



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA

ECOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE INDIVIDUOS

DE *Tapirus bairdii* DE MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALFONSO SINUHÉ ZAVALA PÁRAMO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia

COMITÉ TUTORAL

DR. MAURICIO QUESADA AVENDAÑO

Centro de Investigaciones en Ecosistemas

DRA. ELLA G. VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

Instituto de Ecología

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de abril del 2014, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestro en Ciencias Biológicas del alumno **Zavala Páramo Alfonso Sinuhé** con número de cuenta **512012074** con la tesis titulada: **"Análisis de la variabilidad genética de individuos de *Tapirus bairdii* de México"** bajo la dirección del Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa.

Presidente:	Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza
Vocal:	Dr. Eduardo Mendoza Ramírez
Secretario:	Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño
Suplente:	Dr. Víctor Arroyo Rodríguez
Suplente:	Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de octubre del 2014.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por el apoyo recibido (412357/262584).

Y a los miembros del Comité Tutor, Dra. Ella Vázquez Domínguez, el Dr. Mauricio Quesada Avendaño y a mi asesor el Dr. Ken Oyama.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) y al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) por las facilidades proporcionadas para realizar este proyecto.

Agradezco la colaboración de los zoológicos de Guadalajara, León, Miguel Álvarez del Toro, Animaya y Africam Safari, quienes proporcionaron las muestras con las que fue posible realizar este trabajo.

ÍNDICE.

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. OBJETIVOS	9
II.1 General	9
II.2 Particulares	9
III. ANTECEDENTES	10
III.1 <i>Tapirus bairdii</i>	10
III.2 Distribución	10
III.3 Variabilidad genética en <i>T. bairdii</i>	11
III.4 Proyectos de conservación <i>ex situ</i> para <i>T. bairdii</i>	12
III.5 Análisis genéticos a partir de excretas de <i>T. bairdii</i>	13
IV. HIPÓTESIS	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V.1 Obtención de material biológico	15
V.2 Extracción de ADN de muestras fecales	16
V.3 Extracción de ADN de pelo	17
V.4 Extracción de ADN de sangre	17
V.5 Extracción de ADN de frotis bucal	18
V.6 Integridad y calidad de ADN	18
V.7 Amplificación de microsatélites (SSR) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
V.8 Medición de microsatélites	21
V.9 Análisis estadístico	21
V.10 Amplificación de Región Control mediante PCR	21
V.11 Secuenciación y análisis de ADN	22

VI.	RESULTADOS	24
	VI.1 Extracción de ADN	24
	VI.2 Calidad de ADN	24
	VI.3 Microsatélites	25
	VI.3.1 Diversidad genética	26
	VI.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HW)	28
	VI.3.3 Alelos únicos	28
	VI.3.4 Diferenciación genética	29
	VI.4 Región Control	29
	VI.4.1 Análisis Filogenético	30
	VI.4.2 Red de haplotipos	34
VII.	DISCUSIÓN	35
	VII.1 Variabilidad genética de <i>T. bairdii</i>	35
	VII.2 Protocolo de extracción de ADN	35
	VII.3 Microsatélites	36
	VII.3.1 Alelos únicos	36
	VII.4 Región Control	37
	VII.4.1 Red de haplotipos	38
	VII.5 Manejo <i>ex situ</i>	38
VIII.	CONCLUSIONES	40
IX.	ANEXO I	41
X.	LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro 1. Individuos de <i>T. bairdii</i> muestreados en zoológicos de México.	15
Cuadro 2. Procedencia de muestras de excreta de <i>T. bairdii</i> obtenidas en campo en tres estados de la república mexicana.	16
Cuadro 3. Diluciones de ADN probadas para reacciones de PCR.	19
Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para 6 loci de microsatélites.	20
Cuadro 5. Número de alelos observados y riqueza alélica.	27
Cuadro 6. Comparación con alelos previamente reportados y polimorfismo para 6 loci de microsatélites a través del grupo de individuos en cautiverio de <i>T. bairdii</i> .	27
Cuadro 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg.	28
Cuadro 8. Alelos únicos por grupo.	28
Cuadro 9. Resumen AMOVA para el locus Tba20.	29
Figura 1. ADN extraído de muestras de excreta de tapir (<i>T. bairdii</i>) tomadas en campo.	24
Figura 2. Productos de amplificación de la subunidad 12S obtenidos de muestras de excreta de tapir (<i>T. bairdii</i>) tomadas en campo.	25
Figura 3. Amplificación de microsatélites a partir de muestras de excreta de <i>T. bairdii</i> .	26
Figura 4a. Árbol filogenético generado por inferencia bayesiana.	30
Figura 4b. Árbol filogenético generado por el método Neighbor joining.	31
Figura 4c. Árbol filogenético generado por el método Máxima verosimilitud.	32
Figura 5. Árbol consenso basado en secuencias de región control.	33
Figura 6. Red de haplotipos.	34

RESUMEN.

El tapir centroamericano (*Tapirus bairdii*) está desapareciendo de su áreas de distribución original debido principalmente a la cacería y a la fragmentación y destrucción de su hábitat. Se estima que en los últimos 30 años la población total de esta especie ha disminuido en un 50%, por lo que esta especie está clasificada “En peligro de extinción” tanto a nivel nacional (NOM-ECOL-059 2001, SEMARNAT 2010) como a nivel global de acuerdo con la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). México juega un papel fundamental en la conservación de esta especie ya que alberga cerca de un tercio de la población remanente de la especie, la cual se calcula en 5000 individuos. Existen áreas de conservación que protegen las poblaciones remanentes de tapir en el sureste del país. Sin embargo, estas áreas están siendo amenazadas por el avance de la frontera agrícola y ganadera. Bajo este contexto, resulta fundamental implementar estrategias complementarias que apoyen la conservación del tapir. Una de estas estrategias es la conservación *ex situ*. En México existen 15 individuos de tapir en cautiverio repartidos entre zoológicos e instituciones privadas. Estos individuos permiten contar con una base para desarrollar programas de reproducción en cautiverio que permitan la reintroducción de la especie en el futuro. Sin embargo, para que estos programas sean exitosos, se requiere en primera instancia información que permita caracterizar el grado de diferenciación y variación genética que presentan los individuos en cautiverio. Dado que esta información no existe para México, en el presente estudio se realizó un análisis genético, basado en microsatélites y ADN mitocondrial a partir de muestras de pelo y excretas de 11 individuos provenientes de zoológicos de México. Asimismo, se probó el protocolo de extracción de ADN en 30 muestras de excretas colectadas en diferentes localidades del sureste de México. No fue posible realizar el análisis de microsatélites de excretas obtenidas de poblaciones silvestres, pero las muestras de individuos en cautiverio mostraron una diversidad alélica baja, aunque similar a la obtenida en estudios de individuos en cautiverio y poblaciones silvestres en otras regiones. Por otra parte, el análisis de la región control del ADN mitocondrial mostró la existencia de una alta diversidad de haplotipos en las muestras

provenientes de individuos en cautiverio (obtenidos de poblaciones silvestres) y de las excretas colectadas en el campo (5 diferentes haplotipos en 6 individuos). En conjunto, estos hallazgos revelan que los individuos en cautiverio provenientes de poblaciones silvestres del país pueden ser de gran valor en programas nacionales de reproducción (y posible reintroducción). Esto contrasta con el papel que pueden jugar los individuos provenientes de zoológicos de fuera del país. Asimismo, este estudio permitió obtener información y desarrollar técnicas que pueden ser de gran ayuda para apoyar las estrategias de manejo de esta especie.

Palabras clave: Mamíferos silvestres, conservación ex situ, *perissodactyla*, microsatélites.

ABSTRACT.

Central American tapir (*Tapirus bairdii*), is disappearing from its original areas of distribution, mainly due to fragmentation and destruction of his habitat and the hunt. It has been estimated that only in the last 30 years tapir's world population has been reduced by 50%. This species is classified like endangered to national level (NOM-ECOL-059 2001, SEMARNAT 2002) as worldwide in the IUCN Red List of Threatened Species the IUCN. Mexico plays a fundamental role in the conservation of this species since it is estimated that it shelters near a third of the remaining population of the species, which is calculated in 5000 individuals. There are several areas of conservation in the south-east of the country that provide protection to populations of tapir nevertheless, these are subject to a pressure in increase due to the change of coverage and use of the soil. In view of this panorama is of great importance the implementation of complementary strategies that support the conservation of the tapir. México have 15 individuals in captivity distributed between zoos and private institutions. These Individuals allow to possess a base to develop programs of reproduction in captivity and hereinafter reintroduction of the species. Nevertheless, for the success of these programs is needed, in the first instance information that allows to characterize the degree of differentiation and genetic variation present in the individuals in captivity. Considering that genetic-molecular data is inexistent for this species in México, we analyzed DNA samples obtained from tapir hair and dung from 11 individuals, collected in zoos of México. Moreover, it was tested a DNA extraction protocol over 30 samples of dung, collected in the southeast of México. It was not possible to realize the analysis of microsatellites in dung obtained of wild populations nevertheless, for the samples of individuals in captivity we found an allelic diversity low but still similar to the obtained in studies of individuals in captivity and wild populations in other regions. On the other hand, the analysis of the control region of the mitochondrial DNA showed the existence of a high diversity of haplotypes in the samples from individuals in captivity (obtained of wild populations) and samples of dung collected in the field (5 different haplotipos in 6 individuals). This study reveals the importance that

individuals in captivity from wild populations of México could have in programs of reproduction and possibly reintroduction, in contrast with individuals, which came from zoos out of the country. This study helped to generate valuable data and methodological which can be of great help to support strategies of management for this species.

Keywords: *wild mammals*, *ex situ* management, *perissodactyla*, *microsatellites*.

I. INTRODUCCIÓN.

En la historia de las extinciones recientes, los registros fósiles señalan que al final del Pleistoceno hubo una importante pérdida de especies de mamíferos que afectó particularmente la mayoría de las especies de la denominada mega fauna, individuos de más de 100 kg (Leakey y Lewin, 1996). La extinción de especies es un evento irreversible que forma parte del proceso natural de la evolución, pero actualmente está ocurriendo a niveles mucho más altos debido a los impactos del cambio de uso del suelo, la cacería y la introducción de especies exóticas (Holt y Pickard, 1999). Se estima que la pérdida de especies que está sucediendo en la actualidad es comparable por su magnitud a los cinco grandes eventos de extinciones masivas ocurridas en el pasado geológico (Barnosky *et al.*, 2011).

De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el 22% de las especies de mamíferos están bajo algún nivel de amenaza de extinción (UICN 2014.1). Estas cifras podrían ser aún mayores, si se toma en consideración que hay un 15% de especies de las cuales hay insuficiencia de datos, por lo que no se puede determinar con precisión su nivel de conservación. De nuevo, en el caso de las extinciones contemporáneas, los mamíferos que parecen estar más amenazados son los de mayor talla ya que el peso promedio de las especies catalogadas como amenazadas en la Lista Roja, es de un orden de mayor magnitud que el peso promedio de las no amenazadas (Cardillo, 2002). Esta fuerte amenaza puede provocar una marcada reducción de la diversidad al afectar la variabilidad genética, extirpar poblaciones enteras, y en casos extremos, llevar a la extinción a subespecies o especies enteras (Dirzo y Miranda, 1991; Terborgh y Wright, 1994). El impacto de la extirpación de poblaciones de mamíferos (p. ej., defaunación) no se detiene en el efecto negativo que tiene sobre la diversidad taxonómica sino que también afecta la estructura y procesos de los ecosistemas (Terborgh, 1992; Phillips, 1997; Dirzo, 2001; Ramírez-Mejía y Mendoza, 2010).

Un caso que ejemplifica de manera particularmente clara la situación expuesta anteriormente es el tapir *Tapirus bairdii*, también llamado tapir centroamericano, danta,

tzimin o anteburro. Los tapires son los mamíferos de mayor talla (>250 kg) que habitan en el Neotrópico. Asimismo, son los únicos representantes nativos en el continente del orden Perisodáctila, uno de los órdenes de mamíferos más amenazado. Se estima que en los últimos 33 años la población global de esta especie ha disminuido un 50% debido al impacto de la destrucción de su hábitat y la cacería (Castellanos *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2013). De esta manera, el ámbito de distribución de las poblaciones silvestres de esta especie pasó de ser prácticamente continuo entre la porción norte de Sudamérica y el sur de México, a restringirse a unas cuantas regiones que mantienen hábitat continuo y bien conservado (Mendoza *et al.*, 2013).

Se estima que cerca de un tercio de la población total de *Tapirus bairdii* en vida silvestre (calculada en aproximadamente 5000 individuos) se encuentra en el sur de México. La conservación del tapir en el sureste de México depende en gran medida de la existencia y mantenimiento de áreas de conservación. Existe una fuerte heterogeneidad en términos de la cobertura de áreas protegidas entre diferentes estados del sureste de México. Por ejemplo, el estado de Chiapas tiene una cobertura relativamente amplia (1,285,374.05 ha) respecto a Oaxaca (289,000 ha), por lo que las probabilidades de mantener las poblaciones confirmadas en ambos estados son igualmente heterogéneas. De cualquier manera, existe una creciente presión debida a los patrones de cambio de uso de suelo y vegetación sobre todas las áreas de conservación existentes en esta región (Mendoza *et al.*, 2013).

Dada la situación crítica que enfrentan las poblaciones silvestres de tapir, surge la inquietud de establecer estrategias alternativas que apoyen la conservación de esta especie. Entre estas destacan las iniciativas de conservación *ex situ*, que instituciones como la Asociación de Zoológicos de América (AZA) ha comenzado a impulsar. Sin embargo, la implementación de este tipo de estrategias se ha visto limitada por el número reducido de individuos de esta especie en cautiverio, su sesgo hacia los machos, y la carencia de información genética necesaria para sustentar el desarrollo de un programa de reproducción. Resulta por lo tanto evidente la relevancia de contar con protocolos eficientes y estandarizados que permitan el estudio de la variabilidad genética, tanto en

individuos actualmente en cautiverio, como de individuos de poblaciones silvestres. Dado que esta especie es difícil de detectar en el campo, un punto importante a considerar en este tipo de protocolos es su capacidad de ser utilizados en una amplia variedad de tipos de muestras (por ejemplo, excretas sangre y pelo). Afortunadamente, de manera reciente se han desarrollado una amplia variedad de protocolos para analizar muestras de este tipo. Aunque su aplicación a una especie particular requiere de su revisión y adecuación, las investigaciones publicadas para diferentes especies con estas limitantes de muestreo son varias (Constable *et al.*, 1995; Ernest *et al.*, 2000; Roon, 2003; Okello *et al.*, 2005; Beier *et al.*, 2005; Dreher *et al.*, 2007).

Con la información y los proyectos adecuados, el manejo *ex situ* es una herramienta complementaria que ha madurado para hacer una diferencia significativa para la conservación de algunas especies o subespecies. Un ejemplo es el caso del venado sika de Vietnam (*Cervus nippon pseudaxis*), el cual pasó de tan sólo 200 individuos en cautiverio a inicios del siglo XX, a una población de cerca de 10,000 individuos reteniendo una buena variabilidad genética (Thevenon *et al.*, 2004). En otros casos, aunque el manejo *ex situ* ha evitado la extinción de algunas especies, no ha sido suficientemente exitosa para permitir su reintroducción. Sin embargo, en términos generales el uso adecuado de programas de reproducción para una especie que aún cuenta con varios individuos en vida silvestre puede llegar a tener un impacto favorable para su demografía.

De esta manera, un objetivo primario del manejo en cautiverio es el de conservar la variación genética presente en las poblaciones silvestres (Lacy, 1994). Al establecer una población en cautiverio, ésta se encuentra representada únicamente por el material génico de los fundadores. Por lo tanto, las estrategias para la cría en cautiverio se esfuerzan en reducir al mínimo la pérdida de la variación genética inicial (Rusello y Amato, 2004).

La UICN reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética por tres razones: Primero, el cambio medioambiental es un proceso continuo y la diversidad genética es necesaria para adaptarse a tales cambios. Segundo, la pérdida de diversidad genética está generalmente asociada con la endogamia, una baja en la reproducción y la supervivencia

en especies que normalmente presentan exogamia. Tercero, la diversidad genética contribuye a la diversidad de los ecosistemas (Frankham *et al.*, 2010). Por lo tanto, conocer la variabilidad genética de los individuos en cautiverio de *T. bairdii* es un primer paso esencial para comenzar a definir de manera más específica y organizada las estrategias de reproducción *ex situ* para apoyar la conservación de esta especie en México.

II. OBJETIVOS.

II.1 General.

Evaluar la variabilidad genética de individuos de *T. bairdii* en México.

II.2 Particulares:

1. Optimizar protocolos de extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares para *T. bairdii* a partir de muestreos no invasivos.
2. Analizar la variabilidad genética utilizando microsatélites de individuos de *T. bairdii* cautivos en zoológicos de México.
3. Evaluar la variación genética con DNA mitocondrial de ejemplares silvestres a partir de muestras fecales.

III. ANTECEDENTES.

III.1 *Tapirus bairdii*.

Tapirus bairdii, también conocido como tapir centroamericano, danta, danto, tapir de Baird o tzimin, es una de las cuatro especies de la Familia Tapiridae, la cual, junto con la familia Equidae (caballos) y Rhinocerotidae (rinocerontes) forma el grupo de los perisodáctilos. Los tapires son los mamíferos terrestres de mayor talla en el Neotrópico ya que pueden llegar a rebasar los 300 kg y son considerados importantes dispersores de semillas, con un rol único en la regeneración de los bosques (Fragoso *et al.*, 2003). Son animales principalmente nocturnos y de día pueden pasar varias horas entre el pasto o en pequeños cuerpos de agua o lodo. Aunque suelen ser solitarios se les llega a ver en pequeños grupos cerca de cuerpos de agua. La gestación dura entre 380 y 400 días. Solo hay una cría por parto y la madre cuida de su cría hasta alrededor de los 2 años. Su afinidad por el agua hace que muchas veces defecuen cerca o en cuerpos de agua dificultando la toma de este tipo de muestras.

III.2 Distribución.

Históricamente los tapires estuvieron ampliamente distribuidos en Asia y Norteamérica, donde se extendieron hasta Sudamérica durante el Plioceno (Herskovitz, 1954; Eisenberg, 1997). De las cinco especies vivientes de tapires, cuatro presentan distribución Neotropical (*Tapirus bairdii*, *Tapirus pinchaque*, *Tapirus terrestris* y *Tapirus kabomani*) y una habita en el sureste asiático (*Tapirus indicus*; Feldhamer *et al.*, 1999). En tiempos precolombinos, *T. bairdii* tuvo un ámbito de distribución prácticamente continuo desde el sureste de México hasta el noroeste de Colombia, ocupando desde humedales y bosques costeros hasta bosques mesófilos de montaña y páramos a 3,600 m de altitud (March, 1994; Naranjo y Vaughan, 2000). Sin embargo, las altas tasas de deforestación y fragmentación de los bosques en Centroamérica junto con la cacería han limitado su distribución actual a áreas protegidas y zonas remotas, excepto en El Salvador, donde la especie se considera extirpada (Matola *et al.*, 1997; Mendoza *et al.*, 2013).

En México, la distribución de esta especie ocupó la mayor parte de las áreas tropicales húmedas del sur y sureste del país (March, 1994). Sin embargo, en la actualidad ésta especie solamente está presente en algunas áreas silvestres extensas de los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo y Veracruz (Naranjo, 2009; Mendoza *et al.*, 2013). Las regiones con presencia verificada de tapires son: Reserva de la Biósfera Calakmul y sureste de Campeche; Reserva de la Biósfera Sian Ka'an, centro y sur de Quintana Roo; Reservas de la Biósfera El Ocote, El Triunfo, La Sepultura, Lacantún y Montes Azules, Selva Lacandona y Sierra Madre de Chiapas; Los Chimalapas, Parque Nacional Lagunas de Chacahua y Sierra Mixe, Oaxaca; y Uxpanapa, Veracruz (Naranjo, 2009). Es probable que aún existan pequeñas poblaciones aisladas de tapires en la Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla y zona fronteriza de Tabasco, y en el extremo sur del estado de Yucatán (Naranjo y Cruz, 1998; Lira *et al.*, 2004; Naranjo, 2009).

III.3 Variabilidad genética en *T. bairdii*.

Norton y Ashley (2004a) analizaron la variabilidad genética de 37 individuos de *T. bairdii* mantenidos en cautiverio en diferentes zoológicos de Estados Unidos utilizando microsatélites (SSR). Los 37 individuos analizados incluyeron muestras de los 8 parentales originales y su descendencia tras 4 generaciones. Los parentales provienen de Panamá, Honduras, Nicaragua y Costa Rica y en total se reportaron 5 líneas maternas diferentes de acuerdo al pedigrí reportado en el *International Studbook, Central American tapir Tapirus bairdii* (Roman, 1999). También se analizaron 12 individuos en cautiverio en diferentes zoológicos de Centroamérica, provenientes de Panamá y Costa Rica. En ambos grupos se encontró poca diversidad alélica. Sin embargo, todos los alelos de los ocho parentales del grupo en cautiverio en zoológicos de Estados Unidos estaban aún presentes en la progenie. Los mismos autores encontraron un bajo nivel de heterocigosidad y de diversidad alélica al analizar 30 individuos de dos poblaciones silvestres de Panamá y Costa Rica, lo que hace suponer que en algún momento estas poblaciones estuvieron sujetas a un cuello de botella (Norton y Ashley, 2004b). Asimismo, estos autores proponen que las dos poblaciones estudiadas podrían haber estado unidas históricamente por un

flujo génico mínimo de al menos un individuo por generación. Sin embargo, una limitante de este estudio es el reducido tamaño de la muestra. De hecho, la dificultad de rastrear y muestrear individuos de esta especie es una de las principales razones por las que se cuenta con pocos estudios genéticos, e incluso muchos aspectos básicos de la ecología de *T. bairdii* (p. ej. abundancia y dispersión) son poco conocidos a pesar de que esta especie se ha estudiado desde principios de los 90's (Fragoso, 1991). En contraste, en el caso de *T. terrestris* se cuenta con el genoma mitocondrial completo desde el año 2002 (NCBI), así como con microsatélites específicos (Gonçalves da Silva *et al.*, 2010; Sanches *et al.*, 2009). Esto se relaciona con el hecho a que esta especie es mucho más abundante. Se estima que el tamaño de la población de *T. terrestris* en vida silvestre está entre 14,540 y 36,351 individuos; tan solo en la región comprendida entre el Parque Nacional Madidi, Bolivia y la Reserva Nacional Tambopata, Perú (Wallace *et al.*, 2012). Asimismo, el área de distribución de esta especie abarca 12 países desde Venezuela, hasta el norte de Argentina.

III.4 Proyectos de conservación *ex situ* para *T. bairdii*.

En 2006 el Grupo de Especialistas en Tapir (TSG) y la Asociación de Zoológicos de América (AZA) presentaron el proyecto “Plan maestro de colección regional para el tapir centroamericano”, en el cual se invitó a diferentes zoológicos de Centroamérica, incluidos los zoológicos de México, a participar en el intercambio de individuos para su reproducción. El principal obstáculo para cumplir con el plan fue la obtención de los permisos de CITES y los permisos zoosanitarios de algunos países. México ha recibido individuos procedentes de Estados Unidos con relativa facilidad, pero este intercambio no ha existido con zoológicos de Centroamérica. Por otra parte, los individuos que han llegado a México de zoológicos de Estados Unidos han sido únicamente machos. De esta manera, no existe un balance adecuado en términos de la representación tanto de sexos, como de regiones entre los individuos de *T. bairdii* en cautiverio, lo cual es una limitante para el desarrollo de programas de reproducción. Mucho menos existe información desde el punto de vista genético que permita tener una idea de la representatividad que los

individuos en cautiverio en México tienen con respecto a las poblaciones silvestres. Resulta por lo tanto fundamental desarrollar protocolos de análisis genético que permitan generar información para evaluar la factibilidad de desarrollar programas de reproducción.

III.5 Análisis genéticos a partir de excretas de *T. bairdii*.

En los estudios existentes, el ADN de tapires en cautiverio se ha obtenido principalmente de muestras de sangre. En el estudio de Ashley y Norton (2004a) se menciona que además de sangre, se utilizaron muestras de pelo y excretas, pero se reportan porcentajes de muestras de ADN no amplificables cercanas al 20%, sin especificar cuántas de las muestras no amplificables correspondieron a ADN extraído de excretas o de pelo.

Aunque la obtención de ADN a partir de heces cuenta con protocolos probados en muestras de poblaciones silvestres (Huber *et al.*, 2003), existen factores que suelen hacer que la muestra no tenga la calidad para ser amplificada, tales como la presencia de inhibidores, su escaso volumen, su edad o el hecho de ser almacenada sin buffers que ayuden a su preservación (Höss *et al.*, 1992; Constable *et al.*, 1995; Khon y Wayne, 1997). Aunado a esto existen casos, entre los herbívoros, donde hay una mayor cantidad de limitantes, como la presencia de polifenoles y quinonas en las muestras, que hacen necesario realizar limpiezas adicionales del ADN. Esto puede provocar la pérdida de parte de la muestra, lo cual es sumamente inconveniente cuando se trabaja con sólo unas pocas células del organismo estudiado (Zhang *et al.*, 2006). Debido a esto es necesario adecuar un protocolo que permita obtener ADN con suficiente pureza para analizar muestras tanto de individuos de zoológico, como de muestras obtenidas en campo y con un porcentaje aceptable de éxito.

IV. HIPÓTESIS.

En una comparación de la región control del ADN mitocondrial y de microsatélites, se espera encontrar un número haplotipos y de alelos mayor en individuos de *T. bairdii* capturados y muestreados en vida salvaje en Chiapas que en individuos donados por zoológicos de Estados Unidos los cuales descienden de un grupo de 8 parentales procedentes de Centroamérica reproducidos por más de 5 generaciones.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.1 Obtención de material biológico.

Se obtuvieron 11 muestras de pelo, excretas, sangre y frotis bucal de tapires en cautiverio de los zoológicos de Guadalajara, León, Animaya, Africam Zafari y Zoológico Miguel Álvarez del Toro (Cuadro 1). Además, se obtuvieron 28 muestras de excretas provenientes del hábitat natural de *T. bairdii* de diferentes localidades de Chiapas, Quintana Roo y Campeche (Cuadro 2). Las muestras de excretas se conservaron en etanol 70% y las muestras de pelo se guardaron en bolsas plásticas a temperatura ambiente. Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos para extracción de sangre por vacío (Vacutainer). Las muestras por frotis se tomaron con hisopos de nylon y se almacenaron en tubo falcón de 10 ml a temperatura ambiente.

Cuadro 1. Individuos de *T. bairdii* muestreados en zoológicos de México.

Nombre	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Tipo de muestra	ADN amplificable
Javier ¹	Puebla	8	M	Pelo, sangre y frotis	Sangre
Scooter ¹	León	12	M	Pelo y Excreta	Excreta
Ray ¹	Guadalajara	20	M	Pelo y Excreta	Excreta
Norton ¹	Guadalajara	21	M	Pelo y Excreta	Excreta
Gaby ²	Tuxtla Gutiérrez	2	H	Pelo	Pelo
Toñita ²	Tuxtla Gutiérrez	3	H	Pelo	Pelo
Nando ²	Tuxtla Gutiérrez	4	M	Pelo	Pelo
Lili ³	Tuxtla Gutiérrez	12	H	Pelo	Pelo
Paquita ³	Tuxtla Gutiérrez	14	H	Pelo	Pelo
Tzimin ³	Tuxtla Gutiérrez	12	M	Pelo	Pelo
Bakal ³	Mérida	7	M	Pelo	--

¹ Individuos de *T. bairdii* en zoológicos de México procedentes de zoológicos de Estados Unidos.

² Individuos de *T. bairdii* nacidos en cautiverio en zoológicos de México.

³ Individuos de *T. bairdii* en zoológicos de México procedentes de vida silvestre.

(--) Única muestra de la cual no se obtuvo ADN, individuo originario de Campeche.

Cuadro 2. Procedencia de muestras de excretas de *T. bairdii* obtenidas en campo en tres estados de la república mexicana.

Estado	Áreas de muestreo	Coordenadas
Chiapas	Reserva de la Biosfera Montes Azules	(16° 12' 35" N, 90° 53' 25" O)
	Marqués de Comillas	(16° 8' 13" N, 90° 54' 6" O)
	Reserva de la Biosfera La Sepultura	(16° 19' 55" N, 93° 53' 24" O)
	Reserva de la Biosfera El Triunfo	(15° 41' 18" N, 92° 56' 26" O)
Quintana Roo	Reserva de la Biosfera Sian Ka'an	(19° 54' 59" N, 87° 44' 8" O)
	Área de Protección de Flora y Fauna de Balanka'ax	(18° 12' 19" N, 89° 45' 9" O)
Campeche	Reserva de la Biosfera de Calakmul	(18° 18' 19" N, 89° 51' 31" O)

Las muestras fueron tomadas durante trabajo de campo para estudios de abundancia *T. bairdii* en años anteriores. Las coordenadas corresponden a los puntos de partida de transectos.

V.2 Extracción de ADN de muestras fecales.

La extracción de ADN de excretas se realizó con modificaciones hechas a técnicas previamente reportadas (Orsini y Romano-Spica, 2001; Hoshino y Matsumoto, 2004). Las muestras fueron depositadas en cajas de Petri, se prensaron para retirar el excedente de alcohol y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 6 a 12 h. Las muestras fueron cortadas con bisturí para facilitar la disolución de la materia fecal en el buffer de extracción. En un microtubo de 1.5 ml se agregaron 800 µl de regulador de lisis (Tris HCl 200 mM pH 8.0, SDS 2%, PVP 4%, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM), 20 a 40 mg de muestra triturada, 10 mg de leche descremada en polvo y se agitó en vórtex durante 5 min. Posteriormente, se incubó 15 min a 60 °C, dando pulsos de 3 a 5 s en microondas a 600 W cada 5 min con los tubos destapados. Se agregaron 600 µl de fenol, agitando en vórtex durante 5 min. Se centrifugó durante 10 min en microcentrífuga (Thermo) a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro microtubo de 1.5 ml limpio. Se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), agitando en vórtex durante 5 min. Se centrifugó nuevamente durante 10 min a 10,000 rpm, y se transfirió el

sobrenadante a otro microtubo de 1.5 ml limpio. Se repitió el último paso 1 a 2 veces hasta obtener un sobrenadante de color claro. Se adicionaron 300 µl de cloroformo, se centrifugó nuevamente durante 5 min a 10,000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a otro microtubo. Se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol frío incubando de 20 a 30 min a -20 °C y se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se limpió la pastilla adicionando 300 µl etanol al 70% frío, se mezcló por inversión, se centrifugó de nuevo a 13000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se repitió el último paso hasta obtener un sobrenadante incoloro tras la centrifugación. Se dejó secar la pastilla de ADN y posteriormente se resuspendió en un volumen de 20-30 µl de agua destilada desionizada estéril (H₂O_{dde}).

V.3 Extracción de ADN de pelo.

Se lavó la muestra con H₂O_{dde} para eliminar impurezas y de cada pelo se cortó un segmento de 0.5 a 1 cm a partir del bulbo. Para extraer el ADN se empleó la técnica "salting-out" de Fitz-Simmons (1995). En un microtubo de 1.5 ml se colocaron de 10 a 20 pelos con bulbo y se incubaron con 300 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) y 10 µl de proteinasa K (Sigma) (15 mg/ml) de 1 a 3 horas a 60 °C en un termomixer (Eppendorf). Concluido el tiempo de incubación, se adicionaron 150 µl de acetato de amonio (7.5 M) y se incubó a -70 °C durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una microcentrífuga (Thermo). El sobrenadante se transfirió a otro tubo adicionándole 1 ml de etanol al 95% frío y se incubó nuevamente a -70 °C durante 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó con etanol al 70% frío. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl H₂O_{dde}.

V.4 Extracción de ADN de sangre.

La extracción de ADN de sangre se realizó mediante la técnica "salting-out" de Fitz-Simmons (1995). En un microtubo de 1.5 ml se colocaron 10 µl de sangre y se incubó con 300 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) y 10 µl de

proteínasa K (15 mg/ml) (Sigma) por 1 h a 60 °C en un termomixer (Eppendorf). Concluido el tiempo de incubación, se adicionaron 150 µl de acetato de amonio (7.5 M) y se incubó a -70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una microcentrífuga (Thermo). El sobrenadante se transfirió a otro microtubo adicionándole 1 ml de etanol al 95% frío y se incubó nuevamente a -70 °C durante 10 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó con etanol al 70% frío. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de H₂O_{dde}.

V.5 Extracción de ADN de frotis bucal.

La extracción de ADN de células epiteliales de frotis bucal se realizó mediante la técnica "salting-out" de Fitz-Simmons (1995). Se cortó la punta del hisopo con la muestra y se colocó en un microtubo de 1.5 ml, se incubó con 300 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) y 10 µl de proteínasa K (15 mg/ml) (Sigma) por 1 hora a 60 °C en un termomixer (Eppendorf). Concluido el tiempo de incubación, se adicionaron 150 µl de acetato de amonio (7.5 M) y se incubó a -70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una microcentrífuga (Thermo). El sobrenadante se transfirió a otro tubo adicionándole 1 ml de etanol al 95% frío y se incubó nuevamente a -70 °C durante 10 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó con etanol al 70% frío. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de H₂O_{dde}.

V.6 Integridad y calidad del ADN.

Para revisar la presencia e integridad del ADN, se corrieron 3 µl de cada muestra por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% teñidos con Sybr Safe 1X (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 0.040 M, EDTA 0.001 M a pH 8), aplicando una corriente de 70 V durante 30 min. Los geles se visualizaron y registraron en un foto-documentador (Kodak Gel Logic 2000).

Se realizaron diluciones en H₂O_{dde} (Cuadro 3) de las muestras de ADN procedentes de excretas para reducir la concentración de contaminantes no eliminados presentes en

las mezclas de amplificación de ADN.

Cuadro 3. Diluciones de ADN probadas para reacciones de PCR.

1:5 μ l	1:10 μ l	1:15 μ l	1:20 μ l	1:25 μ l
1:30 μ l	1:35 μ l	1:40 μ l	1:45 μ l	1:50 μ l

Para verificar la calidad del ADN extraído de excretas se realizaron amplificaciones por triplicado del gen mitocondrial de ARN 12S ribosomal mediante el uso de los oligonucleótidos previamente reportados, MA12S-F (5' - AAA GCA AGG CAC TGA AAA TGC CTA GA- 3') y MA12S-R (5' - TCT TCT GGG TGT AGG CCA GAT GCT TT- 3'; Douzery y Catzeflis, 1995). Se realizaron curvas de MgCl₂ y se utilizó una temperatura de alineamiento por debajo de la *T_m* óptima (50 °C) observada en otras especies para descartar estos factores como responsables de amplificaciones fallidas. Cada mezcla de reacción se preparó en microtubos de 0.2 ml como sigue: 1 μ l de ADN (Cuadro 3), 5 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1 mM a 2 mM, 50 μ M de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), platinum *Taq* DNA polimerasa 0.5 U (Invitrogene) y H₂O_{dde} en un volumen total de 12.5 μ l. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94 °C, 5 min seguido de 30 ciclos; desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 47 °C durante 1 min, polimerización a 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C, durante 8 min. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.5% con el marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogene) aplicando una corriente de 70 V durante 30 min, se visualizaron y registraron en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic,

2000).

V.7 Amplificación de microsatélites (SSR) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificaron microsatélites para 6 loci (Cuadro 4) previamente reportados (Norton y Ashley, 2004b; Gonçalves da Silva *et al.*, 2010; Sanches *et al.*, 2009). Para el análisis de detección, los oligonucleótidos directos fueron marcados con el fluorocromo 5-FAM (Invitrogene). Cada mezcla de reacción se preparó en microtubos de 0.2 ml como sigue: de 10 ng de ADN, 10 pmol de cada par de oligonucleótidos, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 50 μM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), platinum *Taq* DNA polimerasa 0.5 U (Invitrogene) y H₂O_{dde} en un volumen total de 25 μl. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 95 °C, 5 min, seguido de 20 ciclos; desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento de 58 a 61 °C durante 40 s y 72 °C durante 2 min. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.5% con el marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogene) aplicando una corriente de 80 V durante 50 min, se visualizaron y registraron en un foto documentador (Kodak Gel Logic, 2000).

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para 6 loci de microsatélites.

Nombre	Motif	Tamaños reportados	na	Tm	Autores	
TtGT137F TtGT137R	ACCATATGCCAAGGGTTTTG GCTGCCTTCATAGTGGCTTC	(GT)17	253- pb	8	60	Gonçalves da Silva <i>et al.</i> , 2010
Tba20F Tba20R	AACCCAAGTTGTCCGTCACA GCAGTTGTCTCTGACCGTGTGTTAG	(AC)15	260-280 pb	8	63	Norton y Ashley, 2004
Tba23F Tba23R	ACAGTTTGTCCCTCCAAGTTG GCAGGTCAAATATACTGTCAGCCTGG	(AC)14	243-253 pb	4	65	Norton y Ashley, 2004
Tter04F Tter04R	CGTTAGCATGATCTCTAGACC CCAGATGAGAAGCAGGATAG	(TG)20	230-264 pb	11	63	Sanches A. <i>et al.</i> , 2009
Tter09F Tter09R	GGAACTCAAGTGGGTCAAG AGTGATGCTTGTGCGGC	(CAGG)7	167-192 pb	5	59	Sanches A. <i>et al.</i> , 2009
Tter14F Tter14R	GATCCTCCTGTTTCAGAT AGCCAAATGTTTTAGACTGAG	(CA)22	174-208 pb	13	59	Sanches A. <i>et al.</i> , 2009

Tter y TtGT corresponden a oligonucleótidos específicos de *T. terrestris*, Tba corresponden a oligonucleótidos específicos de *T. bairdii*.

V.8 Medición de microsatélites.

Para medir el tamaño de los microsatélites se utilizó un secuenciador AB 3100 *Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El tamaño de los productos de amplificación se determinó en relación al tamaño del marcador molecular interno Genescan-350ROX (Applied Biosystems). Para la lectura de los tamaños e identificación de alelos se utilizó el software Peak Scanner versión 1.0 (Applied Biosystems).

V.9 Análisis estadístico.

Para estimar los niveles de riqueza alélica (R_s), se utilizaron los programas GeneAEx versión 6.3 (Peakall y Smouse, 2006) y el programa FSTAT (Goudet, 1995), el cual toma en cuenta la variación en el tamaño de muestra estandarizando la estimación de los alelos por locus al tamaño más pequeño de las muestras. Los individuos de *T. bairdii* donados por zoológicos de Estados Unidos a México (descendientes de parentales centroamericanos) fueron considerados como un grupo diferente al grupo conformado por los individuos capturados dentro del territorio mexicano y su progenie. Para determinar si existía una diferencia en la riqueza alélica entre los grupos de México y Estados Unidos se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Para calcular los niveles de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), y para realizar pruebas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizaron los programas GeneAlex y Genetic Data Analysis GDA (Lewis y Zaykin, 2001). Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre grupos utilizando el programa GeneAlex. La diferenciación genética por F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} y la significancia de los valores de F_{ST} con corrección secuencial de Bonferroni (para $\alpha = 0.05$) se calcularon usando el software FSTAT version 2.9.3. (Goudet, 2001).

V.10 Amplificación de Región Control mediante PCR.

Para la amplificación de la región control, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados previamente a este estudio sobre secuencias de *T. terrestris*, TapDLN-F (5'-ATT

ACC CTG GTC TTG TAA ACC AG- 3') y TapDLN-R (5'-GCC CTG AAG TAA GAA CCA GAT G- 3'). Cada mezcla de reacción se preparó en microtubos de 0.2 ml como sigue: 1 µl de ADN (Cuadro 3), 5 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 50 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), platinum *Taq* DNA polimerasa 0.5 U (Invitrogene) y H₂O_{de} en un volumen total de 12.5 µl. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94 °C, 5 min seguido de 30 ciclos; desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento de 58 °C a 60 °C durante 40 s y polimerización a 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C durante 8 min. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.5% con el marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogene), en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogene) aplicando una corriente de 70 V durante 40 min, se visualizaron y registraron en un documentador de imágenes (Kodak Gel Logic, 2000).

V.11 Secuenciación y análisis de ADN.

Se realizó la secuenciación de los amplicones de RC de ambas cadenas de ADN mediante el método de dideoxy (Sanger *et al.*, 1975), utilizando el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Applied Biosystems), de manera automatizada en un AbiPrism 310 (Applied Biosystems). Los electroferogramas y sus secuencias se alinearon y se editaron con el programa Bioedit 7.09 (Hall, 1999), el número de haplotipos, sitios polimórficos y la diversidad nucleotídica y haplotípica se revisaron con DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). A partir de los alineamientos obtenidos se construyeron árboles filogenéticos con los criterios de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), Neighbor Joining y Bayesiano utilizando los programas MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) y Mr Bayes v3.1 (Ronquis y Huelsenbeck, 2003); los soportes de los nodos se estimaron mediante análisis bootstrap con 1000 réplicas y con muestreo a través de 100,000 generaciones respectivamente. Para la

construcción de una red de haplotipos se utilizó el programa NETWORK (Fluxus Technology, 2013).

VI. RESULTADOS.

VI.1 Extracción de ADN.

Se extrajo ADN genómico a partir de pelo en 7 de 11 muestras de individuos de *T. bairdii* de zoológicos de México. La técnica modificada a partir de Orsini y Romano-Spica (2001) y Hoshino y Matsumoto (2005) fue probada en 3 muestras de excreta de individuos (Ray, Norton y Scooter; Cuadro 1) obteniendo ADN con calidad para PCR. Posteriormente se utilizó la misma técnica en muestras de campo y se obtuvo ADN con diferentes niveles de degradación en 21 de 28 muestras (75%) (Figura 1).

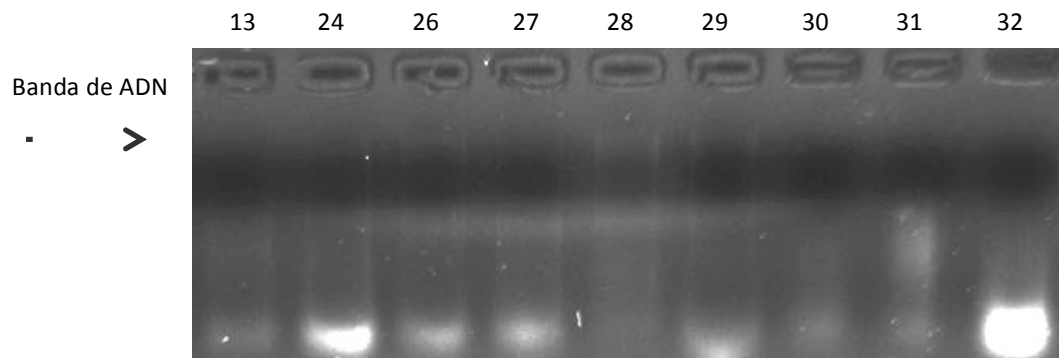


Figura 1. ADN extraído de muestras de excreta de tapir (*T. bairdii*) tomadas en campo (carriles 1 a 9). Los números corresponden a la numeración dada a las muestras en campo. Gel de agarosa al 0.7% teñido con SYBR®Safe.

VI.2 Calidad de ADN.

Las amplificaciones de la subunidad 12S se utilizaron como control positivo para determinar la calidad de 21 muestras de ADN extraído de excretas tomadas en campo. Se obtuvieron productos de amplificación en 13 de 21 muestras de ADN (62%) con diferentes grados de inespecificidad (Figura 2). El mayor número de amplificaciones se obtuvo utilizando diluciones de las muestras de ADN 1:20, 1:25 y 1:30 μ l. En las muestras de excreta de individuos de zoológico se obtuvo ADN con calidad de PCR en el primer intento, sin necesidad de repetir extracciones.

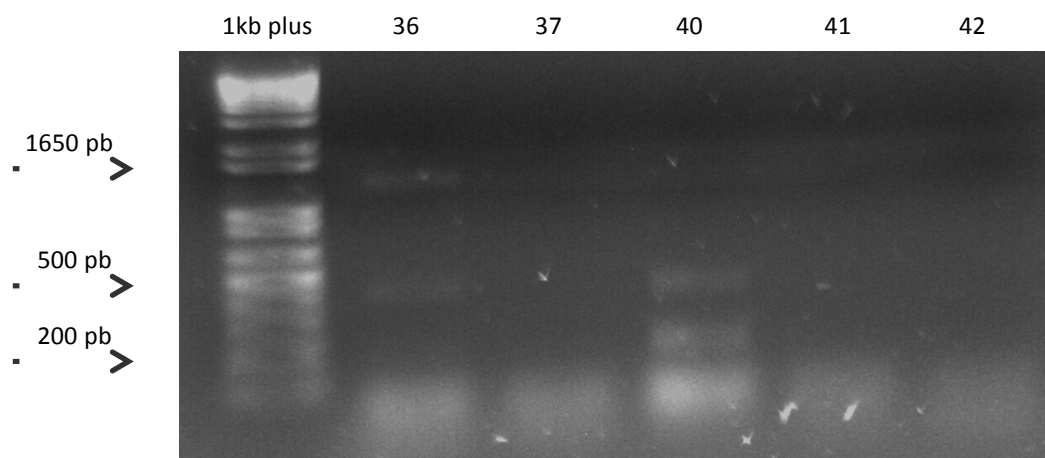


Figura 2. Productos de amplificación de la subunidad 12S obtenidos de muestras de excreta de tapir (*T. bairdii*) tomadas en campo. Los números corresponden a la numeración dada a las muestras en campo. Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. Gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR®Safe.

VI.3 Microsatélites.

Se obtuvieron productos de amplificación de 6 loci de microsatélites para 1 muestra de ADN de sangre, 3 muestras de ADN de excretas (Figura 3) y 6 muestras de ADN de pelo de individuos de zoológicos. A partir de las 6 muestras de ADN de pelo sólo se obtuvieron productos de amplificación para microsatélites en 5 muestras. En total se obtuvieron 6 loci de microsatélites para nueve individuos en cautiverio. Para las muestras obtenidas en campo sólo se obtuvieron 6 productos de amplificación a partir de todos los individuos, siendo el locus Tter09 el que generó mayor número de amplificaciones con 3 productos, seguido por Tter14 con 2 productos y Tba23 que solo amplificó una vez. A partir de los productos de amplificación para microsatélites se obtuvieron 51 lecturas de un total de 54. Sin embargo, no se pudo detectar ningún fragmento obtenido de muestras de campo.

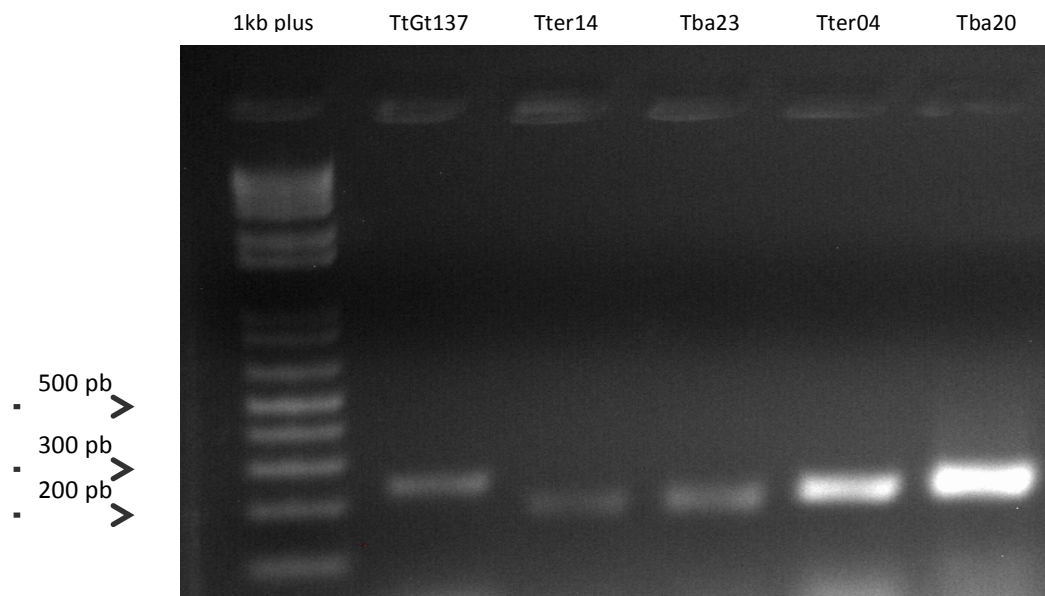


Figura 3. Amplificación de microsatélites a partir de muestras de excreta de *T. bairdii*. Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (carril 1). Productos de amplificación de 5 loci de microsatélites de Norton, un tapir en cautiverio del zoológico de Guadalajara (carriles 2 a 6). Los nombres de los carriles corresponden al oligonucleótido utilizado (cuadro 4). Gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR®Safe.

VI.3.1 Diversidad genética.

Se detectó un total de 24 alelos para 6 loci en la población de individuos en cautiverio ($n = 9$), que mostraron una diversidad alélica promedio de 4 alelos/locus (Cuadro 5), con un intervalo de 3 a 6 alelos/locus. Se probó la significancia de la diferencia en la riqueza alélica entre el grupo de individuos nativos de México y el grupo proveniente de Estados Unidos utilizando la prueba de rangos con signo de Wilcoxon encontrando diferencias no significativas entre grupos para cada locus. Considerando ambos grupos, la riqueza alélica promedio total es de 3.29 alelos.

Cuadro 5. Número de alelos observados y riqueza alélica.

Locus	Alelos observados	Ra México	Ra EU	Da Total
Tter04	3	2.500	2.500	3.000
Tter09	3	2.833	3.000	2.978
Tter14	6	4.000	2.714	5.000
Tba20	4	2.833	3.464	2.978
Tba23	4	3.429	2.750	3.778
TtGT13	4	2.000	3.679	2.000
Promedio	4	2.933	3.018	3.289

Riqueza alélica (Ra) y diversidad alélica total (Da) para los grupos de México y Estados Unidos (EU).

El número de alelos observado fue menor a los reportados excepto para el locus Tba23 (Cuadro 6). La heterocigosidad observada (H_o ; con un intervalo de 1.00 a 0.50) para cada locus fue mayor a la esperada (H_e ; con un rango de 0.406 a 0.656). Los valores promedio negativos de $F_{IS} = -0.295$ y $F_{IT} = -0.285$, a través de los loci fueron indicadores de un probable exceso de heterocigotos dentro de la población. La diferenciación genética ($F_{ST} = 0.021$) fue baja (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación con alelos previamente reportados y polimorfismo para 6 loci de microsatélites a través del grupo de individuos en cautiverio de *T. bairdii*.

Locus	Rango (pb)	N_a ¹	N_o ²	N_e ³	H_o ⁴	H_e ⁵	F_{IS} ⁶	F_{IT} ⁷	F_{ST} ⁸
Tter04	212-232	11	3	1.684	0.500	0.406	-0.090	-0.230	0.000
Tter09	99-139	5	3	2.602	1.000	0.616	-0.525	-0.625	0.000
Tter14	182-200	13	6	2.733	0.775	0.616	-0.123	-0.181	0.000
Tba20	224-246	8	4	2.770	0.875	0.638	-0.286	-0.114	0.133
Tba23	198-232	4	4	2.701	0.9.00	0.627	-0.435	-0.393	0.029
TtGt137	222-246	8	4	3.009	0.875	0.656	-0.312	-0.166	0.111
Media		8.167	4	2.583	0.821	0.593	-0.295	-0.285	0.021

¹ Número de alelos previamente reportados. ² Número de alelos observados. ³ Número de alelos efectivos observados. ⁴ Heterocigosidad observada. ⁵ Heterocigosidad esperada. ⁶ Coeficiente de endogamia dentro de la población. ⁷ Coeficiente de endogamia debido a diferenciación en sub-poblaciones. ⁸ Coeficiente de endogamia entre poblaciones.

VI.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg a través de los loci para todo el grupo mostró desviación del equilibrio de HW para Tter09 (Cuadro 7). Sin embargo, el análisis mediante la prueba exacta de Fisher para cada locus no mostró desviación del equilibrio HW ($P > 0.05$). La prueba de Fisher aplicada por cada grupo tampoco mostró desviaciones significativas del equilibrio de HW.

Cuadro 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Locus	DF	χ^2	Prob.	Signif.
Tter04	3	0.889	0.828	ns
Tter09	3	8.000	0.046	*
Tter14	15	21.240	0.129	ns
Tba20	6	7.000	0.321	ns
Tba23	6	10.111	0.120	ns
TtGT13	6	12.000	0.062	ns

Grados de libertad (DF), valor de chi cuadrada (χ^2), ns = no significativo a $*P < 0.05$.

VI.3.3 Alelos únicos.

Se encontraron 6 alelos únicos de un total de 24 (Cuadro 8), 4 alelos para el grupo de México y 2 para el de Estados Unidos. El locus con mayor número de alelos dentro del grupo de México fue Tter14, que también es el locus con mayor número de alelos (6) entre todos los loci.

Cuadro 8. Alelos únicos por grupo.

Grupo	Locus	Alelo	Frecuencia
México	Tter14	186	0.100
México	Tter14	196	0.100
México	Tter14	200	0.100
México	Tba23	212	0.100
Estados Unidos	Tba20	224	0.250
Estados Unidos	TtGt137	222	0.125

VI.3.4 Diferenciación genética.

Los valores de F_{ST} para el análisis de varianza a través de los loci mostraron valores de cero con $P = 0.01$. El AMOVA por cada locus mostró diferencia solo para Tba20 (Cuadro 9), con una distribución de diversidad genética de 11% entre grupos y de 89% dentro del grupo. Tba20 es uno de los 2 loci que presentaron alelos privados para el grupo de Estados Unidos.

Cuadro 9. Resumen AMOVA para el locus Tba20.

	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	0.719	0.719	0.053	11%
Entre individuos	7	1.725	0.246	0	0%
Dentro de individuos	9	4	0.444	0.444	89%
Total	17	6.444		0.498	100%

$F_{ST} = 0.133$, $P = 0.001$, Grados de libertad (DF).

VI.4 Región Control.

Se analizó un total de 10 secuencias de región control incluyendo 3 individuos muestreados en campo de la región de Chiapas (Anexo 1). La comparación mediante BLAST de las secuencias obtenidas con la información del banco de datos NCBI, mostró que no existen secuencias de Región Control reportadas para *T. bairdii*. Sin embargo, se encontró 86% de identidad con la secuencia correspondiente de *T. terrestris* (GeneBank: AJ428947.1) y 80% con secuencias de *T. indicus* (GeneBank: KJ417810.1).

En el análisis de los fragmentos se encontraron 15 sitios polimórficos con una diversidad haplotípica $H_d = 0.846$ y una diversidad nucleotídica $\pi = 0.0128$. Los cambios nucleotídicos corresponden a transiciones. Se encontraron 5 haplotipos en los 6 individuos de *T. bairdii* de México y 2 haplotipos en los 4 individuos de E.U.

VI.4.1 Análisis filogenético.

Los filogramas generados por inferencia bayesiana (Figura 4a), Neighbor joining (Figura 4b) y Máxima verosimilitud (Figura 4c) se sustentan mutuamente (Figura 5). Dentro del grupo de *T. bairdii* se observa la separación de un subclado conformado por los cuatro individuos que fueron donados por zoológicos de E.U. a los zoológicos de México. La mayor distancia entre individuos de Chiapas es de 0.021. La distancia entre Tzimin y el grupo de individuos donados por E.U. es de 0.019. En el clado basal para *T. bairdii* se ubican Lili y MP3335 formando una politomía.

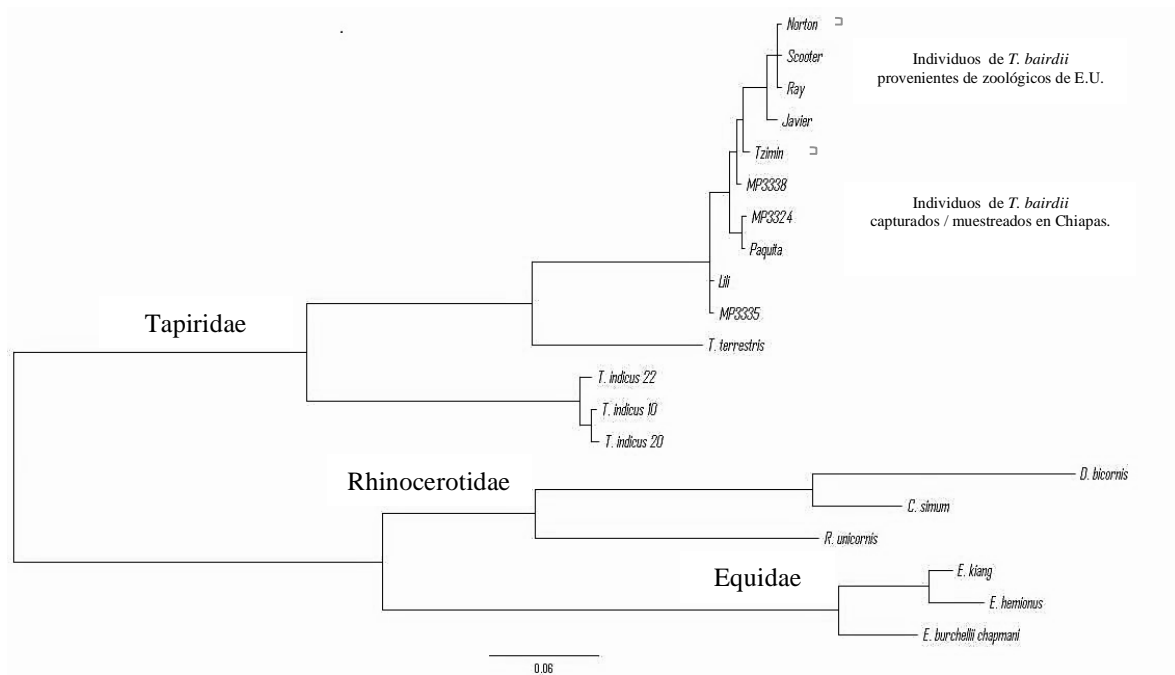


Figura 4a. Árbol filogenético generado por inferencia bayesiana. Árbol basado en secuencias de región control con representantes de las 3 familias del orden perissodactyla. En *T. bairdii* se observa la separación de los individuos que fueron donados a México por zoológicos de E. U. En el subclado basal, en los individuos de Chiapas, MP3335 y Lili forman una politomía.

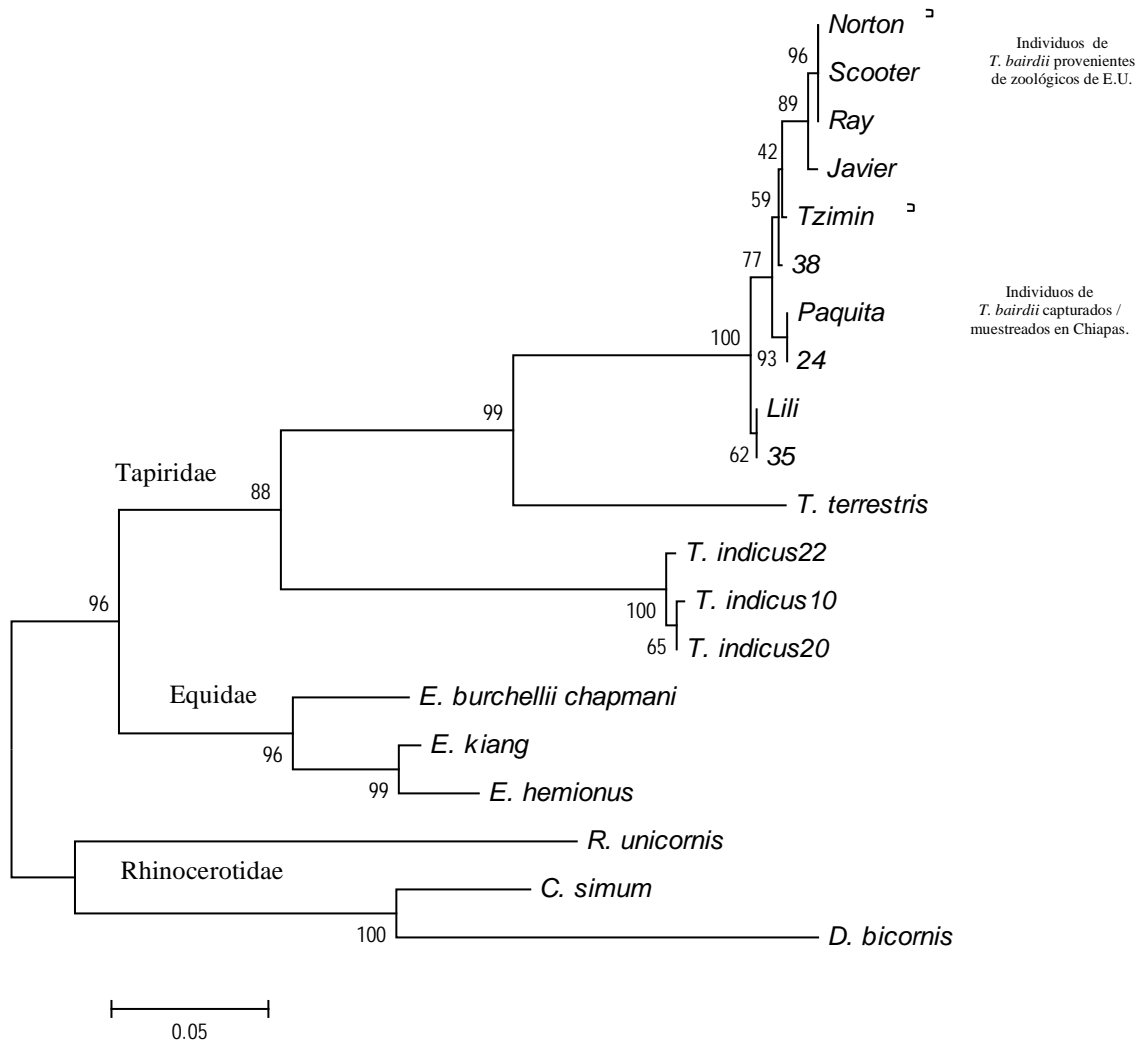


Figura 4b. Árbol filogenético generado por el método Neighbor joining. Árbol basado en secuencias de región control con representantes de las 3 familias del orden perissodactyla. En *T. bairdii* se observa la separación de los individuos que fueron donados a México por zoológicos de E. U.

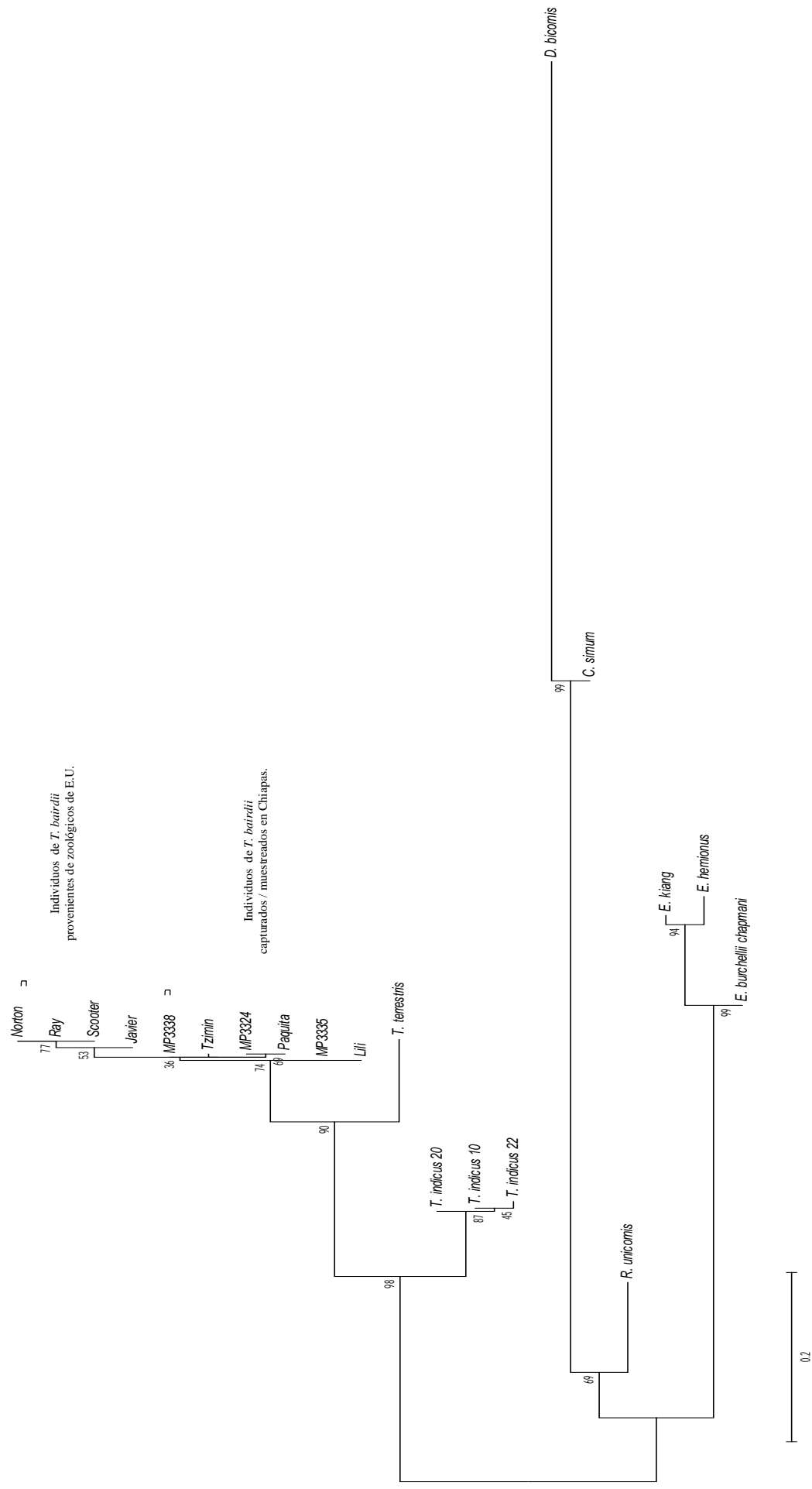


Figura 4c. Árbol filogenético generado por el método Máxima verosimilitud. Árbol basado en secuencias de región control con representantes de las 3 familias del orden perissodactyla. En *T. bairdii* se observa la separación de los individuos que fueron donados a México por zoológicos de E. U.

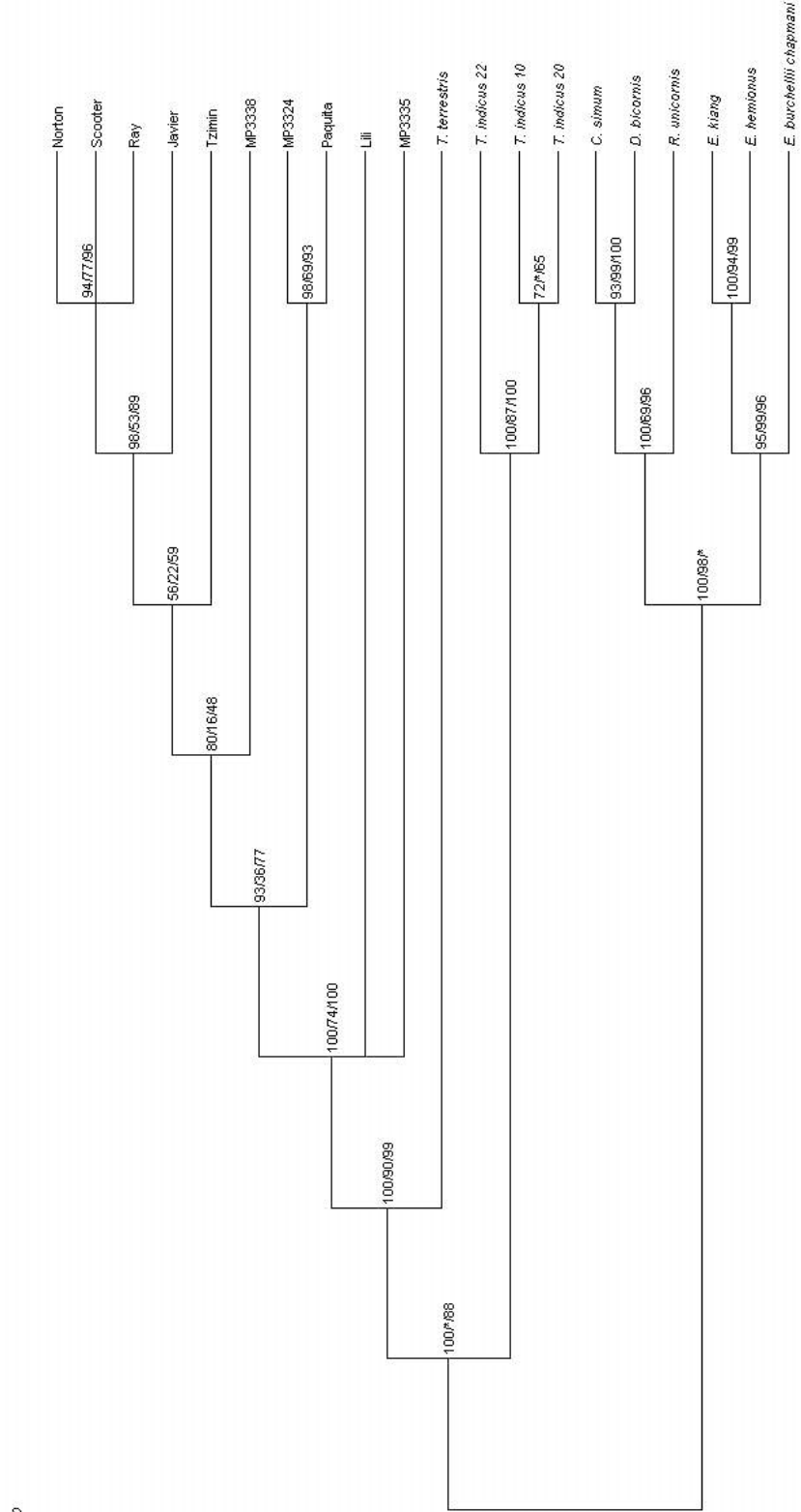


Figura 5. Árbol consenso basado en secuencias de región control. El orden de los números corresponde a los soportes de los arboles: Bayesiano / Máxima verosimilitud / Neighbor joining.

VI.4.2 Red de haplotipos.

La red de haplotipos (Figura 6) también muestra que se separan los individuos provenientes de zoológicos de Estados Unidos con solo 2 haplotipos dentro del grupo. En el grupo nativo de México se observan 5 haplotipos para 6 individuos, excluyendo a la progenie, con una separación dada hasta por 15 pasos mutacionales entre individuos. El grupo con menor número de cambios nucleotídicos muestra 3 cambios entre este y el ancestro hipotético común para el grupo de Chiapas (MV3). Entre los ancestros hipotéticos para ambos grupos, MV3 y MV4, existen solo 5 cambios nucleotídicos.

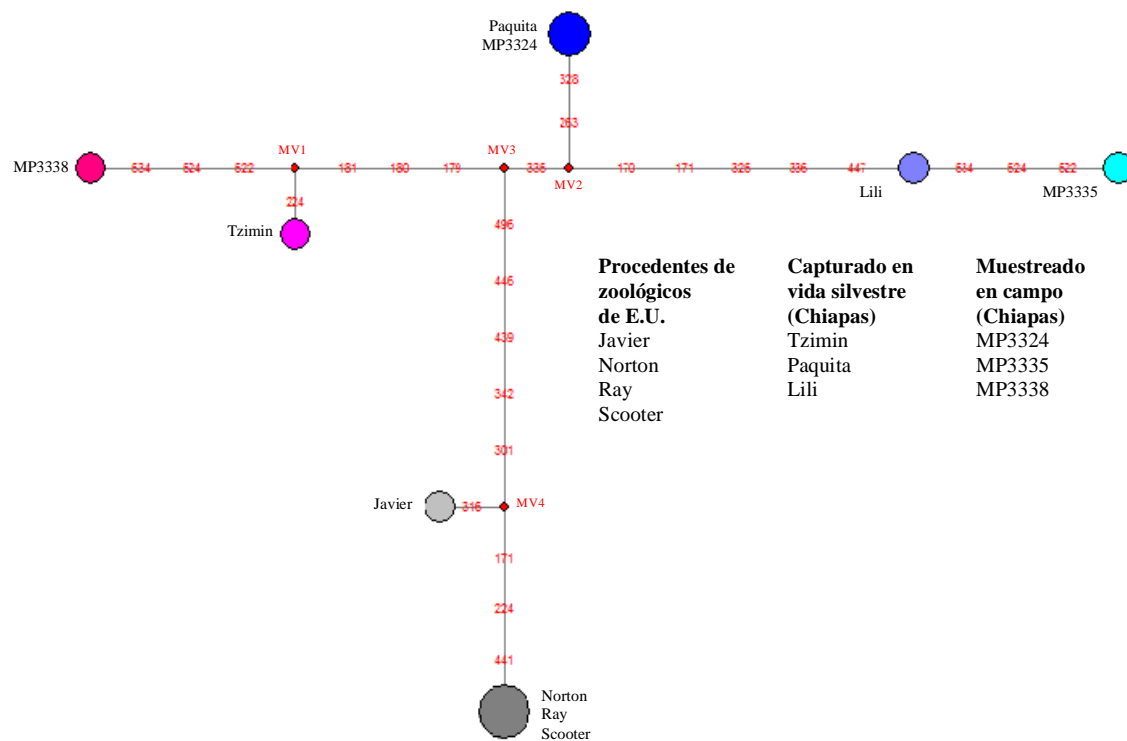


Figura 6. Red de haplotipos. Se muestran las relaciones entre los individuos de zoológico provenientes de Estados Unidos y de México. Red basada en los cambios nucleotídicos de secuencias de Región Control. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos compartiendo el haplotipo, los números sobre las líneas de la red corresponden al lugar de los cambios dentro de las secuencias. Los nodos MV1 a MV4 corresponden a ancestros hipotéticos representan el número de mutaciones entre haplotipos.

VII. DISCUSIÓN.

VII.1 Variabilidad genética de *T. bairdii*.

El análisis mediante microsatélites mostró que no hay diferencia significativa en la riqueza alélica entre los individuos nativos de México y los individuos provenientes de zoológicos de E. U. Contrastando con lo anterior, el número de alelos únicos fue mayor en los individuos de México confirmando la separación que existe entre ambos grupos.

El análisis de región control mostró una mayor variabilidad entre las líneas materna de los individuos nativos de México. Se encontraron 5 haplotipos en los 6 individuos analizados con hasta 15 pasos mutacionales entre secuencias. El grupo procedente de zoológicos de E.U. solo cuenta con dos líneas maternas y la diferencia entre estas es de 4 cambios nucleotídicos.

VII.2 Protocolo de extracción de ADN.

A pesar de que la técnica de extracción utilizada permitió la obtención de ADN de excretas de campo con calidad para PCR, se obtuvieron pocas secuencias de región control debido principalmente a la presencia de ADN de bacterias sobre los que se alinearon los oligonucleótidos, aun cuando fueron diseñados sobre secuencias de *T. terrestris*.

La amplificación de microsatélites a partir de muestras de excretas tomadas en campo fue pobre con un total de solo 6 amplicones. El mismo protocolo funcionó en todas las muestras de excreta tomadas en zoológico, las cuales se tomaron y/o se depositaron en alcohol desde < 6 horas hasta > 36 horas después de ser expulsadas, tanto en agua como en el suelo.

El grado de éxito en la obtención de ADN de excretas podría estar dependiendo del tiempo transcurrido antes de la toma de la muestra, del tiempo que la muestra dura en almacenamiento, o de ambas. Una vez extraído el ADN su degradación es constante, aunque la vida útil de las muestras es muy variable y puede ser desde solo unos días hasta varios meses. El tiempo transcurrido entre la prueba de diferentes diluciones y sus

repeticiones puede ser otro factor que redujo las probabilidades de obtención de microsatélites a partir de las muestras de campo.

VII.3 Microsatélites.

Los loci Tter04, Tter09 y Tter14 mostraron valores de $F_{st} = 0$. Es decir, que no hay fijación de alelos y no hay diferencia significativa entre individuos de México y Estados Unidos para estos 3 loci. Los loci Tba20, Tba23 y TtGt137 mantienen valores dentro del rango observado en otros mamíferos (Garner *et al.*, 2005). La F_{st} promedio para todos los loci fue de 0.021, denotando diferenciación no significativa en subgrupos.

El grupo de individuos nativos de México con o sin la adición de los individuos procedentes de zoológicos de E. U. muestran valores de riqueza alélica similares a los reportados en los estudios previos (Norton y Ashley, 2004a y 2004b). Se estima que en vida silvestre el lapso de tiempo entre cada generación para *T. terrestris* es de hasta 11 años (Wilson y Mittermeier, 2011). Si esta estimación es correcta y los valores demográficos de *T. bairdii* fueran similares a *T. terrestris*, podríamos suponer que la reducción de la población que la UICN estima en 50% en los últimos 33 años, inició o agudizó un cuello de botella. Así, el hecho de que poblaciones en cautiverio, descendientes de pocos fundadores, muestren valores similares de riqueza alélica a los encontrados en poblaciones silvestres puede respaldar la hipótesis de cuello de botella que Norton y Ashley (2004b) propusieron para la población de *T. bairdii* en vida silvestre en Costa Rica. Sin embargo, el reducido número de individuos es insuficiente para llevar a cabo un análisis para sustentar dicho cuello de botella.

VII.3.1 Alelos únicos.

El mayor número de alelos únicos se encontró para el locus Tter14 con 3 de 6 alelos solo dentro de los individuos nativos de México, y mediante éstos se denota la separación entre este grupo y el grupo proveniente de zoológicos de E. U. Además de los alelos de Tter14 se encontraron alelos únicos para TtGt137, Tba20 y Tba23. El número promedio de alelos fue bajo (4) y llama la atención que el único locus reportado previamente para *T.*

bairdii en individuos de zoológicos de Estados Unidos (Tba23) no comparte ningún alelo con los individuos analizados en este estudio. La población de *T. bairdii* que Norton y Ashley (2004a) analizaron en zoológicos de Estados Unidos es descendiente de solo ocho fundadores; de esa población, cuatro individuos de *T. bairdii* fueron donados por zoológicos de Estados Unidos a zoológicos de México por lo que se esperaría encontrar alelos previamente reportados para Tba23. Las diferencias en tamaño entre alelos tiene un rango de 5 a 10 repetidos (AC) entre ambos estudios, y considerando que la reproducción en cautiverio permite que el tiempo entre generaciones sea de 4 a 5 años, se puede considerar que entre cada estudio tan solo han pasado de dos a tres generaciones (10 años). Los errores de lectura por tartamudeo solo pueden explicar pequeñas diferencias con rangos de 1 a 3 nucleótidos. Una posibilidad que podría explicar una diferencia en el tamaño de los microsatélites de esta magnitud es la adición de nuevos parentales dentro de los zoológicos de Estados Unidos, posteriores a los análisis de Norton y Ashley (2004a), y de los cuales serían descendientes los individuos donados a México.

VII.4 Región control.

Los 3 individuos capturados en vida salvaje en Chiapas pertenecen a líneas maternas diferentes, aunque solo se cuenta con dos hembras adultas por lo que se va a perder la línea materna a la que pertenece Tzimin, el macho reproductor del programa que actualmente se lleva a cabo con éxito en el ZooMAT.

A pesar de la pérdida de haplotipos en la siguiente generación, podemos ver en los árboles filogenéticos, que la distancia entre los individuos nativos de México es mayor que la distancia entre las 2 líneas a las que pertenecen los individuos procedentes de E.U. La distancia entre Lili y Paquita, las hembras reproductoras del ZooMAT, es de 0.017 mientras que la distancia entre Javier, Norton, Ray y Scooter es de 0.005. La distancia existente entre Tzimin y MP3335, los individuos más distantes dentro del grupo de México es de 0.021. Estas distancias a pesar de ser pequeñas nos indican que, tan solo en Chiapas, se pueden encontrar individuos con una variabilidad mayor o al menos igual a la que se

puede encontrar en los zoológicos de E.U., el país con mayores facilidades para importar nuevos parentales para el programa de reproducción en nuestro país.

VII.4.1 Red de haplotipos.

En la red de haplotipos se observa que el haplotipo al que pertenece Paquita se ubica como el más próximo al ancestro común hipotético para el grupo de México con solo tres pasos mutacionales. En el mismo grupo, el individuo más distante del ancestro común es MP3335 con 9 pasos mutacionales. Se observa una mayor distancia entre individuos del grupo de México que entre grupos, aun cuando el grupo de E.U. desciende de parentales de diferentes países. El contraste que existe entre la variabilidad encontrada en líneas maternas y una riqueza alélica baja se podría explicar de dos formas. Primero, el número de loci analizados es relativamente bajo y los valores reales de riqueza alélica pueden estar siendo subestimados. Segundo, la baja riqueza alélica podría estar relacionada con la rápida disminución de la población en los últimos 33 años. *T. bairdii* cuenta con una velocidad de reproducción lenta y no ha pasado suficiente tiempo para que exista la predominancia de algunos haplotipos por lo que podríamos suponer que estamos analizando individuos de poblaciones que hasta hace pocas generaciones eran muy grandes y estaban conectadas.

VII.5 Manejo *ex situ*.

Los resultados obtenidos en microsatélites y región control indican que la obtención de individuos en vida salvaje es una mejor opción para aumentar y conservar la variabilidad genética *T. bairdii* mediante programas de manejo *ex situ*. Tan solo en Chiapas se pueden encontrar niveles de variabilidad mayores o iguales a los que ofrecen los descendientes del programa de reproducción en E.U., aun cuando dicho programa inicio con parentales provenientes de diferentes países de Centroamérica. El intercambios de individuos con otros países ha sido y es casi imposible excepto con E.U. Sin embargo, el espacio para mantener individuos también implica un gran esfuerzo para las instituciones y es importante ponderar ¿Qué queremos conservar?

Actualmente, solo un zoológico en nuestro país está llevando a cabo un programa de reproducción con éxito (ZooMAT). Este programa inicio con los individuos analizados en este trabajo. Se cuenta con otros 2 machos que también fueron capturados en vida salvaje, uno del cual no se obtuvo ADN y otro del cual no se obtuvo una muestra. La captura de hembras tanto de Chiapas como de poblaciones de *T. bairdii* en otros estados podría ayudar no solo a aumentar la variabilidad genética para los individuos en cautiverio. Un proyecto integral de monitoreo y muestreo dirigido a la obtención de nuevos parentales nos permitiría obtener más información genética de las poblaciones, y elegir de un modo sistemático a los individuos que pueden extraerse afectando lo menos posible a la población. Las costumbres y comportamiento de esta especie dificultan un estudio a nivel poblacional, pero en especies en peligro de extinción, la escasez de información dificulta aún más tomar las acciones adecuadas.

VIII. CONCLUSIONES.

Considerando la edad de las muestras y las condiciones en que estas son tomadas, el protocolo utilizado para este trabajo cuenta con porcentajes de éxito y reproducibilidad suficientes para continuar estudios sobre variabilidad genética de *T. Bairdii* en campo. El grado de éxito de esta técnica puede aumentar mejorando el muestreo.

La riqueza alélica encontrada en los individuos de *T. bairdii* de México es baja pero similar a los valores previamente reportados por Norton y Ashley, tanto para individuos en cautiverio como para poblaciones silvestres. Sin embargo, el número de individuos analizados es muy pequeño. Además, también es necesario aumentar el número de loci para confirmar que dichos valores reflejan un patrón y no una subestimación sujeta a al muestreo y/o número de loci analizados.

El análisis de la región control indica una alta diversidad de haplotipos para los individuos nativos de México con 5 diferentes haplotipos en 6 individuos. Dado que estos 6 individuos provienen de Chiapas, se puede considerar que esta es una zona muy importante en términos de variabilidad genética para la preservación de la especie.

Es necesario ampliar los estudios de variabilidad genética a poblaciones en vida salvaje para poder confirmar o rechazar la hipótesis de cuello de botella y conocer la estructuración de las poblaciones para tomar las mejores acciones de conservación tanto *ex situ* como *in situ* para *T. bairdii*.

IX. ANEXO I.

Secuencias de región control.

Se incluyen los archivos en formato fasta.

>No-TbDL-TapDLN

```
TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTTTCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AGTTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
GCAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAAACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCCAT-GTAAGTTC---TAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGGAGACTCACATCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCGTGGGGGTTC
```

>Sc-TbDL-TapDLN

```
TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTTTCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AGTTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
GCAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAAACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCCAT-GTAAGTTC---TAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGGAGACTCACATCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCGTGGGGGTTC
```

>Ra-TbDL-TapDLN

```
TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTTTCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AGTTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
GCAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAAACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCCAT-GTAAGTTC---TAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGGAGACTCACATCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCGTGGGGGTTC
```

>Ja-TbDL-TapDLN

```
TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTTTCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
GCAA-CATTGGTAATCGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAAACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCCAC-GTAAGTTC---TAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGGAGACTCACATCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCGTGGGGGTTC
```

>Tz-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTCCCCCCCC
GGTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AGTTGTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAGACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGGTTT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCTGTGGGGGTTC

>Ga-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTCCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTGTTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATATTT-GTCGCTCCAGACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGGTTT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCTGTGGGGGTTC

>Li-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTT--CCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGGATGTTT-GTCACTCCAGACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGATTC---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCTGTGGGGGTTC

>Nan-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTT--CCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGGATGTTT-GTCACTCCAGACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGATTC---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCATTCTCTGTGGGGGTTC

>Pa-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTCCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTGTTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATATTT-GTCGCTCCAGACAGA--ATGGTTGATTC
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGGTTT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC

AACCCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCCATTCCTCGTGGGGGTTC

>To-TbDL-TapDLN

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTT--CCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGGATGTTT-GTCACTCCAGACAGA--ATGGTTGATT
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGATT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCCATTCCTCGTGGGGGTTC

>MP332239-52124

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTCCCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTGTTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATATTT-GTCGCTCCAGACAGA--ATGGTTGATT
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGGTT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCCATTCCTCGTGGGGGTTC

>MP332239-52635

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTT--CCCCCC--
-GTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGGATGTTT-GTCACTCCAGACAGA--ATGGTTGATT
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGATT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCCATCC-TCGTGGGGTCTAA

>MP332239-52838

TCTTGTAACCAGAAAAGGAGAATAACCTCTCCCCAAGACTTCAAGGAAGAAGCCATAGC
CCCACCTTCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTACTTAACTATTCTTGAACGCCATTAAC
GATAAACTACCGTTGTGTACCATATCAGTATTAATAATTTTTCTTTTTTCCCCCCCCG
GGTA--ACGCC-----CTATGTACATCGTGC-ATTA--AATTGTTTGCCCCATGCA
TATAAGCATGTACATTATAATTATTGATCTTGCATAAAGGCATAATATGGTCGCAATAGC
ACAA-CATTGGTAATTGA-ACATGAATGTTT-GTTGCTCCAGACAGA--ATGGTTGATT
CACATAGTACATACTATTATTGATCGTACATACCCATT-AGGTCAAATCATTCTCGAC
AACATGCGTATCACCACCTAC-GTAGGTT---TTAACTACCAACTCCCGAGAAATCACC
AACCCTTGCGAGACTTACATCCTATTCTCGCTCCGGGCCCATCC-TCGTGGGGTCTAA

X. LITERATURA CITADA.

- Barnosky A. D., Matzke N., Tomiya S., Wogan G. O., Swartz B., Quental T. B., Marshall C., McGuire J. L., Lindsey E. L., Maguire K. C., Mersey B., y Ferrer E. A. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*. 471: 51-57.
- Beier L. R., Lewis S. B., Flynn R. W., Pendleton G. y Schumacher T. V. 2005. A single catch snare to collect brown bear hair for genetic mark-recapture studies. *Wildlife Society Bulletin*. 33: 766-773.
- Cardillo M. 2002. The life-history basis of latitudinal diversity gradients: how do species traits vary from poles to the equator. *Journal of Animal Ecology*. 71: 79-87.
- Castellanos A., Foerester C., Lizcano D. J., Naranjo E., Cruz- Aldan E., Lira-Torres I., Samudio R., Matola S., Schipper J., González-Maya J. 2008. *Tapirus bairdii*. IUCN 2014. IUCN Red list of threatened species. Versión 2014.1. <http://iucnredlist.org>.
- Constable J. J., Packer C., Colins D. A. y Pusy A. E. 1995. Nuclear DNA from primate dung. *Nature*. 337: 339.
- Dirzo R. 2001 Plant-mammal interactions: lessons for our understanding of nature and implications for biodiversity conservation. *Ecology achievement and challenge*.
- Dirzo R. y Miranda A. 1991. Altered patterns of herbivory and diversity in the forest understory: a case study of the possible consequences of contemporary defaunation. In: Price, P.W., Lewinshon, T.M., Fernandes, G.W., Benson, W.W.(Eds.), Plant-animal Interactions: *Evolutionary Ecology*, pp. 273-287.
- Dreher B. P., Winterstein S. R., Scribner K. T., Lukacs P. M., Etter D. R., Rosa G. J. M., Lopez V. A., Libants S. y Filcek K. B. 2007. Noninvasive estimation of black bear abundance incorporating genotyping errors and harvested bear. *Journal of Wildlife Management*. 71: 2684-2693.
- Eisenberg J. F. 1997. Tapirs: status survey and conservation action plan. Introduction. Pp. 1-2 in Brooks D. M., Bodmer R. E. and Matola S. (eds.). IUCN/SSC *Tapir Specialist Group*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 164 pp.
- Ernest H. B., Penedo M. C. T., May B. P., Syvanen M. y Boyce W. M. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*. 9: 433-441.

-
- Feldhamer G. A., Drickamer L. C., Vessey S. H. y Merritt J. F. 1999. *Mammalogy: adaptation, diversity, and ecology*. WCB McGraw-Hill, New, York, NY. 563 pp.
- FitzSimmons N. N., Moritz C. y Moore S. S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology Evolution*. V.12 3: 432-440.
- Fluxus Technology Ltd. 2013. Free Phylogenetic Network Software. <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- Fragoso J. M. V., Silvius K. M., Correa J. A. 2003. Long-distance seed dispersal by tapirs increases seed survival and aggregates tropical trees. *Ecology*. 84: 1998-2006.
- Frankham R., Ballou J. D. y Briscoe D. A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Garner A., Rachlow J. L. y Hicks J. F. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology*. 4: 1215-1221.
- Gonçalves da Silva A., Lalonde D. R., Quse V., Shoemaker A. y Russello M. A. 2010. Genetic approaches refine ex situ lowland tapir (*Tapirus terrestris*) conservation. *Journal of Heredity*. 5: 581-590.
- Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices versión 2.9.3. 2001; <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. Series. 41:95-98.
- Hershkovitz P. 1954. Mammals of northern Colombia. Preliminary report no. 7: Tapirs (genus *Tapirus*), with a systematic review of American species. *Proceedings of the United States Natural Museum*. 103:465-496.
- Holt W. V. y Pickard A. R. 1999. Role of reproductive technologies in genetic resource banks in animal conservation. *Review Reproductions*. 4: 143-150.
- Hoshino, Y. T. y Matsumoto N. 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ*. 19:13-19.
- Höss M., Kohn M., Pääbo S., Knauer F., Schroder W. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature*. 359: 199.
- Kohn M. H.; Wayne R. K. 1997. Facts from feces revisited. *TREE*. 12: 223-227.

-
- Lacy R. C. 1994. Managing genetic diversity in captive populations of animals. Pages 63-89 in Bowles M. L. and Whelan C. J. (eds.), *Restoration and Recovery of Endangered Plants and Animals*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Leakey R. y Lewin R. 1996. *The Sixth Extinction: Patterns of Life and the Future of Humankind*. New York: Bantam Dell Publishing Group.
- Lewis P. O. y Zaykin D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Versión 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Librado P. y Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. V. 25 11: 1451-1452.
- Lira-Torres I. Naranjo E., Güiris-Andrade M. y Cruz-Aldan E. 2004. Ecología de *Tapirus bairdii* (Perissodactyla: Tapiridae) en la Reserva de la Biosfera el Triunfo (Polígono I), Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 1-21.
- March I. J. 1994. La situación actual del tapir en México. CIES, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 37 pp.
- Matola S., Cuarón A. D., Rubio-Torgler H. 1997. Status and action plan of Bird's tapir (*Tapirus bairdii*). Pp. 29-45. in Brooks D. M., Bodmer R. E. and Matola S. (eds.). *Tapirs: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Tapir Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 164 pp.
- Mendoza, E., Fuller T. L., Thomassen H. A., Buermann W., Ramírez-Mejía D. and Smith T. B. 2013. A preliminary assessment of the effectiveness of the Mesoamerican Biological Corridor for protecting potential Baird's tapir (*Tapirus bairdii* Gill, 1865) habitat in southern Mexico. *Integrative Zoology*. 1: 35-47.
- Naranjo E. J. 2009. Ecology and conservation of baird's tapir in Mexico. *Tropical Conservation Science*. 2: 140-158.
- Naranjo E. y Cruz E. 1998. Ecología del Tapir (*Tapirus bairdii*) en la Reserva de la Biosfera La Sepultura Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 73: 111-123.
- Naranjo E. y Vaughan C. 2000. Ampliación del ámbito altitudinal del tapir Centroamericano (*Tapirus bairdii*). *Revista de Biología Tropical*. 48: 724.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Databank; AJ428947.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/aj428947.1> (accessed March 2013).
- Norton J. E. y Ashley M. V. 2004a. Genetic variability and population differentiation in

-
- captive Baird's tapirs (*Tapirus bairdii*). *Zoo Biology*. 23: 521–531.
- Norton J. E. y Ashley M. V. 2004b. Genetic variability and population structure among wild Baird's tapirs. *Animal Conservation*. 7: 211–220.
- Okello J. B. A., Wittermyer G., Rasmussen H. B., Douglas I., Nyakaana S., Arctander P. y Siegismud H. R. 2005. Noninvasive genotyping Mendelian analysis of microsatellites in african savannah elephants. *Journal of Heredity*. 6: 679-687.
- Orsini M. y Romano-Spica V. 2001. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in applied microbiology*. 33: 17-20.
- Peakall R. y Smouse P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology*. 6: 288-295.
- Phillips O. L. 1997. The changing ecology of tropical forests. *Biodiversity and Conservation*. 6: 291-311.
- Ramirez-Mejía D., Mendoza E. 2010. El papel funcional de la interacción planta-mamífero en el mantenimiento de la diversidad tropical. *Biológicas*. 1: 9-13.
- Roman J. 1999. 1998 International Studbook, Central American tapir (*Tapirus bairdii*). Norfolk: *American Zoo and Aquarium Association*. 107 p.
- Ronquist F. y Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572-1574.
- Roon D. A., Waits L. P., Kendall K. C. 2003. A quantitative evaluation of two methods or pre-serving hair samples. *Molecular Ecology Notes*. 3: 163-166.
- Russello M. A. y Amato G. 2004. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*. 13: 2829-2840.
- Sambrook J. y Russell D. W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Sanches A., Gomes de Figueiredo M., Fonseca Pereira F., Silveira L., Jácomo A. T. A. y Galetti P. M. 2009. Microsatellite loci isolated from the lowland tapir (*Tapirus terrestris*), one of the largest Neotropical mammal. *Conservation Genetic Resources*. 1: 115-117.
- Sanger F. and Coulson A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal Molecular. Biology*. 94: 441-448.

-
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental, especies nativas de flora y fauna silvestres de México, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, y lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, segunda edición, jueves 30 de diciembre de 2010.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Terborgh J. 1992. Maintenance of diversity in tropical forest. *Biotropica*. 24 : 283-292.
- Terborgh J. y Wright S. J. 1994. Effects of mammalian herbivores on plant recruitment in two Neotropical forests. *Ecology*. 75 : 1829-1833.
- Thevenon S., Thuy L. T., Ly L. V., Maudet F., Bonnet A., Jrne P. y Maillard J. C. 2004. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity of the Vietnamese Sika Deer (*Cervus nippon pseudaxis*) *Journal of Heredity*. 95 (I): 11-18.
- UICN. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2014.1 www.iucnredlist.org.
- Wallace R., Ayala G., Viscarra M. 2012. Lowland tapir (*Tapirus terrestris*) distribution, activity patterns and relative abundance in the Greater Madidi-Tambopata Landscape. *Integrative Zoology*. Vol. 7, 4 : 407-419.
- Wilson D. E. y Mittermeier R. A. 2011. Mammal Species of the World Vol 2. *Linx Editions* In association with International Conservation and IUCN.
- Zhang B., Li M., Ma L. y Wei F. 2006. A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Simples. *Biomedical Genetics*, Springer Science+Business Media, LLC 2006 10.1007/s10528-006-9050-1.