

Genética de Poblaciones Molecular aplicada al estudio de dos grandes Carnívoros Neotropicales (*Tremarctos ornatus* - Oso Andino y *Panthera onca* - Jaguar): lecciones de conservación

Molecular Population Genetics applied to the study of two big Neotropical Carnivores (*Tremarctos ornatus* – Spectacled bear and *Panthera onca* – Jaguar): lessons for conservation

Manuel Ruiz-García¹, Pablo Orozco Terwengel¹, Esteban Payán¹, Armando Castellanos²

1.Unidad de Genética (Grupo de Genética de Poblaciones-Biología Evolutiva). Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Cra 7 A No 43-82. Bogotá DC., Colombia. 2.Fundación Espíritu del Bosque, Quito, Ecuador. E-mail: mruiz@javeriana.edu.co.

PALABRAS CLAVE: Genética de Poblaciones, marcadores moleculares, microsatélites, oso andino, jaguar, grandes carnívoros, conservación biológica.

KEY WORDS: Population Genetics, molecular markers, DNA microsatellites, spectacled bear, jaguar, big carnivores, biological conservation.

RESUMEN

En el presente trabajo aportamos pruebas contundentes de la importancia de la aplicación de los métodos generados por la teoría genético poblacional en conjunción con la utilización de procedimientos moleculares en la determinación de trazos básicos de la historia natural de dos grandes carnívoros neotropicales, el oso andino (*Tremarctos ornatus*), propio de ecosistemas andinos, y el jaguar (*Panthera onca*), el indiscutible super-predador de la selva húmeda americana. Se muestra mediante el uso de microsatélites de ADN nuclear como existen notables diferencias en la estructura genética, niveles de flujo génico, posibles contracciones o expansiones poblacionales, números efectivos y tiempos de divergencia entre las poblaciones, en ambas especies. La situación del oso andino parece más crítica que la del jaguar. Se aportan datos e ideas que pueden ser importantes en la conservación biológica de esos grandes carnívoros. Es indiscutible que ciertos parámetros de la historia natural de esas especies no se pueden reconstruir a partir de métodos ni ecológicos ni paleontológicos, y únicamente los análisis genético poblacionales con marcadores moleculares son capaces de efectuar esas reconstrucciones.

ABSTRACT

In the current work, we bring new and strong insights in favor of the importance of the application of the methods generated by the Population Genetics Theory altogether with the developed procedures by the molecular biology in the determination of basic traits of the natural history of two big Neotropical carnivores, the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*), from the Andean ecosystems, and the jaguar (*Panthera onca*), the amazing and undisputed greatest predator in the American raining forests. We put forward, by means of the use of DNA microsatellites, as there is noteworthy differences in the genetic structure, levels of gene flow, possible population contractions or expansions, effective numbers and divergence times among the populations, in both species. The situation of the spectacled bear seems to be more critical than that found for the jaguar. We bring new data and ideas which could be important from a biological conservation standpoint of these carnivores. It is indisputable that certain natural history parameters of these species could be not obtain with ecological nor paleontological procedures, and only the population genetics analyses with molecular markers are able to carry out these reconstructions.

1. INTRODUCCIÓN

En la mayor parte de las ocasiones es difícil saber cosas del pasado y de la historia natural de las especies silvestres. Podemos averiguar muchas cosas de las poblaciones humanas o de las poblaciones de plantas y animales domésticos porque tenemos registros históricos, censales e, incluso, pedigríes de muchas de ellas. Sin embargo, con las especies silvestres no tenemos ninguna información previa, y ellos no hablan ni poseen documentos que acrediten quiénes son sus padres, de qué poblaciones provienen o cual es la historia de sus antepasados. ¿Cómo poder descubrir algo de ellos que pueda ser útil para entender los procesos biológicos que los han modelado y, simultáneamente, poder conservarlos?. Sin embargo, toda esa importante información está registrada en los genes de cada individuo.

En la década de los años sesenta, con el advenimiento de algunas técnicas, como la electroforesis en geles de almidón, se pudo empezar a estudiar la variabilidad proteínica y, por ende, la genética; primero en algunas especies fáciles de muestrear como los humanos (HARRIS, 1966) y ciertas especies de insectos interesantes desde una perspectiva evolutiva (*Drosophila pseudoobscura*; LEWONTIN & HUBBY, 1966), y pocos años después en algunas especies silvestres relativamente simples de muestrear o, cuando menos, abundantes (*Mirounga angustirostris*, BONNELL & SELANDER, 1974). Sin embargo, muchas especies de animales silvestres son en extremo escasas y notablemente difíciles de muestrear, lo que implicó durante mucho tiempo la imposibilidad de poderlos estudiar desde una perspectiva genético poblacional y, como consecuencia, poder ofrecer una perspectiva evolutiva de sus respectivas historias naturales. A ello se le debe adicionar que los alozimas, isoenzimas, grupos sanguíneos, etc, se degradan rápida y fácilmente con lo que, si ciertos ejemplares habían sido muestreados en zonas remotas, se necesitaba que las muestras sanguíneas obtenidas se llevaran velozmente al laboratorio y se procesaran de inmediato, lo que, a su vez, se convertía en un obstáculo para poder seguir muestreando. Además, se debían capturar los animales para poderles extraer sangre o tejidos, lo que inevitablemente hacía la tarea supremamente inviable y traumática para los animales en caso de conseguirlo. Igualmente, la variabilidad proteínica es un débil reflejo de la variabilidad genética real. No obstante, a mediados de la década de los 80, la situación cambió drásticamente gracias al advenimiento de una nueva técnica, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (MULLIS & FALAAONA, 1987). Este método ha permitido poder amplificar pequeños segmentos de ADN de muestras de tejidos muy diversos, incluyendo pelos, excrementos, huesos, dientes, saliva, etc. Además, el ADN es mucho más estable que la mayor

parte de enzimas por lo que se puede recuperar, incluso, en restos muy antiguos. De este modo, especies muy esquivas o muy escasas, prácticamente imposible de muestrear directamente en la naturaleza, han podido ser objeto de estudios moleculares.

Dos especies de grandes carnívoros neotropicales, con los que prácticamente no se habían podido realizar estudios genético moleculares por las causas anteriormente referidas, han sido ahora estudiadas desde esta perspectiva por nuestro grupo de investigación. Este es el caso del oso andino (*Tremarctos ornatus*), el carnívoro que ocupa la cúspide en la cadena trófica de los ecosistemas andinos, y el jaguar (*Panthera onca*), el gran felino manchado que, también, ocupa la jerarquía del super-predador en los ecosistemas selváticos neotropicales. Es fácil comprender que cualquier red trófica que se vea modificada o destruida tendrá una repercusión en la vida de los grandes superpredadores. Por ejemplo, si se destruyen las bromeláceas, si se extinguen los conejos (*Silvilagus*), algunas especies de ciervos (*Mazama*) y otros pequeños carnívoros (*Nasuella*) en los altiplanos andinos, el alimento de los osos desaparece y, por lo tanto, ellos mismos estarán en peligro. Igual consideración se da con el jaguar. ¿Cuáles serán los recursos tróficos de los que podrán sobrevivir los jaguares, si los humanos extinguen o destruyen las poblaciones de pecaríes (*Tayassu*), de tapires (*Tapirus*), de grandes primates (*Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*), de caimanes o de grandes peces? Obviamente, cazaran el ganado doméstico introducido por el hombre en sus zonas originales y como consecuencia, a su vez, serán cazados por los humanos ante el imperativo de que esos grandes superpredadores esquilman sus intereses económicos en forma de ganado doméstico. Poder reconstruir la historia evolutiva de esos grandes depredadores mediante el estudio de sus genes con procedimientos moleculares y análisis matemáticos derivados de la rica teoría estructural de la genética de poblaciones debería ser una prioridad investigativa en aquellos países en desarrollo que todavía tienen la fortuna de poder conservar esos impresionantes organismos, ya que, de este modo, se podrá reconstruir la historia pasada de esos ecosistemas y poder conocer el futuro de los mismos.

El oso andino está clasificado por la IUCN en la categoría de vulnerable (A2bc) y como especie en peligro en el apéndice I de CITES, exactamente la misma situación en la que se encuentra el jaguar. Ambas especies sufren fuertemente la destrucción y fragmentación de sus respectivos hábitats, además de su caza directa. Por ejemplo, en Colombia anualmente se están matando del orden de unos 50 osos, al igual que se están destruyendo entre 300 y 500 km² de hábitat potencial de esta especie (OREJUELA & JORGENSEN, 1998). La caza de los felinos manchados ha sido todavía más cruenta. Algunos pocos datos son más que suficientes. En la Amazonía peruana únicamente entre 1968 y 1969 se mataron 2000 jaguares, mientras que Estados Unidos importó 13.516 pieles de esta especie en 1968 y 9.831 pieles en 1969, siendo Brasil el primer exportador en esta macabra

estadística. Los números para otros pequeños felinos manchados fueron todavía más escalofrantes: 84.500 pieles de tigrillos fueron exportadas desde Paraguay únicamente en 1983 (BROAD, 1988) y desde principios de los sesenta hasta mediados de los setenta se estuvieron cazando anualmente unos 200.000 ocelotes en la Amazonía, únicamente por sus pieles (GIETELLING, 1972).

Así pues, ambos depredadores pueden considerarse especies claves y paraguas en sus respectivos ecosistemas. Multitud de razones relacionadas con la conservación de las fuentes potenciales de recursos hídricos, de los beneficios del mantenimiento de la biodiversidad en las áreas donde esos dos depredadores habitan, además de razones morales, culturales y espirituales de los pueblos indígenas y de los demás pueblos residentes en países neotropicales pueden ser abogadas en defensa de la conservación del oso andino y del jaguar (PEYTON *et al.*, 1998).

A principios de la década de los 90, varios investigadores (TAUTZ, 1989; SCHLOTTERER *et al.*, 1991) pusieron de manifiesto las bondades de ciertos marcadores moleculares que podían estudiarse mediante la técnica del PCR. Estos marcadores fueron denominados microsátélites o STRP (Short Tandem Repeat Polymorphisms). Este tipo de marcador muestra cortos elementos repetitivos que contienen tándems de repetición de 1 a 6 pares de bases. Estos marcadores se caracterizan por ser sumamente abundantes en el genoma de los eucariotas, al igual que por estar distribuidos de forma aleatoria y ser sumamente polimórficos. En general, sus niveles de heterocigosis son muy elevados al compararlos con los típicos marcadores proteicos, isoenzimáticos o grupos sanguíneos que, tradicionalmente, se han utilizado en genética de poblaciones desde los años 60 (MENOTTI-RAYMOND & O'BRIEN, 1995). Debido a esa alta diversidad genética, y al elevado número de alelos que presentan, se han convertido rápidamente en marcadores sumamente útiles para la configuración de mapas genéticos de recombinación en multitud de diferentes especies. Igualmente, han servido como marcadores típicamente poblacionales y forenses. Por ejemplo, se han utilizado para analizar la estructura social de la ballena yubarta (*Megaptera novaeangliae*) (AMOS *et al.*, 1993), han sido utilizados para diagnóstico de paternidades en diversas especies de animales como, por ejemplo, en chimpances (*Pan troglodytes*) (MORIN *et al.*, 1993), o para determinar qué machos son los más importantes desde el punto de vista reproductivo durante el cortejo en *Drosophila pseudoobscura* (NOOR, 1995). Igualmente, estos marcadores se han utilizado para clasificar individuos, según el grado de parentesco dentro de poblaciones, y así proceder a su reproducción controlada, como en el caso del Oryx de Arabia (*Oryx leucoryx*) (GRETH *et al.*, 1991), para determinar la existencia de cuellos de botella poblacionales, como en el caso del lobo etíope (*Canis simensis*) (GOTTELLI *et al.*, 1994), o para determinar cuál ha sido el grado de pérdida de variabilidad genética durante el último siglo, al comparar el ADN recuperado en pieles de museos del siglo pasado, respecto a especímenes actuales, como en el caso del marsupial Wombat de nariz peluda (*Lasiorninus krefftii*) (TAYLOR *et al.*, 1994). Pero, también, estos marcadores han sido

utilizados con finalidades de tipo sistemático. Por ejemplo, la determinación de la existencia de un linaje puro de lobo gris mexicano (*Canis lupus bayileyi*) (GARCIA-MORENO *et al.*, 1996) y el posible estatus de nuevas especies de chimpancés a partir de las subespecies morfológica y culturalmente reconocidas (MORIN *et al.*, 1994).

No obstante, en muchas ocasiones los estudios propiamente genético poblacionales son complejos, de ardua formulación matemática, publicados en revistas en extremo especializadas y los autores están más interesados en conocer la dinámica evolutiva de los marcadores moleculares empleados que la propia historia natural de los organismos que los contienen. Previamente, hemos forjado artículos donde de una forma compleja y extremadamente técnica hemos dado a conocer los resultados moleculares genético poblacionales que hemos encontrado con ambos super-predadores neotropicales (RUIZ-GARCÍA, 2001, 2002; RUIZ-GARCÍA & PAYÁN, 2002; RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2002 a, b). Sin embargo, hemos encontrado conveniente mostrar de una forma más simple y comparativa los resultados más significativos de esos estudios ya que, de este modo, su impacto conservacionista, y para los lectores interesados más en la historia natural de las especies que en los detalles moleculares o de los modelos matemáticos, será mayor.

Bajo este contexto, vamos a discutir cómo el análisis de una serie de puntos cardinales en el campo de la genética de poblaciones es trascendente en la reconstrucción del pasado de esas dos especies de carnívoros, al igual que para obtener ideas para una proyección de conservación futura. Los puntos analizados son: 1- Determinar los niveles de diversidad genética molecular que poseen esas especies; 2- Detectar posibles desviaciones respecto al equilibrio Hardy-Weinberg; 3- Poder calcular el grado de heterogeneidad genética entre las diversas poblaciones de las dos especies estudiadas; 4- Realizar cálculos indirectos de la cantidad de flujo génico que se ha dado históricamente entre las poblaciones de cada especie; 5- Puesta a punto de análisis de asignamiento. Este análisis revela la capacidad que tienen los marcadores moleculares empleados en asignar correctamente cada ejemplar estudiado a su población original. 6- Determinar la probabilidad de qué dos individuos diferentes posean los mismos genotipos para el perfil multiloci analizado; 7- Detectar animales híbridos que provengan de la mezcla de acervos genéticos diferentes; 8- Revelar la existencia de posibles cuellos de botellas que hayan afectado recientemente la historia de las especies estudiadas; 9- Detectar, por el contrario, si las mismas proceden de una expansión poblacional. 10- Estimar los números efectivos de cada una de esas especies utilizando la teoría genética de la coalescencia, lo que permite conocer cuáles han sido los tamaños reproductivos a lo largo de la existencia de una especie dada; 11- Determinar cuáles son los tiempos de divergencia entre las poblaciones estudiadas en ambas especies.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras analizadas de las dos especies en cuestión fueron las que siguen: 1- En el caso del oso andino se obtuvieron un total de 155 muestras de ADN del mismo número de osos. Concretamente, se obtuvieron 50 muestras de osos colombianos procedentes de 17 puntos geográficos de este país incluyendo las tres cordilleras andinas, 78 muestras ecuatorianas de 6 áreas geográficas diferentes que cruzan de norte a sur y de oeste a este las dos cordilleras andinas de ese país, 12 muestras venezolanas de la cordillera de Mérida, 5 muestras peruanas procedentes de dos áreas del norte de Perú y 10 muestras bolivianas procedentes también de dos zonas diferentes. 2- En el caso de los jaguares, se analizaron 65 muestras, 49 de ellas procedentes de ejemplares colombianos con origen en los departamentos del Meta, Caguán, Vaupés, Guaviare, Guainía, Leticia, Norte de Santander, costa Atlántica, Darién, Antioquia y Chocó, más 16 muestras procedentes de Guatemala (Petén), Paraguay (río Paraná), Perú (región Amazónica de Loreto), Bolivia y Brasil (áreas cercanas a Manaus). Todas las muestras de ADN se obtuvieron haciendo uso de tres métodos bioquímicos diferentes: extracción orgánica con fenol-cloroformo (sangre, tejidos musculares, trocitos de pieles, dientes y huesos), DTAB-CTAB (sangre) y con la resina Chelex al 10 % (manchas de sangre y pelos con raíces).

Los marcadores microsátélites empleados, en el caso del oso andino, fueron G1A, G1D, G10B, G10C, G10L, G10M, G10P, G10X y UAR59. Los ocho primeros microsátélites fueron diseñados por PAETKAU & STROBECK (1994) y PAETKAU *et al.*, (1995), mientras que el último fue diseñado por TABERLET *et al.*, (1997). Los microsátélites aplicados a los jaguares fueron 18, siendo éstos Fca 01, Fca 08, Fca 24, Fca 43, Fca 45, Fca 70, Fca94, Fca 96, Fca 126, Fca 136, Fca 176, Fca 200, Fca 225, Fca 251, Fca 290, Fca 294, Fca 391 y Fca 506, todos ellos diseñados por MENOTTI-RAYMOND & O' BRIEN (1995) y MENOTTI-RAYMOND *et al.*, (1999).

El volumen de las reacciones de PCR fue de 25 µl cuando el ADN molde fue extraído de sangre, tejidos, dientes o huesos, mientras que fue de 50 µl cuando el ADN fue extraído de manchas de sangre o de pelos. Las condiciones de las reacciones de PCR y las temperaturas y número de ciclos llevados a cabo mediante un termociclador Geneamp PCR System 9600 de Perkin Elmer pueden verse en RUIZ-GARCÍA (2001), RUIZ-GARCÍA & PAYAN (2002) y RUIZ-GARCÍA *et al.*, (2002 a,b,c). Los productos que mostraron signos positivos de amplificación fueron corridos en geles denaturantes de poli-acrilamida al 6 % en una cámara vertical de secuenciación Hoefer SQ3. Los geles fueron fijados con ácido acético al 10 %, teñidos con AgNO₃ y revelados con Carbonato de Sodio. El tamaño de los alelos detectados, en pares de bases, se obtuvo por comparación con diversos marcadores de peso ϕ 174, digeridos con los enzimas de restricción Hind III y Hinf I.

2.1 METODOS GENÉTICOS POBLACIONALES APLICADOS

Una vez se han obtenido los genotipos de todos los ejemplares estudiados y las correspondientes frecuencias alélicas, lo primero que se calcula es la diversidad genética (= heterocigosis esperada). Este estadístico es muy informativo ya que nos indica la riqueza genética que posee una población, o una especie, dada independientemente de cual sea el sistema de reproducción o de la acción de la selección natural sobre las frecuencias de genotipos y, paralelamente, puede revelar si durante la historia de la población ha existido algún evento que le haya hecho perder variabilidad genética (RUIZ-GARCÍA, 1991).

El segundo análisis llevado a cabo fue determinar si las poblaciones de osos y jaguares están en equilibrio Hardy-Weinberg. Para ello se utilizaron diversas estrategias analíticas, como fueron el test de Fisher, y los métodos con cadenas de Markov. Determinar si existe, o no, este equilibrio es un primer paso importante para detectar posibles fuerzas evolutivas actuando, o que actuaron, en las poblaciones de las especies estudiadas modificando sus frecuencias genotípicas. Esta es una primera aproximación para la detección de posible endogamia en las poblaciones, subdivisión en las mismas, flujo genético entre acervos diferentes o la acción de la selección natural actuando sobre algún gen en particular.

El tercer análisis empleado determina cuál es el grado de heterogeneidad genética existente entre diversas poblaciones, lo cual es trascendente para conocer si las poblaciones están desconectadas genéticamente unas de otras, o si todas ellas deben ser contempladas como una única y extensa población. El definir posibles Unidades de Manejo independientes (MORITZ, 1994) depende precisamente del grado de diferenciación genética que exista entre esas poblaciones. Para determinar el grado de heterogeneidad empleamos los estadísticos F de WRIGHT calculados con diferentes metodologías como son las de WEIR & COCKERHAM (1984) y la de MICHALAKIS & EXCOFFIER (1996). Igualmente, se empleó el estadístico R_{ST} de SLATKIN (1995) con la metodología de GOODMAN (1997), específicamente creada para medir la heterogeneidad genética con microsatélites, y el método más tradicional para estudiar la diversidad genética en una estructura jerarquizada como es el procedimiento de NEI (1973). La significación de esos estadísticos fue medida mediante procedimientos no paramétricos como el “jackknifing” y el “bootstrap” utilizando 10.000 permutaciones aleatorias.

A partir del análisis anterior, y utilizando también otras metodologías diferentes, se determinaron niveles teóricos de flujo génico entre las poblaciones de osos y jaguares, respectivamente. Destacan las estimas realizadas a partir de los estadísticos de heterogeneidad genética (F_{ST} y R_{ST}), del método de los alelos privados (SLATKIN, 1985) y de un método de máxima verosimilitud

(SLATKIN & BARTON, 1989). Este análisis claramente nos revela si las poblaciones están reproductiva y genéticamente aisladas unas de otras, o no.

El quinto procedimiento empleado se conoce como análisis de asignamiento. Este tipo de análisis es muy instructivo con fines conservacionistas ya que cada individuo analizado es asignado a un acervo genético determinado que puede coincidir, o no, con la población a la que pertenece. El investigador puede determinar “a priori” si clasifica cada individuo en una población determinada en función de su origen geográfico o no. Por ejemplo, individuos que estén en cautiverio, y de los que no se conozca su procedencia geográfica, pueden ser asignados a acervos genéticos determinados en la naturaleza y así poder determinar si es conveniente reproducirlos con tal o cual otro ejemplar, sin necesidad de estar creando híbridos que difícilmente podrían generarse de modo natural. Existen diversas aproximaciones metodológicas para este tipo de análisis. Unas utilizan métodos de máxima verosimilitud con procedimientos frecuenciales (PAETKAU *et al.*, 1995) o de estadística bayesiana (RANNALA & MOUNTAIN, 1997; PRITCHARD *et al.*, 2000), mientras que otras utilizan distancias genéticas (CORNUET *et al.*, 1999). Todas ellas han sido aplicadas en nuestro caso.

Relacionado conceptualmente con algunos de los procedimientos anteriores está el análisis de coincidencia multigenotípica. Este análisis determina la probabilidad que dos individuos en una población dada puedan tener exactamente el mismo perfil multigenotípico para los marcadores empleados. La utilidad de este análisis es evidente. Podemos determinar si muestras de ADN analizadas procedentes de diferentes zonas geográficas, o de diferentes momentos de muestreo, pertenecen, o no, a un mismo individuo. Por ejemplo, imaginemos que un oso andino rehabilitado ha sido devuelto a la libertad. Antes de la liberación se procede a caracterizar su multigenotipo. Tres años después, se obtienen muestras de pelo, o excrementos, de un oso en la región geográfica donde el animal había sido liberado. Si el multigenotipo coincide podemos establecer una probabilidad determinada de que ese ejemplar sea el mismo que se liberó tres años atrás. Diversos procedimientos matemáticos pueden ser aplicados en el desempeño de esta tarea, entre ellos el de los momentos factoriales de KENDALL & STUART (1977), que fue el empleado en nuestro estudio.

Mediante los métodos bayesianos creados por RANNALA & MOUNTAIN (1997) y PRITCHARD *et al.*, (2000) se puede determinar el grado de mezcla genética de individuos que no quedan claramente asignados a un único acervo genético porque portan simultáneamente características de varios de ellos. Incluso, se puede determinar hace cuantas generaciones se dio la mezcla que originó ese individuo híbrido.

Otro análisis empleado, y de importancia tanto evolutiva como conservacionista, es aquel que permite la determinación de posibles cuellos de botella en generaciones recientes. De este modo,

podemos saber si nos estamos enfrentando con una especie que ha perdido variabilidad genética y que necesita de ciertas prácticas conservacionistas especiales o, por el contrario, estamos frente a una especie que ha mantenido elevados niveles de diversidad genética a lo largo de toda su historia. Tres metodologías diferentes fueron empleadas en la posible detección de cuellos de botella. La primera de ellas deriva de la teoría genético poblacional propuesta por CORNUET & LUKART (1996) y se basa en las diferencias observadas entre la heterocigosis esperada obtenida a partir de las frecuencias alélicas respecto a la heterocigosis esperada a partir del número de alelos presente en los genes analizados. Cuando un cuello de botella se da, el número de alelos desciende más rápidamente que la heterocigosis esperada, por lo que la heterocigosis calculada a partir de los primeros será menor que la calculada directamente de las frecuencias alélicas. Si analizamos un conjunto de marcadores en una población que haya pasado por un cuello de botella encontraremos que la mayor parte de éstos presentan menor heterocigosis a partir del número de alelos encontrados que la hallada a partir de las frecuencias alélicas. Con diversas estrategias estadísticas se puede medir si esas diferencias son significativas (test del signo, test de las diferencias estandarizadas, test del signo rango de Wilcoxon y un descriptor gráfico de la forma de la distribución de las frecuencias alélicas). La segunda metodología se basa en el trabajo de GARZA & WILLIAMSON (2001), el cual afirma que el cociente entre el número total de alelos en un marcador microsatélite respecto a la distancia entre el alelo de menor y mayor tamaño será menor que en las poblaciones en equilibrio. Diferentes tipos de simulaciones permiten establecer si este cociente es menor, o no, al esperado en poblaciones en equilibrio. Finalmente, se aplicó el modelo de BEAUMONT (1999), el cual considera un modelo demográfico donde una población varía de tamaño lineal o exponencialmente. Aplicando la teoría de la coalescencia que permite determinar la historia genealógica de los alelos en un marcador en una población dada, se determina la distribución de la probabilidad posterior de esta genealogía y una serie de parámetros demográficos mediante simulaciones cadenas de Markov Monte Carlo. Probablemente este método es el más poderoso para detectar tendencias decrecientes en el pasado de las poblaciones.

Alternativamente, se intentó determinar si las dos especies de carnívoros proceden, por el contrario, de una expansión poblacional detectable a partir de la forma de las distribuciones de las frecuencias alélicas o de las diferencias de la varianzas de las varianzas individuales en el tamaño de los alelos de cada uno de los marcadores estudiados. Utilizamos dos tests diferentes para medir esas posibles expansiones poblacionales, el test k de la kurtosis dentro del locus y el test g interlocus (REICH & GOLDSTEIN, 1998; REICH *et al.*, 1999). Es interesante poder determinar si las especies analizadas representan a un grupo que se ha estado extendiendo y colonizando nuevos terrenos durante los últimos miles de años, o generaciones, ya que esto nos indica que esos grupos

eran los que estaban evolutivamente expandiéndose antes de la irrupción de nuestra especie sobre la faz del planeta.

Una extremadamente útil propiedad de algunos análisis genético poblacionales es que permiten hacer estimaciones del número efectivo promedio de individuos que han caracterizado la historia natural de una especie, o población, ya que existe una relación matemática conspicua entre la variabilidad genética y el tamaño de las poblaciones, aun cuando esta relación no es simple (KIMURA, 1986). Estos tamaños efectivos no son necesariamente el número de individuos de esa especie que están viviendo en la actualidad, si no más bien el tamaño promedio armónico de individuos que han logrado reproducirse efectivamente a lo largo de todas las generaciones que han caracterizado a esa especie hasta el momento presente, lo cual nos indica si la misma se ha caracterizado por grandes o pequeñas poblaciones desde su mismo origen. Se empleó un método de máxima verosimilitud para estimar el parámetro $\theta (= 4N_e\mu)$ del cual se puede despejar el número efectivo. Para escoger el valor de θ más probable se utiliza un procedimiento general Monte Carlo a partir de GRIFFITHS & TAVARÉ (1994) con la técnica de CORNUET & LUIKART (1996) aplicando un modelo mutacional “step-wise”.

Finalmente, se calculó el tiempo de divergencia entre las poblaciones de oso andino de Venezuela, Colombia y Ecuador y entre las poblaciones de jaguares de los Llanos Orientales y Amazonía respecto a las de la costa Atlántica y Chocó. Es determinantemente importante poder conocer si la fragmentación entre las poblaciones de esos carnívoros es un fenómeno reciente y causado por la acción humana o es algo característico de la historia natural de esas especies.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Número de alelos y niveles de diversidad genética en poblaciones de osos y jaguares. En el caso del oso andino, dos de los nueve marcadores empleados fueron monomórficos, con lo que el polimorfismo de los microsatélites estudiados asciende al 77.77 %, mientras que en el caso de los jaguares el 100 % de los marcadores fueron polimórficos. Los marcadores que presentaron mayor número de alelos en el caso de los osos fueron G10M y G10P con 9 alelos, mientras que en el caso de los jaguares los microsatélites que presentaron mayor número de alelos fueron Fca 96 (15 alelos), Fca 08 (15 alelos) y Fca 391 (13 alelos). El número promedio de alelos en los osos fue de 5.67 ± 3.00 , mientras que en los jaguares este valor fue superior (8.00 ± 1.67). Igualmente, el nivel de diversidad genética en los jaguares fue notablemente superior al de los osos ($H = 0.84 \pm 0.10$ versus $H = 0.40 \pm 0.28$).

Así pues, resulta evidente que los jaguares poseen mucha más riqueza genética que el oso andino para el mismo tipo de marcadores. Esto puede parecer paradójico ya que si únicamente tenemos en

cuenta la historia reciente de la interacción humana con ambas especies parece claro que el jaguar ha sido mucho más castigado que el oso andino. Unos pocos datos son suficientes. Aunque la presión humana sobre el oso andino es importante, y eso se puede concluir de datos tales como que el 20 % de los 73.000 km² potenciales de áreas andinas donde podría vivir esta especie están siendo destruidas intensivamente por la minería, campos de coca, agricultura y ganadería, etc o que, únicamente, en Colombia, unos 50 osos son matados anualmente, 10 de ellos simplemente por afición “deportiva” (OREJUELA & JORGENSON, 1998), la destrucción del hábitat y la caza directa de los jaguares ha sido mayor. Durante más de 10 años se estuvieron cazando entre 1000 y 2000 jaguares anualmente solo en la región de Loreto en la Amazonía peruana. Brasil estuvo exportando entre 1960 y 1970 cerca de 8.000 pieles de jaguares anuales tan solo a Estados Unidos. Sin embargo, la diversidad genética en el jaguar duplica la encontrada en el oso andino. Esto significa que los niveles de variabilidad genética que detectamos actualmente en ambos carnívoros no son el resultado de procesos recientes que hayan afectado a las mismas por acción antropogénica en los últimos siglos, sino que son el resultado de la estructura genética ancestral característica de cada una de estas especies.

Alelos típicos de cada una de las poblaciones de osos y jaguares estudiadas. Para ambas especies encontramos alelos privados en algunas de sus poblaciones (Tabla I). En el caso del oso andino, algunos pocos ejemplos son suficientes: En el marcador G1D se encontró un alelo de 182 pb (pares de bases) exclusivo de un oso de origen colombiano, mientras que se encontró un alelo de 186 pb exclusivo entre animales de origen ecuatoriano. Para G10C, se encontraron alelos de entre 109 y 115 pb entre los osos de Colombia y Venezuela, que no fueron encontrados en ningún caso entre los animales de Ecuador, Peru y Bolivia. Por el contrario, en Bolivia se detectó un alelo de 101 pb no hallado en ninguna otra población. G10X presentó alelos de 123 pb y 137 pb no registrados entre los animales de origen colombiano y venezolano estudiados, mientras que alelos típicos de 129 y 133 pb de los animales de Colombia y Venezuela no se encuentran en ninguno de los animales estudiados en Ecuador. Igualmente en el caso del jaguar, entre los 16 animales de origen no colombiano se encontraron algunos alelos que no fueron detectados en los ejemplares muestreados en Colombia. Un ejemplar de jaguar guatemalteco presentó un alelo de 183 pb para Fca 96 que no se encontró en ningún animal colombiano. También este animal procedente de Guatemala presentó un alelo de 159 pb no detectado entre los animales colombianos para Fca 45. Para Fca 08, se encontró un alelo de 123 pb en el animal guatemalteco y dos alelos de 124 y 134 pb en animales procedentes del área central de la Amazonia brasileña. Un alelo de 201 pb en el marcador Fca 391 fue encontrado únicamente en un espécimen boliviano.

Así pues, la enorme variabilidad alélica encontrada en los marcadores microsatélites es una herramienta fundamental para caracterizar ejemplares de diferentes orígenes y poder determinar la procedencia de muchos ejemplares en cautiverio sin asignación geográfica conocida y, por lo tanto, poder aconsejar cruzamientos en cautiverio entre animales que representan los mismos acervos genéticos, o diferentes, dependiendo de los intereses conservacionistas que en cada caso sean más trascendentes.

No existencia de equilibrio Hardy-Weinberg. En ambas especies se observa de forma general la inexistencia de equilibrio Hardy-Weinberg por exceso de homocigotos. Únicamente, G10C y G10P estuvieron en equilibrio para la población total de osos, mientras que solo Fca 391 estuvo en equilibrio en el caso de los jaguares. Cuando este análisis se llevó a cabo por países, se observó en el caso del oso andino que la única muestra claramente en desequilibrio fue la de Ecuador. Los microsatélites que más contribuyeron en este desequilibrio fueron G10M y G10X. Sin embargo, globalmente la población colombiana no difirió globalmente del citado equilibrio. Esto contrasta con lo hallado en los jaguares colombianos. Tanto a nivel global colombiano, como internamente en la población de jaguares de la supuesta subespecie de los Llanos Orientales y Amazonia y en la población, de la otra supuesta subespecie, del norte de Colombia y área Pacífica se encuentran evidentes síntomas de falta de equilibrio Hardy-Weinberg.

Como consecuencia de esos resultados se puede afirmar que, globalmente, ni las poblaciones de osos andinos ni las de jaguares están en una situación de equilibrio, pero que a nivel estrictamente del territorio colombiano, este desequilibrio parece más conspicuo en el caso de los jaguares que en el de los osos. Probablemente, aunque ambas especies están en desequilibrio, los agentes evolutivos causantes de ese hecho tienen una naturaleza diferente.

Heterogeneidad genética. La cantidad y magnitud de la heterogeneidad genética entre las diferentes poblaciones de osos y jaguares estudiadas es extremadamente diferente en ambas especies. El análisis de diversidad génica de NEI(1973) (Tabla II), más los restantes análisis con los estadísticos F de WRIGHT y R_{ST} de SLATKIN (1995), pusieron de manifiesto una considerable cantidad de heterogeneidad genética entre las poblaciones de osos. Estos valores oscilaron entre 0.127 y 0.162 para G_{ST} , 0.179 ± 0.047 (para F_{ST} con “jackknifing”) y 0.194 y 0.262 con la R_{ST} utilizando los procedimientos de ROUSSET (1997) y GOODMAN (1997), siendo todos ellos significativos. Esos valores fueron en todos los casos significativos. Por el contrario, el grado de heterogeneidad encontrado entre las poblaciones de jaguares resultó conspicuamente menor. Los

valores de esos estadísticos oscilaron, en la mayor parte de los casos, entre 0.01 y 0.02 y no fueron significativos.

Eso significa que existen fuertes evidencias para tratar las diversas poblaciones de osos andinos como unidades de manejo separadas, ya que se han acumulado importantes diferencias genéticas entre ellas. Es muy conveniente determinar en países, como Colombia y Ecuador, las características genéticas de sus poblaciones de osos en cautiverio ya que, en el caso de reproducir individuos, podrían estar mezclándose ejemplares de acervos genéticos diferentes. Por el contrario, las poblaciones de jaguares, aun cuando cierta subdivisión puede existir entre ellas, parecen constituir una unidad evolutiva mucho más homogénea y, al menos en Colombia, todos los animales en cautiverio podrían cruzarse sin el problema de estar mezclando animales de acervos genéticos altamente diferenciados.

Estimaciones de flujo génico. En concordancia con el análisis anterior, las estimas teóricas de flujo génico (Nm) obtenidas con diversos procedimientos ponen de relevancia la existencia de cantidades más elevadas para los jaguares que para los osos andinos. En el primer caso, mediante los modelos isla infinito y n -dimensionales con el estadístico F_{ST} se obtuvieron valores de Nm que oscilaron entre 12.13 y 3.09. El método de los alelos privados (SLATKIN, 1985) ofreció un valor considerablemente menor ($Nm = 1.075$). Esa inconsistencia entre ambos métodos puede ser consecuencia de la hipervariabilidad de los microsatélites y de sus altas tasas de mutación por generación. Esos mismos valores para el oso andino son considerablemente menores. Cuando se tomaron las poblaciones de osos de los cinco países en donde habita esta especie, el valor de Nm fue de 1.170 con la F_{ST} y tan sólo de 0.649 para el método de los alelos privados. Cuando únicamente se analizaron las muestras de Colombia y Ecuador, la estima de flujo génico con este último método ofreció un valor, incluso, tres veces inferior al caso anterior ($Nm = 0.273$). Esto significa que la ruptura más conspicua del flujo génico se da entre el acervo genético situado en Colombia y el acervo propio de Ecuador, y que existe algo más de flujo génico entre los animales colombianos y los venezolanos, por un lado, y de los peruanos y bolivianos con los ecuatorianos, por otro. Globalmente, el flujo génico entre las poblaciones de jaguares es del orden de entre tres y diez veces superior al de los osos mediante el procedimiento de la F_{ST} y cerca de 2 veces superior para el método de los alelos privados.

Esto pone en evidencia que existe mayor conexión genética entre las poblaciones de jaguares que entre las de oso andino. Sin embargo, esos valores de flujo génico pueden representar más bien resultados históricos que actuales. Eso significa que, si en la actualidad no existe un elevado flujo génico entre poblaciones de jaguares, el mismo fue interrumpido mucho más recientemente que en

el caso del oso andino y que las poblaciones de esta última especie llevan mucho más tiempo desconectadas unas de otras. Igualmente, este resultado pone en evidencia que históricamente las poblaciones de jaguares han sido considerablemente mayores que las de osos y, posiblemente, que los jaguares han tenido mucha más capacidad de dispersión que los osos y que los Andes no han constituido un obstáculo para los poderosos felinos, mientras que las áreas tropicales selváticas han sido posiblemente un obstáculo insalvable para los osos.

Análisis de asignamiento. Los análisis de asignamiento, en el caso de los osos, aportaron información relevante sobre la dinámica poblacional de esta especie. Todos los métodos empleados ofrecieron porcentajes de más de un 80 % de correcto asignamiento de los ejemplares colombianos y ecuatorianos a sus localidades geográficas de origen. Los únicos métodos que mostraron porcentajes inferiores fueron aquellos que emplearon las distancias de los alelos compartidos (DAS) y la $\delta\mu^2$. El porcentaje de asignación con esta última distancia osciló entre el 68 % y el 71 %. Por el contrario, los métodos bayesianos y frecuenciales mostraron porcentajes de asignación correcta entre el 92 y el 96 %. Estos resultados coinciden plenamente con lo obtenido a partir de simulaciones teóricas por CORNUET *et al.*, (1999). Por lo tanto, efectivamente, se ratificó la existencia de dos acervos genéticos diferentes en Colombia y Ecuador, respectivamente. Adicionalmente interesante es la localización geográfica de aquellos ejemplares que quedaron clasificados en áreas geográficas diferentes a aquellas de las que proceden realmente. Los animales colombianos que fueron clasificados como ecuatorianos provinieron del sur de Colombia, más específicamente de la región de Nariño. Únicamente se encontraron tres excepciones a estos resultados. Dos ejemplares procedente del área del Parque Nacional de Chingaza cercano a Bogotá, en la cordillera oriental de los Andes en Colombia, y un ejemplar en la región de Garagoa en el Departamento de Boyacá, también en la cordillera oriental andina. Sin embargo, para esos tres ejemplares no se tuvieron resultados completos para todos los microsatélites analizados con lo que esas asociaciones pudieran ser simplemente espúreas. Si no lo fueran, estos resultados podrían estar indicando que el acervo genético ecuatoriano se derivó prioritariamente de propágulos de osos procedentes de la cordillera oriental andina, o bien ejemplares de origen ecuatoriano han migrado internándose en la cordillera oriental colombiana. Sea como fuere, parece claro que existe un punto de corte entre ambos acervos genéticos en algún lugar entre el área central y el sur de Colombia. Cuando este tipo de análisis se extendió a todos los osos analizados en los cinco países andinos, los porcentajes de asignamientos correctos decrecieron considerablemente, ofreciendo el método bayesiano un 69 % de correcta clasificación y el método con la distancia de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967) un 73 % de asignamiento correcto. La explicación de este hecho parece evidente

ya que algunos ejemplares venezolanos quedaron agrupados con el acervo colombiano, algunos ejemplares bolivianos quedaron clasificados junto a los individuos ecuatorianos y algunos animales ecuatorianos quedaron agrupados con los pocos ejemplares peruanos estudiados. Es manifiestamente interesante que los individuos peruanos siempre fueron agrupados en un conjunto separado de los demás, lo cual podría ser un síntoma de que en territorio peruano existiera, al menos, otro acervo genético diferente al colombiano y al ecuatoriano. En el caso de los jaguares, se consideró la posible existencia de dos subespecies en territorio colombiano, *Panthera onca onca*, el jaguar de los Llanos orientales y del Amazonas y *P. onca centralis*, el jaguar del norte de Colombia y área Pacífica. Los métodos que ofrecieron unos porcentajes más elevados de correcta clasificación fueron el frecuencial (100 %), bayesiano (97 %) y con la distancia de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967) (95 %) con el procedimiento “as is”. Siempre este procedimiento ofrece mejores resultados que el “leave-one-out”, lo cual coincide con los resultados teóricos de CORNUET *et al.*, (1999). Estos valores son ligeramente mejores que los encontrados en los osos. Sin embargo, los porcentajes de asignamiento peores fueron, en general, inferiores a los determinados en el oso andino (ejemplo, la distancia de NEI, 1972 arrojó un valor del 64 %).

Estos resultados ponen de manifiesto la enorme utilidad de los marcadores microsatélites para discriminar especímenes en función de las áreas geográficas a las cuales pertenecen. De este modo animales mantenidos en zoológicos, u otras instituciones, sin origen geográfico reconocido pueden ser, ahora, asignados a acervos genéticos geográficos determinados. Por otra parte, los resultados obtenidos no muestran necesariamente la existencia de dos subespecies diferentes de jaguares en territorio colombiano ya que como se mencionó previamente los niveles teóricos de flujo génico parecen relativamente elevados. Sin embargo, si aceptamos la existencia de esas dos subespecies de jaguares en Colombia, entonces deberíamos aceptar que los acervos genéticos divergentes de las poblaciones de osos en Colombia y Ecuador, constituyen dos subespecies diferentes. Pese a ello, tendemos a pensar que, al menos, constituyen Unidades de Manejo diferentes (MUs, MORITZ, 1994). Si resultados comparativos con marcadores mitocondriales demostraran fuerte estructura filogeográfica, incluso la categoría de Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) podría ser aplicable, al menos, en el caso del oso andino.

Análisis de coincidencia multigenotípica. La probabilidad de encontrar dos osos con el mismo multigenotipo, con cinco de los marcadores moleculares polimórficos, fue de 3.0995×10^{-3} , lo cual significa que en promedio de cada 52 animales que analicemos encontraremos un par que presentarán el mismo perfil genético (Tabla III). En el caso del felino, necesitaríamos, para encontrar dos jaguares con el mismo perfil multigenotípico, que existieran, al menos, 4.22×10^{14}

jaguares sobre la faz del planeta (lo cual corresponde a una probabilidad de $2.367560513 \times 10^{-15}$). Esto significa que prácticamente es imposible encontrar dos jaguares con el mismo multigenotipo al utilizar los microsatélites empleados aquí.

Por lo tanto, existe muchísima más capacidad de discriminación individual con los marcadores microsatélites en el caso de los jaguares que en el caso de los osos. Esto está motivado fundamentalmente por la más elevada variabilidad genética encontrada en los primeros que en los segundos (mayor heterocigosis esperada y mayor número de alelos por marcador). De esta forma es más fácil cometer errores en los diagnósticos individuales en el caso de los osos que en el caso de los jaguares. Para solventar este problema es necesario poner a punto más marcadores microsatélites para los osos.

Análisis de detección de híbridos. La aplicación del programa STRUCTURE en el caso del oso andino reveló que en el interior de Colombia y en el interior de Ecuador, existe un único acervo genético, respectivamente, ya que $K = 1$ resultó tener el más óptimo logaritmo neperiano del valor de verosimilitud (Tabla IV). Los animales ecuatorianos presentaron una probabilidad de 0.982 de pertenecer a un acervo propio y únicamente una probabilidad de 0.018 de pertenecer al acervo colombiano. Igualmente, los animales colombianos presentaron una probabilidad de 0.944 de pertenecer a un acervo exclusivo de este país, con un escaso valor probabilístico de ser asignados al grupo ecuatoriano. Los individuos venezolanos presentaron una probabilidad mayor de estar relacionados con el acervo colombiano (0.658) que de pertenecer a un origen común con el acervo ecuatoriano (0.342). Únicamente, un ejemplar del departamento de Nariño, al sur de Colombia, mostró claramente ser un híbrido de ambos acervos genéticos. Cuando se aplicó la técnica de asignación bayesiana a los jaguares, se utilizaron dos estrategias diferentes. En primera instancia, se empleó la condición USEPOPINF = 0, lo cual significa que a los animales genotipificados no se les especifica anteriormente al análisis, ni a que área geográfica pertenecen ni a que subespecie son asignados. De este modo el programa determina cual es la probabilidad posterior más elevada a diferentes valores de K. Utilizando 100.000 repeticiones con 10.000 “burn in”, se observó que el valor más probable fue con $K = 3$. Es decir, en realidad la población de jaguares de Colombia, parte del Perú, Bolivia y zona central de la Amazonía brasileña, se descomponen básicamente en tres acervos genéticos diferentes (Tabla IV). Lo enormemente interesante es que en una misma área geográfica podemos encontrar animales pertenecientes a cualquiera de esos tres acervos genéticos, lo que pone de manifiesto la importante capacidad de dispersión de los jaguares, independientemente del lugar de origen donde se hayan conformado esos tres grupos. Cuando USEPOPINF = 1, esto es, cuando sí se determina “a priori” el origen geográfico de cada animal y

de su supuesta pertenencia a una subespecie determinada, la probabilidad posterior más elevada es la que correspondió a $K = 2$. Esto significa que, en realidad, las supuestas 6 subespecies de jaguares existentes en la zona geográfica estudiada, como mucho podrían asignarse a dos acervos genéticos diferentes y los dos acervos están entremezclados en ciertas áreas geográficas determinadas. Esto revela que las supuestas subespecies morfológicas no se ratifican a nivel molecular. Por lo tanto, desde el punto de vista conservacionistas las subespecies de jaguares definidas morfológicamente por otros autores no parecen tener validez desde el punto de vista de la definición de unidades básicas para su manejo.

De nuevo se hace evidente, que la separación reproductiva entre los grupos de osos ha sido más importante que entre los grupos de jaguares y que es más fácil detectar híbridos en éstos que en los primeros.

Análisis de cuellos de botella. Resultados muy similares fueron obtenidos tanto para la población de osos del Ecuador, Colombia y para el grupo total de muestras analizadas en lo que hace referencia a la detección de posibles cuellos de botella recientes (Tabla V). Para los dos modelos mutacionales más extremos, el modelo de los alelos infinitos y el modelo “step-wise”, se encontró una buena fracción de marcadores mostrando resultados negativos, los cuales son incompatibles con un cuello de botella reciente. Únicamente, en el caso de Colombia encontramos un microsatélite (G10B, $p = 0.0275$) que presentó un resultado significativo concordante con un cuello de botella reciente, pero los resultados globales no mostraron ninguna tendencia en favor de esta posibilidad. Podríamos, pues, concluir que esta especie no ha pasado a través de ningún tipo de cuello de botella y que si alguna de las poblaciones hubiera pasado por ese trance, la colombiana sería la mejor candidata. Lo mismo podríamos concluir a partir de los resultados del test de GARZA & WILLIAMSON (2001). La muestra total de osos estudiada en todo su rango de distribución, no mostró haber pasado por ningún cuello de botella con esta última metodología ni al utilizar un modelo step-wise puro (0% de mutaciones multi-step y valor promedio de la ganancia nucleotídica de un par por evento mutacional) ni al utilizar una proporción multi-step del 12% y un incremento promedio por mutación de 2.8 bases nucleotídicas. Igual circunstancia fue encontrada, a nivel de la población de osos de Colombia y de Ecuador, aunque en este último caso, con los parámetros de un modelo puro sep-wise, se obtuvieron valores cercanos a la significancia estadística. Sin embargo, ciertos fenómenos pueden eclipsar nuestra capacidad para detectar cuellos de botellas. El último test, y los análisis del equilibrio Hardy-Weinberg, detectaron que las poblaciones estudiadas no estaban en equilibrio mutación-deriva genética y una de las condiciones de esos tests es que las poblaciones analizadas deben estar en equilibrio. El efecto Wahlund (= subdivisión de las

poblaciones) podría ser una de las causas por las cuales no se pudo detectar ningún cuello de botella. No obstante, el análisis de mezcla poblacional mostró que un único acervo genético está presente en Colombia y en Ecuador, respectivamente. Ese hecho disipa un tanto la importancia del efecto Wahlund como una posible causa que no permita detectar cuellos de botella recientes. Una segunda posibilidad es que los osos se hayan expandido poblacionalmente en los últimos miles de años. Sin embargo, como se comentará más adelante no existe ninguna evidencia favorable a esta alternativa. Una tercera posibilidad es que el cuello de botella no sea “reciente”. “Reciente” significa que el evento se haya producido entre hace $2 N_e$ y $4 N_e$ generaciones. Si consideramos que el número efectivo promedio de osos a lo largo de toda la historia ha podido ser de 10.000 ejemplares y en termino medio una generación consta de unos 7 años, entonces, un cuello de botella “no reciente” es el que se haya producido entre 140.000 y 280.000 años atrás. Como la entrada del oso andino, o la de su ancestro *Tremarctos floridianus*, en Sudamérica se produjo hace entre 14.000 y 30.000 años (KURTEN, 1966), cualquier cuello de botella que se hubiera producido durante la historia de esta especie se debería considerar reciente y por lo tanto detectable bajo esa perspectiva. Si esta tercera alternativa fuera cierta, entonces el número efectivo promedio de la especie tuvo que ser mucho más pequeño que 10.000 individuos. Números efectivos entre 1000 y 2143 ejemplares serían compatibles con cuellos de botellas anteriores a 14.000 y 30.000 años atrás para el caso de $2 N_e$, y entre 500 y 1072 ejemplares para $4 N_e$. Si esos valores fueran correctos, entonces los métodos empleados efectivamente no habrían detectado esos cuellos de botella, simplemente, porque no son recientes. Pero ello implicaría, a su vez, que las poblaciones de osos se habrían expandido desde ese momento, cuestión que no ha sido detectada, a no ser que el cociente N_e/N sea mucho más pequeño de lo pensado previamente (0.3-0.7), lo cual sí está en concordancia con lo afirmado por FRANKHAM (1995) (N_e/N menores de 0.1). Dos alternativas más podrían ser consideradas como agentes explicativos válidos para la no detección de cuellos de botella. La existencia de inmigrantes externos podría ocultar la existencia de cuellos de botella. Efectivamente, aunque no en un cantidad excesiva hemos detectado posible híbridos entre los dos acervos diferentes ubicados en Colombia y Ecuador. Sin embargo, la desviación respecto al equilibrio Hardy-Weinberg se ha dado por exceso de homocigotos, lo cual evidencia lo restringido de la formación de estos posibles híbridos. Si la cantidad de éstos fuera importante, eso podría potenciar como una explicación alternativa para el exceso de homocigotos, la existencia de una frecuencia importante de alelos nulos. Una ultima posibilidad es que simplemente la población fue pequeña, y por ello su limitada variabilidad genética desde su mismo origen, sin necesidad de que haya pasado por un cuello de botella.

La muestra total y la muestra global colombiana de jaguares muestran una situación similar a la del oso andino. Únicamente, un microsatélite, Fca 96, podría identificar la acción de un cuello de botella reciente, pero el conjunto global de todos ellos muestran resultados significativos negativos que enfatizan la mayor importancia de fenómenos de expansión poblacional, flujo génico o, alternativamente, efecto Wahlund afectando a las poblaciones de jaguares. El análisis individual de los animales asignados a *Panthera onca onca* ofrecieron exactamente los mismos resultados. Sin embargo, el grupo de animales asignados por su origen geográfico a *P. onca centralis* sí mostró el haber pasado por un cuello de botella reciente (test de la diferencia estandarizada, $T_2 = 1.945$, $p = 0.02589$; test de Wilcoxon, $p = 0.00586$). Efectivamente, la población de jaguares del norte de Colombia y de la costa Pacífica sí parecen haber sido ampliamente extirpada por caza directa y destrucción de su hábitat. No obstante, el método de Garza & Williamson (2001) no detectó ningún cuello de botella en ninguna de las poblaciones de jaguares estudiadas. La inmensa mayoría de valores M obtenidos están por encima del valor crítico $M_c = 0.579$ que es el valor para un modelo mutacional con los parámetros mutación multi-step del 10% y el cambio promedio de 3.5 bases nucleotídicas por evento mutacional. Con la posible excepción de *P. onca centralis*, no parece que la amplia presión cinegética causada por los humanos, especialmente durante las décadas de los 60 y 70 del siglo XX a causa de las pieles (ver datos en la introducción), tuviera una repercusión importante desde el punto de vista genético en esta especie, lo cual es una indicación de que sus tamaños poblacionales han sido tradicionalmente grandes, en contraposición con lo detectado en los osos andinos. Una alternativa es que las estrategias reproductivas en los felinos sean mucho más efectivas que en los úrsidos, con tiempos generacionales, además, más pequeños y, por lo tanto, su crecimiento poblacional sea mucho más rápido compensando, así, más fácilmente las posibles consecuencias genéticas de los cuellos de botella (NEI *et al.*, 1975).

De este modo, los diversos métodos empleados para detectar cuellos de botellas parecen no haber detectado con rotundidad la existencia de los mismos en ninguna de las dos grandes especies de carnívoros estudiados. En el caso de los jaguares existen razones de peso para pensar que, efectivamente, la especie se ha caracterizado por importantes números poblacionales, al menos a nivel de la Amazonía, y la depredación humana ha tenido una repercusión relativamente pequeña sobre la estructura genética de esta especie haciendo inviable la detección de cuellos de botella. Probablemente, el propio comportamiento reproductivo de esta especie puede ser extremadamente eficaz para no entrar en procesos de fuerte pérdida de variabilidad genética. En el caso del oso andino es muy posible que existan diversos procesos que oculten la trascendencia de los cuellos de botella afectando a esta especie o, simplemente, que ésta desde su origen se mantuvo en poblaciones de pequeño tamaño, pero temporalmente constante. Es interesante manifestar la

importancia de la aplicación de diversos tests para detectar posibles cuellos de botellas, porque todos ellos dependen profundamente de las asunciones de sus respectivos modelos teóricos y cualquier posible desviación respecto a esos modelos puede ocultar la presencia efectiva de cuellos de botella.

Expansiones poblacionales. La aplicación de los tests k y g propuestos por REICH & GOLDSTEIN (1998) y REICH *et al.*, (1999) no reveló ninguna expansión poblacional en los diversos grupos de osos andinos estudiados. La muestra total presentó una distribución binomial para el test k no significativa ($p = 0.2649$), lo mismo que para Colombia ($p = 0.0703$) y para Ecuador ($p = 0.3743$). El test g mostró valores que oscilaron entre 0.284 y 0.546 (excluyendo e incluyendo marcadores monomórficos) para la muestra total, entre 0.521 y 0.809 para Colombia y entre 0.357 y 0.614 para Ecuador. Ninguno de esos valores se acercaron a $g = 0.08-0.12$, que son los valores que revelarían una existencia significativa de los fenómenos de expansión poblacional.

En el caso de los jaguares, el test g interlocus no detectó ninguna evidencia reveladora de expansión poblacional ($g = 0.4526$), pero para la muestra total si se detectó un acercamiento notable a un fenómeno de expansión poblacional con el test k intralocus ($p = 0.0417$). La existencia de una posible expansión poblacional en los jaguares había sido detectada previamente por EIZIRIK *et al.*, (2001) a un nivel más macrogeográfico que el utilizado en nuestro estudio, tanto con haplotipos de ADN mitocondrial como con microsátélites. El método coalescente introducido por BEAUMONT (1999), efectivamente, ratificó esta expansión poblacional en el caso de los jaguares.

Parece existir evidencia matemática suficiente para afirmar que las poblaciones de osos no se caracterizan por haberse expandido de forma masiva y apreciable aun cuando su introducción vía Centro América (o de su ancestro) ha sido reciente desde el punto de vista evolutivo, lo cual sugiere que el fenómeno de colonización de la cordillera de los Andes se llevó a cabo en pequeños propágulos poblacionales, o mediante individuos aislados, sin dejar una firma expansional evidente. Por el contrario, existe una creciente colección de evidencia en favor de que el jaguar es una especie que se ha expandido poblacionalmente de forma apreciable en los últimos 280.000-510.000 años. En otras palabras, mientras que el oso es una especie muy moderna en Sudamérica y que ha colonizado los Andes utilizando una estrategia “gota a gota”, lo cual ha minimizado el impacto del flujo génico entre sus poblaciones fomentando la divergencia entre ellas, el jaguar tiene una trayectoria mucho más antigua en Sudamérica y se ha expandido de forma masiva, existiendo mucha más cohesión genética entre sus poblaciones ya sea porque el flujo génico entre ellas es más elevado que en el caso del oso andino, ya sea porque éste se ha visto interrumpido relativamente mucho más recientemente respecto al tiempo total de permanencia de la especie en el continente.

Estimación de los números efectivos. La Figura 1 muestra los resultados de las simulaciones empleando los métodos de coalescencia a partir de la teoría generada por GRIFFITHS & TAVARÉ (1994) con el método de CORNUET & LUIKART (1996). Aquí únicamente discutiremos los resultados obtenidos para las correspondientes poblaciones colombianas. Las estimaciones de máxima verosimilitud que ofrecieron los valores más pequeños correspondieron a los microsatélites G1D y G10C ($N_e = 1.363$) y la estima más elevada correspondió al marcador G10P ($N_e = 4.144$), con el valor más probable de máxima verosimilitud promedio de 2.430 individuos. Para ello se empleó una tasa de mutación por generación de 5.6×10^{-4} , que es un valor típico en el caso de los mamíferos. Sin embargo, la heterogeneidad de los valores de N_e dependiendo de los microsatélites empleados está probablemente originado por diferencias en las tasas de mutación por generación de cada marcador utilizado. Si uno de cada dos osos es capaz de reproducirse ($N_e/N = 0.5$), ello mostraría que el valor del tamaño poblacional promedio de osos a lo largo de toda su historia, en lo que hoy en día es territorio colombiano, es de unos 3.645 animales, lo cual podría representar cerca de un 20 % de la población total de osos andinos actualmente existente a lo largo de toda su distribución geográfica..

Para el jaguar en Colombia, el valor promedio del número efectivo es de 15.607 individuos. Si tomamos el cociente N_e/N como 0.4, valor promedio obtenido para varias especies de felinos silvestres (SMITH & MACDOUGAL, 1991), obtenemos que el valor más probable obtenido por coalescencia es de 24.971 jaguares en el actual territorio colombiano, lo cual podría representar entorno al 6.25-8.33 % de la población total de jaguares existentes en América.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto que el número de osos existentes en Colombia es, y especialmente ha sido, considerablemente menor que el número de jaguares viviendo en este territorio, lo cual, a su vez, revela que el ecosistema andino está en mucha menor disposición de poder tener una carga considerable de grandes carnívoros que los ecosistemas de selvas húmedas bajas. El problema se acrecienta porque cerca de 4/5 partes de los pobladores humanos de los países andinos, precisamente, viven en esta cordillera montañosa. Igualmente, Colombia parece jugar un papel de refugio más decisivo para la conservación del oso andino que para la del jaguar. Sin embargo, la perpetuación del gran felino manchado es clave para asegurar la correcta dinámica poblacional de las selvas húmedas tropicales y para conocer cual es el potencial y tamaño poblacional de otras especies que viven en esas selvas.

En otro orden de cosas, aquellos marcadores que muestran valores de números efectivos muy divergentes del resto de los otros marcadores deben ser interpretados como poseedores de tasas de mutación por generación muy diferentes al valor promedio encontrado para los mamíferos de $5.6 \times$

10^4 , ya sea porque tienen valores de estas tasas más elevados (menor restricción selectiva y mayor oportunidad de fenómenos de “selective sweeps” diferenciales entre las poblaciones de una misma especie “sensu” SCHLOTTERER & WIEHE (1999)), o porque las tasas son menores (existencia de restricciones mutacionales, actuación de selección natural purificadora en áreas ligadas o situación del marcador en zonas de baja recombinación).

Tiempos de divergencia entre poblaciones de osos y poblaciones de jaguares. Utilizando la expresión, $t = 2 N_e \ln [(2 H_t / H_s)]$ podemos calcular el tiempo de divergencia entre las poblaciones de osos de Venezuela, Colombia y Ecuador, por un lado y entre las poblaciones colombianas de jaguares, supuestamente, pertenecientes a las dos especies previamente comentadas. Para la primera especie, teniendo en consideración $H_t = 0.66$ (diversidad genética en la población total) y $H_s = 0.576$ (diversidad genética promedio en cada subpoblación considerada) y $N_e = 7.500$, se obtuvo un valor de 12.438 años de divergencia. Si aceptamos que la llegada de los osos en Sudamérica pudo haberse dado hace 14.000 años, eso significa que la subdivisión entre las poblaciones fue prácticamente inmediata a su entrada. Eso significa que virtualmente el 89 % del tiempo que la especie lleva en este continente ha estado fragmentada. Es importante hacer notar que ese tiempo de divergencia coincide con el último periodo de cambio glacial y con la entrada del hombre a Sudamérica. Si la entrada de la especie, o de su predecesor (anagénesis), hubiera sido hace 30.000 años, entonces el tiempo de fragmentación alcanzaría el 42 % del tiempo de existencia de esta especie en Sudamérica. Sea como fuere, esta fracción de tiempo es muy considerable.

En el caso del jaguar, con $H_t = 0.857$, $H_s = 0.848$ y $N_e = 15.607$, el tiempo de divergencia ascendió a 21.965 años. Si tenemos en consideración el estudio de EIZERIK *et al.*, (2001), los haplotipos mitocondriales reconocidos de los jaguares empezaron a divergir entre hace 280.000 y 510.000 años. Esto significa que la diferenciación entre las dos supuestas subespecies de jaguares colombiana podría haber cubierto únicamente entre el 4.31 % y el 7.84 % del tiempo que lleva esta especie en Sudamérica. Una proporción de tiempo considerablemente menor que la registrada para el oso andino. Durante todo ese tiempo proporcionalmente mayor que habrían pasado juntas las poblaciones de jaguares, el flujo génico habría homogeneizado mucho más esas poblaciones ya sea porque los números efectivos de esta especie eran mayores, porque las tasas de migración por generación eran mayores o por ambas cosas simultáneamente.

De este modo, los resultados obtenidos mediante la genética de poblaciones molecular pueden permitir reconstruir eventos ocurridos en el pasado y que determinan prioritariamente el presente y futuro inmediato evolutivo de muchas especies de organismos silvestres. En muchos casos donde el registro fósil es incapaz de resolver problemas debido a su escasez, únicamente los métodos

derivados de la teoría genético poblacional y del uso de la biología molecular pueden dar luz a la resolución de esos problemas.

Resulta evidente que el arsenal de conocimientos implícitos en la teoría genético poblacional y el amplio espectro potencial de las técnicas de la biología molecular son capaces de aportar luz en la construcción de hipótesis cognoscitivas sobre la evolución de los organismos, donde otras áreas de las ciencias biológicas, como la ecología o la paleontología, no pueden hacerlo. Igualmente, el conocimiento aportado por la genética de poblaciones, por ejemplo al caso de los dos grandes carnívoros neotropicales aquí estudiados, es esencial para la conservación de especies en peligro de extinción.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece enfáticamente la disposición que tuvo el ex decano de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Dr. Carlos Corredor) para fomentar este tipo de estudios en el medio colombiano. Igualmente se reconoce el apoyo del post-grado y de la Vicerectoría Académica de la Pontificia Universidad en la financiación de dos proyectos, uno para el estudio del oso andino y otro para el estudio de las especies de felinos silvestres en Colombia (905). Los agradecimientos específicos para la investigación con los osos son los siguientes: Por una parte, a la WSPA (World Society for the Protection of Animals) en su oficina en Latino América en Costa Rica (Sr. Huertas) por su ayuda económica y material y, por otra parte, a todos aquellos investigadores que han proveído muestras desinteresadamente para llevar a cabo algunos de los análisis aquí comentados. Entre ellos cabe mencionar a Andrés Eloy Bracho e Isaac Goldstein (Venezuela), Sergio Sandoval, Fernando Nassar, Jorge Gardeazabal, Luz Mercedes Borrero, Marcela Ramírez, Ricardo Botero, Luis Carrillo, Daniel Rodríguez, Jhon Poveda, Haidy Monsalve y Pedro Moreno (Colombia), Heinz Pfenge, Hugo Gálvez, Judith Figueroa, "Pocahontas" y Marcelo Stucchi (Perú) y Robert Wallace (WCS), Susan Paisley y Alvaro Garitano, director de la Colección Boliviana de Fauna (CBF) en el Museo de Historia Natural de La Paz (Bolivia), Huascar Azurday y el Noel Kempff Natural History Museum en Santa Cruz (Bolivia).

Respecto al estudio de los jaguares, nuestros más explícitos agradecimientos van para el Instituto von Humboldt (IVH) en Villa de Leyva (Colombia) por permitir tomar muestras de trocitos de pieles de jaguares de su colección mastozoológica. Esos agradecimientos se concretan en las personas de Yaneth Muñoz-Sabas y de los directores de esta institución, Dr. Cristian Samper y Dr. Fernando Gaast. Respecto al muestreo de campo nuestras gracias van para Hugo Gálvez, Connie

Stelle, Roberto Munevar, y las comunidades Huitoto, Ticuna y Jaguas, quienes ayudaron a obtener una gran cantidad de las muestras aquí analizadas.

BIBLIOGRAFIA

- AMOS, B., SCHLOTTERER, C & TAUTZ, D. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling, *Science*, **260**: 670-672.
- BEAUMONT, M.A. 1999. Detecting population expansion and decline using Microsatellites. *Genetics*, **153**: 2013-2029.
- BONNELL, M. L. & SELANDER, R. K. 1974. Elephant seals: genetic variation and near extinction. *Science*, **188**: 908-909.
- BROAD, S. 1988. Little spotted cat, tiger cat, or onchilla. Pp. 124-130 in *Significant trade in wildlife: a review of selected species in CITES Appendix II*, Volume 1: Mammals. World Conservation Monitoring Center, Cambridge.
- CAVALLI-SFORZA L.L. & EDWARDS, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution*, **21**: 550-570.
- CORNUET J.M., & LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**: 2001-2014.
- CORNUET, J. M., PIRY, S, LUIKART, G, ESTOUP, A, & SOLIGNAC, M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**: 1989-2000.
- EIZIRIK, E., KIM, J. H., MENOTTI-RAYMOND, M., CRAWSHAW, P., O'BRIEN, S. J., & JOHNSON, W. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, **10**: 65-79.
- FRANKHAM, R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research*, **66**: 95-107.

GARCIA-MORENO, J., ROY, M. S., GEFFEN, E., & WAYNE, R. 1996. Relationships of genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of Microsatellite loci. *Conservation Biology*, **10**: 376-384.

GARZA, J. C., & WILLIAMSON, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from Microsatellite loci, *Molecular Ecology* **10**: 305-318.

GIETELING, C. 1972. Jaguar en ocelot: biologies, bedreiging en bescherming. Unpublished report, WWF Netherlands, AA Zeist.

GOODMAN S.J. 1997. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significances. *Molecular Ecology*, **6**: 881-885.

GOTTELLI D, SILLERO-ZUBIRI, C., APPLEBAUM, G. D., ROY, M.R., GRMAN, D. J., GARCIA-MORENO, J., OSTRANDER, E. A., & WAYNE, R. K. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, **3**: 301-312.

GRETH, A., SUNNUCKS, P., VASSART, M., & STANLEY, H. 1991. Genetic management of an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) population without known pedigree. Proceedings of Ungulate 91. September, 1991, Toulouse, France.

GRIFFITHS R.C., & TAVARÉ, S. 1994. Simulating probability-distributions in the coalescent. *Theoretical Population Biology*, **46**: 131-159.

HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. London B*, **164**: 298-310.

KENDALL M., & STUART, A. 1977. *The advanced theory of statistics* Volume I. Macmillan, New York.

KIMURA, M. 1986. DNA and the neutral theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B*, **312**: 343-354.

KURTEN B. 1966. Pleistocene bears of North America. I. Genus *Tremarctus*, spectacled bears. *Acta Zoologica Fennica*, **115**: 1-20.

LEWONTIN, RC., & HUBBY, J. L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**: 595-609.

MENOTTI-RAYMOND M.A, & O'BRIEN, S. J. 1995. Evolutionary conservation of ten Microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity*, **86**: 319-322.

MENOTTI-RAYMOND, M. A., DAVID, V. A., LYONS, L.A., SCHAFFER, A. A., TOMLIN, J. L., HUTTON, M.K., & O'BRIEN, S.J. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*, **57**: 9-23.

MICHALAKIS Y, & EXCOFFIER, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to Microsatellite loci. *Genetics*, **142**: 1061-1064.

MORIN, P. A, MOORE, J., CHAKRABORTY, R., JIN, D. L., GOODALL, J., & WOODRUFF, D.S., 1994. Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science*, **265**: 1193-1201.

MORITZ C., 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**: 373-375.

MULLIS, K., & FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**: 335-350.

NEI, M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3321-3323, 1973.

- NEI, M., MARUYAMA, T., & CHAKRABORTY, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29: 1-10.
- NOOR, M. A. F. 1995. Incipient sexual isolation in *Drosophila pseudoobscura bogotana* Ayala & Dobzhansky (Diptera: Drosophilidae). *Pan-Pacific Entomologist*, **71**: 125-129.
- OREJUELA J., & JORGENSEN, J. 1998. Status and management of the spectacled bear in Colombia. In *Spectacled Bear Conservation Action Plan* (Peyton B, Ed), Chapter 9, pp. 168-179.
- PAETKAU D., & STROBECK, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* **3**: 489-495.
- PAETKAU D., CALVERT, W., STIRLING, S. & STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, **4**: 347-354.
- PEYTON B., YERENA, E., RÚMIZ, D. I., JORGENSEN, J. & OREJUELA, O. 1998. Status of wild Andean bears and policies for their management. *Ursus*, **10**: 87-100.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS, M., & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- RANNALA, B., & MOUNTAIN J.L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**: 9197-9201.
- REICH D.E., & GOLDSTEIN, D. B. 1998. Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 8119-8123.
- REICH D.E., FELDMAN, M. W. & GOLDSTEIN, D.B. 1999. Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 453-466.

ROUSSET F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228.

RUIZ-GARCÍA, M. 1991. Más sobre la Genética de Poblaciones de *Felis catus* en la costa Mediterránea española: un análisis de la estructura genética de las poblaciones naturales de gatos. *Evol. Biol.*, **5**: 227-283.

RUIZ-GARCÍA, M. 2001. Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the Northern Andean Area. *Hereditas* (in press).

RUIZ-GARCIA, M. 2002. Population Genetic Structure of the Andean bear: How many evolutionary population units ?. *Molecular Ecology* (submitted)

RUIZ-GARCÍA, M., & PAYAN, C. E. 2002. Molecular Evolution of the Jaguar (*Panthera onca*) in Colombia using Microsatellite markers, *Journal of Mammalogy* (in press).

RUIZ-GARCÍA, M., OROZCO-TERWENGEL, P., CASTELLANOS, A. & ARIAS, L. 2002 a. Molecular population genetics analysis and Bayesian and coalescence approaches of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*) by means of DNA Microsatellites. *Journal of Molecular Evolution* (submitted).

RUIZ-GARCÍA, M., PAYÁN, C.E. & ALVAREZ, D. 2002 b. Bayesian and coalescence Microsatellite evolution of the jaguar (*Panthera onca*) and the puma (*Puma concolor*) in Columbia. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

RUIZ-GARCIA, M., PAYAN-GARRIDO, C. E. & CASTELLANOS, A. 2002. Hierarchical genetic structure of *Leopardus pardalis* in Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia and Brazil: molecular gene diversity and geographical patterns. *Molecular Ecology* (submitted).

SCHLOTTERER C., AMOS, B., & TAUTZ, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in Cetacean species. *Nature*, **354**: 63-65.

SCHLOTTERER C., & WIEHE, W. 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In *Microsatellites. Evolution and applications*. (Goldstein DB, Schlotterer C, Eds), Oxford University Press, pp. 238-248.

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

SLATKIN M. 1995. A measure of population subdivision based on Microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-462.

SLATKIN M., & BARTON, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, **43**: 1349-1368.

SMITH, J. L., & McDUGAL, C. 1991. The contribution of variance in lifetime reproduction to effective population size in tigers. *Conservation Biology*, **5**: 484-490.

TAYLOR A.C., SHERWIN, W. B., & WAYNE, R. K. 1994. Genetic variation of simple sequence loci in a bottlenecked species: the decline of the northern hairy-nosed wombat (*Lasiornhinus krefftii*). *Molecular Ecology*, **3**: 277-290.

TAUTZ D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**: 6463-6471.

WEIR B.S., & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.

ENCABEZAMIENTO FIGURAS

FIGURA 1. Simulaciones utilizando la teoría de la coalescencia mediante el procedimiento de Griffith & Tavaré (1994) para calcular el parámetro $\theta = 4 N_e \mu$ (N_e = Número efectivo; μ = tasa de mutación por generación). Asumiendo una tasa de mutación de 5.6×10^{-4} , se despejan los valores de los números efectivos con mayor probabilidad de verosimilitud. A/ Para tres conjuntos de muestras de oso andino (*Tremarctos ornatus*); B/ Para cuatro conjuntos de jaguares (*Panthera onca*). Los números efectivos más probables para cada microsatélite empleado son marcados sobre las distribuciones de θ .

Tabla I. Alelos microsatélites específicos encontrados únicamente en las poblaciones de A/ osos de ciertos países andinos y B/ de jaguares de dos supuestas subespecies diferentes en Colombia. Igualmente se anotan ciertos alelos encontrados en jaguares de otros países latinoamericanos (Guatemala, Brasil y Bolivia) y que no se encontraron en ninguno de los animales colombianos analizados. Los alelos están medidos en pares de bases (pb). Los marcadores G1D, G10B, G10C, G10M, G10P, G10X y G10L son los que presentaron diferencias para las poblaciones de oso andino (*Tremarctos ornatus*) y los marcadores Fca 96, Fca 45, Fca 08 y Fca 391 son los que presentaron alelos característicos en las diversas poblaciones de jaguares (*Panthera onca*) estudiadas.

- Specific Microsatellite alleles only found in the Andean bear populations of several countries (A) and in the jaguar populations of two supposed different subspecies in Columbia (B). Otherwise, several alleles found in jaguars of other Latin American countries (Guatemala, Brazil and Bolivia) and no presented in the Colombian animals analyzed are noted. The alleles are measured in base pairs (bp). The G1D, G10B, G10C, G10M, G10P, G10X and G10L markers are those which showed differences in the Andean bear populations (*Tremarctos ornatus*) and the Fca 96, Fca 45, Fca 08 and Fca 391 markers are those which presented differences between several jaguar populations studied (*Panthera onca*).

OSO ANDINO (*Tremarctos ornatus*)

Locus	COLOMBIA	ECUADOR	VENEZUELA	BOLIVIA
A				
G1D	182	186		
G10B	162	154	154	
G10C	109		109	101
	115		115	
G10M		212		
		214		
		218		
		220		
		222		
G10P	137	149	149	
		153		
G10X		123		121
	129			
	133		133	
			135	
		137		
G10L	127			
	129			
		139		
		141		
		147		

JAGUARES (*Panthera onca*)

Locus	<i>Panthera onca onca</i>	<i>Panthera onca centralis</i>	Locus	COLOMBIA	OTROS PAISES
Fca 96	185		Fca 96		183 Guatemala
	187		Fca 45		159 Guatemala

	189		Fca 08	123 Guatemala
	195			124 Manaus (Brasil)
		219		134 Manaus (Brasil)
Fca 45	139		Fca 391	201 Bolivia
	147			
	149			
	151			
	153			
	155			
Fca 391	195			
	197			
	209			
	211			
	214			
	221			
		203		
		207		
		215		
		223		

Tabla II. Análisis de diversidad genética con el método de NEI (1973) aplicado al oso andino (poblaciones venezolanas, colombianas, ecuatorianas, peruanas y bolivianas) y al jaguar (poblaciones colombianas, peruanas y brasileñas). Se utilizaron 7 microsatélites polimórficos en caso del oso andino y otros 7 marcadores microsatélites en el caso del jaguar. H_o = Heterocigosis observada; H_s = Heterocigosis esperada promedio en la subpoblaciones; H_t = Heterocigosis esperada en la población total; D_{st} = Diferenciación genética absoluta entre la subpoblaciones de la población total; D_{st}' = Lo mismo que el parámetro anterior pero corregido por tamaño muestral; H_t' = Igual que H_t pero corregido por tamaño muestral; G_{st} = Diferenciación genética relativa entre las subpoblaciones respecto a la diversidad genética encontrada en la población total; G_{st}' = Lo mismo que en el caso anterior pero incluyendo corrección por tamaño muestral; G_s = Estadístico análogo al estadístico F_{is} de Wright (1965) para medir el grado de desviación promedio subpoblacional respecto a las frecuencias genotípicas en equilibrio Hardy-Weinberg.

- Genic diversity analysis with the NEI (1973) procedure applied to the Venezuelan, Colombian, Ecuadorian, Peruvian and Bolivian Andean bear (*Tremarctos ornatus*) populations and to the Colombian, Peruvian and Brazilian jaguar populations. Seven polymorphic Microsatellites were employed in the case of the spectacled bear and other seven Microsatellite markers were used in the jaguar case. H_o = Observed heterozygosity; H_s = Average expected heterozygosity in the subpopulations; H_t = Expected heterozygosity in the overall population; D_{st} = Absolute genic differentiation between the subpopulations of the overall population; D_{st}' = The same as the statistic previously mentioned but corrected for sample size; H_t' = The same but corrected by sample size; G_{st} = Relative genetic differentiation between subpopulations in regard to the gene diversity found in the total population; G_{st}' = The same but corrected by sample size; G_s = Analogous statistic to the Wright (1965) F_{is} statistic to measure the degree of average subpopulation deviation regard to the genotype frequencies in Hardy-Weinberg equilibrium.

OSO ANDINO (<i>Tremarctos ornatus</i>)									
Locus	H_o	H_s	H_t	D_{st}	D_{st}'	H_t'	G_{st}	G_{st}'	G_s
G1D	0,182	0,408	0,401	-0,007	-0,009	0,398	-0,018	-0,024	0,553
G10B	0,521	0,719	0,815	0,096	0,144	0,863	0,118	0,167	0,276
G10C	0,287	0,330	0,346	0,017	0,022	0,352	0,048	0,063	0,130
G10M	0,304	0,554	0,699	0,145	0,194	0,747	0,208	0,259	0,451
G10P	0,572	0,716	0,781	0,064	0,086	0,802	0,083	0,107	0,201
G10X	0,241	0,618	0,777	0,159	0,212	0,830	0,204	0,255	0,610
G10L	0,440	0,688	0,801	0,113	0,169	0,857	0,141	0,197	0,360
Total	0,364	0,576	0,660	0,084	0,112	0,688	0,127	0,162	0,368
JAGUAR (<i>Panthera onca</i>)									
Fca 96	0,758	0,884	0,897	0,013	0,026	0,91	0,014	0,028	0,142
Fca 126	0,341	0,845	0,817	-0,028	-0,055	0,79	-0,034	-0,070	0,597
Fca 45	0,392	0,767	0,801	0,034	0,067	0,835	0,042	0,081	0,489
Fca 43	0,417	0,86	0,853	-0,007	-0,014	0,846	-0,008	-0,016	0,515
Fca 08	0,567	0,738	0,745	0,007	0,014	0,752	0,009	0,019	0,232
Fca 391	0,762	0,898	0,928	0,030	0,060	0,958	0,032	0,063	0,152
Fca 176	0,617	0,943	0,955	0,012	0,024	0,967	0,012	0,024	0,346
Total	0,551	0,848	0,857	0,009	0,017	0,865	0,010	0,020	0,351

Tabla V. Análisis para detectar posibles cuellos de botellas en diferentes conjuntos de muestras de osos andinos (*Tremarctos ornatus*) y de jaguares (*Panthera onca*) mediante los métodos de CORNUET & LUIKART (1996) y LUIKART *et al.*, (1998). Ko = Número de alelos observados; He = Heterocigosis esperada a partir de las frecuencias alélicas; Heq = Heterocigosis esperada a partir del número de alelos encontrados; S. D. = Desviación estándar; IAM = modelo mutacional de los alelos infinitos; SMM = modelo mutacional “step-wise”; Prob. = Probabilidad; * P < 0.05, valor significativo pero por expansión poblacional, efecto de subdivisión o flujo génico entre acervos genéticos diferentes; # P < 0.05, valor significativo causado por un cuello de botella reciente. Este caso únicamente se presenta en la muestra de *Panthera onca centralis* del norte de Colombia y del área Pacífica.

- Analysis to detect possible bottleneck events in different sample sets of Andean bears and jaguars employing the CORNUET & LUIKART (1996) and LUIKART *et al.*, (1998). Ko = Observed allele number; He = Expected heterozygosity from allele frequencies; Heq = Expected heterozygosity throughout the allele number found; S. D. = Standard Deviations; IAM = Infinite Allele Model; SMM = Stepwise mutation model; Prob. = Probability; * P < 0.05, significant value but for population expansion, subdivision effect or gene flow among different gene pools; # P < 0.05, significant value caused by a recent bottleneck event. This case was only shown in the sample of *Panthera onca centralis* at the northern and in the Pacific areas from Columbia.

OSO ANDINO (<i>Tremarctos ornatus</i>)								
MUESTRA TOTAL DE OSOS	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	Locus	ko	He	Heq	S.D.	Prob	Heq	S.D.
G1D	4	0,254	0,449	0,171	0,175	0,561	0,126	0,030
G10B	6	0,731	0,587	0,142	0,142	0,719	0,075	0,478
G10C	5	0,248	0,519	0,157	0,084	0,652	0,091	0,003
G10M	9	0,788	0,736	0,092	0,330	0,828	0,039	0,130
G10P	9	0,713	0,739	0,093	0,308	0,830	0,037	0,013
G10X	8	0,709	0,693	0,107	0,466	0,796	0,052	0,066
G10L	7	0,851	0,765	0,076	0,073	0,819	0,043	0,249
Test del signo	IAM	0,60345						
	SMM	0,09983						
Test de las diferencias estandarizadas	IAM	0,45887						
	SMM	0,00000*						
Prueba de Wilcoxon	IAM	0,53125						
	SMM	0,98828						
MUESTRAS DE OSOS DEL ECUADOR								
MUESTRAS DE OSOS DEL ECUADOR	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	Locus	ko	He	Heq	S.D.	Prob	Heq	S.D.
G1D	3	0,298	0,394	0,163	0,348	0,457	0,154	0,203
G10B	6	0,480	0,643	0,121	0,120	0,743	0,068	0,008
G10C	2	0,108	0,227	0,160	0,413	0,268	0,165	0,310
G10M	9	0,859	0,784	0,072	0,095	0,847	0,034	0,427
G10P	8	0,674	0,763	0,080	0,144	0,829	0,038	0,004
G10X	4	0,422	0,504	0,155	0,300	0,596	0,113	0,090
G10L	4	0,747	0,638	0,106	0,157	0,683	0,085	0,291
Test del signo	IAM	0,12779						
	SMM	0,11856						
Test de las diferencias estandarizadas	IAM	0,19798						

Prueba de Wilcoxon	SMM	0,00004*
	IAM	0,81250
	SMM	0,98828

MUESTRAS DE OSOS DE COLOMBIA	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	ko	He	Heq	S.D.	Prob	Heq	S.D.	Prob
G1D	3	0,116	0,393	0,165	0,084	0,468	0,148	0,026
G10B	5	0,789	0,616	0,124	0,028	0,703	0,081	0,083
G10C	3	0,265	0,408	0,161	0,286	0,483	0,143	0,129
G10M	4	0,543	0,561	0,134	0,378	0,631	0,100	0,184
G10P	7	0,753	0,790	0,067	0,234	0,833	0,040	0,044
G10X	3	0,484	0,454	0,150	0,512	0,515	0,132	0,358
G10L	4	0,821	0,751	0,063	0,254	0,773	0,056	0,388
Test del signo	IAM	0,39406						
	SMM	0,11091						
Test de las diferencias estandarizadas	IAM	0,41516						
	SMM	0,02682*						
Prueba de Wilcoxon	IAM	0,59375						
	SMM	0,96094						

MUESTRA TOTAL (COLOMBIA, PERU, BOLIVIA, BRASIL)	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	ko	He	Heq	S.D.	Prob.	Heq	S.D.	Prob
Fca 96	14	0,913	0,831	0,059	0,005	0,897	0,021	0,238
Fca 126	7	0,759	0,718	0,098	0,427	0,797	0,047	0,171
Fca 45	10	0,778	0,771	0,079	0,425	0,852	0,031	0,036
Fca 43	7	0,826	0,708	0,098	0,049	0,787	0,052	0,233
Fca 08	15	0,797	0,870	0,042	0,053	0,914	0,015	0,000
Fca 391	13	0,919	0,892	0,031	0,164	0,918	0,015	0,583
Fca 200	6	0,857	0,797	0,059	0,164	0,828	0,042	0,339
Fca 176	12	0,923	0,897	0,029	0,173	0,919	0,016	0,509
Test del signo	IAM	0,10762						
	SMM	0,57371						
Test de las diferencias estandarizadas	IAM	0,07126						
	SMM	0,00172*						
Prueba de Wilcoxon	SMM	0,67969						
	SMM	0,67969						
MUESTRA TOTAL DE COLOMBIA	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	ko	He	Heq	S.D.	Prob.	Heq	S.D.	Prob

Fca 96	14	0,913	0,845	0,051	0,016	0,901	0,017	0,276
Fca 126	7	0,763	0,721	0,091	0,392	0,799	0,047	0,185
Fca 45	9	0,782	0,758	0,081	0,462	0,834	0,037	0,086
Fca 43	7	0,831	0,733	0,089	0,077	0,803	0,047	0,309
Fca 08	12	0,695	0,846	0,050	0,014	0,894	0,021	0,000
Fca 391	12	0,918	0,888	0,035	0,164	0,913	0,017	0,487
Fca 200	6	0,857	0,796	0,060	0,163	0,825	0,043	0,275
Fca 176	12	0,924	0,908	0,025	0,307	0,922	0,016	0,578

Test del signo **IAM** 0,1098
SMM 0,53913

Test de las diferencias estandarizadas **IAM** 0,17376
SMM 0,00041*

Prueba de Wilcoxon **SMM** 0,67969

Panthera onca onca	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	ko	He	Heq	S.D.	Prob.	Heq	S.D.	Prob
Fca 96	11	0,900	0,848	0,048	0,070	0,890	0,023	0,391
Fca 126	5	0,786	0,847	0,037	0,241	0,859	0,032	0,126
Fca 45	9	0,862	0,828	0,055	0,338	0,869	0,030	0,313
Fca 43	5	0,797	0,688	0,097	0,086	0,743	0,064	0,185
Fca 08	10	0,593	0,845	0,050	0,001	0,884	0,026	0,000
Fca 391	8	0,939	0,914	0,023	0,139	0,921	0,017	0,250
Fca 176	6	0,911	0,863	0,036	0,070	0,875	0,029	0,119

Test del signo **IAM** 0,46382
SMM 0,63998

Test de las diferencias estandarizadas **IAM** 0,28957
SMM 0,0006*

Prueba de Wilcoxon **SMM** 0,53125

Panthera onca centralis	Valores observados		bajo I.A.M.			bajo S.M.M.		
	ko	He	Heq	S.D.	Prob.	Heq	S.D.	Prob
Fca 96	8	0,858	0,794	0,066	0,134	0,845	0,033	0,419
Fca 126	6	0,810	0,724	0,086	0,138	0,781	0,058	0,390
Fca 45	3	0,637	0,459	0,148	0,110	0,504	0,014	0,190
Fca 43	6	0,879	0,823	0,050	0,143	0,846	0,037	0,275
Fca 08	7	0,833	0,826	0,052	0,491	0,853	0,036	0,258
Fca 391	6	0,835	0,799	0,059	0,388	0,828	0,040	0,620
Fca 200	6	0,864	0,829	0,048	0,308	0,846	0,038	0,460
Fca 176	8	0,909	0,915	0,022	0,372	0,921	0,018	0,240

Test del signo **IAM** 0,08680
SMM 0,41804

Test de las diferencias estandarizadas **IAM** 0,02589#
SMM 0,22244

Prueba de **SMM** 0,19141
Wilcoxon

Tabla III. (A) Probabilidades de concordancias multigenotípicas para el conjunto global de muestras de oso andino estudiadas en Venezuela, Colombia y Ecuador. Para ello, se utilizaron diferentes metodologías para calcular esas probabilidades. Número = Número de osos andinos esperados que compartan los mismos genotipos para los marcadores microsatélites empleados, asumiendo que la población total de osos andinos es de unos 18.500 animales. * asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg. (B) Probabilidades de concordancias multigenotípicas para varias agrupaciones de muestras de jaguares (total, Colombia y para las subespecies *P. onca onca* y *P. onca centralis*) calculadas con el método simple corregido.

- (A) Match probabilities (Q) for the overall northern Andean area spectacled bear population studied in Venezuela, Colombia and Ecuador. Number = number of spectacled bears with the possible same genotypes for the polymorphic Microsatellite loci employed assuming a total spectacled bear population size of 18.500 animals. * assuming H-W equilibrium. (B) Match probabilities (Q) for several sample sets of jaguars (Total, Columbia, and for the jaguar subspecies, *P. onca onca* and *P. onca centralis*) estimated with the corrected simple method.

(A)	Q	Número: un de osos de cada
Método simple	6.9267×10^{-3}	144
Método simple corregido	3.0995×10^{-3}	52
Regla del producto	1.4839×10^{-4}	0.27
Regla 2P *	4.7393×10^{-4}	9
Utilizando F_{St} por locus	2.1821×10^{-3}	40
Utilizando el promedio F_{St} para todo los loci	1.7087×10^{-3}	32

(B)	Q	Número: un jaguar de cada
Muestra total de Jaguares	$2.367560513 \times 10^{-15}$	4.22×10^{14}
Muestra de Jaguares colombianos	$1.484304977 \times 10^{-15}$	6.73×10^{14}
<i>P. o. onca</i>	$1.562942594 \times 10^{-12}$	6.398×10^{11}
<i>P. o. centralis</i>	$2.600612667 \times 10^{-12}$	3.8452×10^{11}

Tabla IV. (A) Determinación del número de acervos genéticos más probable en las poblaciones de osos de Venezuela, Colombia y Ecuador (Ven/Col/Ecu), de Ecuador y Colombia, de tan solo Ecuador y de tan solo Colombia. Se asumió desconocimiento de las probabilidades “apriorísticas” de los orígenes geográficos para todas las K partiendo de una supuesta única e hipotética población (USEPOPINFO = 0). El mayor valor del Ln de la verosimilitud indica el número más probable de diferentes acervos genéticos para esos conjuntos de muestras. Dos acervos genéticos fueron encontrados para la muestra de Venezuela-Colombia-Ecuador y para la muestra de Colombia-Ecuador, mientras que un único acervo genético fue encontrado dentro de Ecuador y de Colombia, respectivamente. (B) El mismo análisis pero aplicado a una muestra de 65 jaguares que representan básicamente la distribución del jaguar en el norte de Sudamérica, parte de la cordillera andina y del centro de la Amazonía. Utilizando la técnica USEPOPINF = 0, se detectaron tres acervos genéticos diferentes como el hecho más probable y utilizando la técnica USEPOPINF = 1 y asumiendo 6 subespecies de jaguares diferentes en la zona de estudio en función de las clasificaciones previas, dos acervos genéticos fueron detectados como el resultado más probable

--- (A) Determination of the most probable number of gene pools conforming the Andean bear populations of Venezuela, Colombia and Ecuador (Ven/Col/Ecu), of Ecuador and Colombia (Ecu/Col), and Ecuador and Colombia individually. We assumed uninformative priors on all K as each sample belonged to a hypothetical single population (USEPOPINFO = 0). The highest Ln likelihood value indicates the most probably number of different gene pools within these samples. Two gene pools were detected for the Venezuela-Colombia-Ecuador sample and for the Colombia-Ecuador sample, meanwhile only one gene pool was detected within Ecuador and within Colombia, respectively. (B) The same analysis but applied to a sample of 65 jaguars which represented basically the distribution of this species in northern South America, a fraction of the Andean Cordillera and the center of the Amazon. By means of the parameter USEPOPINF = 0 , three different gene pools were detected as the most likelihood result. By means of the parameter USEPOPINF = 1 and assuming six different subspecies in the area of study in function of previous classifications, two gene pools were detected as the most likelihood result.

(A)	Ln de la verosimilitud			
<i>K</i>	Ven/Col/Ecu	Ecu/ Col	Ecuador	Colombia
1	-570.7	-510.2	-272.2	-169.8
2	-521.5	-468.5	-301.0	-174.9
3	-525.3	-472.9	-321.3	-181.1
4	-532.9	-481.3	-293.9	-182.0
5	-537.2	-487.3	-293.2	-196.9
6	-545.8	-490.0	-287.7	-211.2

(B)		Ln de la verosimilitud		
K	Sin clasificar "a priori"	Clasificad os a "priori" en 6 subespeci es diferentes	K	
1	-927.5	-927.4	7	-914.8
2	-895.7	-902.8	8	-913.6
3	-891.2	-913.5	9	-914.6
4	-893.4	-913.2	10	-915.6
5	-898.8	-912.6		
6	-904.1	-913.7		

