

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**VARIABILIDAD GENÉTICA DEL MONO TITÍ (*Saimiri oerstedii*) EN COSTA RICA: IMPLICACIONES PARA SU CONSERVACIÓN.**

**Informe de Práctica de Especialidad para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Ana Yancy Morales Arce**

**Cartago Enero, 2004**

## RESUMEN

El proyecto tiene como objetivo principal conocer la variabilidad genética del mono tití (*Saimiri oerstedii*) en Costa Rica además de sus implicaciones en la conservación de esta especie; debido a que se le considera como una de las especies amenazadas o vulnerables a desaparecer.

Para ello se utilizaron marcadores de ADN llamados microsatélites, cuyas secuencias se amplificaron utilizando la técnica de PCR. También se estimaron las variables morfométricas de cada individuo y se determinó la dosis de droga más adecuada en el proceso de captura.

Entre los resultados principales se obtuvo que la especie presenta baja variabilidad genética, lo que compromete su existencia a corto plazo. El marcador AP68 no amplifica para esta especie contrario al AP74 con el se obtuvieron tres alelos. En cuanto a la dosis de droga para la captura se recomienda utilizar una dilución 3X de Zoletil 50.

Se recomienda incluir más marcadores para completar la información acerca de la diversidad genética del *S. oerstedii*. El análisis debe ser reforzado con un mayor número de muestras, para que se elabore un plan de conservación del mono tití de forma urgente, que contemple tanto el aspecto genético, como el estado de salud y el ecológico de este primate.

**Palabras clave:** microsatélites, mono tití, PCR, variabilidad genética, marcadores de ADN, especie en peligro, *Saimiri oerstedii oerstedii*, *Saimiri oerstedii citrinellus*.

## **ABSTRACT**

This main objective of this project is to learn about the genetic variability of the tití monkey (*Saimiri oerstedii*) in Costa Rica and to study its implications in the conservation of the species, since it is considered an endangered species.

To this end, DNA markers, called microsatellites, were used. The microsatellites sequences were amplified using the PCR technique. Morphometric variables of each individual were estimated, along with the correct amount of drug to be used for their capture.

During this study, it was discovered that the species has a low genetic variability, which compromises their long term survival. Discovered that the AP68 marker does not amplify this species; the AP74 marker however yielded three alleles. The recommended dosage of drug to capture the monkeys was a Zoletil 50 dilution 3X.

It is advised to utilize more markers to complete the information about the genetic variability of the *S. Oerstedii*. This analysis should be reinforced with more samples, so that a plan for the conservation of the tití monkey can be created. This plan should contemplate the genetic aspects, as well as health and ecological issues.

**Keywords:** microsatellites, tití monkey, PCR, genetic variability, DNA markers, endangered species, *Saimiri oerstedii oerstedii*, *Saimiri oerstedii citrinellus*.

## **DEDICATORIA**

Al SEÑOR TODO PODEROSO, por su infinito amor, por todo lo que me ha dado y por ayudarme a llegar hasta aquí. Por no dejarme en los momentos en que más lo necesité a pesar de todo.

A mis padres, Ana Rosa Arce Araya y Heriberto Morales Anchía, por su apoyo, amor y por darme la posibilidad de estudiar.

A mis hermanos Andrea, Cristian, Adenith y especialmente al pequeño Jarod (pollito) por ser parte muy importante de mi vida.

A Carlos Ml. Hernández, por su paciente amor y por ser ante todo un amigo, un compañero y alguien en quien puedo confiar. Gracias por saber como hacerme sonreír siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial, quisiera agradecer a mi profesor asesor, el Dr. Gustavo Gutiérrez Ezpeleta, por toda su colaboración, paciencia y por ser una verdadera guía.

A Federico Hernández, por su apoyo, amistad y paciencia.

Al MSc. Ronald Sánchez y al Dr. Misael Chinchilla por la paciencia hacia mis preguntas durante las giras y toda su colaboración.

A mis profesores lectores Giovanni Garro y Claudia Zúñiga por su paciencia y comprensión.

A Jeffry, Francisco, Leonardo, Yasmín y a todos los compañeros de giras.

Al MSc. Marco Vinicio Peñaranda, al Dr. Manuel Pontigo y a la Prof. Maritza Guerrero por su gran ayuda.

Agradecer también a mi compañero de laboratorio Juan Pablo Palavicini, a Maurilio Cordero y a todos los que colaboraron de alguna forma con el proyecto.

A todos mis amigos y amigas, especialmente a Karla, Caterine y a Maite por darme una mano cuando la necesité; también a Douglas y Yami por su disposición. A todos ellos les doy gracias por su confianza en mí y por su apoyo.

Para finalizar agradezco a la Escuela de Biología y todos sus profesores, por todos los conocimientos que me transmitieron y por ser un excelente apoyo en mi proceso de aprendizaje.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
INDICE GENERAL .....	6
1. Introducción .....	11
2. Objetivos .....	14
2.1. Objetivo general .....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Revisión de literatura.....	15
3.1. Antecedentes de Primates del Nuevo Mundo .....	15
3.2. Descripción de las subespecies del Género <i>Saimiri</i> presentes en Costa Rica... 16	
3.2.1. Distribución geográfica de las sub- especies .....	16
3.2.2. Tipos de hábitat y hábitos alimenticios del <i>Saimiri oerstedii</i> .....	17
3.2.3. Aspectos poblacionales y de comportamiento generales.....	19
3.3. Estudios genéticos realizados en algunas especies de <i>Saimiri</i> .....	21
3.4. Relevancia de los marcadores moleculares microsatélites (STRs).....	23
4. Materiales y Métodos .....	25
4.1. Áreas de Estudio .....	25
4.1.1. Parque Nacional Manuel Antonio .....	25
4.1.2. Reserva biológica privada Lapa Ríos .....	26
4.1.3. Isla Damas .....	26
4.1.4. Silencio.....	28
4.2. Recolección de muestras de sangre y toma de variables morfométricas.....	28
4.3. Técnicas Moleculares.....	29
4.3.1. Microsatélites utilizados.....	29
4.3.2. Extracción y amplificación del material genético. ....	29
4.3.3. Visualización de productos.....	30

4.4. Análisis de los productos.....	31
4.5. Análisis de datos genéticos y morfométricos.....	32
5. Resultados .....	33
5.1. Variables morfométricas y aplicación de drogas. ....	33
5.2. Resultados del microsatélite AP74 analizado por regiones.....	37
6. Discusión.....	43
7. Conclusiones.....	46
8. Recomendaciones.....	47
9. Bibliografías.....	48
Anexos .....	54

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Número estimado de individuos presentes en el Parque Nacional Manuel Antonio, Parque Nacional Corcovado y Costa Rica.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de los marcadores de microsátélites AP74 y AP68.....	29
<b>Cuadro 3.</b> Cantidad de droga usada en la captura de monos tití ( <i>S. oerstedii</i> ) y duración de su efecto.....	33
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de ocho variables morfométricas y un índice de condición física, entre monos tití ( <i>S. oerstedii</i> ) de la región Pacífico Central y Pacífico Sur de Costa Rica.....	34
<b>Cuadro 5.</b> Correlación existente entre las distintas variables morfométricas para la especie <i>S. oerstedii</i> , a partir de muestras de las regiones del Parque Nacional Manuel Antonio, Refugio de Fauna Silvestre de Silencio, Isla Damas y Reserva bioógica privada Lapas Ríos. Datos asociados entre dos variables; va de -1, aumento de uno disminuye al otro y +1 cuando los dos aumentan.....	35
<b>Cuadro 6.</b> Regresión lineal múltiple a partir del análisis de varianza para seleccionar variables corporales asociadas al peso de los mono tití ( <i>S. oerstedii</i> ) muestreados en las diferentes regiones del país.....	36
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de las variables de cintura y cuerpo por medio de una regresión lineal para escoger una ecuación que prediga el peso de los individuos de <i>S. oerstedii</i> muestreados .....	36



<b>Cuadro 8.</b> Modelo lineal simple con el que se obtiene el valor predictivo del peso de un individuo de <i>S. oerstedii</i> por medio de la medida de cintura (cm).....	37
<b>Cuadro 9.</b> Genotipos encontrados en el loci de microsatélite Ap74 para los mono tífi ( <i>S. oerstedii</i> ) de cuatro localidades de captura.....	39
<b>Cuadro 10.</b> Número de individuos en la muestra (N), número promedio de alelos (n), heterocigosidad esperada y observada (Levene, 1949) en <i>S. oerstedii</i> para las regiones .....	40
<b>Cuadro 11.</b> Valores de Fit, Fis, Fst (Hartl y Clarke, 1989) y Nm (Slatkin y Barton, 1989) para el locus AP74 analizado en monos tífi ( <i>S. oerstedii</i> ) en los sitios de estudio.....	40
<b>Cuadro 12.</b> Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas entre los sitios de captura de mono tífi ( <i>S.oerstedii</i> ). Las distancias genéticas se muestran bajo la diagonal y geográfica (km) sobre la misma.....	41

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución geográfica original del mono tití ( <i>S. oerstedii</i> ) en Costa Rica (Fuente: Wong, 1990a).....	17
<b>Figura 2 .</b> Mapa del Parque Nacional Manuel Antonio (Fuente: Wong, 1990a).....	25
<b>Figura 3.</b> Mapa de la Península de Osa (Fuente: Carrillo <i>et al</i> , 2000).....	27
<b>Figura 4.</b> Bordes costeros de Isla Damas digitalizados de las fotografías aéreas: (A) de 1941 y (B) fotografía aérea de 1998 (Fuente: Lizano y Salas, 2001).....	28
<b>Figura 5.</b> Fotografía de gel de agarosa obtenido de la electroforesis del ADN de <i>S. oerstedii</i> con el microsatélite AP74.....	31
<b>Figura 6 .</b> Frecuencia de alelos en el locus AP74 de individuos muestreados de <i>S. oerstedii</i> para las regiones del Parque Nacional Manuel Antonio, Reserva Biológica Privada Lapa Ríos, Isla Damas y el Refugio de Fauna Silvestre en Silencio.....	37
<b>Figura 7.</b> Frecuencia de alelos en el locus AP74 de individuos de <i>S. oerstedii</i> muestreados en la Región del Parque Nacional Manuel Antonio.....	38
<b>Figura 8.</b> Dendrograma (Nei, 1972) basado en las distancias genéticas de las poblaciones de <i>S. oerstedii</i> localizadas en el Refugio de Fauna Silvestre de Silencio, Parque Nacional Manuel Antonio, Isla Damas y Reserva Biológica Privada Lapa Ríos.....	43

## 1. Introducción

Las amenazas que afectan la vida de los primates no humanos varían según la especie y entre las regiones (Mittermier, 1986). La deforestación, junto con la caza y el comercio ilegal, amenazan la sobrevivencia de los primates silvestres que viven en las regiones del trópico (Gutiérrez-Ezpeleta, 2000).

Una de las especies amenazadas o vulnerables a desaparecer es el mono tití (*Saimiri oerstedii*) (CITES, 2003), que habita en los bosques de Costa Rica y Panamá (Wilson, 2002; Wong, 1990a; Boinski, 1999). Otras especies del género se encuentran en América del Sur, en un área limitada por Colombia al oeste y la cuenca del Amazonas y las Guayanas al este (Wong, 1990a). La separación entre las especies de América Central y las de América del Sur se estima que es de unos 900km (Morera, 2002).

En Costa Rica existen dos subespecies de este género: *S. oerstedii oerstedii* y *S. oerstedii citrinellus* (Wilson, 2002). La subespecie *S. oerstedii citrinellus* se distribuye en las tierras bajas del Pacífico Central (Parque Nacional Manuel Antonio), mientras que los *S. oerstedii oerstedii* al sur de la vertiente pacífica (Parque Nacional Corcovado) (Happel, 1986). La altitud promedio del hábitat de estos primates se encuentra entre los 0 y 300 msnm, aunque se han localizado hasta los 500 msnm (Arauz, 1993; Parque Zoológico Simón Bolívar, 1997).

Tanto *S. oerstedii oerstedii* (endémico de Costa Rica y Panamá) y *S. oerstedii citrinellus* (subespecie endémica de Costa Rica) se consideran en peligro de extinción, principalmente por la pérdida de su hábitat, el desarrollo de infraestructura hotelera y por su captura y venta como mascotas (Cropp y Boinski, 2000; Saénz, 1992; Carrillo *et al*, 2000). La especie está protegida y regulada por la Ley de Conservación de la Vida Silvestre No. 7317, la Ley Orgánica del Ambiente No. 7554 y el decreto No. 26435-MINAE (MINAE, 1999).

Además está incluida en el Apéndice I del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 2003).

En general, los esfuerzos de conservación en Costa Rica han sido principalmente dirigidos a la creación de parques nacionales y áreas protegidas (Mena y Artavia, 1997). Sin embargo, esta estrategia no garantiza la conservación a mediano y corto plazo de las especies de primates y otros animales dentro de las áreas protegidas (Gutiérrez-Ezpeleta, 2000). Es necesario complementar estos esfuerzos con análisis de la diversidad genética, en conjunto con los estudios ecológicos que ya se han llevado a cabo en ciertas especies silvestres. Aunque se han realizado algunos estudios de diversidad desde los años 50-60, se han enfocado principalmente hacia la citogenética y, en menor grado, hacia análisis en isoenzimas y de ADN, por lo que en el país sólo existen estudios puntuales y modestos y la información al respecto está dispersa (MINAE, 1999).

Los estudios en los primates podrían también ilustrar el impacto que han tenido la deforestación y la efectividad de los esfuerzos de conservación en la preservación de la biodiversidad, particularmente en poblaciones animales (Gutiérrez- Ezpeleta, 2000), de ahí la relevancia de este tipo de investigaciones y el gran aporte que podrían hacer en el área de conservación.

Uno de los propósitos del presente estudio fue determinar el grado de variación genética entre individuos de las poblaciones de *Saimiri* en Costa Rica. Estos resultados se obtuvieron por medio de la utilización de marcadores llamados microsatélites o STRs, cuyas secuencias se amplificaron utilizando la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Este proyecto es uno de los cuatro componentes del programa de investigación "Variabilidad genética y determinación del estado de salud del mono congo (*Alouatta palliata*), del mono colorado (*Ateles geoffroyi*), del mono tití (*Saimirii oerstedii*) y del mono cara blanca (*Cebus capucinus*) de Costa Rica: implicaciones para la conservación de estas especies", realizado por un grupo de investigadores, en su mayoría de la Universidad de Costa Rica; bajo la coordinación del Dr. Gustavo A. Gutiérrez Ezpeleta (Biología, UCR), cuyo propósito es cuantificar la problemática de las especies de primates en Costa Rica para proponer un plan de conservación para ellas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

- Caracterizar la variación genética de la especie (*Saimiri oerstedii*) en las poblaciones de Costa Rica, usando loci de microsatélites (MS).

Otros objetivos generales que se generaron durante la realización del proyecto fueron:

- Estimar las medidas morfométricas de los individuos muestreados.
- Determinar la dosis de la droga ideal empleada que presente mejor resultado en la captura de monos tití (*Saimiri oerstedii*) para extraer las muestras de sangre.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Recolectar muestras de sangre de *S. oerstedii* de diferentes regiones de Costa Rica.
- Extraer y purificar el material genético (ADN) a partir de las muestras de sangre de *S. oerstedii* recolectadas.
- Amplificar el ADN probando los marcadores microsatélites AP74 y AP68.

### 3. Revisión de literatura

#### 3.1. Antecedentes de Primates del Nuevo Mundo

El orden Primates es uno de los grupos mas antiguos; sin embargo, su registro fósil es muy incompleto, posiblemente, porque que la formación de fósiles en las áreas tropicales ha sido mas difícil que en las zonas templadas. Los Primates se derivaron de los insectívoros y algunas de las primeras familias de primates fueron difíciles de clasificar por su poca divergencia del plan original de los insectívoros; de esta forma, los primates o monos componen el punto final de una rama destacada desde sus orígenes en el árbol filogenético de los mamíferos (Mora, 2000).

Los listados recientes de primates vivientes dividen a los monos del Nuevo mundo o primates neotropicales (subfamilia Platyrrhini, superfamilia Ceboidea) en 15 géneros. Estos géneros con base en juzgamientos tanto por evidencias morfológicas (fósil y neontológica), como por evidencia de ADN molecular constituyen siete grupos monofiléticos o clados, separados unos de otros desde el oligoceno tardío hasta los tiempos de la mitad del Mioceno, hace unos 25 y 17 millones de años (Escobar, 2002). Estos siete clados se agrupan dentro de tres familias, una de ellas es la Cebidae, con la subfamilia Cebinae que incluye el género *Saimiri* (Robinson, 1987). La divergencia del género *Saimiri* se estima entre 16.5 a 19 millones de años (Cropp y Boinski, 1999).

En la familia Cebidae existen 58 especies comprendidas en 11 géneros, que se localiza desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina (Mora, 2000). En Costa Rica existen cuatro de estas especies las cuales son: *Allouatta palliata*, *Ateles geoffroyi*, *Cebus capucinus* y *Saimiri oerstedii* (Wilson, 2002).

### **3.2. Descripción de las subespecies del Género *Saimiri* presentes en Costa Rica**

Las dimensiones del *S. oerstedii* son: longitud de cabeza-cuerpo 26.6 - 29.1 cm, cola 36.2-39 cm, longitud del pie 7.6-8.6 cm (Mora, 2000). Su peso oscila entre 0.5-1.1 Kg (Robinson, 1987; Mora, 2000). La hembra es mas pequeña que el macho (Reid, 1997).

La espalda, la parte inferior de las piernas, las manos y pies son de color naranja, los hombros y caderas son oliváceos (Mora, 2000). El pelaje de la espalda es un poco largo y con elevaciones (Emmons, 1990). En la cabeza tiene un capuchón negro, el hocico es negro y la cara presenta como una máscara blanca; el macho posee las mejillas y el capuchón más pálidos que la hembra; las orejas y la parte lateral del cuello son blancas (List y Solano, 2001). La cola es olivácea con la mitad distal negra y en la punta posee un pequeño mechón, la cola no es prensil (Muñoz, 1990). La barbilla y cuello son blancos, el resto de las partes inferiores del cuerpo son naranja pálido (Mora, 2000). Son los únicos monos pequeños en Centroamérica con hocico negro y máscara blanca (Emmons, 1990). *S. oerstedii citrinellus* presenta una coloración mas pálida y grisácea que *S. oerstedii oerstedii*, localizada en la zona sur, principalmente el Parque Nacional Corcovado (Boinski, 1997)

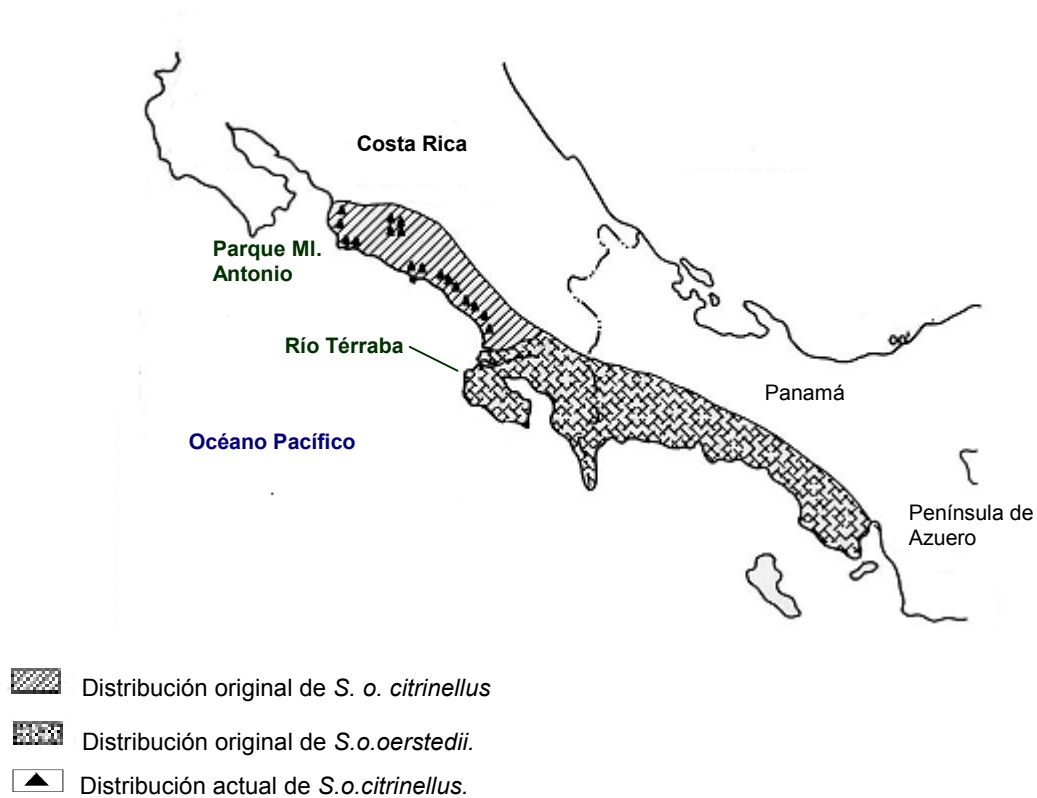
#### **3.2.1. Distribución geográfica de las sub- especies**

*S. oerstedii citrinellus* se localiza principalmente en el Pacífico Central de Costa Rica (Wong, 1990) y se distribuía originalmente en las tierras bajas del Pacífico central, donde el Cerro Herradura (9° 40`N, 84° 35`O) y las montañas de Dota (9° 37`N, 84° 35`O) fueron los límites en el borde noroeste, mientras que el Río Grande de Térraba (8° 25`N, 84° 25`O) era el límite sur (Arauz, 1993) (Fig 1). La distribución actual comprende la misma zona pero se encuentra muy fragmentada, siendo el Parque Nacional Manuel Antonio la única área protegida (Wong, 1990).



Los límites de la distribución actual se encuentran entre los Ríos Parrita y Naranjo: al noroeste Río La Gloria a inmediaciones de la Quebrada Amarilla y al sur los manglares ubicados a inmediaciones de Coronado y el Río Grande de Térraba (UICN/SSC, 1996; Fernández, 1997).

*S. oerstedii oerstedii* se localiza desde la provincia de Chiriquí en Panamá (8° 58'N, 83° 39'O) hasta el Pacífico Sur de Costa Rica (8° 58'N, 83° 39'O) (List y Solano, 2001).



**Figura 1.** Mapa de distribución geográfica original del mono tití (*S. oerstedii*) en Costa Rica (Fuente: Wong, 1990a).

### 3.2.2. Tipos de hábitat y hábitos alimenticios del *Saimiri oerstedii*

Los monos del género *Saimiri* pueden vivir en una gran variedad de hábitats como son: los bosques primarios, secundarios, manglares y bosque de galería. También forrajean en zonas de cultivo ubicadas a lo largo de corrientes de agua (List y Solano, 2001).

Los bosques característicos de distribución en Costa Rica pertenecen al piso basal y premontano de la región tropical; de ellos el bosque húmedo y el bosque muy húmedo premontano ocupan la mayor parte de la zona (Boinski, 1987c).

El hábitat más adecuado para los *Saimiri oerstedii* probablemente sea aquel que esté compuesto por una mezcla de diferentes tipos de vegetación, entre los que destacan el bosque secundario maduro o el bosque primario y bosque secundario con árboles frutales (Wong, 1990b).

Son primates frugívoros e insectívoros y pueden agregar un suplemento adicional de hojas, nueces, semillas, bayas, yemas, flores, resinas, arácnidos y pequeños vertebrados, aprovechan dos tercios o tres tercios de día buscando alimento (Notman, 1988).

El tipo de hábitat más utilizado por *S. o. citrinellus* del Parque Nacional Manuel Antonio es el bosque secundario donde pasan el 50% del tiempo y utilizan el bosque primario en menor grado (0-7%) (Wong, 1990 a).

En el Parque Nacional Manuel Antonio depende en gran medida de frutas cultivadas por el hombre (guaba, banano, mango, maíz, guanábana). Además, las plantaciones de palma africana constituyen una importante fuente de alimento en el sentido de que la espesa maleza que crece en el tronco de las palmas de mayor tamaño y en el suelo sirve de refugio a una gran variedad de invertebrados (Arauz, 1993).

Las actividades más frecuentemente desarrolladas por *S.o.citrinellus* son forrajear cerca del suelo y viajar. Esta última actividad aumenta al final de la estación lluviosa cuando hay mayor escasez de alimento, por esta misma razón, el descanso estacionario disminuye (Boinski, 1989).

El hábitat preferido por los *S. o. oerstedii* es el bosque secundario; y durante la época lluviosa, el bosque primario y tardío (Boinski, 1987b).

En Corcovado, los *S. o. oerstedii* se alimentan principalmente de larvas de escarabajos, mariposas, saltamontes, huevos de aves, frutas, néctar de flores y vertebrados pequeños como lagartijas, aves, ranas y neonatos de murciélagos (Boinski, 1986).

Sin embargo su dieta está determinada por la cantidad de alimento disponible, de ahí que la época lluviosa es un periodo de escasez de alimento porque se reduce la abundancia de artrópodos a causa de la disminución de follaje tierno comestible y la disminución del tiempo de actividad de los artrópodos debido a las fuertes lluvias, por lo cual aumenta el consumo de frutos y flores (Boinski, 1988.; Wong, 1990b).

### **3.2.3. Aspectos poblacionales y de comportamiento generales.**

El mono tití se caracteriza por ser diurno, arborícola y social. Su carácter social se refleja en la formación de grupos de 20 o más individuos (Mora, 2000).

El *S.o.citrinellus*, bajo condiciones naturales, vive en tropas formadas de 22 a 66 individuos, en promedio 30 individuos; de ellos 35% son hembras adultas, 27% infantes, 25% juveniles y 12% machos adultos (Wong, 1990b). Su ámbito de acción varía entre 35 a 63 ha, dependiendo del tamaño del grupo y del hábitat utilizado (Wong, 1990a).

En Corcovado, el *S.o.oerstedii* forma grupos de 38 a 45 individuos que ocupan entre 79 y 110 ha (Boinski, 1987b).

En general, las hembras alcanzan su madurez sexual a los 2.5 a 3 años de edad y los machos a los 4 años (Matamoros y Wong, 1996). Como la gestación tarda 6 meses, las hembras producen la primera cría alrededor de los 3 años (UICN/SSC, 1996). Tienen una cría por gestación y el sistema de apareamiento es polígamo (Mora, 2000).

Los nacimientos se dan principalmente en la estación lluviosa (List y Solano, 2001). En 1990 la tasa de natalidad fue de 76 % (Wong, 1990b). En 1996 se estimó que la natalidad variaba entre 57-89%, pero la proporción de hembras que se reproducen cada año es 90% con algún porcentaje de mortalidad de las crías después del nacimiento; existe un límite bajo de mortalidad juvenil de un 25% (List y Solano, 2001).

Los machos son muy agresivos durante la competencia por las hembras e incluso se hieren unos a otros (List y Solano, 2001). Mientras no haya una relación fuerte entre dominancia y éxito de la monta entre los machos reproductores, los subadultos o machos subordinados son alejados y no pueden reproducirse (List y Solano, 2001). Su periodo de vida es de 20 a 21 años; la probabilidad máxima de vida en condiciones naturales es 10 años; entonces el tiempo de generación podría estar entre 3 y 8 años (Matamoros, 1996). En cautiverio se ha reportado que viven hasta 25 años ya que tienen menor competencia, depredación, problemas ambientales, enfermedades, carencia de alimento y otros factores (List y Solano, 2001).

Las poblaciones de individuos informados para Costa Rica son muy variables (Cuadro 1); las diferencias entre los cálculos hechos por los diferentes autores pueden deberse al método de estimación utilizado (Matamoros y Wong, 1996).

**Cuadro 1.** Número estimado de individuos presentes en el Parque Nacional Manuel Antonio, Parque Nacional Corcovado y Costa Rica.

<b>Fuente</b>	<b>Cantidad de individuos reportados.</b>	<b>Sitio</b>
1984 (Vaughan , C)	186	Parque Nacional Ml .Antonio
1987 (Boinski, S)c	300	Parque Nacional Ml. Antonio
1990 (Wong, G)b	581	Parque Nacional Ml. Antonio
1990 (Wong, G)a	2000	Pacífico Central
1994 (Boinski, S)	Menos de 200	Parque Nacional Ml. Antonio
1994 (Boinski, S)b	Más de 500	Parque Nacional Corcovado
1997 (Boinski,S)	1246	Parque Nacional Corcovado
1996 (PRMVS-VII)	1475-1859	Costa Rica
1996 (Matamoros,Y)	2000	Costa Rica
1997 (Boinski, S)b	Menos de 4000	Costa Rica
2003 (Echeverría, P)	1500	Pacífico Central

### **3.3. Estudios genéticos realizados en algunas especies de *Saimiri*.**

La mayoría de estudios realizados han sido meramente dirigidos hacia aspectos ecológicos de estas especies. Sin embargo se pueden encontrar estudios realizados a partir de material genético, como el de Cropp y Boinski (1999 y 2000) utilizando trozos del genoma del ADN mitocondrial, con los que lograron diferenciar especies de *Saimiri* para usos biomédicos. Además combinando la información con la evidencia de fósiles comprobaron que la especie *Saimiri* presente en Centro América no había sido producto de introducción humana, aparte de determinar las relaciones filogenéticas entre seis especies del género.

Entre los estudios genético poblacionales más importantes, cabe citar el de Banguera y colaboradores (2002) realizado con *S. sciureus* y *S. boliviensis* (10 individuos de cada especie) en Colombia. Ellos utilizaron los microsatélites AP74, AP68 y AP40 en sus estudios. El locus AP74, que es altamente polimórfico, mostró 16 alelos diferentes para *S. sciureus*; los otros microsatélites no mostraron resultados. Además, en este estudio determinaron que los niveles de diversidad genética en *S. sciureus macrodon* y *S. boliviensis peruviensis* en la colección de Iquitos oscila entre  $H = 0.39$  y  $0.56$ .

Ruiz (2000) trabajó en *S. sciureus* con el uso de ocho microsatélites (D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S51, D17S804, AP74 y AP40), el AP40 resultó monomórfico (176 pb), seis de ellos (D6S260, D8S165, D14S51, D17S804, AP74 y D5S111) fueron polimórficos; y el que mostró las mejores características para el análisis fue el marcador AP74. *S. sciureus* presentó un  $H = 0.5206$ ; parecido al nivel de heterocigosidad encontrado en 1990 para *S. sciureus macrodon* y *S. sciurues albigena* por Vandenberg y colaboradores (1990) con un valor de 0.521.

Por otra parte, Silva y colaboradores (1993) en un estudio con electroforesis de proteínas (isoenzimas y grupos sanguíneos). Encontraron que el nivel de heterocigosidad para *S. sciureus sciureus* era de 0.027, mientras que, en *S. ustus* era de 0.013 y para *S. boliviensis* de 0.047.

Sampaio y colaboradores (1991) obtuvieron niveles de heterocigosidad de 0.1513 para *S. boliviensis peruviensis*, 0.1968 en el caso de una población de *S. ustus* y de  $H = 0.4227$  para otra población de esta misma especie; los resultados anteriores fueron obtenidos con el uso del loci de microsatélite CAII.

### **3.4. Relevancia de los marcadores moleculares microsatélites (STRs)**

El término microsatélite se derivó porque inicialmente estas secuencias repetitivas en tandem podían ser separadas del resto del genoma como fracciones sateliticas, cuando se analizaban con gradientes de cloruro de cesio (CATIE, 1995).

Weber y May (1989) y Litt (1989) y colaboradores describieron las repeticiones en tandem de longitud corta "Short Tandem Repeats"(STR) o microsatélites cuya secuencia repetitiva tiene una longitud de 2-7 pb, los cuales pueden o no estar asociadas con genes. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse mas frecuentemente que otros tipos de secuencia, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir similitudes entre especies muy relacionadas (Bruford y Wayne, 1998).

Las repeticiones STR están ampliamente difundidas en todo el genoma y el hecho de que la secuencia repetitiva sea muy pequeña facilita su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su amplificación. Los tipos de repeticiones que ocurren en los microsatélites varían entre las especies. En mamíferos las repeticiones (GT) $n$  son las más comunes ( $n$  representa el número de veces que se repite la secuencia). Dado que GT corresponde a CA en la cadena opuesta del ADN, a través del genoma se encuentran repeticiones de (GT) $n$  y (CA) $n$  (Wright, 1994).

Debido a que estos marcadores son diploides, presentan menor sensibilidad que el ADN mitocondrial, a los efectos de migración diferencial entre sexos. Los mismos, tienen un mayor número de alelos que las isoenzimas y RFLPs, son altamente polimórficos en casi todos los grupos de eucariotas y los iniciadores desarrollados para una especie pueden ser usados en taxa relacionados (Scholötterer *et al*, 1991; Baron *et al*, 1992).

Además juegan un papel importante en el mantenimiento de la hipervariabilidad, pues la variación en las secuencias repetitivas, conduce a una gran variación multialélica y por consiguiente hace que los microsatélites sean invaluableles como marcadores genéticos para detectar polimorfismos (Clisson y Crouau, 2000).

Los microsatélites representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos (Baron *et al*, 1992). Además se utilizan solos o como un complemento de otras metodologías (Escobar, 2002). Utilizando microsatélites se han encontrado diferencias genéticas significativas entre poblaciones silvestres, que habían pasado inadvertidas con la utilización de otros marcadores (Quan, 2002). Dado que estos loci presentan gran variabilidad, alta tasa de mutación, herencia codominante, neutralidad con respecto a selección, son considerados actualmente como el marcador por excelencia para los estudios de genética molecular de poblaciones (Gutiérrez-Ezpeleta, 2000).

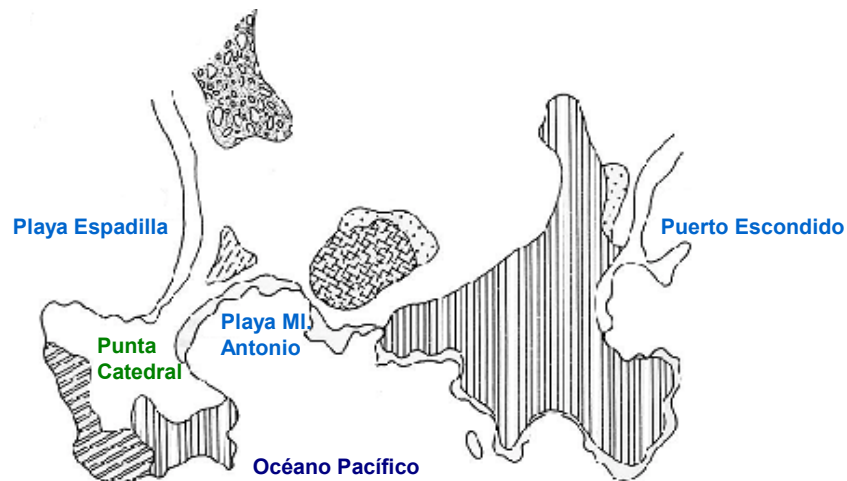


## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Áreas de Estudio

#### 4.1.1. Parque Nacional Manuel Antonio

Ubicado en el Pacífico Central, en la provincia de Puntarenas, a 175 km al sureste de la ciudad de San José (9° 26'N y 84° 09' O). Tiene una extensión de 683 ha, la topografía es accidentada, y presenta pendientes de 20% o más en gran parte del área (Fig 2). La elevación oscila entre 0 a 150 msnm (Wong, 1990a).



**Figura 2.** Mapa del Parque Nacional Manuel Antonio (Fuente: Wong, 1990a).

Los meses más cálidos se pueden situar entre marzo y mayo. Las temperaturas mínimas en las partes bajas no descienden de los 25 °C por lo general (Wong, 1990b). La precipitación varía entre los 3 000 y los 4 000 milímetros anuales, al ascender al sector montañoso la precipitación aumenta registrándose al noreste del puerto de Quepos promedios anuales de precipitación de 4 500 mm. Luego al continuar subiendo la cordillera, la lluvia vuelve a disminuir, hasta obtener promedios anuales de 2 300 mm. La época seca en la zona costera se extiende desde enero hasta marzo, mientras que la lluviosa desde abril a diciembre (Instituto Meteorológico Nacional, 2003).

Aquí también se presenta una disminución de las lluvias entre julio y agosto fenómeno conocido como veranillo de San Juan, el mes más seco es febrero y el más lluvioso es octubre (Instituto Meteorológico Nacional, 2003).

Según la clasificación de Holdridge, el Parque Nacional Manuel Antonio se ubica en una transición de zonas, de bosque húmedo tropical a bosque muy húmedo tropical (Holdridge, 1989).

#### **4.1.2. Reserva biológica privada Lapa Ríos**

La reserva privada Lapa Ríos esta localizada en la Península de Osa (1750 Km<sup>2</sup> aproximadamente) del suroeste de Costa Rica, lat 8° 32' 00 N, long 83° 18' - 83° 31' W (Carrillo *et al*, 2002) (Fig. 3) .

El clima de la Península de Osa es caliente y húmedo con una temperatura promedio anual de 25 ° C y una precipitación de 6000 mm, con la mayor lluvia caída de agosto a diciembre y la menor precipitación entre febrero y abril (Carrillo *et al*, 2002).

De acuerdo a Holdridge, la Península de Osa tienen tres zonas de vida: bosque tropical húmedo, bosque tropical muy húmedo y bosque pluvial premontano (Holdridge, 1979).

#### **4.1.3. Isla Damas**

La Isla Damas se localiza a 12,5 km del parque Nacional Manuel Antonio aproximadamente (9° 27' 26" N, 84° 12' 26" W) (Costa Rica, 1978). La temperatura media anual varía desde los 27 °C hasta los 20 °C. La distribución de las lluvias, tanto en la zona costera como la montañosa, es típica del Pacífico (Instituto Meteorológico Nacional, 2003).

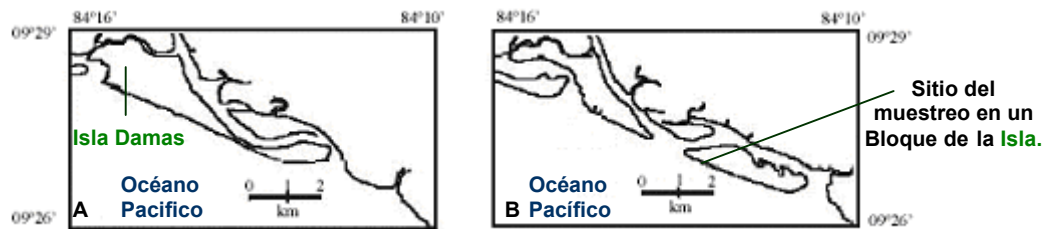
Fue declarada isla continental según el Oficio # 97075 del Instituto Geográfico Nacional (IGN/SC-97075), cuya formación se deriva de un antiguo delta (Lizano, 2001).



**Figura 3.** Mapa de la Península de Osa (Fuente: Carrillo *et al*, 2000).

La isla se formó por los sedimentos de los ríos Parrita y Paquita (Bergoeing, 1998). A este tipo de formaciones se les llama islas barreras o espigas, compuestas básicamente por arena y otros sedimentos transportados por el río, las olas, corrientes de marea y los vientos. La dirección de la espiga indica que el transporte predominante de sedimentos ha sido hacia el este-sureste desde que se tienen registros fotográficos hasta el presente, como se muestra en la figura 4.

Según las versiones de los residentes del lugar, el 21 de agosto de 1997 se produjo un oleaje que partió a la isla en dos bloques, iniciando así, un proceso de erosión alrededor de esta abertura (Lizano y Salas, 2001).



**Figura 4.** Bordes costeros de Isla Damas digitalizados de las fotografías aéreas: (A) de 1941 y (B) fotografía aérea de 1998 (Fuente: Lizano y Salas, 2001).

#### 4.1.4. Silencio

En la región de Silencio, a unos 15.5 km del Centro de Quepos se encuentra un Refugio de Fauna silvestre. En este refugio se albergaban monos tití (*S. oerstedii*) en cautiverio, que habían sido decomisados y de los cuales se obtuvieron muestras de dos de ellos.

#### 4.2. Recolección de muestras de sangre y toma de variables morfométricas

Las muestras de sangre fueron colectadas de un total de 22 de individuos (Anexo 1). Para la captura de los animales se utilizó dardos (PNEU-DART ing, 1 cc, 1/2") lanzados con rifle de gas comprimido (CO<sub>2</sub>) los cuales contenían anestésico Zoletil 50 a una concentración aproximada de 0.2 mg por kg de peso, variando las diluciones de 1X-3X y en algunas excepciones aplicándose ketamina para completar el proceso de anestesia, una vez que el animal había sido capturado (Anexo 2). Se utilizaron redes para la captura de los animales para amortiguar su caída. Para cada individuo se anotaron datos sobre peso (lb, onz), medidas corporales (cm) como: largo de cola, brazo, pierna, cintura, cuello, pecho, región palmar, región plantar, cuerpo y sexo (Anexo 1). Se obtuvo 1-2 ml de sangre de la vena femoral de cada individuo adulto y 1 ml de cada juvenil. Las muestras se mantuvieron a 4° C hasta que fueron traídas al laboratorio para su procesamiento y almacenamiento.

Los animales se observaron hasta que pasara completamente el efecto de la anestesia y pudieran reincorporarse por sus propios medios. Se obtuvieron 20 muestras de la Región Pacífico Central, de las cuales 2 provinieron del Refugio de Fauna Silvestre de Silencio, 1 de la Isla Damas y 17 de la localidad del Parque Nacional Manuel Antonio. Además se obtuvieron 2 muestras de la Reserva Privada Lapa Ríos, cerca del Parque Nacional Corcovado.

### 4.3. Técnicas Moleculares

#### 4.3.1. Microsatélites utilizados

Las muestras se analizaron con dos marcadores microsatélites (STRs) de ADN nuclear (AP68 y AP74). Los marcadores fueron desarrollados para *Alouatta palliata* (Ellsworth y Hoelzer, 1998) y sus motivos de repetición fueron respectivamente (TG)<sub>17</sub> y (TG)<sub>19</sub>. Un resumen del tipo de repetición, la secuencia de los iniciadores y los alelos descritos para cada marcador se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Descripción de los marcadores de microsatélites AP74 y AP68 utilizados.

Microsatélites	Motivo de repetición	Ámbito de longitud	Iniciador adelante Iniciador atrás	Temp. (°C) de unión del iniciador
AP74	(TG) <sub>19</sub>	154	5'- TGCACCTCATCTCTTTCTCTG-3' 5'- CATCTTTGTTTTCTCATAGC-3'	52
AP68	(TG) <sub>17</sub>	190	5'-TGTTGGTATAATCTTTCCTA-3' 5'CATACACCTTTGAGTTTCT-3'	50

#### 4.3.2. Extracción y amplificación del material genético.

Los análisis de laboratorio se realizaron en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. El ADN fue aislado de las muestras de sangre obtenidas, usando dos diferentes protocolos de extracción: usando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, 1999) en 14 individuos, y el kit NucleoSpin Blood para los 8 individuos restantes (2002) (Anexo 3).

Tras las extracciones se procedió a amplificar el ADN de los microsatélites por medio de la técnica de PCR. Las reacciones de PCR se prepararon para un volumen final de 25 µl y los componentes utilizados fueron: 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2.5 µl de buffer 10X, 0.5 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl de cada iniciador, 18.6 µl de agua - PCR, 0.4 µl de Taq polimerasa (2 unidades) y 1 µl de ADN.

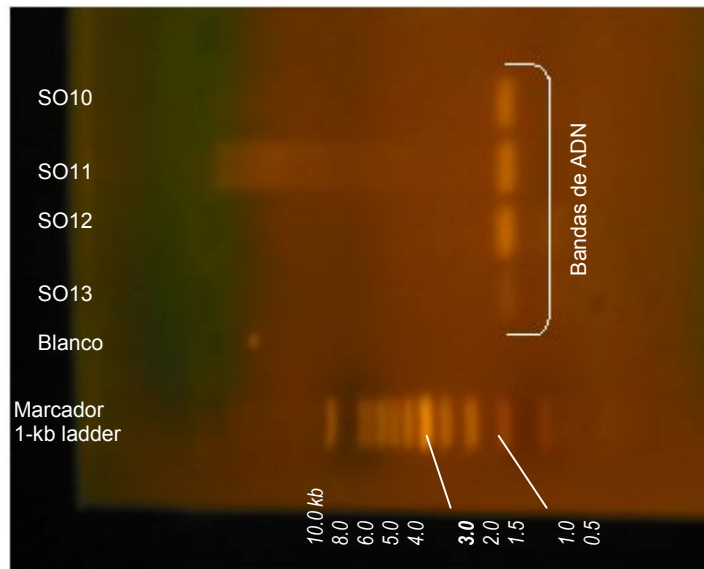
Se utilizó un termociclador Mastercycler Personal Eppendorf, en un inicio y luego, un termociclador Geneamp PCR System 9600 de Perkin Elmer. Las temperaturas utilizadas fueron las siguientes: 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, un minuto a la temperatura de unión (50 °C para AP68, 52 °C para AP74) y un minuto a 72 °C.

El iniciador AP68 se probó en diez oportunidades con los 22 individuos siguiendo las especificaciones de Ellsworth y Hoelzer (1998). Sin embargo en ninguno de los casos se obtuvo amplificación. Con respecto al iniciador AP74 no se obtuvieron datos para tres individuos. Por tanto, los datos que se muestran aquí se basan exclusivamente en el microsatélite AP74.

#### **4.3.3. Visualización de productos**

Los productos de amplificación del PCR fueron corridos en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) el cual fue empleado para verificar que las muestras realmente habían amplificado. Después de 30 minutos, en una cámara con buffer TAE 1X, a 100 V constantes, se extrajo el gel de agarosa y fue colocado en un transiluminador de luz UV. La calidad del gel se verificó mediante comparación con el marcador de peso molecular 1 Kb-ladder (Fig 5).

Una vez que se confirmaba la amplificación los productos fueron guardados a 4 ° C hasta el momento en que se colocaran en el analizador genético.



**Figura 5.** Fotografía de gel de agarosa obtenido de la electroforesis del ADN de *S. oerstedii* con el microsatélite AP74.

#### 4.4. Análisis de los productos

Se utilizó el analizador genético ABI Prism 310 (Perkin - Elmer) para el procesamiento de las muestras amplificadas. Cada muestra se preparó con 0.5  $\mu$ l del marcador ROX, 12  $\mu$ l de formamida y 1  $\mu$ l de ADN amplificado. Luego estuvieron durante 6 minutos en el termociclador a 95°C con el fin de desnaturalizar la doble hélice e inmediatamente se colocaron en hielo con el fin de mantener dicha hélice abierta.

Una vez preparadas se colocaron en el analizador y se dieron los parámetros especificados para el marcador Rox y el polímero Pop 4 empleados por este. Los resultados se leyeron utilizando el programa el software GeneScan 3.1 (Perkin Elmer - Biosystem) para luego obtener los genotipos en el software Genotyper 2.1 (Perkin Elmer - Biosystem).

#### **4.5. Análisis de datos genéticos y morfométricos.**

Los microsatélites generan datos sobre número promedio de alelos, frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas. La variación genética dentro de las poblaciones estudiadas se midió por medio de la heterocigosidad esperada (Levene, 1949). Además se calcularon las desviaciones de las proporciones Hardy-Weinberg así como el flujo genético por medio de los valores  $Nm$  (Stlatkin y Barton, 1989). Se construyeron dendrogramas para los sitios de captura por el programa Popgene 1.32 utilizando la distancia genética de Nei (Nei, 1972). Al mismo tiempo se compararon distancias genéticas entre las poblaciones muestreadas. La evaluación estadística se realizó con el programa Popgene 1.32 (Yeh y Boyle, 1999).

En el caso de las medidas morfológicas se realizó un análisis de varianza por medio del programa Excel, para determinar diferencias de las medidas entre los sitios de muestreo así como la correlación entre estas, con las cuales se pudiera determinar un modelo de regresión,  $Y=b_0+b_1X$ , que se ajustara a esas medidas.\*

---

\* Pontigo, M. 2003. (Comunicación personal).



## 5. Resultados

### 5.1. Variables morfométricas y aplicación de drogas.

**Cuadro 3.** Cantidad de droga usada en la captura de monos tífi y duración de su efecto.

Dosis	Concentración	Tiempo de recuperación
I	Zoletil (2X) + Ketamina (1X)	8-10 h
II	Zoletil (2X)	6 h aprox.
III	Zoletil (3X)	2-4h

En el caso en que se aplicó 0.1 de Ketamina 1X además de la dosis de 0.2 de Zoletil se dio un retraso en el tiempo de recuperación (8-10 h. aprox), en comparación con la aplicación de Zoletil 2X únicamente (6 h aprox) y aún menor fue el tiempo de recuperación cuando las dosis fueron de Zoletil 3X (2-4h) (Cuadro 3).

No se encontró diferencias significativas entre los tamaños de pierna derecha, mano derecha, cintura, pecho, cola, cuerpo, cuello y además entre el peso de los monos capturados en el Parque Nacional Manuel Antonio. Sin embargo al hacer la comparación entre las poblaciones del Parque Nacional Manuel Antonio, Reserva Biológica Privada Lapa Ríos y el Refugio de Fauna Silvestre de Silencio en cuanto al peso se presentaron diferencias significativas ( $F_{0.05}=3.05$ ,  $p=0.05$ ). Las poblaciones que presentaron las diferencias significativas fueron entre la Reserva Lapa Ríos y el Refugio de Fauna de Silencio ( $T_{0.05}= 2.11$ ,  $p=0.04$ ) y mayor aún entre Manuel Antonio y Silencio ( $T_{0.05} = 2.48$ ,  $p=0.02$ ), a diferencia de ellos entre Lapa Ríos y Manuel Antonio no se presentaron diferencias significativas entre los pesos de los individuos. Respecto al tamaño de cola también se presentaron diferencias significativas entre los sitios ( $F_{0.05}=3.37$ ,  $p=0.04$ ), dándose la diferencia específicamente entre Silencio y Manuel Antonio ( $T_{0.05}= 2.07$ ,  $p=0.05$ ) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Comparación de ocho variables morfométricas y un índice de condición física, entre monos Tití (*Saimiri oerstedii*) de la región Pacífico Central y Pacífico Sur de Costa Rica.

	PARQUE NACIONAL MANUEL ANTONIO		REFUGIO DE FAUNA SILVESTRE SILENCIO		ISLA DAMAS	RESEVA BIOLÓGICA PRIVADA LAPA RÍOS		F	P
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Promedio	Desviación estándar		
Peso	2.4	0,8	0.9	0,05	1	2.7	0,1	3.05	0.05*
Cuello	12.1	2,2	12.5	0,5	8	11	0	1.38	0.27
Cintura	13.3	1,9	11	0	10	12.7	1,2	1.72	0.19
Cola	39.3	2.8	35	2	32	38.5	0,5	3.37	0.04*
Cuerpo	27.6	3,6	27	1	23	26.5	0	0.58	0.63
Pecho	17.5	1,9	16	0	13	17	1	2.05	0.14
Pata derecha	23.4	2.5	22.5	0.7	21	24.2	0.3	0.48	0.69
Mano derecha	18.4	2.9	16.7	1.25	16	18.3	1,3	0.38	0.76
ICF**	0.10	0.04	0.042	0.004	0.047	0.11	0.004	2.06	0.14

\* Diferencias estadísticamente significativas con un alfa de 0.05.

\*\* Índice de Condición Física= Peso corporal/ largo de pata derecha.

De las correlaciones entre las medidas corporales (variables morfométricas) que se presentaron, las mas altas fueron entre las variables cintura / peso ( $r^2 = 0.8377$ ,  $p = 0.000$ ,  $g.l = 20$ ), pecho / peso ( $r^2 = 0.8475$ ,  $p = 0.000$ ,  $g.l = 20$ ) y cintura / pecho ( $r^2 = 0.9318$ ,  $p = 0.000$ ,  $g.l = 20$ ) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Correlación entre las distintas variables morfométricas para la especie *S. oerstedii*, a partir de muestras de las regiones del Parque Nacional Manuel Antonio, Refugio de Fauna Silvestre de Silencio, Isla Damas y Reserva Biológica Lapas Ríos (Datos asociados entre dos variables; va de -1, aumento de uno disminuye al otro y +1 cuando los dos aumentan).

<b>VARIABLE</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>G.L = 20</b>
Peso /Cuello	0.5421	0.0091	
Peso/ Cola	0.5619	0.0065	
Peso/ Cuerpo	0.6490	0.0011	
Peso/ Cintura	0.8377	0.0000	
Peso/ Pecho	0.8475	0.0000	
Peso/ Brazo	0.2905	0.1898	
Peso/ Pata	0.3562	0.1037	
Cuello/ Cola	0.4423	0.0393	
Cuello/ Cuerpo	0.3418	0.1195	
Cuello/ Cintura	0.6539	0.0010	
Cuello/ Pecho	0.6568	0.0009	
Cuello/ Brazo	-0.0511	0.8212	
Cuello/ Pierna	0.1665	0.4589	
Cola/ Cuerpo	0.1456	0.5181	
Cola/ Cintura	0.5456	0.0086	
Cola/ Pecho	0.5791	0.0047	
Cola/ Brazo	0.5094	0.0154	
Cola/ Pierna	0.4988	0.0181	
Cuerpo/ Cintura	0.6345	0.0015	
Cuerpo/ Pecho	0.6827	0.0005	
Cuerpo/ Brazo	0.1726	0.4425	
Cuerpo/ Pierna	0.0430	0.8495	
Cintura/ Pecho	0.9318	0.0000	
Cintura/ Brazo	0.2568	0.2486	
Cintura/ Pierna	0.4355	0.0428	
Pecho/ Brazo	0.2080	0.3529	
Pecho/ Pierna	0.3336	0.0965	
Brazo/ Pierna	0.3014	0.1728	

**Cuadro 6.** Regresión lineal múltiple a partir del análisis de varianza para seleccionar variables corporales asociadas al peso de los mono tití (*S. oerstedii*) muestreados.

	<b>Coefficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Probabilidad</b>
Intercepción	-5,5698	2,0250	-2,7505	0,0156
Cuello	-0,0127	0,0854	-0,1484	0,8841
Cola	0,0523	0,0657	0,7967	0,4389
Cuerpo*	0,0572	0,0573	0,9980	0,3352
Cintura*	0,1704	0,1872	0,9104	0,3780
Pecho	0,1270	0,1986	0,6394	0,5329
Brazo	0,0033	0,0579	0,0568	0,9555
Pierna	0,0001	0,0662	0,0015	0,9988

\* Variables que muestran la mayor asociación por su baja probabilidad.

Al existir varias variables correlacionadas se procedió a realizar una regresión lineal múltiple para elegir las medidas corporales más asociadas con el peso. Este modelo revela que las variables morfométricas con mayor asociación al peso de los monos tití muestreados son el largo del cuerpo y la cintura (Cuadro 6).

**Cuadro 7.** Comparación de las variables de cintura y cuerpo por medio de una regresión lineal para escoger una ecuación que prediga el peso de los individuos de *S. oerstedii* muestreados.

	<b>Coefficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Probabilidad</b>
Intercepción	-3,4837372	0,9231921	-3,7735776	0,001285
Cuerpo	0,053365	0,0422577	1,2628449	0,2219239
Cintura	0,3350231	0,0731743	4,5784231	0,0002052 **

\*\* Probabilidad menor equivale a variable más asociada con el peso proporcionalmente.

A partir de una regresión lineal múltiple entre las variables más asociadas (Cuadro 6) se eligió por medio de una regresión simple la medida de la cintura como la variable morfométrica que podía asociarse directamente con el peso de los individuos (*S. oerstedii*) capturados, al presentar la menor probabilidad (Cuadro 7).

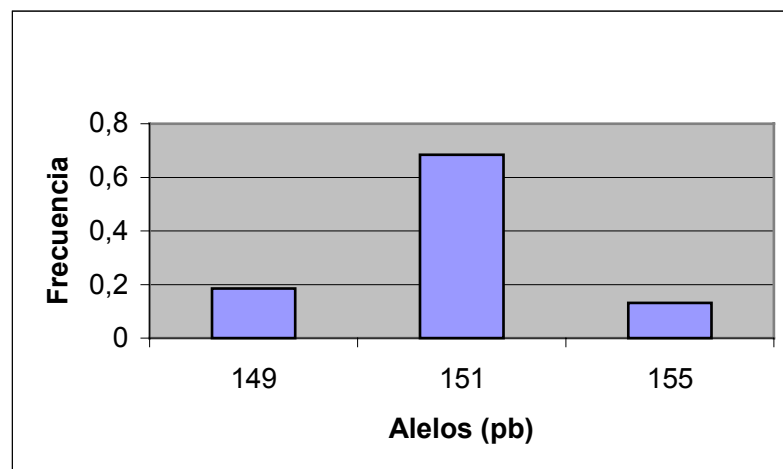
La regresión lineal realizada entre las variables se resume en un modelo lineal simple donde se puede sustituir la incógnita (X) por la medida de la cintura en centímetros, de forma que se pueda predecir el peso de los monos tífi muestreados (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Modelo lineal simple con el que se obtiene el valor predictivo del peso de un individuo de *S. oerstedii* por medio de la medida de cintura (cm).

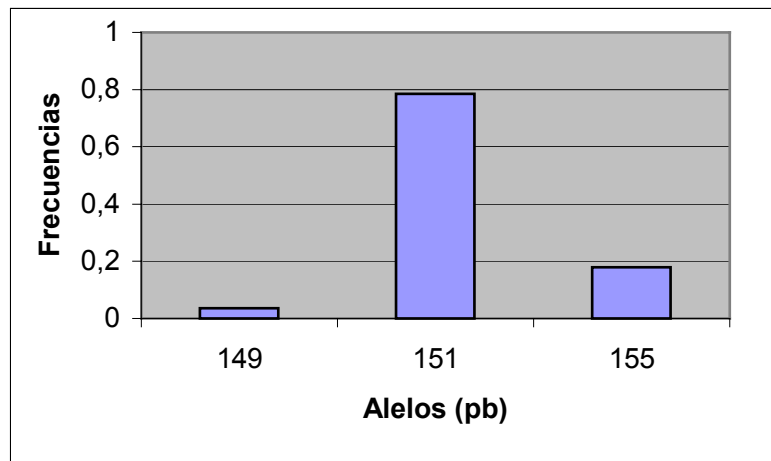
$Y = b_0 + b_1 * X$	Modelo Lineal
Intersectada	-2,3803
Pendiente	0,3652
R. Cuadrada	0,6748
Cociente de f	31,1264
Probabilidad	0,000053

## 5.2. Resultados del microsatélite AP74 analizado por regiones.

Las regiones en estudio presentaron tres alelos (149 pb, 151 pb y 155 pb) de los cuales el de mayor frecuencia correspondió al de 151 pb.



**Figura 6.** Frecuencia de alelos en el locus AP74 de individuos muestreados de *S. oerstedii* para las regiones del Parque Nacional Manuel Antonio, Reserva Lapa Ríos, Isla Damas y el Refugio de Fauna de Silencio.



**Figura 7.** Frecuencia de alelos en el locus AP74 de los monos tití muestreados en la Región del Parque Nacional Manuel Antonio.

En Manuel Antonio los monos tití también mostraron los alelos de 149, 151 y 155 pb y la mayor frecuencia la presentó el alelo de 151 pb (Fig 7).

La presencia de los alelos encontrados (figuras 6 y7) se dio en 4 genotipos diferentes para la región del Parque Nacional Manuel Antonio; mientras que en la Reserva Biológica Lapa Ríos se presentó solo 1 genotipo y 1 alelo. Por otra parte tanto la región de Isla Damas como la de Silencio presentaron 1 y 2 genotipos respectivamente con los 2 mismos alelos (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Genotipos encontrados en el loci de microsatélite Ap74 para los mono tití (*S. oerstedii*) de cuatro localidades de captura.

Localidades	Genotipos
<b>Parque Nacional Manuel Antonio</b>	
SO03	B B
SO04	B B
SO06	B B
SO07	B B
SO10	B C
SO11	B B
SO14	B C
SO15	B B
SO16	A B
SO17	C C
SO18	B C
SO20	B B
SO21	B B
SO22	B B
Total de genotipos	4
<b>Refugio de Fauna de Silencio</b>	
SO01	A B
SO02	B B
Total de genotipos	2
<b>Isla Damas</b>	
SO19	A B
Total de genotipos	1
<b>Reserva Biológica Privada Lapa Ríos</b>	
SO12	A A
SO13	A A
Total de genotipos	1
<b>Total de genotipos</b>	<b>4</b>

\*El alelo A = 149 pb, el B = 151 pb y C = 155 pb.

**Cuadro 10.** Número de individuos en la muestra (N), número promedio de alelos (n), heterocigosidad esperada y observada (Levene, 1949) en *S. oerstedii* para las regiones en estudio.

Ubicación	N	n	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada
Manuel Antonio	14	1.5	0.2857	0.3624
Silencio	2	1.6	0.5000	0.5000
Lapa Ríos	2	1	0.0000	0.0000
Isla Damas	1	2	1.0000	1.0000
Total de poblaciones	19	1.9	0.3158	0.4936

El número promedio de alelos fue mayor en Isla Damas con 2 (por presentar sólo un individuo), seguido por el Refugio de Fauna Silvestre de Silencio con 1.6, el Parque Nacional Manuel Antonio con 1.5 y por último la Reserva Biológica Lapa Ríos con 1. En general el número promedio de alelos fue de 1.9 y la heterocigosidad observada en el total de los individuos *S. oerstedii* fue menor que la heterocigosidad esperada (Cuadro 10).

**Cuadro 11.** Valores de  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  (Hartl y Clarke, 1989) y  $N_m$  (Slatkin y Barton, 1989) para el locus AP74 analizado en monos tití (*S. oerstedii*) en los sitios de estudio

	$F_{IT}$	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$N_m^*$
Manuel Antonio	0.3494	0.2174	0.1687	1.2321
Todos los sitios	0.1728	-0.4583	0.4328	0.3276
P	0.3373	0.8707	0.4139	

$$* N_m = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}.$$

Los valores de  $F_{ST}$  no fueron significativamente diferentes de cero entre los sitios estudiados, lo que sugiere una homogeneidad genética entre las localidades de captura. Los valores de  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$  se presentan negativos cuando existe un exceso de heterocigotos y positivos con un exceso de homocigotos, midiendo la existencia de equilibrio H-W a nivel poblacional total y a nivel subpoblacional.



En el cuadro 11 se observa que tanto el valor de  $F_{IS}$  como el de  $F_{IT}$  no presentan diferencias significativas a cero tanto en Manuel Antonio como en los todos los sitios de captura, lo cual indica que no hay un exceso de homocigotos o heterocigotos entre las localidades. El valor de flujo genético ( $Nm$ ) fue mayor en Manuel Antonio (1,23) en comparación los sitios estudiados en general (0,32) (Cuadro 11).

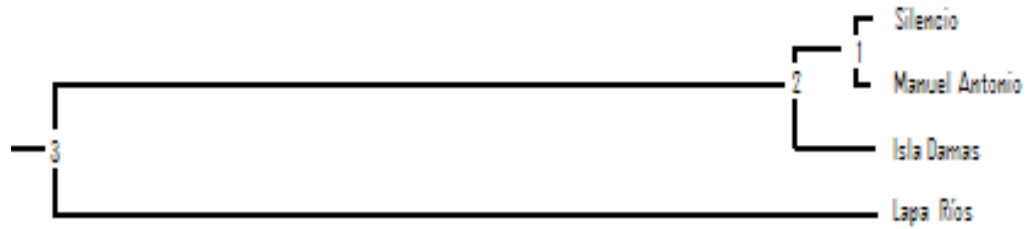
**Cuadro 12.** Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas entre los sitios de captura de mono tití (*S.oerstedii*). Las distancias genéticas se muestran bajo la diagonal y geográfica (km) sobre la misma.

Localidad	(1)	(2)	(3)	(4)
(1) Refugio de Fauna Silvestre Silencio	****	13.5	127.5	23.5*
(2) Parque Nacional Manuel Antonio	0.0638	****	135	12.5
(3) Reserva Biológica Privada Lapa Ríos	1.1513	3.1172	****	148.5
(4) Isla Damas	0.1116	0.3283	0.3466	****

\* Los individuos que representan la región de Silencio se encontraban en cautiverio y provenían de la región de Manuel Antonio.

En el cuadro 12 se observa que las localidades con menor distancia genética entre ellas son las de Refugio de Fauna Silvestre de Silencio y el Parque Nacional Manuel Antonio (0.06) seguida Refugio de Silencio con Isla Damas (0.11). También las localidades de Isla Damas – Parque Nacional Manuel Antonio presentaron una distancia genética semejante a las anteriores (0.32).

Las poblaciones de la Reserva Biológica Lapa Ríos y el Parque Nacional Manuel Antonio presentan la mayor distancia genética entre las poblaciones (3.11), mientras que entre la Reserva Lapa Ríos y el Refugio de Fauna de Silencio e Isla Dama se presenta una distancia genética menor a la anterior (1.15 y 0.34 respectivamente), siendo estas las que a su vez consecuentemente presentan las mayores distancias geográficas. El valor de distancia genética se refiere a la porción de elementos genéticos que no comparten 2 poblaciones.



**Figura 8.** Dendrograma (Nei, 1972) basado en las distancias genéticas de las poblaciones de *S. oerstedii* localizadas en el Refugio de Fauna Silvestre de Silencio, Parque Nacional Manuel Antonio, Isla Damas y Reserva Biológica Privada Lapa Ríos.

En el dendrograma de la figura 8 se ilustran las distancias genéticas que se presentan entre las diferentes regiones del muestreo de monos tití (*S. oerstedii*) a partir de los resultados con el microsatélite AP74.

## 6. Discusión

La comparación de medidas morfométricas entre todos los individuos de *S. oerstedii* analizados resaltó diferencias únicamente en pesos y tamaños de la cola; lo cual es comprensible debido a que los animales presentaban diversas edades y estados de desarrollo (Cuadro 4). Además la correlación de las medidas morfológicas demostró la relación del peso con la cintura de cada mono tití (Cuadro 5). El peso en cada uno se puede predecir por medio de un modelo lineal simple de regresión que permite pronósticos de una variable (peso) por otra (medida de cintura),  $Y = -2,3803 + 0,3652 X$  ( $R^2=67,48\%$ ) (Cuadros 6 y 7). El peso de un primate puede darnos una idea de su edad y, a la vez es un parámetro importante en la determinación de dosis de droga adecuada para captura (Glander, 1991). Debido a que los tití presentan el peso más bajo entre las especies de primates de Costa Rica (Mora 2000), la aplicación de las drogas para captura, como el Zoletil o Ketamina, debe ser en dosis muy diluidas (List y Solano, 2001), como la dilución 3X de Zoletil (Cuadro 3).

Es importante destacar que tanto los resultados morfométricos como los genéticos que se presentan (Cuadros 4 y 10), posiblemente estén muy influenciados por el tamaño de la muestra y el bajo número de loci examinados (Szapkievich, 1998). Además los microsátélites utilizados no fueron fabricados para especies de *Saimiri* específicamente (Ellsworth y Hoelzer, 1998) y uno de ellos (AP68) no amplificó posiblemente por estar sometido a la selección constrictiva y a tasas de mutación por generación diversas en diferentes taxas de primates neotropicales (Ruiz, 2001).

La variabilidad genética se mide por el índice de heterocigosidad (H), un resultado aceptable es de esta variabilidad es  $H= 0,6$  (Cantero, 2000). En este estudio los valores de heterocigosis promedio (H) y el número medio de alelos para cada región se resumen en las figura 6 y 7 y los cuadros 9 y 10. Dichos valores son más bajos que los mostrados por otros estudios que utilizaron igualmente el marcador AP74 en otras especies del género ( $H= 0.51$  (Ruiz, 2001) y  $H= 0.521$  (Vandberg, 1990) en *S. sciureus*;  $H= 0.39$  y  $0.56$  en *S. sciureus macrodon* y *S. boliviensis peruviensis*, respectivamente (Banguera, 2002)).

Sin embargo cuando la comparación se hace con los índices de variabilidad observados en la literatura de estudios que usaron de otros marcadores, para distintas especies y poblaciones del género *Saimiri* se encuentra una coincidencia en los bajos valores hallados ( $H= 0.1513$  en *S. boliviensis peruviansis*,  $H=0.1968$  en *S. ustus* y  $H= 0.4227$  en otra población de *S.ustus*. (Sampaio, 1991);  $H=0.027$  en *S. sciureus sciureus*,  $H= 0.013$  en *S. ustus* y para *S. Boliviensis*  $H= 0.047$  (Silva, 1993)).

La baja variabilidad genética observada (cuadros 10 y 11) para *S. oerstedii* podría deberse al efecto del tamaño muestral y a la disminución del tamaño poblacional como consecuencia de la fragmentación del hábitat de esta especie por la deforestación (Vargas, 1994) (Anexo 5). Según Sánchez, los monos han perdido espacio, viven en grupos pequeños aislados y sin corredores biológicos para cruzarse (Cantero, 2000). Esto implica cruzamientos entre los parientes dando lugar a un elevado número de alelos recesivos que podrían ser deletéreos en los descendientes (Frankham, 1995). Por lo anterior los miembros de las poblaciones de monos tití podrían ser muy homogéneos, lo que a su vez comprometería su supervivencia frente adversidades. Por ejemplo, frente a una epidemia todos podrían morir, pero si existiera variabilidad algunos sobrevivirían, lo que les permitiría multiplicarse nuevamente (Cantero, 2000).

Gutiérrez Ezpeleta citado por Cantero (2000) indica está demostrado que, entre más variable sea el material genético de una especie su sistema inmunológico puede responder mejor a las enfermedades (agentes patógenos), de ahí la importancia de este valor.

Además si una población de un organismo que constituye una especie está bien adaptada para ocupar y reproducirse con éxito en su ambiente podríamos asumir que sus miembros son genéticamente homogéneos porque los alelos más favorables de cada locus se han fijado (Frankham, 1995). Sin embargo, los datos actuales apoyan la idea que el acervo genético de una población diploide mantiene un alto grado de heterocigosidad.

Esta diversidad está oculta, por así decirlo, porque no es necesariamente aparente en el fenotipo. Tal diversidad puede muy bien servir para que la población se adapte a los cambios ambientales y promover la supervivencia de las especies (Frankham, 1995).

Para que una población de *S. oerstedii* sea viable genéticamente se requiere que la población efectiva mínima tenga un tamaño de 5000 individuos (Boinski, 1997), sin embargo este número difiere en mucho de los obtenidos en diferentes censos como se muestra en el cuadro 1.

Por otro lado las distancias genéticas indican que las poblaciones del Pacífico Sur y las del Pacífico Central se encuentran muy separadas, no sólo geográficamente sino también genéticamente, lo que podría confirmarse mediante un muestreo mayor en Corcovado, que determine mejor las diferencias genéticas entre las poblaciones como subespecies distintas. Las regiones de Silencio, Isla Damas y Parque Nacional Manuel Antonio se encuentran muy relacionadas genéticamente, principalmente los individuos de Silencio con los de Manuel Antonio ya que probablemente ellos provengan de alguna de estas tropas, pues se conoce que provienen de un mismo perfil genético y además, se encuentran bajo condiciones ambientales similares. La relación entre Manuel Antonio con Isla Damas podría deberse a que provienen de una misma tropa ancestral dividida como consecuencia de los procesos geológicos de la zona, que provocaron la formación de la isla y a su dinámica (Lizano y Salas, 2001).

Los resultados de este proyecto no son alentadores para la especie pues muestran la clara tendencia de que su supervivencia se encuentra comprometida a corto plazo. El realizar un estudio genético de esta índole es de gran importancia para la conservación de *S. oerstedii*, ya que permite elaborar un plan de conservación realmente efectivo. Un plan que ayude a la reintroducción de individuos basados en las necesidades genéticas de cada población. Por lo anterior se espera que con una combinación de estos resultados, más estudios futuros con otros microsatélites, puedan brindar la información necesaria para realizar estos planes.

## 7. Conclusiones

- El marcador microsatélite AP68 no amplifica en la especie *S. oerstedii*.
- *S. oerstedii* presenta índices de variabilidad genética bajos, con el marcador microsatélite AP74.
- Se necesitan más marcadores para completar el estudio genético de *S. oerstedii*.
- El realizar un estudio genético es de gran importancia en la elaboración de un plan, que ayude a la traslocación de estos individuos basándose en la composición genética, ecológica y la salud de cada población.
- Existe una correlación entre el peso y la cintura de cada mono tití que puede predecir una variable (peso) por otra (medida de cintura),  $Y = -2,3803 + 0,3652 X$  ( $R^2=67,48\%$ ), por medio de un modelo lineal simple de regresión.
- La aplicación de las drogas para captura, como el Zoletil o Ketamina, debe ser en dosis muy diluidas como la dilución 3X de Zoletil.

## 8. Recomendaciones

- Se recomienda aumentar el número de muestras en las regiones de Manuel Antonio, Isla Damas y Corcovado y además incluir más marcadores microsatélites previamente probados en otras especies del género *Saimiri* para completar la información acerca de la diversidad genética del *S. oerstedii*.
- Otra recomendación es elaborar un plan de manejo con la mayor brevedad que integre la información genética completa con análisis clínicos y ecológicos. En el caso de ser necesarias las reubicaciones, se debe considerar el análisis clínico exhaustivo y la constitución genética con el fin de evitar la reintroducción de enfermedades en poblaciones que no las padecían anteriormente
- Para conectar las poblaciones geográficamente aisladas de manera natural es recomendable la construcción de corredores biológicos entre sus hábitats.
- Se recomienda continuar la investigación genética, sobre esta especie para conocer más sobre su estado y dinámica poblacional.

## 9. Bibliografías

- ARAUZ, J. 1993. Estado de conservación del mono tití (*Saimiri oerstedii*) en su área de distribución original, Manuel Antonio, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 97 p.
- BANGUERA, E.; RUIZ, M.; GALVEZ, H.; ALVAREZ, D. 2002. Discriminación de especies de los géneros *Saimiri* y *Aotus* mediante la técnica de RAPD y STRPs: Un estudio preliminar para la identificación de diferencias ínterespecíficas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. En revisión.
- BARON, B.; POIRIER, C.; SIMON, D.; BARNIER, C.; GUENET, J. 1992. A new strategy for rapid identification of microsatellites from libraries with large size inserts. *Nucleic Acids Research* 20 (14): 3665-3669.
- BERGOEING, J. 1998. Geomorfología de Costa Rica. Instituto Geográfico Nacional. 409 p.
- BOINSKI, S. 1987a. Birth synchrony in squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*): A strategy to reduce neonatal predation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 21: 393-400.
- BOINSKI, S. 1987b. Habitat use by squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*) in Costa Rica. *Folia Primatologica* 49: 151-167.
- BOINSKI, S. 1987c. The Status of *Saimiri oerstedii citrinellus* in Costa Rica. *Primate Conservation* 8: 69-72.
- BOINSKI, S. 1988. Association of birds with monkeys in Costa Rica. *Biotropica* 20 (2): 136-143.
- BOINSKI, S. 1989. The ontogeny of foraging in squirrel monkeys, *Saimiri oerstedii*. *Animal Behaviour* 37: 415-428.
- BOINSKI, S. 1994. The Costa Rican squirrel monkey: waltzing toward extinction. *American Journal of Primatology* 33 (3): 196-197.
- BOINSKI, S. 1997. Uncertain conservation status of squirrel monkeys in Costa Rica, *Saimiri oerstedii oerstedii* and *Saimiri oerstedii citrinellus*. *Folia Primatologica* 68: 181-193.



- BOINSKI, S. 1999. The social organizations of squirrel monkeys: implications for ecological models of social evolution. *Evolutionary Anthropology* 8 (3):101-112.
- BRUFORD, M.; WAYNE, R. 1993. Microsatellites and their application to conservation genetics. *Genome and Evolution* 3: 939-943.
- CANTERO, M. 2000. ¿Hasta cuando sobrevivirán? *La Nación*. San José (CR). Noviembre, 8:6.
- CARRILO, E.; WONG, G.; CUARÓN, A. 2000. Monitoring mammal's populations in Costa Rica; protected areas under different hunting restrictions. *Conservation Biology* 14 (6): 1580-1591.
- CATIE. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. CATIE. Serie Técnica. Inf. Tec. 252. 183 p.
- CITES. 2003. Apéndice I (en línea). Consultado 9 jun. 2003. Disponible en: <http://www.cites.org/esp/disc/text.shtml#texttop>.
- COSTA RICA. INSTITUTO GEOGRÁFICO NACIONAL. 1978. Hoja cartográfica Quepos. San José, CR. Esc. 1: 50 000.
- CLISSON, M.; CROUJAU, R. 2000. Conservation and evolution of microsatellite loci in primate taxa. *American Journal of Primatology* 50: 205-214.
- CROPP, S.; BOINSKI, S. 1999. Phylogenetic relationships among *Saimiri* species based on nuclear and mitochondrial DNA evidence. *American Journal of Physical Anthropology* 28: 112.
- CROPP, S.; BOINSKI, S. 2000. The Central America squirrel monkey (*Saimiri oerstedii*): Introduced hybrid or endemic species? *Phylogenetics and Evolution* 16(3): 305-365.
- ECHEVERRIA, P. 2003. Corredores para los tití. *La Nación*. San José (CR). Junio, 22: 17.
- ELLESWORTH, J.; HOELZER, G. 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World Primate; The mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Molecular Ecology* 7: 657-658.
- EMMOS, L. 1990. Neotropical Rainforest Mammals. Chicago, E.U. The University of Chicago Press. p.143-144.

- ESCOBAR, P. 2002. Análisis genético poblacional y sistemática molecular en cuatro especies de *Alouatta*. Tesis Bach. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 154 p.
- FERNÁNDEZ, M. 1997. Habitat fragmentation and protection status evaluation of titi monkey (*Saimiri oerstedii citrinellus*) population in Central Pacific Region, Costa Rica. San José. CR. Organization for Tropical Studies. 55 p.
- FRANKHAM, R. 1995. Conservation genetics. *Genetics* 29: 305-327.
- GLANDER, K.; MARIE, L.; LAURENCE, F.; CHAPMAN, C. 1991. Field methods for capture and measurement of three monkey species in Costa Rica. *Folia Primatologica* 57: 70-82.
- GUTIERREZ-EZPELETA, G. 2000. Variación genética del mono congo (*Alouatta palliata*), del mono colorado (*Ateles geoffroyi*), del mono tití (*Saimiri oerstedii*) y del mono cara blanca (*Cebus capucinus*) de Costa Rica: implicaciones para la conservación de estas especies. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José, CR. 10 p.
- HAPPEL, R. 1986. Socioecology and conservation of the red-backed squirrel monkey (Primates: Cebidae, *Saimiri oerstedii*). *Brenesia* (21): 455-464.
- HARTL, D.; CLARK, A. 1989. Principles of population genetics. Sunderland, E.U. Sinauer Associates publishers. 682 p.
- HOLDRIDGE, L. 1979. Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 216p.
- INSTITUTO METEOROLÓGICO NACIONAL. 2003. Condiciones climáticas (en línea). Consultado 12 set. 2003. Disponible en: [www.imna.ac.cr](http://www.imna.ac.cr).
- IUCN/SSC. 1996. Taller de evaluación de viabilidad de población y viabilidad de población y hábitat de *Saimiri oerstedii citrinellus*. Costa Rica. s.p.
- LEVENE, H. 1949. On a matching problem in genetics. *Ann Math Stat* . 20: 91-94.
- LIST, M.; SOLANO, O. 2001. Práctica dirigida en el manejo veterinario de primates no humanos en cautiverio. Tesis Lic. Universidad Nacional. Heredia, CR. 234 p.
- LITT, M.; LUTY, J. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Genetics* 44: 397-401.

- LIZANO, O.; SALAS, D. 2001. Variaciones geomorfológicas en los últimos 50 años de la Isla Damas, Quepos, Costa Rica. *Biología tropical* 49 (2): 171-177.
- MATAMOROS, Y.; WONG, G. 1996. Population and Habitat Viability Assessment Workshop for *Saimiri oerstedii citrinellus*. Final report. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/UICN). Apple Valley, E.U. sp.
- MENA, Y.; ARTAVIA, G. 1997. Sistema nacional de áreas de conservación. Informe Tec. MINAE. San José, CR. 8 p.
- MINAE, 1999. Resumen Ejecutivo del Estudio Nacional de Biodiversidad. San José, Costa Rica. sp.
- MITTERMIER, R. 1986. Conservation of primates and their primate societies. Chicago, USA. The University of Chicago Press. p.447-990.
- MORA, J. 2000. Mamíferos silvestres de Costa Rica. San José, CR. EUNED. 220 p.
- MORERA, R. 2002. Análisis situacional del mono tití en el área de amortiguamiento del parque Internacional La Amistad. Área de Conservación La Amistad Pacífico. Una estrategia para su conservación. San José, CR. INBIO. Sp.
- MUÑOZ, J. 1990. El tití mono ardilla. Heredia, Costa Rica. UNA informa. (3)8: 11.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat* 106: 283-292.
- NOTMAN, E. 1988. The activity pattern, home range, daily movement and food habits of *Saimiri oerstedii citrinellus* in Manuel Antonio National Park, Costa Rica. *Journal of the Minnesota Academy of Science* 53(3): 32.
- PARQUE ZOOLOGICO SIMON BOLIVAR. 1997. Conservación, asesoramiento y manejo planificado para los primates Mesoamericanos. Informe final. San José, Costa Rica. sp.
- PRMVS-VII Promoción-1996. Evaluación de la fragmentación del hábitat y estado del mono tití (*Saimiri oerstedii citrinellus*) en el pacífico Central Costa Rica. Monografía de Proyecto integrado del Programa Regional en Manejo de Vida Silvestre. San José, CR. sp.
- QUAN, C. 2002. Efectos de la fragmentación del hábitat sobre la variabilidad genética de tropas en mono congo (*Alouatta palliata*) en el Área de Conservación Tempisque. Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional. Heredia, CR. 155 p.

- REID, F. 1997. Mammals of Central America and Southeast Mexico. New York, E.U. The University of Chicago Press. p. 175-182.
- ROBINSON, J. 1987. Capuchins, squirrel monkeys, and atelines: socioecological convergence with Old World Primates howlers: variation in group size and demography. Chicago, E.U. The University Chicago Press. 69-82 p.
- RUIZ, M. 2000. The use of several Microsatellite loci applied to eight Neotropical Primates (*Cebus albifrons*, *Cebus Apella*, *Cebus capucinus*, *Saimiri sciureus*, *Aotus nancymae*, *Allouatta seniculus*, *Lagothrix lagothicha*, and *Ateles fusciceps*) revealed a strong recent bottleneck event in the woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*) In Colombia. En revisión. sp.
- RUIZ, M. 2001. The evolution of the AP68 molecular marker clearly revealed the correct Atelinae phylogeny. *Folia primatologica*. En revisión. sp.
- SAENZ, J. 1992. El turismo, su impacto socioeconómico sobre los recursos naturales de Manuel Antonio. *Ciencias Ambientales* (9): 156-164.
- SAMPAIO, M.; SCHNEIDER, M.; BARROSO, C.; SILVA, B.; SCHNEIDER, H.; ENCARNACIÓN, F.; MONTOYA, E.; SALZANO, F. 1991. Carbonic anhydrase II in new world monkeys. *International Journal of Primatology* 12: 389-402.
- SCHOLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequences in primates species. *Nature* 354: 63-35.
- SILVA, B.; SAMPAIO, M.; SCHNEIDER, H.; MONTOYA, E.; ENCARNACIÓN, F.; CALLEGARI, S.; SALZANO, F. 1991. Protein electrophoresis variability in *Saimiri* and the question of its species status. *American Journal of Primatology* 29: 183-193.
- SLATKIN, M.; BARTON, N. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*. 43: 1349-1368.
- SZAPKIEVICH, V.; COMAS, C.; ZUNINO, G.; MUDRY, M. 1998. Análisis de variabilidad proteica en *Alouatta caraya* y *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini). *Mastozoología Neotropical* 5 (1): 53-59.
- VANDEBERG, J.; WILLIAMS, S.; MOORE, C.; CHENG, M.; ABEE, C. 1990. Genetic relationships among three squirrel monkey types: implications for taxonomy, biomedical research and captive breeding. *American Journal of Primatology*. 22: 101-111.

- VARGAS, G. 1994. La vegetación de Costa Rica: su riqueza, diversidad y protección. San José, Costa Rica. Editorial Guayacán Centroamérica. 93 p.
- VAUGHAN, C. 1984. Estimación de las poblaciones de algunos mamíferos en el Parque Nacional Manuel Antonio. *Brenesia* (22): 207-217.
- WEBER, J.; MAY, P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the PCR. *American Journal Human Genetics* 44: 388-396.
- WILSON, D. 2002. Mammals of Costa Rica. CONABIO-UNAM. Simonetti, J (eds). México, D.F. p: 227-253.
- WONG, G. 1990a. Ecología del mono tití (*Saimiri oerstedii citrinellus*) en el Parque Nacional Manuel Antonio, Costa Rica. Tesis Lic. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 57 p.
- WONG, G. 1990b. Uso del hábitat, estimación de la composición y densidad poblacional del mono tití (*Saimiri oerstedii citrinellus*) en la zona de Manuel Antonio, Quepos, CR. Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 92 p.
- WRIGHT, J. 1994. Mutation at VNTRs: Are the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome* 37: 345-347.
- YEH, F.; BOYLE, T. 1999. POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.

## **Anexos**

**Anexo 1.** Identificadores, fechas, acompañados de sexo y datos morfométricos de los 22 monos tití capturados. Los tamaños corporales están dados en centímetros y el peso en kilogramos.

No.	Sexo	Código	Fecha	Lugar	Marca	ADN	Sangre	Bianco	Tejido	Peso (lb, onz)	Cuello	Cola	Cuerpo	Cintura	Pecho	Brazo	Región palmar	Pierna	Región plantar	T (°F)
SO1	M	♂1	29/09/2002	Silencio	No	X		X		1	12	33	26	11	16	15,5		22		
SO2	H	♀2	29/09/2002	Silencio	No	X		X		0,9	13	37	28	11	16	18		23		
SO3	M	♂3	04/10/2002	M. Antonio	No	X	X	X		1, 12	12	36	22	12	15	16		21		
SO4	M	♂4	04/10/2002	M. Antonio	66	X	X	X		3,9	15	40	31	16	19	19,5		26		
SO5	M	♂5	04/10/2002	M. Antonio	86	X	X	X		3,9	16	40	31	17	21	20		24		
SO6	H	♀1	15/11/2002	M. Antonio	Dona amarilla	X	X	X		2,6	14	42	30	13	17	18,5		24		
SO7	M	♂2	15/11/2002	M. Antonio	Cola Quebrada	X	X	X		2,2	11	34	28	11,5	16	15		22		
SO8	M	♂3	15/11/2002	M. Antonio	Dona naranja	X	X	X		3,5	16	38	32	15	20	14		20		
SO9	M	♂3	25/04/2003	M. Antonio	No	X	X	X		2,3	12	41	21	11	16	18		25		
SO10	M	♂4	25/04/2003	M. Antonio	No	X	X	X		1,1	13	42	21	12	16	18		23		
SO11	M	♂5	26/04/2003	M. Antonio	No	X	X	X		3,2	14	44	26	16	20	19		29		
SO12	M	♂3	07/06/2003	Lapa Rios	No	X	X	X	X	2,8	11	38	26,5	14	18	19,7	5,6	24,5	8,5	
SO13	H	♀2	07/06/2003	Lapa Rios	No	X	X	X	X	2,6	11	39	26,5	11,5	16	17	5	24	7,5	

Continuación del Anexo 1.

No.	Sexo	Código	Fecha	Lugar	Marca	ADNI	Sangre	Blanco	Tejido	Peso (lb,onz)	Cuello	Cola	Cuerpo	Cintura	Pecho	Brazo	Región palmar	Pierna	Región plantar	T (°F)
SO14	M	♂4	20/06/2003	M. Antonio	R444	X	X			2,11	10	39	30	14	17	19	5,7	26	9	
SO15	H	♀5	20/06/2003	M. Antonio	R449	X	X			2,1	9	38	26	10,5	15,5	17,2	6	22,7	9	
SO16	M	♂6	20/06/2003	M. Antonio	R413	X	X			2,12	10	36	30,5	13,5	18	18	6,6	26	9,2	
SO17	M	♂7	20/06/2003	M. Antonio	No	X	X			3,2	11,4	42,6	29,5	15	20,5	18,5	5,7	25	8,5	
SO18	M	♂2	04/07/2003	M. Antonio	R439	X	X			2,3	10	41	26,5	12	16	28	7	23,5	9,5	99,5
SO19	M	♂4	05/07/2003	Isla Damas	R479	X	X			1	8	32	23	10	13	16	5	21	8	96,5
SO20	M	♂1	23/08/2003	M. Antonio	R461	X	X			1,2	10	36	24	11	15	15	6	21	9	102,1
SO21	M	♂2	23/08/2003	M. Antonio	R405	X	X			2,9	12	42	31	14	19	20	6,5	20	10	100,3
SO22	M	♂3	23/08/2003	M. Antonio	R478	X	X			2,5	10,5	37	31	13	17,5	20	7	20	10	101,8
SO23	M	♂8	20/06/2003	M. Antonio	No						11,5	33	20	10	12	13	5	17	8,5	



**Anexo 2.** Observaciones generales y dosis de droga que se utilizaron en la captura de mono tí. f.

No.	Sexo	Observaciones	Dosis
SO1	M	dientes en buen estado	
SO2	H	Dientes en buen estado, no se obtuvo sangre suf. para microbiología	
SO3	M	Dientes pequeños, no se le colocó marca	
SO4	M	Dientes en buen estado	
SO5	M	Dientes en buen estado	
SO6	H	Dientes en buen estado, dona amarilla pata izquierda	
SO7	M	Dientes en buen estado, cola quebrada	
SO8	M	Dientes en buen estado, dona anaranjada pata izquierda	
SO9	M	Dientes en buen estado	0,5 Zol 2X
SO10	M	Dientes en buen estado.	0,5 Zol 2X
SO11	M	Dientes B. Colmillo izquierdo sale de la cavidad	0,5 Zol 2X
SO12	M	Le falta el colmillo izquierdo, Demas dientes buen estado	0,5 Zol 2X
SO13	H	Con cría, Dientes en buen estado	0,5 Zol 2X
SO14	M	Mano izquierda atrofiada y berruga en la nariz.Col 0,7.	0,5 Zol 2X
SO15	H	Dientes B.Col.sup 0,7 cm,Oreja izquierda con hueco	0,5 Zol 2X
SO16	M	Dientes en buen estado,Col.sup 0,7 cm	0,5 Zol 2X + 0,1 ketamina 1X
SO17	M	Dientes en buen estado	0,5 Zol 2X
SO18	M	Ganglio Peritesticular, dientes en buen estado	0,5 Zol 2X
SO19	M	Testículos no habían descendido,dientes en buen estado	0,5 Zol 2X
SO20	M	Testiculos no habían descendido,colmillo sup=2,inf=1,5	0,5 Zol 3X
SO21	M	Dientes en buen estado(col.sup=0,5.inf=0,5) Td:1,9.Ti:2,2	0,5 Zol 3X
SO22	M	Dientes en buen estado(col.sup=0,5.inf=0,6)Td:1,9,Ti:1,9	0,5 Zol 3X
SO23	M	Cría, No se tomó muestra de sangre	

### **Anexo 3.** Protocolos para purificación de ADN de sangre completa

#### **A) Kit NucleoSpin® Blood.**

1. Tomar 200 µl de sangre. Añadir 25 µl de Proteinaza K y 200µl de buffer lisis B3, luego agitar durante 10-20 segundos. Incubar a 70 °C de 10-15 min.
2. Agregar 210 µl de etanol (96-100%) y agitar.
3. Colocar una columna del kit en un tubo de 2 ml para cada muestra y agregar la mezcla. Centrifugar 1 min y descartar el líquido que pasó a través de la columna.
4. Trasladar la columna a un nuevo tubo de 2 ml y añadir 500µl de buffer. Centrifugar 1 min y descartar el líquido del tubo.
5. Colocar la columna en otro tubo de 2 ml y añadir 600 µl de buffer B5. Centrifugar 1 min y descartar el tubo.
6. Introducir la columna en un tubo de nuevo y centrifugar durante un minuto. Luego agregar 100 µl de buffer BE previamente sumergido en baño maría a 70 ° C. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar un minuto a la velocidad máxima.
7. Guardar el producto y descartar la columna.

## **B) Wizard Genomic DNA Purification Kit**

- 1) Se tomaron 300  $\mu$ l de la muestra de sangre y se combinaron con 900  $\mu$ l de solución de lisis celular. Se mezcló por inversión.
- 2) La mezcla se incubó por 10 minutos.
- 3) Se centrifugó durante 20 segundos a 13200 rpm.
- 4) Se descartó el sobrenadante y se agitó el botón.

### **Lisis del núcleo y precipitación de proteínas**

- 5) Se le añadió al botón 300  $\mu$ l de la solución de lisis nuclear y se mezcló por inversión.
- 6) A la mezcla se le adicionó 100  $\mu$ l de la solución de precipitación de proteínas, y se agitó durante 20 segundos.
- 7) Se centrifugó a 13200 rpm durante 3 minutos.
- 8) El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo.

### **Precipitación de ADN y Rehidratación**

- 9) Se agregó 300  $\mu$ l de isopropanol y se mezcló.
- 10) Centrifugación a 13200 rpm.
- 11) Luego de descartar el sobrenadante se le añadió etanol 70%.
- 12) Se vuelve a centrifugar como en el paso 7.
- 13) Aspirar el etanol y dejar que el botón se seque con el aire.
- 14) Rehidratar el ADN en un volumen de 10  $\mu$ l con la solución de rehidratación por una hora a 65 °C o toda la noche a 4 °C.

**Anexo 5.** Reducción de la cobertura boscosa de Costa Rica desde 1800 hasta 1987, producto de la deforestación (Vargas, 1994).

