de CAR-Sucré, donde fueron secadas en un horno a 40°C por 24 horas en un horno. Posteriormente, en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente en un recipiente plástico con silica gel hasta su procesamiento.

Siguiendo lo propuesto por Echegaray *et al.* (2005), cada muestras fecal colectada se etiquetó para su posterior identificación y localización. Para cada muestra se tomó registro de:

- Colector, Fecha, Coordenadas, Humedad y Temperatura.
- Antigüedad: Basándose en la apariencia de las muestras fecales, estas se clasificaran según el tiempo de deposición: muy reciente (menos de un día),

reciente (más de un día, pero aun con materia orgánica en descomposición) y vieja (secos y sin materia en descomposición).

5.3. Extracción de ADN

Para el análisis de muestras fecales usando herramientas moleculares se extrajo ADN de las células descamadas del lumen del epitelio intestinal que se encuentran en la superficie de las heces colectadas siguiendo los protocolos previamente estandarizados por Restrepo (2010) en el laboratorio de Biodiversidad y Ecología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia. Para la extracción de ADN se utilizó QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo de Restrepo (2010) (Anexo 1).

Para cuantificar el ADN extraído se utilizó un cuantificador NanoVue®, a través de este método también se obtuvo una estimación de la pureza del ADN por medio de la relación de absorbancia (A260/A280nm) realizado por Restrepo (2010).

5.4. Amplificación de ADN

Para evaluar la calidad del ADN extraído y la utilidad de las muestras fecales colectadas para la identificación de *L. pardalis*, se amplificó un fragmento de 135 pb, del gen 16S y un fragmento de 585 pb de la región control que contiene la región hipervariable I (Tabla 1), siguiendo los protocolos previamente estandarizados por Restrepo (2010) en el laboratorio de Biodiversidad y Ecología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia. La reacción de amplificación para el fragmento del gen 16S se realizó en un volumen final de 30µL con 1X de Buffer de reacción (Invitrogen), 2.0mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM de dNTPs (Invitrogen), 0.5µM de cada primer (Primer H y Primer F₁ unimuseo) (Invitrogen), 0.75 u de *Taq* Polimerasa (Invitrogen) y 2µL de ADN extraído. Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 2 min seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 30 seg con una extensión final de 72°C por 1 min. La reacción de amplificación para el fragmento de la región control se realizó en un volumen final de 20µL con 1X de Buffer de reacción (Invitrogen), 1.5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM de dNTPs (Invitrogen), 0.5µM de cada primer (MTLPRO₂ y CHR₃) (Invitrogen), 0.75 u de *Taq* Polimerasa (Invitrogen) y 2µL de ADN extraído. Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 2 min seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 45°C por 30 seg y 72°C por 30 seg con una extensión final de 72°C por 1

min. Los productos de las amplificaciones fueron analizados con un marcador de peso molecular, con un control positivo-ADN extraído de sangre de especímenes en cautiverio, control positivo-ADN extraído de heces colectadas en especímenes en cautiverio y control negativo por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) % teñido con 1µl de bromuro de etidio (BEt), Para visualizar estos geles se utilizó un transiluminador de luz UV.

| Nombre Primer | Secuencia 5' - 3' | Combinación | Tamaño de amplificado |
|-----------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| 16SUniMuseo-L1 | GYTTACGACCTCGATGTTGG | 16SUniMuseo-L1 x 16SUniMuseo-H1 | Aprox. 135 pb |
| MTLPRO2 (HVS-1) | CACTATCAGCACCCAAAGCTG | MTLPRO2 (HVS-1) x CHR3 | Aprox. 535 pb |
| CHR3 | CCTGTACATGCTTAATATTC | | |
| 16SUniMuseo-H1 | AYAGATAGAAACYGACCTGGAT | | |

Tabla 1. Los oligonucleótidos generados para amplificar 16S fueron 16SUniMuseo-L1 junto con 16SUniMuseo-H1. Mientras par región control fueron MTLPRO2 (HVS-1) junto con CHR3. Las bases degeneradas son: **R**=A+G, **Y**=C+T, **W**=A+T, **H**=A+C+T, **N**=A+C+G+T

Para las amplificaciones con los dos fragmentos se realizaron tres replicas. Para medir el porcentaje de éxito de la amplificación, fue calculado dividiendo el numero de amplificaciones exitosas entre el número total de amplificaciones de acuerdo con (Chu *et al.* 2006). Un patrón de patrón de bandas fue “repetible” cuando se tuvo éxito en la amplificación en al menos dos de las tres réplicas que se hicieron, la repetitividad se calculó por la proporción de las muestras con patrón de bandas “repetible” en el total de las muestras que amplificaron, de acuerdo a lo realizado por (Chu *et al.* 2006).

5.5. Secuenciación

Las muestras que amplificaron para el gen 16S fueron purificadas con el fin de remover los oligonucleótido y dNTPs no incorporados. Posteriormente los productos purificados fueron enviados para ser secuenciados al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

5.6. Análisis de datos

Mediante la realización de un análisis de varianza de un factor con un α del 0.05, se compararon los valores obtenidos para cantidad y pureza del ADN obtenido de las heces colectadas en campo con los datos obtenidos en la estandarización de los protocolos para muestras tratadas de la misma manera pero de individuos en cautiverio. Del mismo modo, para evaluar la calidad del ADN obtenido de muestras colectadas en campo con el obtenido de individuos en cautiverio, se compararon los porcentajes de amplificación mediante una prueba de diferencias de proporciones que permito saber si existen diferencias significativas entre los datos obtenidos.

Para evaluar la eficiencia del gen mitocondrial 16S para la identificación de la especie *L. pardalis* se realizó un alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida para este fragmento de las heces colectadas en campo por medio de una búsqueda en la base de datos GenBank con la herramienta BLAST. Posteriormente, se efectuó un alineamiento usando el programa bioinformático BioEdit (Hall 1999) entre la secuencia obtenida de la colecta en campo y la secuencia para este fragmento de ADN extraído a partir de sangre de *L. pardalis* en cautiverio al igual que con la primera secuencia arrojada por el BLAST y con 4 secuencias del gen mitocondrial 16S previamente caracterizado de las especies que se encuentran reportadas en la zona donde se encontraron las muestras fecales, donde se cargaron secuencias de GenBank para: *Felis catus* (codigo de acceso S75317.1), *Canis lupus familiaris* (codigo de acceso AB499816.1), *Procyon lotor* (codigo de acceso DQ334817.1), y *Tamandua mexicana* (codigo de acceso NC 004032.1).

6. Resultados

6.1. Muestreo en Campo

A pesar de que los meses en los que se realizó la investigación se caracterizó por tener un periodo inusual de lluvias, se colectaron un total de 9 muestras fecales, de las cuales 3 se clasificaron como recientes y 6 como viejas según la antigüedad que tenían al momento de la colecta. En el bosque alrededor adyacente a la estación primatológica de CAR-Sucre (9° 32' 32,4'' N 75° 20' 48,8'' W) (Fig. 3) fueron encontradas 6 muestras, mientras en el bosque secundario conocido como "Ojos de Agua" (9° 30' 25,1'' N 75° 22' 38,6'' W) (Fig. 4) se colectaron 3 heces. En el tercer lugar donde se realizó

búsqueda de muestras fecales, el “Cerro de las Torres” ($9^{\circ} 30' 52,7''$ N $75^{\circ} 20' 44,8''$ W) no se encontró ninguna muestra.



Fig. 3 Sitio 1 de muestreo. Bosque adyacente a la Estación Primatológica de CAR-Sucre

El muestreo con transectos no permitió encontrar muestras fecales. Ante esta situación, se optó por realizar la búsqueda de muestras mediante el seguimiento de rastros, es decir, se hizo una búsqueda a partir de huellas y marcas de garras en los árboles. Esta metodología permitió encontrar 7 muestras fecales, sin embargo esta metodología presenta un alto grado de dificultad pues requiere de mucho tiempo y esfuerzo, lo que hizo necesario la prueba de otra alternativa. Por esta razón, se realizaron muestreos con perros de caza y se logró encontrar 2 muestras fecales.



Fig. 4 Sitio 2 de muestreo. Bosque secundario “Ojos de Agua”

Durante el muestreo realizado se encontraron dos troncos con marcas de garras y en cada uno de ellos se encontraron muestras fecales, esto facilitó la discriminación de estas muestras. Las otras 7 muestras fueron encontradas sobre rocas y vegetación en

diferentes lugares de las zonas estudiadas, todas las muestras se caracterizaban por encontrarse en lugares cubiertos, poco visibles y poco transitados.

6.2. Cantidad, pureza y calidad del ADN

En total, se obtuvieron 9 muestras fecales para ser evaluadas. Los resultados obtenidos para la cantidad y pureza del ADN extraído a partir de éstas muestras se encuentran en la Tabla 2. Debido a que las muestra 1, 3, 4 y 6 inicialmente no amplificaron con ninguno de los dos fragmentos evaluados, se repitió toda la extracción con estas muestras (1R, 3R, 4R y 6R) para asegurar que los resultados obtenidos no fueran producto de errores metodológicos. En la Tabla 2 se muestran los datos de cantidad y pureza de estas repeticiones.

| Muestra | Cantidad de ADN extraído ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | Pureza Relación A260/A280 |
|---------|--|---------------------------|
| 1 | 253 | 1,447 |
| 2 | 23,8 | 1,765 |
| 3 | 207,5 | 1,611 |
| 4 | 36,7 | 1,974 |
| 5 | 13,3 | 2 |
| 6 | 110,2 | 1,866 |
| 7 | 9,9 | 2,021 |
| 8 | 54,1 | 1,895 |
| 9 | 24,6 | 1,968 |
| 1R | 32,5 | 1,857 |
| 3R | 124,8 | 1.673 |
| 4R | 130,9 | 1,617 |
| 6R | 44,9 | 1.915 |

Tabla 2. Valores obtenidos para concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y pureza (relación A260/A280) para cada una de las muestras encontradas en campo.

Al comparar los valores de cantidad de las muestras colectadas en campo con los valores obtenidos por Restrepo (2010) para muestras de *L. pardalis* colectadas de individuos en cautiverio tratadas con el mismo protocolo, se encontró que no presentaban diferencias significativas ($P=3.02$). Del mismo modo, los resultados obtenidos para la pureza tuvieron un promedio general de $A260/A280=1.853$ y no arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.79$) con los datos obtenidos

por Restrepo (2010). Mostrando que la cantidad y pureza del ADN extraído no varía según la procedencia de las muestras.

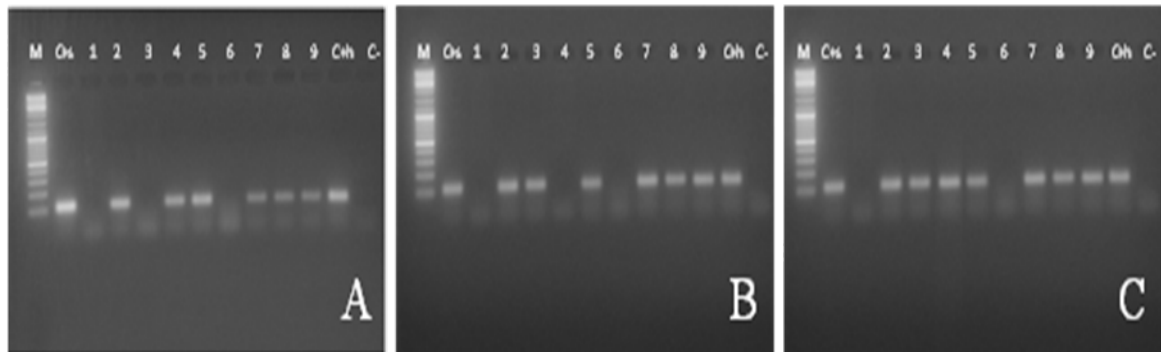


Fig. 5 Amplificación por PCR de un fragmento (135 pb) de gen mitocondrial 16S para nueve muestras fecales colectadas en Colosó, Sucre. Donde M= Marcador de peso, C+s= Control positivo-ADN extraído de sangre, los números del 1 al 9 corresponden a cada una de las muestras colectadas, C+h= Control positivo-ADN extraído de heces colectadas en cautiverio y C- = Control negativo

Para un total de 27 amplificaciones realizadas con el gen mitocondrial 16S se obtuvo un éxito de 70.37%, equivalente a 19 amplificaciones exitosas (Tabla 3). Las muestras que amplificaron para la primera prueba fueron: 2, 4, 5, 7, 8 y 9 (Fig. 5A), mientras que para la segunda amplificaron las mismas a excepción de la muestra 4 que no amplificó, en esta prueba la 3 si amplificó (Fig. 5B). Para la tercera amplificación se repitió la extracción de las muestras 1, 3, 4 y 6 para confirmar que no se hubiese cometido algún error al momento de extracción y la amplificación, y se encontró que todas las muestras que habían amplificado en las dos pruebas anteriores fueron exitosas mientras de las muestras 1 y 6 (Fig. 5C) no fue posible conseguir su amplificación. Arrojando un 100% de repetitividad del patrón de bandas de las muestras analizadas para amplificadas realizadas con el gen mitocondrial 16S (Tabla 3). Mediante la aplicación de la prueba de proporciones, se encontró que existen diferencias significativas entre la calidad del ADN obtenido de individuos de poblaciones naturales y el obtenido de individuos en cautiverio.

| Muestra | Primera Amplificación | Segunda Amplificación. | Tercera Amplificación. |
|---------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | -- | -- | -- |
| 2 | + | + | + |
| 3 | -- | + | + |
| 4 | + | -- | + |
| 5 | + | + | + |
| 6 | -- | -- | -- |
| 7 | + | + | + |
| 8 | + | + | + |
| 9 | + | + | + |

Tabla 3. Datos de cada amplificación por PCR realizada con el gen mitocondrial 16S para las nueve muestras fecales colectadas en Colosó.

+: Amplificación Exitosa; --: Amplificación No exitosa.

Para la Región control (HSV-I) se realizaron un total de 21 amplificaciones debido a que no se incluyeron las muestras 1 y 6 debido a que no amplificaron con el fragmento de 135 pb, se obtuvo un éxito de 38,09%, equivalente a 8 amplificaciones (Tabla 4). Las muestras que amplificaron en la primera prueba fueron 5 y 8 (Fig. 6A), mientras que para la segunda y tercera amplificaron 5, 7 y 8 (Fig. 6B). Arrojando un 100% repetitividad en el patrón de bandas de las muestras analizadas para la amplificadas para este fragmentos (Tabla 4). El bajo éxito de amplificación al usar estos primers, indica que el ADN fecal obtenidos de muestras en campo está más degradado, lo cual imposibilita la amplificación de fragmentos de mayor tamaño (región control, 535 pb) (Fig. 6A y 6B).

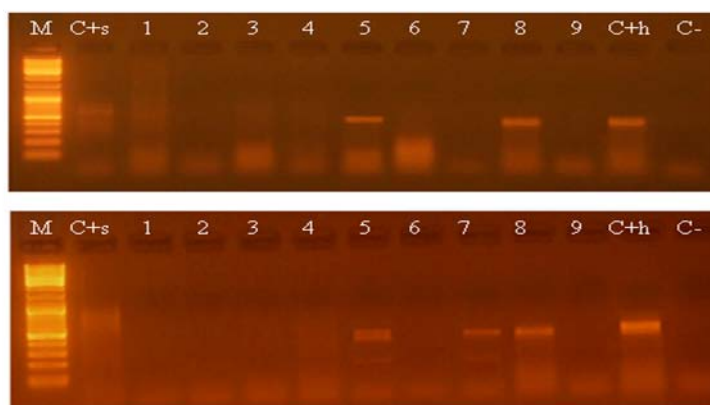


Fig. 6 Amplificación por PCR de un fragmento (535 pb) de la región control hipervariable I (HSV-I) Para nueve muestras fecales colectadas en Colosó, Sucre. Donde M= Marcador de peso, C+s= Control positivo-ADN extraído de sangre, loa números del 1 al 9 corresponden a cada una de las muestras colectadas, C+h= Control positivo-ADN extraído de heces colectadas en cautiverio y C- = Control negativo.

| Muestra | Primera Amplificación | Segunda Amplificación. | Tercera Amplificación. |
|---------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 2 | -- | -- | -- |
| 3 | -- | -- | -- |
| 4 | -- | -- | -- |
| 5 | + | + | + |
| 7 | -- | + | + |
| 8 | + | + | + |
| 9 | -- | -- | -- |

Tabla 4. Datos de cada amplificación por PCR realizada de la región control hipervariable I (HSV-I) para las nueve muestras fecales colectadas en Colosó.
+: Amplificación Exitosa; --: Amplificación No exitosa.

6.3. Secuencias

De los siete fragmentos del gen 16S secuenciados, se obtuvo una secuencia para ser analizada (debido a falta de tiempo no permitió la obtención de más secuencias). Una comparación realizada con la base de datos genéticos GENBANK encontró una similitud de 100% de esta secuencia con siete secuencias de la base de datos. Estas siete secuencias corresponden a cuatro especies de la clase **Mammalia**, orden **Carnivora**, suborden **Feliformia**, familia **Felidae** y subfamilia **Felinae**.

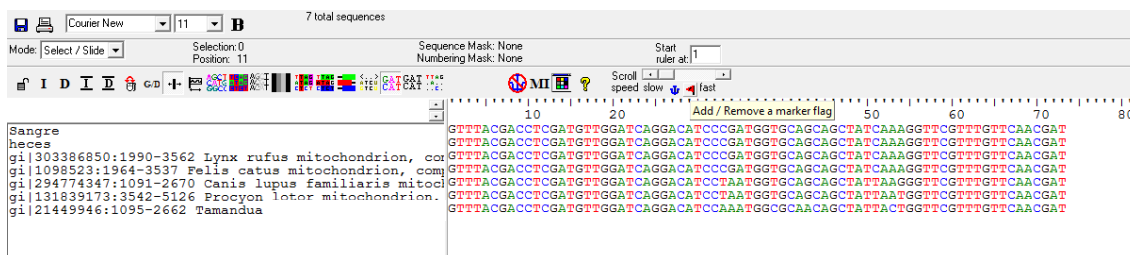


Fig. 7 Alineamiento de secuencias mediante el programa Bioedit. Donde se comparan la obtenida de la muestra fecal con las secuencias de: *L. pardalis*, *Lynx rufus*, *Felis catus*, *Canis lupus familiaris*, *Procyon lotor* y *Tamandua mexicana*.

A partir del alineamiento realizado con BioEdit (Hall 1999), se encontraron diferencias entre la secuencia obtenida de la muestra colectada en campo y las secuencias de *Canis lupus familiaris*, *Procyon lotor* y *Tamandua mexicana*. Sin embargo, no fue posible encontrar diferencias entre la secuencia obtenida de la muestra colectada en campo con las secuencias de *Felis catus* y de *Lynx rufus* y las obtenidas de sangre de *L. pardalis* (Fig. 7).

7. Discusión y Conclusiones

La colecta de muestras fecales en campo presentó inconvenientes, debido a las condiciones climáticas que se presentaron al momento de realizar el muestreo, puesto que no fueron las más adecuadas para la búsqueda de heces, factor que pudo haber influido en la cantidad y la calidad de las muestras que se encontraron. Del mismo modo, la mayor dificultad fue encontrar las muestras siguiendo las metodologías propuestas, debido a que muchas de estas se encuentran descritas por diversos autores (Palomares *et al.* 2002; Adams *et al.* 2003; Gompper *et al.* 2006) pero su descripción es muy general y al llegar a campo, se demuestra que las especificaciones son inestables y poco replicables. Además de esto, en zonas altamente intervenidas no es posible encontrar muestras fecales; como sucedió en el tercer lugar de muestreo, el “Cerro de las Torres” (9° 30′ 52,7″ N 75° 20′ 44,8″ W), en el cual a pesar de que los habitantes reportaban de ataques de ocelotes a aves de corral en fincas adyacentes a este lugar, al no existir una zona bien conservada en este lugar no se encontraron muestras fecales.

El muestreo con transectos no fue efectivo para encontrar las heces, a pesar de que se realizó por senderos donde se tenía registro fotográfico de ocelotes. Esto puede deberse a que las lluvias, el tránsito de otras especies y de seres humanos dificultaba que las muestras fecales se conservaran en estos lugares. Del mismo modo, este método de colecta no es apropiado para el trabajo con heces de *L. pardalis*, debido a que deja muchos sitios sin muestrear y limita la búsqueda de este material que es difícil de encontrar. De acuerdo con lo experimentado al momento de realizar el muestreo en campo, se propuso una metodología para realizar un muestreo de heces para análisis genético, este se encuentra en el Anexo 2.

Por otro lado, al comparar la cantidad y pureza del ADN obtenido de muestras fecales colectadas en campo con lo obtenido de muestras fecales colectadas de individuos en cautiverio, se encontró que no existen diferencias significativas entre estas variables. Por lo cual, podemos deducir que los protocolos estandarizados permiten conservar las muestras evitando la degradación del material genético, sin alterar la cantidad y el rango de pureza del ADN extraído. Es decir, se pudo obtener buenas cantidades de ADN con un promedio de pureza de $A_{260}/A_{280}=1.853$ el cual según Broquet *et al.* (2007) indica un grado óptimo de pureza, ya que este rango debe encontrarse entre 1,8 y 2. Mediante

este resultado podemos inferir, que el utilizar la porción de la superficie de las muestras fecales permite restringir el riesgo de coextraer sustancias que limiten la pureza del ADN extraído (Stenglein *et al.* 2010). Al no encontrar diferencias significativas en el nivel de pureza y cantidad se puede proponer que la efectividad del Kit para retirar la mayor cantidad de sustancias que pueden interferir con la pureza del material genético es un factor esencial para el desarrollo de este tipo de estudios, lo cual se encuentra soportado por los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas por Wasser *et al.* (1997) Bellemain & Taberlet (2004), Bhagavatula & Singh (2006), Lampa *et al.* (2008), Broseth *et al.* (2010), Frantz *et al.* (2003).

El estudio realizado por Bhagavatula & Singh (2006) demostró que el uso de muestras fecales colectadas de poblaciones naturales presenta una mayor dificultad para la extracción de ADN de buena calidad en comparación con la extracción de ADN de muestras colectadas de especímenes en cautiverio. Estos resultados soportan lo obtenido en la presente investigación, ya que se encontró que a pesar que no existen diferencias significativas para la cantidad y la pureza del ADN obtenido entre los dos tipos de muestras; para la calidad existen diferencias estadísticamente significativa entre el ADN obtenido de muestras de individuos en cautiverio y de individuos en poblaciones naturales. Esto se vio reflejado en que el trabajo con muestras colectadas en campo tuvo un porcentaje de amplificaciones exitosas realizadas con el gen mitocondrial 16S más bajo (70.37%), comparado con el 100% de éxito obtenido en las amplificaciones con individuos en cautiverio. A pesar de la gran diferencia, el éxito de amplificación obtenido con muestras colectadas en campo se encuentran dentro del rango reportado para los estudios de ADN fecal en diferentes especies el cual según Chu *et al.* (2006) se encuentra entre 56-100%. El tener un porcentaje de amplificaciones exitosas menor en los estudios realizados en condiciones de campo es una tendencia que se presenta en los estudios con muestras no invasivas (Palomares *et al.* 2002; Chu *et al.* 2006; Ruell & Crooks 2007; Valière *et al.* 2007; Mondol *et al.* 2009), esto se puede deber a que la calidad de muestras obtenidas en condiciones de campo pueden estar influenciadas por diversos factores como la dieta de las especies (Murphy *et al.* 2003), la antigüedad de las heces (Chu *et al.* 2006) y las condiciones desfavorables de alta precipitación y humedad que se presenta en algunos ecosistemas (Murphy *et al.* 2007). Las limitaciones que este tipo de factores pueden generar sobre la calidad del ADN fecal de poblaciones naturales está asociado Según Kreader (1995) y Chu *et al.* (2006) a la presencia de

inhibidores que se generan durante la descomposición de la materia fecal, como: los restos de animales predados, los ácidos tánicos, sustancias húmicas, sales biliares, la bilirrubina y sustancia fúlvicas que interfieren en la amplificación por PCR.

La amplificación de la de la región control hipervariable I (HSV-I) utilizando los primers MLTPRO₂ – CHR₃, nos permitió evaluar el porcentaje de éxito en la amplificación en un fragmento de mayor tamaño (535 pb) y más específico para la identificación de *L. pardalis*. Para este fragmento se obtuvo un éxito en la amplificación de 38,09%, sin embargo en la estandarización realizada por Restrepo (2010) no se había obtenido amplificaciones para este fragmento, lo cual se debió posiblemente a que no las muestras secadas no se secaron inmediatamente sino que se dejó que pasaran cerca de 6 días para secarlas lo que permitió el crecimiento de hongos y una mayor degradación del ADN fecal imposibilitándolo para la amplificación de fragmentos grandes. Es por esto que se recomienda secar las muestras en la mayor brevedad posible para detener la descomposición de la materia orgánica y el crecimiento de sustancias fúngicas que puede influir en el éxito de los resultados obtenidos siguiendo los protocolos estandarizados por Restrepo (2010). Pese al bajo éxito en la amplificación, los resultados obtenidos nos permite decir que los protocolos para la colecta y extracción de ADN fecal estandarizados por Restrepo (2010) no solo permite obtener óptimas cantidades con una pureza óptima, sino que también son una herramienta que permite ADN amplificable.

Regnaut (2006) afirma que el éxito de amplificación puede ser evaluado desde la primera amplificación, ya que en las repeticiones no se encuentran diferencias. En algunos casos esta afirmación es acertada, sin embargo en los resultados obtenidos se encontraron diferencias en las 2 primeras amplificaciones con el gen mitocondrial 16S por lo que fue necesario realizar la extracción nuevamente de las muestras que habían presentado variaciones en el patrón de bandas. Del mismo modo, la amplificación de la región control hipervariable I (HSV-I) mostró resultados similares a los obtenidos en la para el fragmento del gen 16s. Además, la importancia de las repeticiones de las amplificaciones radica en el hecho de garantizar que los patrones de bandas obtenidos son verídicos y no producto de contaminación o errores en los procedimientos realizados (Chu *et al.* 2006). De esta forma los resultados de repetitividad del 100% para los dos fragmentos amplificados, no solo garantizan que el patrón de bandas pertenece a las

muestras analizadas sino que también nos muestra la efectividad de los protocolos utilizados para la obtención de ADN que permita la reproductibilidad de los resultados. El hecho que las muestra número 1 y 6 no hubiesen amplificado para el fragmento 16S y que para la región control hipervariable I (HSV-I) el éxito de la amplificación haya sido menor (38,09%) se puede deber al estado de degradación en el que se encontraba el ADN en estas muestras como resultado de la humedad y la antigüedad (Waits 2001).

El hecho que el ADN obtenido de las muestras fecales se encuentre parcialmente degradado afecta la obtención de secuencias de buena calidad, lo que dificulta la comparación entre las muestras objeto de estudio y las secuencias que han sido caracterizadas previamente (Taberlet *et al.* 1996). Esto se ve reflejado por los datos obtenidos en la presente investigación, donde solo fue posible obtener una secuencia de buena calidad para ser comparada. Regnaut (2005) afirma que la degradación del ADN de heces colectadas en poblaciones naturales se da principalmente por DNAsas libres presentes en la materia fecal lo que puede incidir en gran medida en la amplificación y posterior secuenciación del ADN fecal. De igual forma, la degradación del ADN también se encuentra dada por las condiciones ambientales en las que se encuentran expuestas las muestras junto con los inhibidores que presentan. Al existir diversidad de factores que dificultan el empleo de muestras fecales como herramientas para el estudio de especies silvestre, Oka & Takenaka (2001) sugiere contrarrestar algunos de los efectos como los de inhibición (el cual considera crítico) mediante el uso de soluciones durante el proceso de extracción como CTAB/NaCl y BSA.

Sin embargo, por medio de la única secuencia que fue posible conseguir se obtuvieron datos importantes en este estudio. Ya que al realizar un alineamiento (BLAST) se pudo comparar con todas las secuencias para el gen mitocondrial 16S reportadas en el banco genético más grande del mundo (Genbank). Lo que evidencia la importancia de la secuencia obtenida, además también se logró discriminar que la secuencia tenía una alta similitud con las secuencias de diferentes felinos. El alineamiento de la secuencia obtenida con otras secuencias disponible en Genbank permitió una comparación más restringida y verídica con *L. pardalis*, *Lynx rufus*, *Felis catus*, *Canis lupus familiaris*, *Procyon lotor* y *Tamandua mexicana*. Gracias a estas comparaciones podemos afirmar que la muestra colectada en Colosó (Sucre) pertenecen a un felino. Puesto que la similitud entre la secuencia obtenida y las secuencias previamente caracterizadas

contrastadas con el BLAST, muestran que esta región es compartida por varias especies de felinos, mostrando así que existe una alta probabilidad que pertenezca a uno. Esta probabilidad aumenta aún más al observar los resultados obtenidos con el alineamiento realizado con BioEdit, puesto que al comparar el fragmento obtenido con los reportados para diferentes especies, como: *Canis lupus familiaris*, *Procyon lotor* y *Tamandua mexicana* se puede observar que existen diferencias en la secuencia. Sin embargo, al ser esta una secuencia tan conservada no permitió diferenciar entre: *L. pardalis*, *Lynx rufus*, *Felis catus*. Por lo tanto, no podemos afirmar que la secuencia obtenida pertenece a *L. pardalis* pero sí podemos aseverar que la muestra no pertenece a *Canis lupus familiaris*, *Procyon lotor* y *Tamandua mexicana*. Igualmente, podemos asegurar que la secuencia pertenece a un felino. Dado que en la zona donde se realizó el estudio no existen registros de felinos silvestres diferentes a ocelote, existe una alta probabilidad que esta muestra pertenezca a un individuo de *L. pardalis*. Sin embargo, para confirmar de forma verídica la procedencia de la muestra se continuará con esta investigación con el fin de obtener la secuencia de la región control hipervariable I (HSV-I), que no fue posible obtener en el desarrollo de este estudio, como también se secuenciarán tanto este fragmento como el fragmento del gen 16S para todas las muestras colectadas.

7.1. Conclusiones

De los tres métodos de colecta, el que permitió coleccionar un mayor número de muestras fecales en el trabajo realizado en Colosó (Sucre)-Colombia fue el seguimiento de rastros, el cual es una herramienta útil para el muestreo en campo de heces de *Leopardus pardalis*. Del mismo modo, el período inusual de lluvias en los que se realizó el trabajo disminuyó la efectividad de las metodologías usadas para la colecta de muestras fecales de *Leopardus pardalis*.

El trabajo realizado permitió probar que los protocolos estandarizados por Restrepo (2010) permiten realizar estudios genéticos con muestras fecales de poblaciones naturales de *L. pardalis*.

El gen mitocondrial 16S puede ser usado para la identificación de felinos usando ADN extraído de muestras fecales, sin embargo al ser un gen que presenta pocas variaciones nucleotídicas entre especies no es eficiente para la identificación de *L. pardalis*.

Las muestras fecales permiten obtener registros de *L. pardalis* en Colombia y se pueden convertir en fuente de información para la realización de análisis genéticos con esta especie; sin embargo, es necesario de un trabajo conjunto con otras metodologías no invasivas (cámaras trampa y trampas huella) para el estudio de poblaciones naturales de *L. pardalis*.

8. Recomendaciones

Para la realización de estudios con ADN obtenido a partir de células descamadas del lumen del epitelio intestinal se recomienda garantizar que estos se lleven a cabo en épocas del año con temporadas secas o de bajas precipitaciones.

Se recomienda probar métodos de colecta específicos para la colecta de heces en campo que permitan obtener mejores resultados para la realización de estudios en Colombia, como el método desarrollado recientemente por Wultsch (2008). El consiste en el uso de perros entrenados para la búsqueda específica de muestras fecales de *L. pardalis* o “Scats Dogs”.

Del mismo modo se deben desarrollar métodos alternativos al horno para secar las muestras en lugares que no se tenga acceso a electricidad.

Para utilizar ADN fecal como fuente de información para la realización de estudios genéticos, se debe probar el uso de sustancias adicionales (BSA y CTAB) que disminuyan los efectos de los inhibidores en la amplificación y secuenciación de ADN fecal.

Para estudios posteriores se recomienda el análisis de secuencia de primers polimórficos como la HVS- 1, para la genotipificación de los individuos.

La realización de muestreos más extensivos y sistemáticos permitirían conocer datos más exactos sobre la distribución, ecología y estado actual de *L. pardalis* en Colombia.

9. Bibliografía

Adams JR, Kelly BT, Waits LP. Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology* 2003; **12**: 2175-2186.

Albaugh GP, Iyengar V, Lohani A. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer* 1992; **52**: 347-350.

Alda F, Inogés J, Alcaraz L, Oria J, Aranda A & Doadrio I. Looking for the Iberian lynx in central Spain: a needle in a haystack? *Animal Conservation* 2008; **11**: 297–305.

Avice JC. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*. 1998; **7**: 371-379.

Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 2009; **9**: 1279–1301.

Bellemain E, Taberlet P. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology* 2004; **4**: 519-522

Bhagavatula J, Singh L. Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: A pilot study. *BMC Genetics* 2006; **48** (7): 1-12.

Bosch M, Marmi J, Ferrando A, López-Giráldez F, García E, Ponsá M, Kellermann T, Guallar B, Bisbal F, Domingo-Roura X. Genotipar sin capturar Galemys 2005; **17**: 81-102.

Broquet T, Menard N, Petit E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 2007; **8**: 249-260.

Brosseth H, Flagstad Ø, Wårdig C, Johansson M, Ellegren H. Large-scale noninvasive genetic monitoring of wolverines using scats reveals density dependent adult survival. *Biological Conservation* 2010; **143**: 113–120

Ceballos G. Vertebrate diversity, ecology, and conservation in neotropical dry forest. En *Tropical deciduous Forest Ecosystem*. (eds.). Bullock S, Medina E, Mooney HA. University Chicago Press. Chicago. EE.UU. 1995; 195-222 pp

Chame M. Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. Member Institute Oswaldo Cruz 2003; **98**: 71-94.

Clavijo A, Ramírez GF. Taxonomía, Distribución y Estado de Conservación de los felinos Suramericanos: Revisión Monográfica. *Boletín Científico Centro de Museos de Historia Natural* 2007; **13** (2): 43-60.

Corrales C. Análisis comparativo de la subespecies de ocelote (*Leopardus pardalis*) a partir de datos craneométricos y moleculares. 2005 Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Chu JH, Lin YS, Wu HY. Applicability of Non-Invasive Sampling in Population Genetic Study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*). Taiwania 2006; **51** (4): 258-265.

Davison A, Birks J, Brookes R. On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. Journal of Zoology 2002; **257**: 141-143.

Echegaray J, Martínez A, Ayala AH, Martínez de Lecea F, Celis JB, de la Torre JA. El lobo (*Canis lupus*) en la comunidad autónoma del país Vasco. Uso del ADN fecal para el seguimiento de sus poblaciones. (eds.). Dirección de Biodiversidad del Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz

Eggert LS, Eggert JA, Woodruff DS. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. Molecular Ecology 2003; **12**: 1389-1402.

Eizirik E, Bonatto S, Johnson W, Crawshaw P, Vie JC, Brousset D, O'Brien SJ, Salzano F. Phylogeographic patterns and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in two Neotropical Cats (Mammalia, Felidae). Molecular Evolution 1998; **47**: 613-624.

Frantz AC, Pope LC, Carpenter PJ, Roper TJ, Wilson GJ, Delaha RJ, Burke T. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. Molecular Ecology 2003; **12**: 1649-1661.

Foran DR, Crooks KR, Minta SC. Species Identification from Scat: An Unambiguous Genetic Method. Wildlife Society Bulletin 1997; **25** (4): 835-839.

Gompper ME, Kays RW, Ray JC, Lapoint SD, Bogan DA, Cryan JR. A Comparison of Noninvasive Techniques to Survey Carnivore Communities in Northeastern North America. Wildlife Society Bulletin 2006; **34** (4): 1142-1151.

Gros PM, Kelly MJ, Caro TM. Estimating Carnivore Densities for Conservation Purposes: Indirect Methods Compared to Baseline Demographic Data. Oikos 1996; **77**(2):197-206.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 1999; **41**:95-98.

Hedmark E, Flagstad Ø, Segerstrom P. DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. Conservation Genetics 2004; **5**: 405-410.

Instituto Alexander von Humboldt (IAVH). 1998. Caracterización ecológica de cuatro remanentes de Bosque seco Tropical de la región Caribe colombiana. Grupo de Exploraciones Ecológicas Rápidas, IAVH, Villa de Leyva. pag. 76. eds.).

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Los felinos como especies focales y de alto valor cultural. (eds.). Inventario Nacional de la biodiversidad y la Estrategia nacional para la prevención y el control del tráfico ilegal de especies silvestres. Bogotá, Colombia 2010: 1-8 pp.

Janečka JE, Jackson R, Yuquang Z, Diqiang L, Munkhtsog B, Buckley-Beason V, Murphy WJ. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. *Animal Conservation* 2008; **11**: 401-411.

Kohn MH, Wayne RK. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 1997; **12** (2): 223-227.

Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK. Estimating population size by genotyping faeces. *Proc. Real Society of London* 1999; **266**: 657-663.

Kurose N, Masuda R, Tatara M. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: A noninvasive method for conservation on the Tsushima islands, Japan. *Journal of Heredity* 2005; **96**: 688-697.

Lampa S, Gruber B, Henle K, Hoehn M. An optimisation approach to increase DNA amplification success of otter faeces. *Conservation Genetics* 2008; **9**: 201-210

Muñoz C. Caracterización y seguimiento de poblaciones animales amenazadas. http://www.ucm.es/info/zoo/Vertebrados/CPA_archivos/tema2.html Consultado el 11 de octubre de 2010.

Mondol SK, Karanth U, Samba N, Gopaldaswamy AM, Andheria A, Ramakrishnan U. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biological Conservation* 2009; **142**: 2350-2360.

Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 2001; **10**: 1835-1844.

Miotto RA, Rodríguez FP, Ciocheti G, Galetti P. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica* 2007; **39**: 647-654.

Napolitano C, Bennett M, Johnson WE, O'Brien SJ, Marquet PA, Barria I, Poulin E, Iriarte A. Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic Andean cats species using genetic identification of faecal samples. *Molecular Ecology* 2008; **17**: 678-690.

Navarro JF, Muñoz J. Manual de huellas de algunos mamíferos terrestres de Colombia—Edición de campo. En: Navarro JF, Muñoz J. (eds.) Editorial Multipresos. Medellín, Colombia 2000; 354 pp.

- O'Brien SJ. Source A Role for Molecular Genetics in Biological Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; **91** (13): 5748-5755.
- Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Johnson WE. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 2002; **11**: 2171–2182.
- Piggott MP, Taylor AC. Extensive evaluation of faecal preservation and extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology* 2003; **51**: 341-355.
- Pocock RI. The Races of the Ocelot and the Margay. *Papers of Mammalogy Zoological Series Field Museum of Natural History* 1941; **155**: 945-959.
- Redford KH, Eisenberg JF. The Mammals of the Neotropics: the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. En: Redford KH, Eisenberg JF. (eds.). University Chicago Press. Chicago. EE.UU. 1992; 692 pp.
- Regnaut S, Lucas FS, Fumagalli L. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conservation Genetics* 2006; **7** (3): 449-453.
- Restrepo (2010). Estandarización y Optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación del gen 16S, a partir de heces de *Leopardus pardalis*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Riveros A, Sofrony C, Taylor D, Jiménez G, Cepeda I, Martínez N, Giontescu N, Riaño N, Isaacs P, Jiménez S. Programa Nacional para la Conservación de Felinos. Fundación Vida Silvestre Neotropical (FVSN). Bogotá, D.C., Colombia 2005; 81 pp
- Ruell EW, Crooks KR. Evaluation of Noninvasive Genetic Sampling Methods for Felid and Canid Populations. *The Journal of Wildlife Management* 2007; **71**(5): 1690-1694
- Spiering PA, Szykman M, Wildt DE, Somers MJ, Maldonado JE. Sampling error in non-invasive genetic analyses of an endangered social carnivore. *Conservation Genetics* 2009; **10**: 2005-2007.
- Stenglein L, De Barba M, Ausband DE, Waits LP. Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. *Molecular Ecology Resources* 2010; **10**: 109-114.
- Sunquist ME, Sunquist, F. Ecological constraints on predation by large felids. *Carnivore behavior: Ecology and Evolution* 1994; **23**: 283-301.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 1996; **24** (16): 3189-3194.

Taberlet P, Luikart G Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Molecular Ecology* 1999; **7**: 1419–1422.

Taberlet P, Waits LP, Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Tree* 1999; **14** (8): 323-327.

The IUCN Red list of Threatened Species 2009. <http://www.iucnredlist.org/>. Consultado el 4 de septiembre de 2010.

Trolle M, Kery M. Estimation of ocelot density in the pantanal using capture–recapture analysis of camera-trapping data. *Journal of Mammalogy* 2003; **84** (2): 607-614.

Valière N, Bonenfant C, Toigo C, Luikart G, Gaillard M, Klein F. Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics* 2007; **8**:69-78.

Waits LP, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 2005; **69**:1419-1433.

Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd G, Fain SR. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular ecology* 1997; **6**: 1091-1097.

Weaver JL, Wood P, Paetkau D, and Laack L. Use of scented hair snares to detect Ocelots. *Wildlife Society Bulletin* 2005; **33** (4):1-8.

Weigel I. Das Fellmuster der wildlebender Katzenarten und der Hauskatze in vergleichender und stammesgeschichtlicher Hinsicht. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 1961; **9**: 1-120.

Wong G, Lockwood M, De Lacy TM. Mamíferos del Parque Nacional Corcovado, Costa Rica. En: Wong G, Lockwood M, De Lacy TM. (eds.). INBIO and SINAC. San José, Costa Rica. 1999; 112.-157.

Wulfsch C. Noninvasive tracking of jaguars (*Panthera onca*) and co-occurring feline species in Belize by combining molecular scatology, remote camera trapping and GIS: the impact of fragmentation. (eds.). Submitted to: Programme for Belize. Department of Fisheries and Wildlife Sciences. Virginia, United States of North America. 2008; 1-14.

Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA HECES CON QIAamp DNA Stool Mini Kit.

MATERIALES Y EQUIPOS

Bolsas ziploc
Cajas de petri
Navajas
Tubos de microcentrífuga (1.5 y 2 mL)
Cámara de extracción
Centrífuga
Vortex
Baño María

REACTIVOS

Buffer ASL
Pastilla de InhibitEX
Proteinasa K (2 mg/mL)
Buffer AL
Etanol de grado molecular al 100%
Buffer AW1
Buffer AW2
Buffer AE

PROCEDIMIENTO

1. Dentro de la cámara de extracción (previamente esterilizada bajo luz UV) saque 220 mg de raspadura de materia fecal e introdúzcala en un tubo de 2 mL.
Si la muestra es conservada en Buffer, debe mantenerla congelada hasta el momento de agregar el Buffer ASL.
Antes de agregar el Buffer ASL éste se debe precalentar por 5 minutos a 70°C.
2. Agregue a cada tubo 1.6 mL de Buffer ASL, y realice un vortex por 1 minuto y 30 segundos para homogeneizar las muestras.
3. Centrifugue a 14000 rpm. Tenga en cuenta que dependiendo del método de conservación utilizado, se debe variar el tiempo. Para muestras conservadas en Buffer se recomienda centrifugar por 10 minutos, mientras que para secado se recomienda hacerlo por 15 minutos y finalmente para etanol-silica es prudente centrifugarlo durante 20 minutos.
4. Luego transfiera 1.4 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL.
Si no alcanza a obtener este volumen centrifúguelo por 5 minutos más.
Para el siguiente paso se deben cambiar los guantes para asegurar la esterilidad de la pastilla.
5. Agregue la pastilla de InhibitEX a cada muestra. Inmediatamente después realice un vortex por 1 minuto y 30 segundos e incúbelo por 1 min a temperatura ambiente.

La incubación es esencial en este proceso, ya que es cuando la pastilla at los inhibidores.

6. Centrifugue las muestras por a 10 minutos a 15000 rpm, para que el pellet este bien compacto.
7. Inmediatamente después que la centrifuga se detenga, transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL y descarte el pellet. Y vuelva a centrifugar por 3 minutos a máxima velocidad.
8. Pipetee 25 μ L de proteinasa K en un tubo de 2 mL.
9. Pipetee 600 μ L del sobrenadante obtenido en el paso 7 y transfíeralo al tubo de 2 mL que contiene la proteinasa K.
10. Agregue 600 μ L de Buffer AL y haga un vortex por 15 segundos. Nunca debe agregar el Buffer AL sobre la Proteinasa K.
11. Incube la mezcla durante 10 minutos a 70°C.
12. Al sacar del baño maría, agregue 600 μ L de etanol de grado molecular al 100% y haga un vortex por 15 segundos.
13. Transfiera 600 μ L de la mezcla que obtuvo el paso anterior a un tubo de dos columnas, y centrifúguelo a máxima velocidad por 1 minuto.
14. Transfiera la columna con la membrana a un tubo de 2 mL proveído por el Kit y agregue otra alícuota de 600 μ L. Centrifúguelo a máxima velocidad por 1 minuto.
15. Repita el paso anterior con los últimos 600 μ L.
16. Transfiera la columna con la membrana nuevamente a un tubo 2 mL proveído por el Kit y agregue 500 μ L de Buffer AW1 y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto. Transfiera nuevamente la columna con la membrana a un nuevo tubo.
17. Agregue 500 μ L de Buffer AW2 y centrifugue a máxima velocidad por 3 minutos
18. Transfiera la columna con la membrana a un tubo de 1.5 mL y agregue 200 μ L del Buffer AE directamente sobre la membrana. Deje incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto y medio.

Anexo 2. METODOLOGIA PARA EL MUESTREO DE HECES PARA ANÁLISIS MOLECULARES DE *Leopardus pardalis*.

EQUIPOS Y MATERIALES.

GPS.

Higrotermometro.

Guantes de látex

Bolsas de papel de 30cm x 15cm.

Cámara fotográfica.

Horno con temperatura indicador de temperatura.

Marcador.

Nevera de Icopor.

Silica gel con indicador de Humedad.

PROCEDIMIENTO.

1. Asegurarse que la época en la que se vaya a realizar el muestreo se ha una época seca, o en su defecto con baja precipitación.
2. Realice una investigación preliminar que le permita conocer los mamíferos de tamaño mediano que se encuentran en la región con los que posiblemente puede confundir las heces de *Leopardus pardalis*.
3. Identificar los sitios con presencia *Leopardus pardalis*, mediante el uso de rastros como huellas, cámaras trampa o reportes de avistamientos y ataques por los habitantes de la región.
4. Mediante el uso de perros previamente entrenados (Wultsch 2008) para la búsqueda de heces de *Leopardus pardalis*, realizar una búsqueda mediante el seguimiento de rastros en sitios cubiertos, poco visibles y pocos transitados. Prestando mucha atención a los roscaderos que se encuentran a lo largo de la búsqueda. Al llegar a un rascadero buscar cerca de este, ya sea enterradas o sobre la vegetación, muestras fecales.
5. Al momento de encontrarse una muestra fecal identifique los criterios morfológicos más relevantes y compárelos con los descritos por Chame (2003):
 - Heces en forma cilíndrica con forma de salchicha.
 - Presencia de sub-divisiones.
 - Ahusadas en uno de sus extremos terminales.
 - Forma compacta.
 - Diámetro del excremento entre 1.3cm y 1.6cm.
 - Largo del excremento de 12.7cm aprox. y ancho del excremento 1.6cm aprox.



Si la muestra encontrada esta en mal estado y no permite identificar todas estas características, procure asegurarse que la muestra tiene un diámetro mayor a 1.3cm; si tiene dudas o no puede corroborar esta medida NO descarte la muestra.

6. Procure asegurarse que la muestra está compacta y NO proviene de un animal enfermo. De igual forma evite coleccionar muestras depositadas en cuerpos de agua, o que la presencia de hongos cubren toda la muestra.
7. Tome registro de:
 - Colector, Fecha, Coordenadas, Humedad y Temperatura.
 - Antigüedad: Basándose en la apariencia de las muestras fecales, estas se clasificaran según el tiempo de deposición: muy reciente (menos de un día), reciente (más de un día, pero aun con materia orgánica en descomposición) y vieja (secos y sin materia en descomposición).
8. Usando los guantes de látex tome la muestra y deposítela en la bolsa de papel, procurando tomar la menor cantidad de vegetación o tierra asociada, teniendo cuidado de no aplastarla.
9. Procese las muestras en el menor tiempo posible en un horno a 40°C por 24 horas continuas o más hasta que la muestra este completamente seca, para que las células epiteliales se fijen a la superficie de la muestra. Si la humedad de la muestra es muy alta cambie la bolsa de papel constantemente.
10. Para transportar las muestras almacénelas en una nevera de icopor de tal forma que no se aplasten entre sí, con abundante silica gel.
11. Si por algún motivo, la muestra presente hongo deposítela en tres bolsas de papel, aislándola de las demás para evitar que contamine el resto. De igual forma, retire la sección de la muestra que presenta hongo, tratando de salvar la mayor cantidad de muestra.

12. Una vez en el laboratorio almacena las bolsas de papel en un recipiente plástico o en una nevera de icopor que contenga silica gel en el fondo hasta su procesamiento, controlar la humedad a las que esta la muestra.