



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA GENÉTICA DEL MONO AULLADOR DE MANTO
(*Alouatta palliata mexicana*) Y SU CONSERVACIÓN EN
MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DIEGO ZUBILLAGA MARTÍN



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2021



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Zubillaga

Martín

Diego

(55)28806686

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

415035156

2. Datos del tutor

Dra.

Ella Gloria

Vázquez

Domínguez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Brenda

Solórzano

García

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Horacio Valdemar

Bárceñas

Rodríguez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Tania

Garrido

Garduño

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Alejandro

Flores

Manzanero

7. Datos del trabajo escrito.

Estructura genética del mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) y su conservación en México

62 p

2021



Tania Delgado

“We abuse land because we regard it as a commodity belonging to us. When we see land as a community to which we belong, we may begin to use it with love and respect.”

-Aldo Leopold

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de genética y ecología del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El financiamiento de este trabajo se realizó a través del Proyecto IN202819 “Diversidad, aislamiento y diferenciación genética de dos primates en peligro de extinción en el sureste de México”, del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (responsable: Dra. Ella Vázquez Domínguez).

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Ella Vázquez Domínguez, por permitirme integrarme a su equipo de trabajo, darme tantas buenas oportunidades y transmitirme grandes conocimientos dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Brenda Solórzano García, por toda la paciencia y el entrenamiento en campo, en laboratorio, durante los análisis de datos y en la revisión de este trabajo, y por transmitirme el amor hacia los primates mexicanos.

Al M. en C. Horacio V. Bárcenas Rodríguez, por todo el apoyo durante la carrera, por darme la oportunidad de conocer el campo a su lado, y por la revisión y discusión de este trabajo.

A la Dra. Tania Garrido Garduño y el Dr. Alejandro Flores Manzanero por tomarse el tiempo para revisar este trabajo y enriquecerlo con sus comentarios.

Al resto de los integrantes del Laboratorio de genética y ecología del IE, UNAM, por el apoyo y la compañía durante estos años de trabajo.

A Pablo y Rubén, por sus grandes conocimientos del campo y de los primates mexicanos, y todo su apoyo durante las salidas de colecta.

A Mariana, Kyle y Samuel, por su ayuda durante la recolección de muestras para la tesis.

A Don Bartolo, Don Gertrudis, Don Carmelo, Doña Juana, Don Simplicio, Alfonso, Lucio y todas las familias que nos apoyaron en campo en las regiones de Uxpanapa, Santa Marta y Los Tuxtles en Veracruz.

A Ana de la Hacienda de la Luz, Comalcalco, Tabasco, por permitirnos trabajar en su finca.

Al INAH por permitirnos trabajar en la Zona Arqueológica de Comalcalco.

A la SEMAHN de Chiapas por permitirnos trabajar en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica Finca Santa Ana, Pichucalco.

A la Estación de Biología Tropical Los Tuxtles, UNAM, por permitirnos trabajar y colectar ahí.

A la UNAM, por todas las oportunidades y apoyo; por convertirse en mí segunda casa.

A Tania Delgado, amiga y artista, por la realización de la portada de esta tesis.

A mis amigos de la carrera (y la vida): Yair, Erick, Carmina, Amanda, Diana, Abelardo, Zamna, Ayrton, Diego, Luis y todo el que me haya motivado a ahondar en los estudios de la vida.

A mis papás y mi hermano, por todo el apoyo y amor brindado a lo largo de mi vida.

A los monos y todos los que luchan por preservar las selvas mexicanas, ya que sin ellos no habría objeto de estudio.

Para los monos, y todos sus admiradores.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Genética de poblaciones.....	2
I.2 Variación genética.....	3
I.3 Estimadores de variación genética.....	5
I.4 Marcadores moleculares.....	6
I.5 Loci de microsatélites.....	7
I.6 Estructura poblacional y diferenciación genética.....	8
I.7 Genética de la conservación.....	9
II. ANTECEDENTES	
II.1 Los primates mexicanos y su conservación.....	10
II.2 <i>Alouatta palliata mexicana</i>	10
II.3 Genética de poblaciones del mono aullador de manto.....	13
III. OBJETIVOS.....	14
IV. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	14
V. JUSTIFICACIÓN.....	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1 Área de estudio	
VI.1.1 Poblaciones silvestres.....	15
VI.1.2 Poblaciones en semicautiverio.....	15
VI.2 Trabajo de campo y toma de muestras.....	16
VI.3 Trabajo de laboratorio	
VI.3.1 Extracción de ADN.....	17
VI.3.2 Amplificación de loci de microsatélites con PCR.....	17
VI.3.3 Secuenciación y genotipificación de loci de microsatélites.....	20
VI.4 Análisis genéticos y estadísticos	
VI.4.1 Alelos nulos.....	21
VI.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	21
VI.4.3 Definición de grupos genéticos (estructura genética).....	21
VI.4.4 Diferenciación poblacional.....	22
VI.4.5 Diversidad genética y endogamia.....	22
VI.4.6 Análisis de parentesco.....	23
VI.4.7 Estimación de N_e	23

VII. RESULTADOS

VII.1 Extracción de ADN y amplificación de loci de microsatélites.....	24
VII.2 Alelos nulos.....	24
VII.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	25
VII.4 Grupos genéticos.....	27
VII.5 Diversidad genética.....	29
VII.6 Índice de endogamia.....	30
VII.7 Diferenciación poblacional.....	30
VII.8 Análisis de parentesco.....	32
VII.9 Tamaño efectivo poblacional.....	33

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Efectos históricos en la genética del mono aullador de manto.....	34
VIII.2 La fragmentación y sus consecuencias.....	37
VIII.3 Historia de tres poblaciones en semicautiverio.....	40
VIII.4 Implicaciones para su conservación.....	41

IX. CONCLUSIONES.....

43

REFERENCIAS.....

44

ANEXOS

Anexo 1.....	56
Anexo 2.....	57
Anexo 3.....	58
Anexo 4.....	59
Anexo 5.....	60
Anexo 6.....	61
Anexo 7.....	62

RESUMEN

El mono aullador de manto, *Alouatta palliata mexicana*, es una de las tres especies de primates que existen en México. Representa la distribución más al norte de primates no-humanos en el continente americano. Está catalogada como especie en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2010, al igual que la subespecie según la lista roja de la IUCN, con una tendencia poblacional en declive. A pesar de la importancia de integrar información genética poblacional para la conservación de especies, a la fecha se han realizado escasos estudios genéticos de la población silvestre de este mono en México, todos a nivel local sin abarcar su rango de distribución completo. Además, en dichos estudios se han utilizado marcadores moleculares distintos, por lo que no son del todo comparables entre ellos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura genética de las poblaciones silvestres del mono aullador de manto *A. p. mexicana* a lo largo de su distribución en México, y así evaluar la estructura genética de sus poblaciones, tamaño efectivo poblacional, endogamia y parentesco. Por medio de un muestreo no invasivo, se colectaron excretas de individuos diferentes claramente identificados en campo, provenientes de 15 localidades con poblaciones nativas y de tres poblaciones semicautivas. Se analizaron nueve loci de microsatélites para un total de 128 individuos. Con base en análisis bayesianos se identificaron tres grupos genéticos: Norte, Centro-oeste y Centro-este, los cuales presentaron diferencias genéticas significativas entre grupos. La diversidad genética global incluyó 54 alelos (4 a 8 alelos por locus), con valores moderadamente bajos de número de alelos ($N_a=6.0 \pm 0.55$), riqueza alélica ($R_a=5.91$) y heterocigosis observada y esperada ($H_o=0.345 \pm 0.05$; $uH_e=0.565 \pm 0.06$). Se encontraron señales positivas de endogamia a nivel de grupo genético y por región, con presencia de parientes de primer orden en todas las poblaciones. El tamaño efectivo poblacional fue bajo ($N_e=59.5$). Las poblaciones en semicautiverio presentaron niveles de endogamia y diversidad genética similares a las poblaciones silvestres, por lo que podrían ser considerados como reservorios para enriquecer el pool genético de las poblaciones silvestres en un futuro. Nuestros resultados muestran la urgencia de realizar esfuerzos para la conservación de los tres grupos genéticos identificados, considerando cada uno una Unidad de Manejo, para así asegurar el mantenimiento de su diversidad adaptativa y la supervivencia de *A. p. mexicana*. Proponemos que los monos aulladores de manto en México constituyen una Unidad Evolutiva Significativa crucial para la preservación de la diversidad filogenética y funcional de esta especie. En este estudio se reafirma el grave riesgo en el que se encuentra el mono aullador de manto en el país y la necesidad de accionar para asegurar la preservación de la especie a largo plazo.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es un área que, con base en las leyes de Mendel y otros principios genéticos aplicados a las poblaciones naturales, estudia el origen, los niveles y la distribución de la variación genética en las poblaciones a través del tiempo y el espacio (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007; Hamilton, 2009). Debido a que la evolución, en su sentido más básico, se puede definir como el cambio en el tiempo de las frecuencias alélicas o la combinación de alelos en el pool genético de una o varias poblaciones (Templeton, 2006), se puede señalar que la genética de poblaciones también estudia los mecanismos responsables de la microevolución, es decir las fuerzas que resultan en cambios evolutivos dentro de las especies a lo largo del tiempo (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007). Uno de los objetivos de esta ciencia interdisciplinaria es construir predicciones que puedan ser aplicadas de manera general a especies y sistemas genéticos, para esto se comparan patrones genéticos observados en poblaciones reales con patrones esperados para probar modelos construidos usando principios y supuestos generales (Hamilton, 2009). Sin embargo, también se pueden utilizar principios de modelos que han sido previamente probados y aceptados como una base para plantear hipótesis acerca de los procesos que causaron un patrón genético observado en una población natural (Hamilton, 2009).

El modelo en el que se fundamenta la teoría de genética de poblaciones, a pesar de sus supuestos simplificados y poco realistas, ha probado ser útil para describir diversos atributos genéticos poblacionales, sirviendo como un modelo base para desarrollar otros más complejos y realistas (Templeton, 2006). Este modelo asume poblaciones grandes que tienden al infinito, donde el apareamiento es al azar y no hay mutación, migración (flujo génico) o selección, es decir que todos los individuos tienen la misma probabilidad de reproducirse. Por lo tanto, las frecuencias alélicas y genotípicas entran en equilibrio después de una sola generación y se mantienen constantes en el tiempo (Frankham *et al.*, 2010). A éste se le denomina equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), en honor a los investigadores que lo desarrollaron de manera independiente en 1908 (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).

Si las frecuencias alélicas de una población no se encuentran en EHW significa que algunas de las condiciones del modelo no se están cumpliendo y, por lo tanto, es probable que alguna fuerza evolutiva y/o proceso ecológico las esté afectando (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007). El equilibrio Hardy-Weinberg para una población diploide con un solo locus se representa con la siguiente ecuación:

$$p + q = 1; (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

(Ecuación 1)

donde: $p = f(A) \rightarrow$ frecuencia del alelo A

$q = f(a) \rightarrow$ frecuencia del alelo a

$p^2 = f(AA) = D \rightarrow$ frecuencia del genotipo homocigoto AA

$q^2 = f(aa) = R \rightarrow$ frecuencia del genotipo homocigoto aa

$2pq = f(Aa) = H \rightarrow$ frecuencia del genotipo heterocigoto Aa

I.2 Variación genética

La variación de los genes a través del tiempo y el espacio constituye la base fundamental del cambio evolutivo. Sin variación genética, la evolución, y por lo tanto la vida misma, no sería posible (Futuyma y Kirkpatrick, 2017). La variación genética es, en consecuencia, la fuente de toda la biodiversidad en nuestro planeta (Scott Mills, 2013). Se ha visto que una variabilidad genética alta otorga mayores oportunidades a las poblaciones para evolucionar y adaptarse a los cambios ambientales; contribuye además a la diversidad de los ecosistemas, volviéndolos más resilientes (Frankham *et al.*, 2010). Esta variación se genera, mantiene y pierde en las poblaciones por medio de las interacciones de varios procesos que pueden aumentar o disminuir sus niveles (Hedrick, 2011), los cuales son:

- Mutación: cualquier error o cambio heredable que ocurra en el material genético, y es la fuente fundamental de variación genética en las poblaciones naturales (Hartl y Clark, 2007; Allendorf *et al.*, 2013). Las mutaciones ocurren tanto a nivel molecular como a nivel cromosómico, por lo que incluyen diversos procesos que van desde cambios en la secuencia nucleotídica de un solo gen hasta la formación de nuevos rearrreglos cromosómicos, así como inversiones y translocaciones (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007; Allendorf *et al.*, 2013). Estos procesos crean diversidad dentro del pool genético, pero tienden a ocurrir lentamente (Templeton, 2006; Scott Mills, 2013). La mayoría de los genes silvestres tienen una tasa de mutación de entre 10^{-4} a 10^{-6} por gen por generación (Hartl y Clark, 2007). Estas mutaciones pueden o no tener efectos detectables en el fenotipo de los individuos (Allendorf *et al.*, 2013).
- Flujo génico: movimiento efectivo de alelos entre poblaciones locales producto del movimiento de individuos (migración) o de gametos, permitiendo que variantes genéticas se propaguen entre poblaciones (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007; Hamilton, 2009). Si el flujo génico es limitado se produce heterogeneidad en las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones, es decir estructura poblacional, que puede generar diferenciación

entre éstas (Hamilton, 2009). En cambio, si hay presencia de flujo genético, las variaciones genéticas se comparten entre poblaciones, y puede aumentar su diversidad genética (Scott Mills, 2013).

- Deriva génica: cambio en las frecuencias alélicas de una población producto de la aleatoriedad en los eventos de supervivencia, reproducción y herencia (Scott Mills, 2013; Futuyma y Kirkpatrick, 2017). Estos cambios en las frecuencias alélicas resultan en la pérdida de unos alelos mientras que otros se fijan de manera aleatoria, disminuyendo la variación genética (Scott Mills, 2013). Generalmente es resultado de procesos de cuello de botella o efecto fundador, y se mide indirectamente con el tamaño efectivo de la población, o N_e (Futuyma y Kirkpatrick, 2017).
- Selección natural: cualquier diferencia consistente en la adecuación entre diferentes clases de entidades biológicas (Futuyma y Kirkpatrick, 2017). Los alelos que promueven la adecuación (supervivencia y reproducción) incrementan su frecuencia de generación en generación, asociado generalmente con una mayor capacidad de la población para sobrevivir y reproducirse en ese ambiente, promoviendo la adaptación evolutiva (Hartl y Clark, 2007). La selección natural está estrechamente relacionada con el ambiente en el que se desarrollan las poblaciones, y puede ser direccional, estabilizadora o disruptiva dependiendo del genotipo favorecido (Futuyma y Kirkpatrick, 2017).
- Endogamia: es un mayor número de eventos reproductivos entre individuos genéticamente relacionados de lo que se esperaría por azar (Höglund, 2009). El coeficiente de endogamia f describe la probabilidad de que dos alelos en un locus sean idénticos por descendencia, es decir que ambos sean copias de un alelo particular heredadas por un ancestro común (Höglund, 2009). Este proceso disminuye la heterocigosis y puede aumentar la frecuencia de alelos deletéreos en las poblaciones, disminuyendo su adecuación mediante la depresión por endogamia (Höglund, 2009; Frankham *et al.*, 2010).
- Recombinación: proceso que involucra el intercambio de material genético entre múltiples cromosomas o entre diferentes regiones de un mismo cromosoma, por lo que involucra cualquier mecanismo genético que pueda crear una nueva combinación de alelos o haplotipos, en eventos meióticos y no-meioíticos, que creen una nueva combinación de genes que pueda ser heredada (Hartl y Clark, 2007; Clancy, 2008). Junto con la mutación, la recombinación puede generar niveles realmente altos de variación genética (Templeton, 2006).

I.3 Estimadores de variación genética

Existen múltiples estimadores que permiten cuantificar la diversidad genética de manera estandarizada, generalmente descrita en términos de heterocigosis, frecuencias alélicas, genotípicas y número de alelos (Frankham *et al.*, 2010). La elección del estimador está relacionada principalmente con el tipo de marcador genético utilizado, pero algunos de los más comunes son:

- Loci polimórficos: estrictamente hablando, un locus es polimórfico si presenta más de un alelo. Sin embargo, entre más grande sea la muestra más posible será encontrar alelos raros por lo tanto, se suele considerar que un locus es polimórfico si la frecuencia del alelo más común es menor a 0.95 o 0.99 (Höglund, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).
- Heterocigosis: es la medida más utilizada para calcular la variación genética dentro y entre las poblaciones. Se basa en la ecuación del equilibrio de Hardy-Weinberg (*Ecuación 1*), y plantea que un individuo que no es homocigo en un locus es, por lo tanto, heterocigo. Así que se puede definir como la proporción de individuos que son heterocigotos en un locus. La heterocigosis esperada (H_E), a veces llamada diversidad genética, es la heterocigosis que se espera en una población con base en las frecuencias alélicas observadas (Höglund, 2009), dados k alelos en un locus, se puede definir como:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

(*Ecuación 2*)

donde: H_E = heterocigosis esperada

p_i^2 = frecuencia de homocigotos

También existe la heterocigosis observada (H_O), que es el promedio de las proporciones observadas de genotipos heterocigotos (Höglund, 2009). En condiciones de panmixia, se espera que la heterocigosis observada y la esperada sean cercanas, pero si la población se encuentra en desequilibrio de Hardy-Weinberg, la H_O se puede calcular como:

$$H_O = \sum_{i < j}^n p_{ij}$$

(*Ecuación 3*)

donde: H_O = heterocigosis observada

p_{ij} = frecuencia de heterocigotos

- Alelos por locus/Riqueza alélica: Se refiere al número de variantes o alelos distintos que puede presentar un gen. Esta medida depende del tamaño de muestra, así que para poder comparar muestras de tamaños distintos se emplea la riqueza alélica (Höglund, 2009), la cual permite ajustar el número de alelos por locus utilizando el método de rarefacción de Hurlbert (1971), de manera que el número de observaciones en la población coincida con el número de muestra más bajo en el estudio (El-Mousadik y Petit, 1996).

I.4 Marcadores moleculares

Antes de los 1960s los métodos para detectar y medir la variación genética se basaban casi en su totalidad en observaciones de variantes del fenotipo y patrones de cría, por lo que era casi imposible estudiar y rastrear la variación genética en poblaciones silvestres (Scott Mills, 2013). El estudio de la variación genética aplicado a un gran número de genes en una alta variedad de organismos se volvió posible cuando surgieron técnicas que permitieron estudiar directamente los genes y sus productos (Hartl y Clark, 2007). La primera innovación llegó con el desarrollo de la electroforesis de proteínas, permitiendo observar la variación genética en alelos llamados *alozimas*, logrando identificar organismos homocigotos y heterocigotos. Sin embargo, para su estudio era necesario sacrificar a los organismos y analizar muestras frescas (hígado, pulmón, etcétera), además de que tenían limitaciones de número de genes posibles a estudiar (Scott Mills, 2013).

La electroforesis continúa siendo utilizada para el estudio de la variación genética con base en secuencias de ADN, dada la carga negativa de esta molécula que permite su movimiento en un campo eléctrico (Hartl y Clark, 2007). Por ello existen variados análisis que consisten en correr fragmentos de ADN, mitocondrial o nuclear, a través de un gel para separar piezas de ADN por tamaño (Scott Mills, 2013). Muchos de estos análisis utilizan enzimas de restricción, que cortan el ADN de doble cadena en partes específicas donde se ubican los sitios de restricción, generando fragmentos de restricción (Hartl y Clark, 2007). Cualquier diferencia en el tamaño de un fragmento de restricción que se encuentra segregando en poblaciones naturales es llamado un *polimorfismo en el tamaño del fragmento de restricción* (RFLPs, por sus siglas en inglés), y como tienden a ser abundantes en los organismos han sido ampliamente utilizados en el estudio de la variación genética en poblaciones naturales (Hartl y Clark, 2007).

La siguiente gran revolución en el estudio de la genética molecular vino en los 1980s con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que permitió la amplificación de fragmentos específicos del ADN en el laboratorio. Esto resultó en la creación de marcadores genéticos específicos que provenían de muestras muy pequeñas de ADN y con alta

resolución para distinguir individuos y poblaciones. Ello permitió trabajar con ADN de animales silvestres y de muestras antiguas, de manera no destructiva e incluso no invasiva (Frankham *et al.*, 2010; Scott Mills, 2013). Algunos de estos marcadores son: *ADN polimórfico amplificado aleatoriamente* (RAPD, por su siglas en inglés), loci de *microsatélites y secuencias de ADN y polimorfismos de un solo nucleótido* (SNP, por su siglas en inglés), (Höglund, 2009; Frankham *et al.*, 2010; Allendorf *et al.*, 2013).

I.5 Loci de microsatélites

Los loci de microsatélites, también llamados *repetición tándem simple* (STR, por sus siglas en inglés) o *repetición de secuencia simple* (SSR, por sus siglas en inglés), son un tipo de marcador de secuencia de ADN basado en técnicas de PCR. Estos loci son pequeñas secuencias, de 1 a 6 pares de bases, repetidas en tándem a lo largo del genoma que suelen presentar muchos alelos por locus, por la variación en el número de copias tándem, y altos niveles de heterocigosis (Templeton, 2006; Hamilton, 2009; Allendorf, *et al.*, 2013). El número de repeticiones en un locus polimórfico va en un rango aproximado de 5 a 100, por lo que los productos de PCR de microsatélites generalmente son de entre 75 y 300 pares de bases, dependiendo el locus y la localización de los oligonucleótidos (Allendorf *et al.*, 2013).

Estos marcadores moleculares son uno de los métodos más favorecidos para medir la diversidad genética en poblaciones naturales de organismos silvestres, ya que pueden ser amplificados a partir de muestras no invasivas. Cada locus es codominante, donde los alelos presentan herencia mendeliana y alto polimorfismo, incluso en poblaciones pequeñas y especies en riesgo (Frankham *et al.*, 2010; Allendorf *et al.*, 2013; Scott Mills, 2013). Estos niveles de polimorfismo resultan de una alta tasa de mutación relacionada principalmente al deslizamiento durante la replicación del ADN (Ellegren, 2000), con tasas de mutación típicas de 10^{-3} o 10^{-4} por generación (Allendorf *et al.*, 2013). Este polimorfismo es expresado en el tamaño de los alelos y se puede visualizar en geles de electroforesis y cromatogramas (Templeton, 2006; Hamilton, 2009).

Los microsatélites suelen reflejar la variación genética para loci neutrales, ya que las repeticiones tándem usualmente están localizadas en segmentos de ADN no codificante (Frankham *et al.*, 2010). Sin embargo, los sitios de los oligonucleótidos pueden ser altamente conservados, por lo que los oligos (secuencias específicas que permiten amplificar un locus de microsatélite) desarrollados para una especie, frecuentemente pueden ser utilizados para especies relacionadas (Allendorf *et al.*, 2013). Por lo tanto, estos marcadores son una de las

herramientas más poderosas e informativas para estudiar la variación genética en poblaciones naturales (Frankham et al., 2010).

I.6 Estructura poblacional y diferenciación genética

La estructura poblacional es la diferencia que existe entre las poblaciones en la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar se apareen (Hamilton, 2009). Dicha probabilidad generalmente no es aleatoria y depende de la cercanía de los individuos en la población, ya que las poblaciones tienden a subdividirse naturalmente en grupos más pequeños dentro de los cuales suele ocurrir el apareamiento (Hartl y Clark, 2007). Cuando hay estructura o subdivisión poblacional es casi inevitable que exista algo de diferenciación genética, que sucede cuando las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones cambian, comúnmente por procesos como la selección natural, la ausencia de flujo génico y la endogamia (Templeton, 2006; Hartl y Clark, 2007).

Existen numerosos métodos que permiten cuantificar la estructura genética de las poblaciones naturales, siendo los estadísticos F determinados por Sewall Wright (1951) los más utilizados:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

(Ecuación 4)

donde: H_S = heterocigosis esperada promedio de las subpoblaciones, asumiendo apareamientos aleatorios dentro de cada subpoblación.

H_I = heterocigosis observada promedio dentro de cada subpoblación

F_{IS} = correlación entre el estado de dos alelos en un genotipo muestreado aleatoriamente

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

(Ecuación 5)

donde: H_T = heterocigosis esperada de la población total

H_S = heterocigosis esperada promedio de las subpoblaciones

F_{ST} = probabilidad de que dos alelos muestreados al azar sean idénticos

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

(Ecuación 6)

donde: H_T = heterocigosis esperada de la población total

H_I = heterocigosis observada promedio dentro de cada subpoblación

F_{IT} = correlación entre el estado de dos alelos de un genotipo muestreado al azar de una sola subpoblación dada la posibilidad de apareamiento no aleatorio dentro de las poblaciones y divergencia en frecuencia de alelos entre poblaciones.

Sin embargo, estos estadísticos no son los más eficientes si se trabaja con marcadores como los microsatélites, los cuales presentan modelos de alelos infinitos y procesos de mutación distintos (Rousset, 1996). Slatkin (1995) introdujo un estadístico análogo a la F_{ST} de Wright (Ecuación 5), pero más apropiado para el análisis de loci de microsatélites, ya que se basa en un modelo de mutación escalonada, y se representa con la siguiente ecuación:

$$R_{ST} = \frac{S-SW}{S}$$

(Ecuación 7)

donde: SW = diferencia cuadrática media de tamaño de alelos entre pares de genes dentro de las poblaciones

S = diferencia cuadrática media de tamaño de alelos entre pares de genes tomados de una colección de P poblaciones

1.7 Genética de la conservación

La biología de la conservación es considerada una disciplina en crisis, donde la urgencia de los problemas que enfrenta demanda una rápida y eficaz toma de decisiones con base en la información disponible en el momento (DeSalle y Amato, 2009). Por lo tanto, se ha vuelto un campo multidisciplinario abarcando distintas áreas de la biología, como la ecología, genética, biología de vida silvestre, biología de recursos, antropología, economía, etc. (Frankham *et al.*, 2010). Se ha reconocido la importancia de los factores genéticos en la biología de la conservación desde el inicio de los 1970s (Frankel, 1974), incluso formó parte de la discusión de uno de los primeros libros de esta área (Frankel y Soulé, 1981).

La genética de la conservación se puede definir como el uso de las teorías y técnicas genéticas, con base en la genética de poblaciones, para reducir el riesgo de extinción en las especies amenazadas. Actualmente se enfoca en describir las diversas consecuencias genéticas que surgen de la reducción del tamaño poblacional de especies silvestres y buscar alternativas que aseguren su prevalencia en el futuro (Frankham *et al.*, 2010). Uno de los principales objetivos de esta disciplina es establecer acciones que garanticen el mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones para así evitar el vórtex de la extinción, que ocurre en poblaciones pequeñas donde se incrementa el nivel de endogamia y deriva génica, reduciendo la diversidad

genética; todo lo cual tiene efectos negativos sobre individuos y poblaciones (Höglund, 2009). Entre las problemáticas que aborda la genética de la conservación tenemos el definir unidades de conservación y corredores funcionales para las especies en riesgo (Barbosa *et al.*, 2018), conocer cómo la urbanización ha afectado la evolución de las especies silvestres (Johnson y Munshi-South, 2017), evaluar los efectos de los procesos de fragmentación y pérdida de hábitat en la estructura genética de las poblaciones (Schweizer *et al.*, 2016; Srebek-Araujo *et al.*, 2018), indagar posibles rutas de tráfico de especies (Nash *et al.*, 2018), y conocer el estado de conservación y la historia de las poblaciones de las especies en riesgo (Shaffer *et al.*, 2015; Abadía-Cardoso *et al.*, 2017; Leigh *et al.*, 2019). Es sin duda clave que la información obtenida sea incorporada a los planes de conservación de especies en riesgo que garanticen su presencia a largo plazo (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006).

II. ANTECEDENTES

II.1 Los primates mexicanos y su conservación

Los primates no-humanos son un grupo de mamíferos que actualmente está pasando por una crisis de conservación severa, con cerca del 60% de las especies en peligro de extinción y 75% con poblaciones en decremento a nivel mundial (Estrada *et al.*, 2017). México alberga la distribución de primates más norteña dentro del continente americano, con tres especies: mono araña (*Ateles geoffroyi vellerosus*), mono aullador negro (*Alouatta pigra*) y mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) (Tobón *et al.*, 2012). Las tres especies pertenecen al infraorden Platyrrhini, que se caracteriza por sus narinas planas y laterales, y a la familia Atelidae, los platyrrhinos más grandes, todos con una cola prensil con un extremo ventral desnudo para un mejor agarre. En México se distribuyen en el sureste del país, habitando bosques tropicales de Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco y la península de Yucatán (CONANP, 2012). Son primates diurnos y arborícolas, *Alouatta* se alimenta principalmente de hojas y *Ateles* de frutas, pero ambos se consideran folívoro-frugívoros. Todas las especies de primates mexicanos se encuentran en peligro de extinción según la NOM-059-SEMARNAT-2010, resultado de las mismas amenazas: destrucción y fragmentación del hábitat, cacería de subsistencia y tráfico ilegal (Chapman y Peres, 2001; CONANP, 2012).

II.2 *Alouatta palliata mexicana*

El mono aullador de manto (*Alouatta palliata*) se distribuye desde el sur de México, a lo largo de toda América Central, hasta la costa oeste del Pacífico de Colombia y Ecuador y el norte de Perú (Cortés-Ortiz *et al.*, 2015, Ruiz-García *et al.*, 2007). Es un primate robusto y de gran talla,

considerado uno de los más corpulentos de América, con adultos que miden entre 38-58 cm de cuerpo, y entre 90-125 cm incluyendo la cola, siendo ésta más larga que el cuerpo (CONABIO, 2011; CONANP, 2012). Presenta dimorfismo sexual donde los machos son más grandes (4.5 y 9.8 kg) que las hembras (3.1 y 7.6 kg) y se caracterizan por un aumento en su hueso hioides, que les permite emitir su particular aullido (Rowe, 1996). Pueden vivir hasta 19 años (Di Fiore y Campbell, 2007), iniciando su reproducción a los 3.5 años y con intervalo entre crías de 1.8 años (Raguet-Schofield y Pavé, 2015). Tiene pelaje largo y denso de un color característico café oscuro, la cara carece de pelo y el hocico es chato, con nostrilos amplios, redondos y planos. Presentan mentón elongado con pelo en forma de barba, y una cola larga y prensil desnuda en el último tercio inferior con dermatoglifos. La piel es color negro, ojos café oscuro y el macho presenta un escroto de color blanco (CONABIO, 2011; CONANP, 2012). Históricamente se reconocen cinco subespecies: *A.p. mexicana*, *A.p. palliata*, *A.p. aequatorialis*, *A.p. coibensis* y *A.p. trabeata* (Hall, 1981; Cortés-Ortiz *et al.*, 2015). Sin embargo, Ruiz-García *et al.* (2017) documentan que hay sólo dos subespecies claramente definidas (*A.p. palliata* y *A.p. mexicana*).

En México habita la subespecie *Alouatta palliata mexicana* (Figura 1), la cual es un animal diurno, principalmente folívoro y de hábitos arborícolas, que suele preferir la cobertura vegetal primaria; se llega a desplazar hasta 700 m en busca de alimento (CONABIO, 2011). Estos monos viven en tropas que van desde tres hasta más de 50 individuos. Existe migración entre tropas, incluyendo individuos expulsados de los grupos que andan solos o en pareja momentáneamente, y después se unen a otro grupo. Se ha reportado dispersión tanto de machos como hembras (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2017), aunque posiblemente haya mayor filopatría de ambos sexos en las poblaciones mexicanas (Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015). Su ámbito hogareño se ha estimado en 27 ha (Cristóbal-Azkarate y Arroyo-Rodríguez, 2007; Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2010), pero en realidad es muy variable y depende directamente de la cantidad de alimento disponible, la fragmentación de su hábitat y otros procesos de aislamiento.

El mono aullador de manto debe su nombre a la presencia de una franja de pelaje difusa y plateado-cobrizo plateado en los flancos y parte del dorso, en contraste con el dorado de *A. p. palliata* (Ruiz-García *et al.*, 2017). También se puede diferenciar por algunas características de morfología del cráneo (Rylands *et al.*, 2006). Esta subespecie se distribuía históricamente en nuestro país desde el sur de Veracruz hasta el sur de Chiapas en la frontera con Guatemala (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003), pero actualmente su distribución es fragmentada, con poblaciones silvestres únicamente en pequeñas regiones de los estados de Veracruz, Oaxaca, Tabasco y el norte de Chiapas (CONANP, 2012). Existe un área de simpatría con la otra especie de aullador

en México, *A. pigra*, en la región de Macuspana, Tabasco, donde se han confirmado evidencias de hibridación (Cortés-Ortiz *et al.*, 2007).

Todas las subespecies de mono aullador se encuentran dentro del Apéndice I de CITES, y *A. p. mexicana* se considera en peligro de extinción según la lista roja de la IUCN (Cuarón *et al.*, 2020), debido a su distribución restringida y por ser la especie de primate mexicano que ha presentado un mayor decremento de sus poblaciones silvestres en los últimos años (Argüello-Sánchez y García-Feria, 2014). Esta subespecie representa también la distribución más norteña de entre todos los primates no-humanos en América (Rylands *et al.*, 2006). Por todas estas razones el mono aullador de manto es considerado una especie prioritaria para la conservación (CONANP, 2012).



Figura 1. Hembra de mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) alimentándose en el dosel de la selva. Imagen de ©bathyporeia.

II.3 Genética de poblaciones del mono aullador de manto

La genética es una herramienta esencial en el campo de la conservación, sin embargo se han realizado pocos estudios sobre la genética de poblaciones de primates mexicanos (Argüello-Sánchez y García-Feria, 2014). En el caso específico de *Alouatta palliata mexicana* solo se ha estudiado la genética de poblaciones silvestres del estado de Veracruz en la Selva Zoque dentro de la región del Valle de Uxpanapa (Argüello-Sánchez, 2012; Dunn *et al.*, 2013) y en la Reserva de la Biósfera de los Tuxtlas (Alcocer-Rodríguez, 2015; Jaso-del Toro *et al.*, 2016), y unos cuantos datos del estado de Tabasco (Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015; Villanueva-García, 2017). El estudio más reciente y que abarca una mayor distribución incluye regiones muy similares a las estudiadas anteriormente (Melo-Carrillo *et al.*, 2020).

La mayoría de los estudios realizados han mostrado una diversidad genética moderadamente baja ($H_e < 0.5$) en las poblaciones de *A.p. mexicana*, que se ha asociado a su historia biogeográfica, relativamente reciente en Mesoamérica. Se cree que su colonización fue desde el sur del continente tras la unión del istmo de Panamá hace 3 millones de años (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Rylands *et al.*, 2006). La posterior expansión poblacional posiblemente presentó procesos de cuello de botella y/o de efecto fundador, que pudieron resultar en bajos niveles de diversidad genética (Dunn *et al.*, 2013). Se ha reportado una baja diferenciación genética entre distintos estados de conservación del hábitat, que puede indicar flujo genético entre las poblaciones en distintas condiciones ecológicas (Jasso-del Toro *et al.*, 2016). El estudio realizado por Melo-Carrillo *et al.* (2020) no mostró diferenciación genética entre las poblaciones analizadas de la subespecie. Sin embargo, los estudios de genética realizados en poblaciones silvestres han sido generalmente a una escala geográfica local y no abarcan diversas poblaciones a lo largo del rango completo de distribución de la subespecie en México; tampoco se han cuantificado patrones de endogamia, ni de tamaños efectivos poblacionales de la subespecie.

Cabe resaltar que desde los años 60s se han creado numerosas poblaciones en cautiverio y semicautiverio del mono aullador de manto en el país, muchas en áreas no naturales y/ o no nativas (Rodríguez-Luna *et al.*, 2003; Aguilar-Melo *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha realizado ningún análisis genético de éstas. Así, este sistema podría servir como modelo para evaluar patrones genéticos de poblaciones en cautiverio de mamíferos medianos. Además, en este caso particular nos permitiría poder determinar más certeramente la historia y el estado en el que se encuentran actualmente estas poblaciones respecto a las silvestres.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la composición genética de poblaciones silvestres del mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) a lo largo de su distribución en México y evaluar las implicaciones en su conservación.

Objetivos Particulares

- Estimar la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres y en semicautiverio de *Alouatta palliata mexicana* en México.
- Evaluar los niveles de endogamia en poblaciones en semicautiverio y silvestres.
- Proponer posibles causas de la diferenciación genética de las poblaciones.
- Sugerir acciones de conservación basadas en los resultados obtenidos.

IV. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis

Las poblaciones silvestres de mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) en México presentarán diferentes niveles de diversidad genética y endogamia, además de una alta estructuración, resultado de su historia biogeográfica y el aislamiento de sus poblaciones.

Predicciones

- Las poblaciones silvestres de *Alouatta palliata mexicana* en México tendrán una diversidad genética baja con relación a otras especies del género por su historia biogeográfica.
- Las poblaciones presentarán estructura y diferenciación genética resultado de procesos históricos y contemporáneos de fragmentación y pérdida de hábitat.
- Las poblaciones que presenten baja conectividad y aislamiento en sus poblaciones tendrán niveles de endogamia significativos.
- Las poblaciones silvestres presentarán una mayor diversidad genética y menores niveles de endogamia en comparación con poblaciones semicautivas.

V. JUSTIFICACIÓN

La subespecie mexicana del mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) se encuentra gravemente amenazada (Cuarón *et al.*, 2020). Se han realizado pocos estudios genéticos de las poblaciones silvestres de este primate en México, a pesar de lo clave que resulta la información genética para su conservación. Los pocos estudios existentes son en localidades específicas, sin abarcar el rango de distribución de la subespecie; se han utilizado asimismo marcadores moleculares distintos, por lo que no son del todo comparables entre ellos (Dunn *et al.*, 2013; Alcocer-Rodríguez, 2015; Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015; Jaso-del Toro *et al.*, 2016; Villanueva-García, 2017; Melo-Carrillo *et al.*, 2020). Asimismo, no se ha estudiado la estructura genética de las poblaciones silvestres de *A. p. mexicana* a lo largo de su distribución en México, y tampoco se encontraron reportes en la literatura sobre aspectos de endogamia, tamaño efectivo poblacional, además del nulo trabajo genético en poblaciones en cautiverio. Por lo tanto, la meta de este trabajo fue estudiar la genética de poblaciones silvestres del mono aullador de manto, abarcando la mayor parte de su distribución en el país, haciendo énfasis en su estructura genética, e incluyendo también tres poblaciones en semicautiverio (aislados e introducidos pero sin encierro ni manejo humano). Sólo contando con información sistemática y completa será posible determinar con precisión el estatus de *A. p. mexicana* y establecer así mejores decisiones para su conservación y priorizar las acciones para mantener la viabilidad de las poblaciones a largo plazo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Área de estudio

VI.1.1 Poblaciones silvestres

El área de estudio abarcó cinco regiones del sur/sureste de México: Los Tuxtlas, Santa Marta y Uxpanapa en Veracruz; Comalcalco en Tabasco y Pichucalco en Chiapas (Fig. 2). Todas éstas se componen de bosque tropical perennifolio (Rzedowski, 2006) con distintos grados de perturbación, desde hábitat altamente fragmentado y remanentes de bosque en reservas privadas, hasta áreas naturales protegidas y zonas federales donde se mantiene un bosque más continuo.

VI.1.2. Poblaciones en semicautiverio

Se estudiaron tres poblaciones de *Alouatta palliata mexicana* en semicautiverio. En la Isla Agaltepec, que se encuentra dentro del Lago de Catemaco, Veracruz, existe una población resultado de una introducción de dos grupos, de cinco monos cada uno, en 1988 y 1989,

provenientes de Mirador Pilapa y de una comunidad cerca del río San Juan Evangelista, Veracruz, respectivamente (Rodríguez-Luna *et al.*, 2003). Para 1997 ya había 57 monos en la isla (Rodríguez-Luna *et al.*, 2003) y en el 2002 la población era de 95 individuos (Cristóbal-Azkarate y Dunn, 2013).

Una situación similar ocurrió en el Centro Ecológico y Recreativo El Zapotal en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, donde también se encuentra el Zoológico Miguel Álvarez del Toro (ZooMAT), y donde translocaron un grupo de cuatro monos aulladores del Parque Museo La Venta, Villahermosa, Tabasco en 1982 (Cuarón, 1997) y una hembra de la zona de Tabasco-Chiapas en 1985 (Aguilar-Melo *et al.*, 2013). En 2008 la población del parque estaba compuesta por 77 individuos, todos descendientes de la población inicial de cinco monos (Aguilar-Melo *et al.*, 2013). También se muestreó la tropa de monos que existe dentro del Parque Museo La Venta; aunque su origen no está documentado, se conoce su existencia desde la fundación del Parque a finales de los años cincuenta (Fuentes *et al.*, 2003).

VI.2 Trabajo de campo y toma de muestras

El trabajo de campo se realizó durante 2018 y 2019 abarcando gran parte de la distribución de *Alouatta palliata mexicana* en el país. En total se muestrearon 15 poblaciones nativas de las cinco regiones, tres localidades en la región de Los Tuxtlas, cinco en la región de Santa Marta y cuatro en la región de Uxpanapa, todas en Veracruz; dos en la región de Comalcalco, Tabasco y una de Pichucalco, Chiapas; además de las tres poblaciones semi-cautivas, dos de los zoológicos La Venta, Tabasco y el ZooMAT, Chiapas, y la población traslocada a la Isla Agaltepec en Catemaco, Veracruz (Fig. 2, Tabla 1). Se realizó un muestreo no invasivo, colectando muestras fecales frescas de individuos previamente identificados. Las heces se colectaron justo después de la deposición, asegurándonos de no repetir individuos y de no contaminar las muestras, las cuales se preservaron en tubos de 50 ml con etanol al 90%, buffer de lisis y/o NaCl (Oklander *et al.*, 2004). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio en donde fueron preservadas a -20°C para posterior extracción de ADN. De cada individuo (muestra) se registró sexo (masculino o femenino), edad (cría, juvenil o adulto), tamaño de grupo y ubicación geográfica.

VI.3 Trabajo de laboratorio

VI.3.1 Extracción de ADN

Previo a la extracción se tomaron ~400 gr de cada muestra y se dejaron secar por una noche en una campana de flujo laminar dentro de cajas Petri con sílica gel y papel filtro. La extracción de ADN se realizó con el kit comercial Stool DNA isolation (Norgen Biotek Corp.), siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones (Anexo 1). Para verificar la integridad y cantidad relativa del ADN, se visualizó cada una de las extracciones con electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con GelGreen®, examinados bajo luz ultravioleta y comparando con marcadores de peso molecular (VC 100bp Plus DNA Ladder Vivantis®) (Anexo 2). La densidad y pureza del ADN extraído de cada muestra se cuantificó y verificó en NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

VI.3.2 Amplificación de loci de microsatélites

Se probaron oligonucleótidos o primers para la amplificación de los loci de microsatélites (SSR). Se probaron 11 loci previamente utilizados por Cortés-Ortiz *et al.* (2010) en muestras de *Alouatta palliata*: Ap68 y Ap74 fueron creados específicamente para *A. palliata* (Ellsworth y Hoelzer, 1998); Apm01, Apm04, Apm09, Api07, Api08, Api09 y Api11 fueron creados para el estudio de la hibridación de *A.p. mexicana* y *A. pigra* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2010); Ab04 se diseñó para la especie *A. belzebul* (Gonçalves *et al.*, 2004) y D6S260 para el estudio en humanos por Research Genetics, Inc (Huntsville, Al, EUA) (Anexo 3). Se escogieron estos primers por ser los que presentaron una mayor variación en estudios realizados previamente en *Alouatta* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2010).

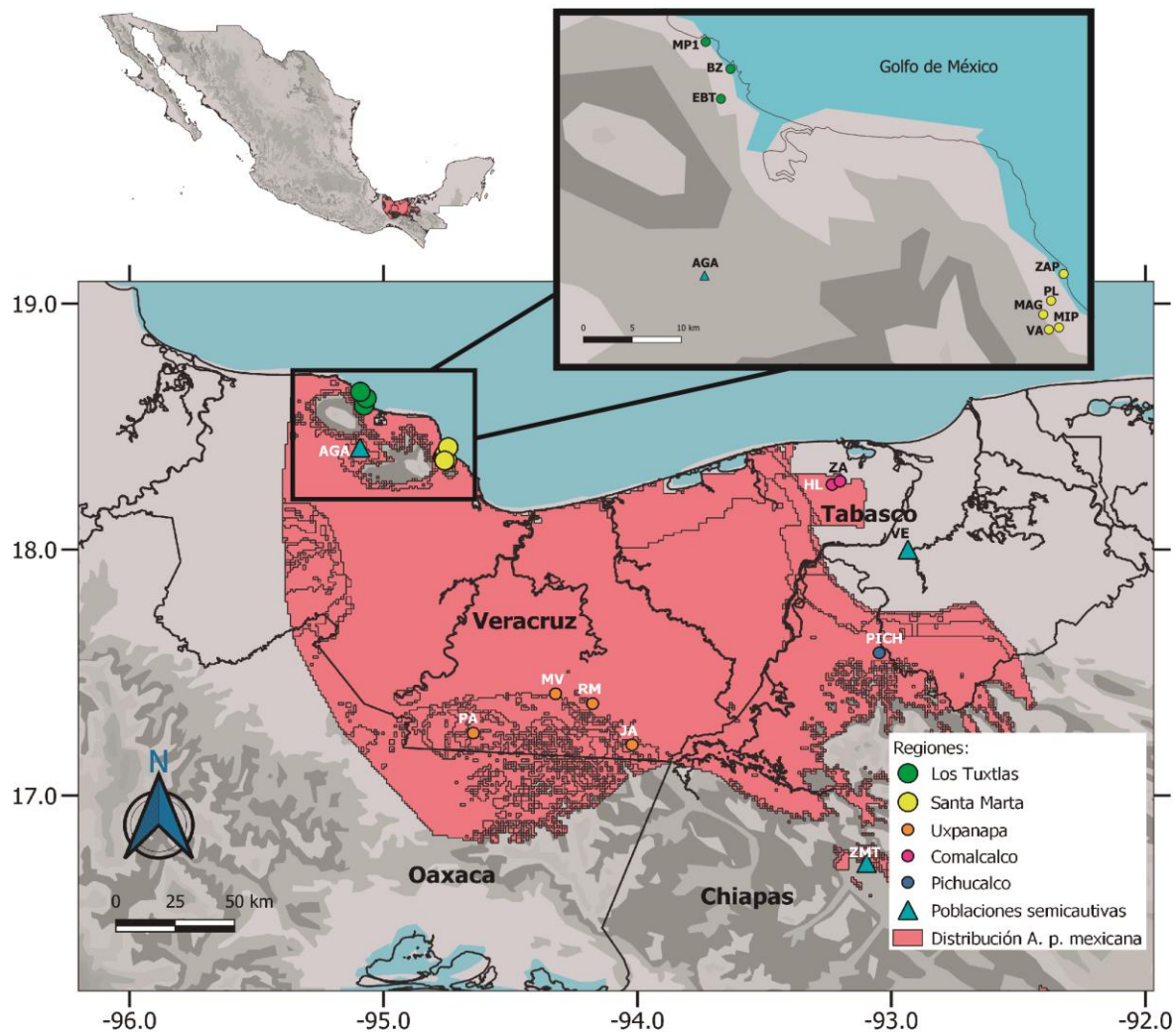


Figura 2. Distribución del mono aullador de manto *Allouata palliatta mexicana* (CONABIO, 2011b). Se indican las localidades de muestreo, donde las poblaciones nativas están representadas con puntos coloreados por región y las poblaciones en semi-cautiverio con triángulos azules: 1) Los Tuxtlas, con tres localidades, Montepío (MP1), Balzapote (BZ) y Estación de Biología, UNAM (EBT) (ver acercamiento en el cuadrado superior); 2) Santa Marta, con cinco localidades, Zapoapan (ZAP), Playa (PL), Magallanes (MAG), Mirador Pilapa (MIP) y la Valentina (VA), también presentado en el cuadro superior; 3) Uxpanapa, con cuatro localidades, Plan de Arroyo (PA), Murillo Vidal (MV), Ramos Millán (RM) y el Jaguar (JA); 4) Comalcalco, con dos localidades, Zona Arqueológica (ZA) y Hacienda la Luz (HL); y 5) Pichucalco, con una localidad, Finca Santa Ana (PICH). Las poblaciones en semi-cautiverio: Isla Agaltepec (AGA), Zoológico La Venta (VE) y ZooMAT (ZMT).

Tabla 1. Localización geográfica (región y localidad) de las poblaciones estudiadas de *Alouatta palliata mexicana* entre 2018-2019. Se indican las coordenadas (en UTM), el tamaño aproximado del grupo y el número de individuos genotipados.

Región	Localidad	ID Figura 1	Tamaño Grupo	Indv. Genotip.	UTM – Z15 N	
Los Tuxtlas	Montepío	MP1	~14	8	279350	2062376
	Balzapote	BZ	~17	11	281852	2059440
	Estación de Biología, UNAM	EBT	~22	11	280836	2056236
Santa Marta	Zapoapan	ZAP	15	10	315609	2037062
	Playa	PL	5	5	314534	2034362
	Magallanes	MAG	~1	1	313475	2032721
	Mirador Pilapa	MIP	15	10	315074	2031304
	La Valentina	VA	4	4	314043	2031094
Uxpanapa	Plan de Arroyo	PA	11	10	324930	1908387
	Murillo Vidal	MV	9	6	359496	1925800
	Ramos Millán	RM	3	3	374954	1921298
	El Jaguar	JA	2	1	391396	1902634
Comalcalco	Hacienda la Luz	HL	~40	10	475289	2019412
	Zona arqueológica	ZA	~30	9	478593	2020935
Pichucalco	Finca Santa Ana	PCH	~35	10	493087	1942567
Poblaciones semicautivas	Agaltepec	AGA	+50	9	278950	2037274
	La Venta	VE	6	1	506864	1990129
	ZooMAT	ZMT	+50	9	489597	1849122

Todos los loci fueron amplificados individualmente usando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con un volumen final de 10 μ L, conteniendo: 1.5 μ L de ADN, 0.08 μ L Taq Vivantis, 1 μ L de Buffer 10X, 2-3 mM MgCl₂ (Tabla 2), 0.5 μ L (10 pmol) de cada primer (Fw y Rev), 1 μ L de DNTPs (2 mM) y 0.4 μ L de 1mg/mL de suero de albúmina bovino (BSA, por sus siglas en inglés) para mejorar la amplificación. Las condiciones estándar del ciclo fueron: desnaturalización a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, temperatura específica de alineamiento para cada locus (Tabla 2) por 90 segundos, y 60 segundos a 72°C; y una extensión final a 72°C por 20 minutos. Se utilizó un ciclo optimizado de touchdown (Tabla 2) para las muestras que no amplificaron con las condiciones estándar. Se confirmó la amplificación vía electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con GelGreen® y examinados bajo luz ultravioleta, comparando directamente con marcadores de peso molecular (VC 100bp Plus DNA Ladder Vivantis®) (Anexo 2).

Tabla 2. Características de los loci de microsatélite utilizados y sus condiciones de amplificación con PCR para poblaciones del mono aullador de manto. NOTA: El locus Ap68 fue monomórfico en las poblaciones analizadas y el locus Api09 no se pudo amplificar (no se muestra en la tabla).

Locus	Tamaño alelos (pb)	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	[MgCl ₂] en PCR	Condiciones de PCR y/o touchdown y temperatura de alineamiento
Apm01^a	204-210	4	0.711	0.616	3 mM	10 ciclos a 65°C + cada ciclado -0.5°C + 30 ciclos a 60°
Apm04^a	240-250	6	0.289	0.742	3 mM	10 ciclos a 65°C + cada ciclado -0.5°C + 30 ciclos a 60° C ó 35 ciclos a 65° C
Apm09^a	170-184	4	0.211	0.240	3 mM	35 ciclos a 55°C
Api07^a	113-125	4	0.328	0.476	3 mM	37 ciclos a 50°C
Api08^a	271-285	8	0.234	0.516	3 mM	10 ciclos a 60°C + cada ciclado -0.5°C + 30 ciclos a 55° C ó 35 ciclos a 65° C
Api11^a	257-269	7	0.273	0.438	2 mM	10 ciclos a 55°C + cada ciclado -0.5°C + 30 ciclos a 50° C ó 35 ciclos a 65° C
Ap68^b	192	1	0	0	2.5 mM	35 ciclos a 55° C
Ap74^b	146-160	7	0.328	0.555	2.5 mM	35 ciclos a 50° C
Ab04^c	171-185	8	0.281	0.789	2.5 mM	35 ciclos a 67° C
D6S260^b	174-186	6	0.445	0.716	2.5 mM	10 ciclos a 55°C + cada ciclado -0.5°C + 30 ciclos a 50° C ó 35 ciclos a 65° C

^a(Cortés-Ortiz *et al.*, 2010); ^b(Ellsworth y Hoessler, 1998); ^c(Gonçalves *et al.*, 2004). *Na*: número de alelos, *Ho*: heterocigosis observada, *He*: heterocigosis esperada; MgCl₂: concentración de magnesio.

VI.3.3 Secuenciación y genotipificación de loci de microsatélites

Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar al servicio de análisis de fragmentos de la Universidad de Illinois (UIUC Core Sequencing Facility), donde utilizan un secuenciador capilar AbiPrism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems ®), y marcador de peso molecular la escalera ROX-500 Size Standard (Applied Biosystems ®). Algunos de los loci se secuenciaron multiplex, siempre cuidando que presentaran tinciones fluorescentes HEX o FAM distintos, y tamaños de alelo diferentes.

Para realizar el genotipado, los cromatogramas obtenidos se leyeron con el programa GeneMarker v2.6.7 (SoftGenetics®), basándonos en el tamaño de alelos reportado por Cortés-Ortiz *et al.* (2010) y que el pico del alelo sobrepasara el marcador de peso molecular. Los valores obtenidos de los alelos se estandarizaron con un redondeo establecido, donde se consideró el valor obtenido de mayor y menor magnitud y se dejó una separación mínima entre alelos de dos pares de bases, ya que los loci son dinucleótidos simples o compuestos (Anexo 3).

VI.4 Análisis genéticos y estadísticos

VI.4.1 Alelos nulos

Los alelos nulos en los loci de microsatélite pueden surgir cuando las mutaciones evitan que los oligonucleótidos se unan, amplificándolos incorrectamente (Callen *et al.*, 1993). Sin embargo, se puede calcular su frecuencia a partir de la aparente deficiencia de heterocigotos (Chakraborty *et al.*, 1993). Brookfield (1996) creó un análisis donde utiliza el hecho de no tener individuos con cero bandas como una observación, el cual es más adecuado para el caso en donde se encuentran una o más bandas en todos los loci de todos los individuos de la muestra.

El análisis para detectar alelos nulos se realizó con PopGenReport v2.0 (Adamack y Gruber, 2014) en el ambiente R (R Core Team, 2019), con base en las fórmulas de Brookfield (1996), ya que todos los individuos muestreados presentaron una o más bandas en cada locus. También se estimaron los alelos nulos con base en un algoritmo de Estimación-Maximización, con el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007) y 1000 repeticiones bootstrap.

VI.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Se efectuó una prueba exacta de Hardy-Weinberg con el paquete pegas v.0.12 (Paradis, 2010) en R, con una prueba de chi cuadrada y permutaciones de Monte Carlo con B=1000 repeticiones. También se probó desequilibrio de ligamiento entre loci, para corroborar que ningún locus segregara junto con otro, con PopGenReport v2.0 en R (Adamack y Gruber, 2004), con 199 permutaciones. Se calculó el índice de asociación entre todos los loci (I_a) (Kamvar *et al.*, 2014) y el índice de asociación r_{barD} modificado por Agapow y Burt (2001). Los resultados de EHW y LD se corroboraron con el software Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005) con las especificaciones automáticas del programa para los parámetros de las cadenas de Markov. Como factor de corrección se aplicó una tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) cuando fuera necesario para ajustar los niveles de significancia en comparaciones múltiples (Verhoeven *et al.*, 2005).

VI.4.3 Definición de grupos genéticos (estructura genética)

Para determinar la estructura genética con base en los loci de microsatélites y definir si existen grupos genéticos diferenciados, se utilizaron aproximaciones de agrupamientos bayesianos con y sin información espacial, implementados en los programas Geneland v4.0.7 (Guillot *et al.*, 2008) y STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) respectivamente. En STRUCTURE se corrió un modelo con mezcla genética, o admixture, con frecuencias alélicas independientes en una serie de 20

corridas independientes, probando $K=1-12$, sin información poblacional a priori, con 1, 000,000 de iteraciones MCMC y un burn-in de 100,000 replicaciones. Se determinó el número óptimo de clusters (K) con Structure Harvester Web v0.6.94 (Earl *et al.*, 2012), basado en el valor de Delta K (Delta $K = \text{mean}(|L''(K)|)/\text{sd}(L(K))$), el valor promedio más alto del logaritmo estimado de la probabilidad de los datos ($\text{LnP}[K]$) y la desviación estándar más baja entre las corridas independientes para cada K , con base en la prueba de Evanno (Evanno *et al.*, 2005). Con este mismo software se eligió la mejor corrida para cada K con base en el mayor Ln estimado de la probabilidad de los datos y el mayor valor promedio del Ln de la probabilidad de cada corrida.

Para el análisis en Geneland se utilizó la localización geográfica de cada sitio de muestreo en coordenadas UTM. El número apropiado de clusters (K) se infirió con base en 20 corridas independientes, cada una con $K=1-12$, con 500,000 iteraciones MCMC (salvando cada 1000 iteraciones) y con frecuencias alélicas no relacionadas; se definió la incertidumbre espacial de las coordenadas como 293.16 m, basado en el ámbito hogareño de 27 ha (Cristóbal-Azkarate y Arroyo-Rodríguez, 2007; Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2010), para esto se consideró una circunferencia equivalente al ámbito hogareño (27 ha = 270,000 m²) y se calculó su radio. Adicionalmente se realizaron 10 corridas independientes con los mismos parámetros descritos anteriormente, pero con una K fija en el valor obtenido en el primer ejercicio ($K=3$). La probabilidad posterior de identidad poblacional fue computada con un burn-in de 1000 iteraciones. Se eligió la mejor corrida con base en el valor más alto de la probabilidad posterior de los datos.

VI.4.4 Diferenciación poblacional

Para evaluar diferenciación genética entre poblaciones se estimaron los estadísticos F pareados, con un método de distancia basado en el número diferente de alelos (F_{ST}) y con un método de distancia basado en la suma de las diferencias de tamaño al cuadrado (R_{ST}). También se realizó un análisis molecular de la varianza (AMOVA) para determinar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, así como entre los clusters genéticos obtenidos (ver resultados); todo ello con el software Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005).

VI.4.5 Diversidad genética y endogamia

Todos los índices fueron calculados a escalas regionales y locales considerando solo las poblaciones con al menos cinco individuos. El número de alelos por locus (N_a), número privado de alelos (P_a), heterocigosis observada (H_o) y heterocigosis esperada imparcial (uHe) se calcularon en GenAlEx v6.503 (Peakall y Smouse, 2012). El número de loci polimórficos y el coeficiente de endogamia (F_{IS}), con base en los estimadores de R_{ST} y en F_{ST} , se calcularon con

Arlequin. La riqueza alélica rarificada (Ra) se calculó con PopGenReport (Adamack y Gruber, 2014), con base en un tamaño de muestra estándar del sitio de muestreo más pequeño y con los genotipos completos en todos los loci. El coeficiente de endogamia también se calculó con INEst v.2.1 (Chybicki y Burczyk, 2009), que permite correcciones simultáneas para alelos nulos y fallas aleatorias en el genotipo. Para esto, se utilizó un modelo de endogamia individual (IMM), probando el modelo 'nulo' y todas las combinaciones de los parámetros 'n' (alelos nulos), 'f' (endogamia) y 'b' (falla en genotipo), usando 200,000 iteraciones MCMC y un burnin de 20,000. La decisión del modelo más adecuado se eligió con base en los criterios de información de desviación (DIC) para cada corrida.

VI.4.6 Análisis de parentesco

Debido a que se identificó *in situ* cada individuo del que fue colectada cada muestra, no fue necesario realizar análisis de identidad. Sin embargo, para estimar el nivel de parentesco dentro y entre las poblaciones muestreadas, nativas y en semicautiverio sí se calculó la probabilidad de identidad entre hermanos (PI_{SIBS}) introducida por Waits *et al.* (2001), con GenAlEx. También se realizó un análisis de parentesco con ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006), el cual estima la probabilidad de que dos individuos pertenecientes al mismo grupo sean medios hermanos, hermanos completos, padres-hijos o sin relación. Estos índices se estimaron a escalas tanto regional como local, considerando solo las poblaciones con al menos cinco individuos.

VI.4.7 Estimación de N_e

Se estimó el tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada región, cluster genético y global, así como para las poblaciones en semicautiverio de Agaltepec y ZooMAT. Se utilizaron dos métodos de muestra única: el de desequilibrio de ligamiento con jackknifing asumiendo un apareamiento aleatorio y el paramétrico de exceso de heterocigotos, todos con el software NeEstimator v2.1 (Do *et al.*, 2014). Considerando que alelos raros tienden a sesgar los estimados de N_e basados en LD, Waples y Do (2010) señalan que en el análisis puede permitir un número alto de alelos para incrementar la precisión sin incrementar el sesgo, y recomiendan utilizar valores moderados de frecuencia alélica mínima (0.02, 0.01). Por lo tanto, en este caso consideramos un $P_{crit}=0.01$.

VII. RESULTADOS

Se colectaron 275 excretas de *Alouatta palliata mexicana* provenientes de 15 localidades con poblaciones nativas de cinco regiones a lo largo de su distribución, y de tres poblaciones en semicautiverio (Fig. 2, Tabla 1). Para la extracción del ADN y la realización de los análisis posteriores, se eligieron aleatoriamente 10 muestras por localidad, o todas las muestras en caso de ser grupos pequeños. Esto por cuestiones de logística y presupuesto, pero siempre manteniendo una representación significativa de cada población.

VII.1 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de loci de microsatélites

Se logró extraer ADN de 142 excretas (individuos; Tabla 1). En algunas muestras la extracción de ADN no fue exitosa, posiblemente debido a una baja densidad de células epiteliales en la excreta. Cabe resaltar que el mayor éxito de extracción (ADN en mayor densidad y de mejor calidad) fue con muestras almacenadas en NaCl, en concordancia con Oklander *et al.* 2004, lo cual es muy conveniente ya que es el protocolo más barato, más fácil de transportar y de manipular. Las muestras colectadas en buffer de lisis y etanol al 90% también fueron efectivas para la extracción, pero el ADN obtenido fue de menor calidad.

De los 11 loci de microsatélites probados se lograron amplificar todos menos el locus Api09, probablemente debido a su gran tamaño (467-471 pb; Cortés-Ortiz *et al.*, 2010). El locus Ap68 resultó monomórfico; por lo tanto, los análisis se basaron en 9 loci polimórficos (Anexo 3). Las muestras para las que no se logró amplificar la totalidad de los loci fueron descartadas. Sólo se secuenció una muestra (individuo) de la población cautiva de La Venta por lo que se excluyó de los posteriores análisis realizados por localidad. En total, se identificaron 54 alelos, en un rango de 4 a 8 alelos por locus, para un total de 128 individuos (Tablas 2, 3).

VII.2 Alelos nulos

Los resultados basados en la fórmula de Brookfield (1996) y en el algoritmo de Estimación-Maximización (E-M) indicaron que todos los loci de microsatélites utilizados presentan alelos nulos en las poblaciones muestreadas. Sin embargo, en las estimaciones globales los loci Apm01 y Apm09 no presentaron alelos nulos y el resto presentaron una frecuencia igual o menor a 0.4, siendo ésta la más alta sólo obtenida para el locus Ab04 (Brookfield); los resultados con E-M fueron similares con proporciones un poco menores (0.28 para Ab04). La presencia más alta de alelos nulos fue en las regiones de Tabasco y Santa Marta (Anexo 4).

VII.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Todos los loci analizados mostraron desequilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$), el locus Ab04 en mayor proporción y Apm09 el locus más cercano al equilibrio (Anexo 5.1). Las poblaciones en semicautiverio de la Isla Agaltepec y ZooMAT, junto con la región de Pichucalco en Chiapas, fueron las que presentaron una mayor proporción de la población en EHW (Anexo 5.2).

De manera global se detectó bajo desequilibrio de ligamiento (DL), con un índice de asociación entre todos los loci (I_a) igual a 0.215 ($p/I_a = 0.005$) y un índice modificado (r_{barD}) de 0.027 ($p/r_{barD} = 0.005$) (Fig. 3). El mayor índice de asociación ($r_{barD} = 0.183-0.203$) se encontró entre los loci Api08, Api11 y Ap74 (Fig. 3a). La presencia de DL varió por región, la más alta fue entre los loci Ap74 y D6S260 en la región de Pichucalco ($r_{barD} = 0.693$; Fig. 3b-f). La población en semicautiverio Isla Agaltepec presentó entre Apm01:Api07 ($r_{barD} = 0.588$), Apm01:D6S260 ($r_{barD} = 0.644$) y Api08:Api11 ($r_{barD} = 0.665$) (Fig. 3g), y $I_a = 0.450$ ($p/I_a = 0.055$) y $r_{barD} = 0.059$ ($p/r_{barD} = 0.055$).

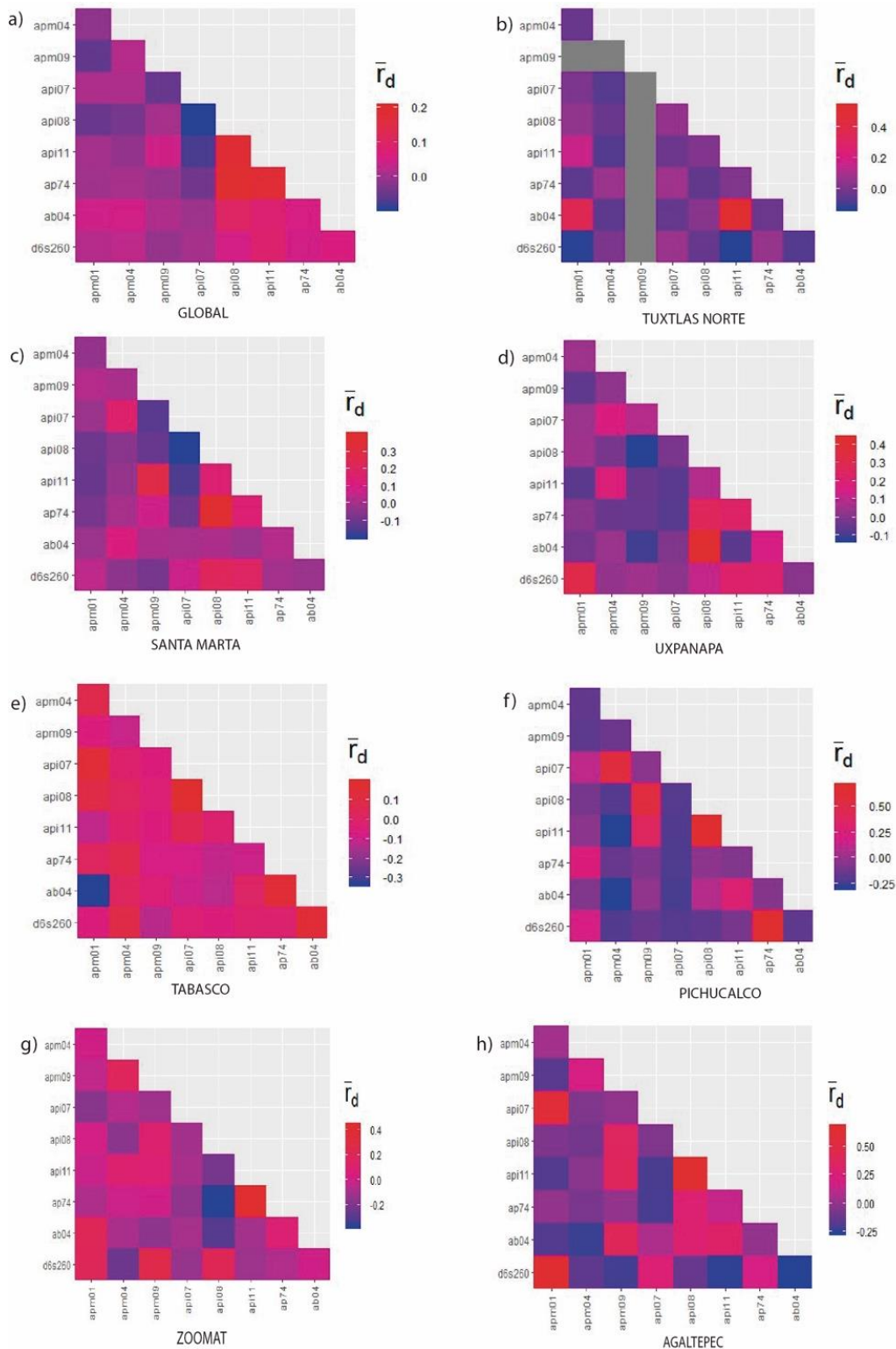


Figura 3. Desequilibrio de ligamiento entre loci de microsatélites amplificados para mono aullador de manto, considerando la población global (a), cada región (b-f) y las poblaciones en semicautiverio (g-h). Se muestra el índice de asociación (\bar{r}_d) modificado por Agapow y Burt (2001), calculado para cada combinación pareada posible. En color azul se muestran índices de menor magnitud y en rojo de mayor magnitud.

VII.4 Grupos genéticos

El número de clusters genéticos más óptimo con base en STRUCTURE fueron $K=2$ ($\text{LnP}[K]=-2476.9645$) y $K=3$ ($\text{LnP}[K]=-2385.475$) (Fig. 4a). Un mayor número de K no resultaron informativos para el estudio. Los resultados de agrupación cuando se incluyó la información geográfica (Geneland) coincidieron indicando como número más probable $K=3$ (Mean $\text{LnP}[K]=-3530.69$). Al correr el análisis con $K=3$ fija, se aprecia en la gráfica de resultados que los grupos concuerdan casi en su totalidad con los de STRUCTURE $K=3$ (Fig. 4). Las principales diferencias son que la población en semicautiverio de Isla Agaltepec presenta mayor afinidad al grupo Centro-Este, y en STRUCTURE es de origen mixto, al igual que algunas poblaciones de la región de Santa Marta que son de origen mixto en STRUCTURE, pero en Geneland fueron asignadas al grupo Centro-Oeste (Fig. 4b). Con base en estos resultados, y asignando una proporción media de pertenencia ($\geq 65\%$) para clasificar las poblaciones de monos aulladores como parte de un cluster genético específico, las cinco regiones geográficas y poblaciones en semicautiverio muestreadas se agruparon en los siguientes tres grupos:

- Norte: región Tuxtlas (MP1, BZ, EBT)
- Centro-Oeste: región Santa Marta (ZP, PL, MAG, MIP, VA), parte de la región Uxpanapa (MV, JA) y la población en semicautiverio del ZooMAT (ZMT).
- Centro-Este: región Comalcalco (HL, ZA), Pichucalco (PCH), parte de la región Uxpanapa (RM, PA) y las poblaciones en semicautiverio de la Venta (VE) e Isla Agaltepec (AGA).

Algunas localidades dentro de los tres grupos genéticos presentan similitudes con otros grupos. La localidad de Montepío en Los Tuxtlas, que presenta afinidad principalmente con el grupo Norte, tiene individuos con genotipos similares al grupo Centro-Oeste. Las localidades de Zapopan y La Valentina en la región Santa Marta, dentro del grupo Centro-Oeste, presentan afinidades con los otros dos grupos, sobre todo con el grupo Norte, lo mismo que la localidad de Plan de Arroyo dentro del grupo Centro-Este. Como era de esperarse, las poblaciones en semicautiverio ZooMAT e Isla Agaltepec presentaron genotipos mezclados por su origen no nativo (Fig. 4a).

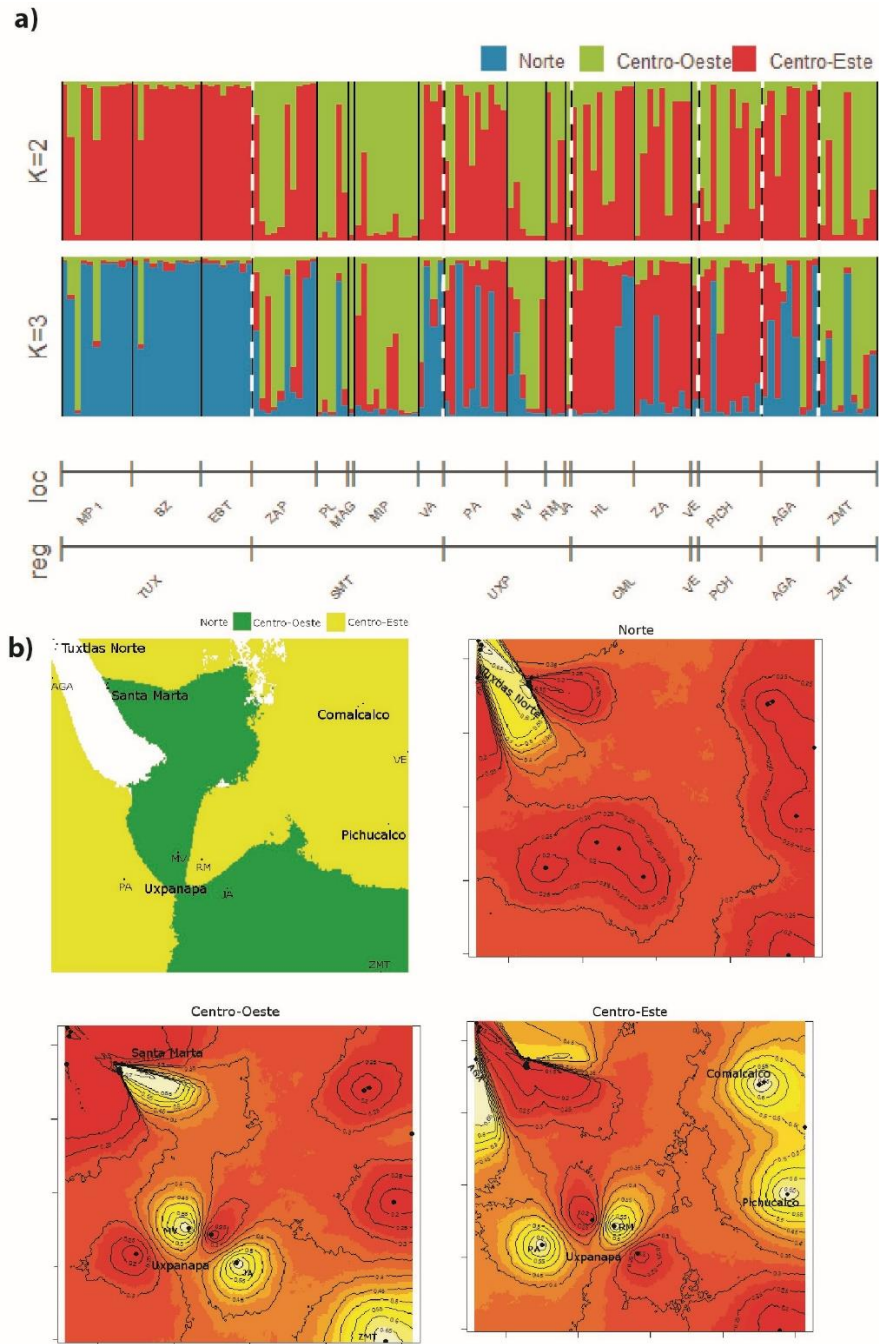


Figura 4. Estructura genética de poblaciones de *Alouatta palliata mexicana* en México. **a)** Gráficas de STRUCTURE mostrando $K=2-3$, en la base se indican las regiones y localidades de estudio. **b)** Mapas de análisis bayesiano con información espacial (GENELAND) donde se muestran los tres grupos genéticos (mapa superior izquierda), en concordancia con STRUCTURE $K=3$, y cada cluster por separado; las curvas de nivel indican la probabilidad posterior de pertenencia, con los valores altos y bajos coloreados en amarillo y rojo, respectivamente. TUX: Tuxtías, SMT: Santa Marta, UXP: Uxpanapa, CML: Comalcalco, VE: La Venta, PCH: Pichucalco, AGA: Isla Agaltepec, ZMT: ZooMAT, MP1: Montepío, BZ: Balzapote, EBT: Estación de Biología, ZAP: Zapoapan, PL: Playa, MAG: Magallanes, MIP: Mirador Pilapa, VA: La Valentina, PA: Plan de Arroyo, RM: Ramos Millán, MV: Murillo Vidal, JA: Jaguar, HL: Hacienda la Luz, ZA: Zona Arqueológica.

VII.5 Diversidad genética

La diversidad genética obtenida en total fue moderada, con un número promedio de alelos ($Na=6.0 \pm 0.55$), riqueza alélica rarificada ($Ra=5.91$), heterocigosis observada ($Ho=0.345 \pm 0.05$) y heterocigosis esperada ($uHe=0.565 \pm 0.06$) (Tabla 3). El cluster genético que presentó un mayor número de alelos privados, es decir los alelos presentes sólo en ese grupo, fue Centro-Este ($Pa=6$), mientras que a nivel región fueron Uxpanapa y Tabasco ($Pa=2$). Los valores de heterocigosis obtenidos fueron similares entre las poblaciones, incluso en las cautivas (Tabla 3). Los valores más bajos de variabilidad se obtuvieron en la región de Los Tuxtlas, o cluster genético Norte ($Ho=0.330 \pm 0.06$; $uHe=0.434 \pm 0.06$). Esta población, la más norteña en la distribución, también fue la que presentó valores más bajos de riqueza alélica y número promedio de alelos, junto con las poblaciones en semicautiverio Isla Agaltepec y ZooMAT. La región de Pichucalco, dentro del grupo Centro-Este, fue la que presentó la mayor heterocigosis ($Ho=0.378 \pm 0.08$).

Considerando las diferentes localidades estudiadas, se encontró que Plan de Arroyo ($Ho=0.400 \pm 0.08$), dentro de la región Uxpanapa, y la Zona Arqueológica ($Ho=0.383 \pm 0.09$) de la Región Comalcalco (ambas agrupadas en el cluster genético Centro-Este) presentaron los valores más altos de heterocigosis (Anexo 6); estas localidades también se caracterizaron por presentar el mayor número de alelos privados ($Pa=2$), seguidas de Murillo Vidal, en la región Uxpanapa y dentro al grupo Centro-Oeste ($Pa=1$) (Anexo 6).

Tabla 3. Diversidad genética del mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*) por cluster genético (Norte, Centro-Oeste y Centro-Este), por región geográfica (Tuxtlas, Santa Marta, Uxpanapa, Tabasco y Pichucalco) y para las poblaciones en semicautiverio Isla Agaltepec y ZooMAT. N: número de grupos de monos, n: número de individuos, *nl*: número de loci, *Pa*: número de alelos privados, *Na*: número promedio de alelos, *Ra*: riqueza alélica rarificada, *Ho*: heterocigosis observada, *uHe*: heterocigosis esperada.

	N	n	<i>nl</i>	<i>Pa</i>	<i>Na</i>	<i>Ra</i>	<i>Ho</i>	<i>uHe</i>
Norte	3	30	8	1	3.333 ± 0.408	3.227	0.330 ± 0.055	0.434 ± 0.063
Centro-Oeste	8	46	9	4	5.222 ± 0.641	4.861	0.331 ± 0.057	0.589 ± 0.056
Centro-Este	7	52	9	6	5.222 ± 0.364	4.679	0.365 ± 0.061	0.529 ± 0.053
Tuxtlas	3	30	8	1	3.333 ± 0.408	2.797	0.330 ± 0.055	0.434 ± 0.063
Santa Marta	5	30	9	1	4.778 ± 0.572	3.857	0.348 ± 0.072	0.587 ± 0.059
Uxpanapa	4	20	9	2	4.333 ± 0.408	3.776	0.328 ± 0.075	0.576 ± 0.062
Tabasco	3	20	9	2	4.222 ± 0.401	3.596	0.372 ± 0.071	0.547 ± 0.044
Pichucalco	1	10	9	0	3.889 ± 0.512	3.565	0.378 ± 0.081	0.487 ± 0.066
Agaltepec	1	9	9	0	2.889 ± 0.261	2.773	0.358 ± 0.080	0.492 ± 0.061
ZOOMAT	1	9	9	0	3.333 ± 0.408	3.057	0.309 ± 0.055	0.466 ± 0.058
Total	18	128	9	54	6.000 ± 0.553	5.905	0.345 ± 0.051	0.565 ± 0.058

VII.6 Índice de endogamia

El modelo que explicó mejor los datos entre endogamia (f), alelos nulos (n) y fallas en el genotipo (b), fue el de endogamia (Tabla 4). Se identificó endogamia significativa en los tres clusters genéticos y para todas las localidades. Este resultado refuerza el que las poblaciones no se encuentren en EHW. Con base en los coeficientes de endogamia corregidos por alelos nulos y errores en el genotipo ($AvgF_i$; Tabla 4), todos fueron positivos y significativamente alejados del cero, con intervalos de probabilidad posteriores de 95% (95% HPDI). Asimismo, la endogamia es un componente prominente en el modelo que mejor se ajusta a los datos en todas las poblaciones de mono aullador analizadas. El cluster genético con mayor índice de endogamia fue Centro-Oeste ($AvF=0.345$), mientras que a nivel de región el índice más alto se observó para Santa Marta ($AvF=0.424$) y Uxpanapa ($AvF=0.423$). Las poblaciones en semicautiverio mostraron valores de endogamia similares, siendo el ZooMAT la que tuvo un valor mayor ($AvF=0.343$). Los resultados del índice de endogamia estimados con base en F_{ST} y R_{ST} fueron similares (aunque menores), y no todos fueron significativos (Tabla 4)

VII.7 Diferenciación poblacional

Los resultados del AMOVA mostraron que la variabilidad genética se distribuye entre clusters genéticos ($F_{ST}=0.149$), donde poco más de la mitad de la variabilidad genética (52.54%) se explica por la variación dentro de las poblaciones, una proporción menor (32.57%) se explica por la variación entre poblaciones dentro del cluster genético y la menor (14.89%) por la variación entre clusters. La diferenciación pareada entre clusters genéticos fue significativa tanto basada en F_{ST} (0.076-0.128; $p<0.01$) como en R_{ST} (0.068-0.258; $p<0.01$); la diferenciación pareada entre regiones también fue significativa en la mayoría de los casos ($F_{ST}=0.009-0.192$, $p<0.01$; $R_{ST}=0.056-0.420$, $p<0.05$) (Tabla 5).

Cabe resaltar que a nivel de localidades se identificó diferenciación significativa entre grupos de *A.p. mexicana* ($p<0.05$) viviendo en fragmentos de bosque dentro de una misma región para Santa Marta (MIP-PL: $R_{ST}=0.149$, $F_{ST}=0.147$; MIP-ZP: $R_{ST}=0.084$, $F_{ST}=0.174$), Uxpanapa (PA-MV: $R_{ST}=0.156$, $F_{ST}=0.211$) y Comalcalco (HL-ZA: $R_{ST}=0.076$, $F_{ST}=0.033$) (Anexo 7).

Tabla 4. Índices de endogamia de las poblaciones de mono aullador de manto analizadas en este estudio. Se muestran los resultados por cluster genético, por localidad con subtotal por región geográfica, para las poblaciones en semicautiverio, y en total. n: número de individuos, Avg F_I : coeficiente de endogamia promedio corregido con alelos nulos (para los modelos ^a'fb', ^b'f', ^c'fn', ^d'fbn') con intervalos de probabilidad posteriores de 95% (95% HPDI), $F_{IS}(R_{ST})$: coeficiente de endogamia calculado con un AMOVA basado en R_{ST} , $F_{IS}(F_{ST})$: coeficiente de endogamia calculado con un AMOVA basado en F_{ST} . *significativo para $\alpha=0.05$ **significativo para $\alpha=0.01$

Región / cluster	Localidad	n	Avg F_I	95% HPDI	$F_{IS}(R_{ST})$	$F_{IS}(F_{ST})$
Norte		30	0.260 ^b	0.167-0.359	0.341**	0.244**
Centro-Oeste		46	0.345 ^a	0.278-4.08	0.559**	0.441**
Centro-Este		52	0.290 ^c	0.114-0.415	0.244**	0.311**
Los Tuxtlas	MP1	11	0.227 ^b	0.093-0.394	0.377*	0.225*
	BZ	11	0.175 ^b	0.0-0.341	0.412**	0.186*
	EBT	8	0.196 ^a	0.022-0.404	0.063*	0.224
	Subtotal	30	0.260 ^b	0.167-0.359	0.341**	0.244**
Santa Marta	ZAP	10	0.316 ^b	0.182-0.490	0.477**	0.349**
	PL	5	0.297 ^b	0.088-0.479	0.605**	0.364**
	MIP	10	0.390 ^a	0.252-0.528	0.683**	0.395**
	Subtotal	30	0.424 ^b	0.342-0.504	0.570**	0.411**
Uxpanapa	PA	10	0.183 ^c	0.061-0.356	0.292*	0.252**
	MV	6	0.362 ^b	0.184-0.586	0.311	0.414**
	Subtotal	20	0.423 ^b	0.314-0.501	0.408**	0.438**
Comalcalco	HL	10	0.329 ^b	0.157-0.456	0.203	0.289**
	ZA	10	0.219 ^c	0.0-0.404	0.238*	0.334**
	Subtotal	20	0.220 ^d	0.005-0.414	0.253**	0.325**
Pichucalco	PCH	10	0.157 ^d	0.001-0.332	0.076	0.234**
Poblaciones semicautivas	AGA	9	0.252 ^b	0.095-0.423	-0.064	0.285**
	ZMT	9	0.343 ^a	0.156-0.488	0.528**	0.352**
Total		128	0.417 ^a	0.376-0.464	0.446**	0.391**

Tabla 5. Niveles de diferenciación genética entre las poblaciones de *Alouatta palliata mexicana* de México. Se muestra las comparaciones entre **a)** regiones geográficas y **b)** clusters genéticos, con base en R_{ST} (abajo de la diagonal, en negro) y F_{ST} (arriba diagonal en gris).

Significativo *para $\alpha=0.05$ y ** $\alpha=0.01$

a)

	Tux	SMarta	Uxp	Comal	Pich	Agal	ZooMAT
Los Tuxtlas	-	0.099**	0.137**	0.149**	0.158**	0.105**	0.154**
Santa Marta	0.231**	-	0.047**	0.073**	0.066**	0.039**	0.074**
Uxpanapa	0.271**	0.032**	-	0.055**	0.032**	0.021	0.162**
Comalcalco	0.262**	0.068**	0.060**	-	0.022	0.040**	0.171**
Pichucalco	0.378**	0.139**	0.091**	0.011	-	0.009	0.192**
Agaltepec	0.147**	0.056*	0.039	0.120**	0.170**	-	0.191**
ZooMAT	0.420**	0.032	0.064*	0.106**	0.265**	0.205**	-

b)

	Norte	Centro-Oeste	Centro-Este
Norte	-	0.096**	0.128**
Centro-Oeste	0.258**	-	0.076**
Centro-Este	0.190**	0.068**	-

VII.8 Análisis de parentesco

Los resultados del análisis de parentesco muestran la presencia de parientes de primer orden en todas las poblaciones muestreadas, donde la región de los Tuxtlas presentó un mayor parentesco, con hasta 31% de relaciones padre-hijo, hermanos completos y medios hermanos (Tabla 6). Las poblaciones de las otras regiones mostraron porcentajes de parentesco de entre 7% y 16%. El análisis de probabilidad de identidad entre hermanos mostró resultados similares al porcentaje de parentesco entre hermanos completos y medios hermanos, pero con menor magnitud.

Tabla 6. Análisis de parentesco del mono aullador de manto entre poblaciones por localidad (no se analizaron localidades con $n < 5$; n: número de individuos). PI_{SIBS} : probabilidad de identidad ente hermanos, Parentesco: porcentaje de relación específica (P-H: padres-hijos, HC: hermanos completos, MH: medios hermanos).

Región / cluster	Localidad	n	PI_{SIBS}	Parentesco (%)		
				P-H	HC	MH
Los Tuxtlas	MP1	11	0.011	7.3	3.6	14.5
	BZ	11	0.028	9.1	3.6	18.2
	EBT	8	0.036	0.0	7.1	7.1
Santa Marta	ZAP	10	0.005	0.0	6.7	6.7
	PL	5	0.005	0.0	0.0	0.0
	MIP	10	0.006	6.7	0.0	2.2
Uxpanapa	PA	10	0.006	0.0	8.9	6.7
	MV	6	0.008	0.0	6.7	0.0
Comalcalco	HL	10	0.008	0.0	6.7	6.7
	ZA	10	0.005	2.0	4.4	2.2
Pichucalco	PCH	10	0.009	4.4	2.2	6.7
Poblaciones semicautivas	AGA	9	0.010	2.8	8.3	2.8
	ZMT	9	0.013	0.0	2.8	5.6

VII.9 Tamaño efectivo poblacional

Las estimaciones de tamaño efectivo poblacional contemporáneo mostraron valores relativamente bajos (Tabla 7). El valor más alto fue para el cluster genético Centro-Este ($N_e=129.8$), mientras que el resto de los valores estimados fueron menores de 70. El N_e global fue asimismo bajo ($N_e=59.5$). Al ser un tamaño efectivo poblacional bajo, y ser el resultado de un análisis con más de 100 individuos y 9 loci de microsatélite, se espera que los estimados obtenidos sean precisos, y aun cuando se tengan valores negativos (infinitos), los límites inferiores del IC, que son finitos, también proveen información útil sobre los posibles valores límites (Waples y Do, 2010) (Tabla 7).

Tabla 7. Tamaño efectivo poblacional (N_e) ($\pm 95\%$ intervalo de confianza IC) por cluster genético, región geográfica y poblaciones cautivas, estimado con NeEstimator v2.1 (Do et al., 2014), con base en el modelo de desequilibrio de ligamiento (DL) y una frecuencia alélica mínima $P_{crit}=0.01$.

Región	Modelo DL ^a	Modelo DL ^b
Norte	34.0 (8.7 - ∞)	34.0 (14.0 – 451.6)
Centro-Oeste	65.0 (31.7 – 301.3)	65.0 (37.7 – 157.9)
Centro-Este	129.8 (42.0 - ∞)	129.8 (61.1 – 1647.4)
Los Tuxtlas	34.0 (8.7 - ∞)	34.0 (14.0 – 451.6)
Santa Marta	26.5 (12.7-94.5)	26.5 (15.8 – 54.4)
Uxpanapa	21.6 (9.1 – 147.4)	21.6 (10.7 – 72.5)
Comalcalco	∞ (27.5 - ∞)	∞ (37.8 - ∞)
Pichucalco	∞ (10.0 - ∞)	∞ (13.8 - ∞)
Agaltepec	13.9 (1.5 - ∞)	13.9 (2.1 - ∞)
ZooMAT	∞ (23.4 - ∞)	∞ (88.0 - ∞)
Total	59.5 (39.2 – 97.0)	59.5 (46.5-78.0)

^a:Jackknife, ^b: Paramétrico

VIII.DISCUSIÓN

VIII.1 Efectos históricos en la genética del mono aullador de manto

Se cree que los primeros platirrininos llegaron a Sudamérica desde África hace 40 o 50 millones de años, posiblemente por dispersión entre las islas que se formaron en el Atlántico (Oliveira *et al.*, 2009). El linaje del género *Alouatta* comenzó a diversificarse hace unos 6-6.8 millones de años (Ma), coincidiendo con la formación del norte de los Andes, separando a las especies del sur y el norte de la cordillera (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Ruiz-García *et al.*, 2017). Las segundas, representadas por las especies presentes en México (*A. palliata* y *A. pigra*), divergieron hace unos 3-3.7 Ma, justo cuando se sugiere que los primates entraron a Mesoamérica cruzando a través del Istmo de Panamá (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Ford, 2006; Ruiz-García *et al.*, 2017). Parece ser que las poblaciones del ancestro de *A. palliata* y *A. pigra*, provenientes del norte de Sudamérica, se expandieron rápidamente hasta el límite norte de la actual distribución de *Alouatta* en el gran intercambio de fauna de las Américas (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Lynch-Alfaro *et al.*, 2015). Durante este proceso hubo cambios en el nivel del mar, la orografía y la cobertura vegetal debido a fluctuaciones climáticas, provocando una especiación alopátrica, con un posterior incremento en el rango de distribución de *A. palliata* a expensas del de *A. pigra* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Ford, 2006; Lynch-Alfaro *et al.*, 2015).

Tabla 8. Valores de diversidad genética reportados para distintas poblaciones de *Alouatta palliata* y para *A. pigra* y *A. caraya*. (*Ho*: heterocigosis observada, *He*: heterocigosis esperada, *Na*: número promedio de alelos por locus, *N*: número de individuos, *N loci*: número de loci)

Localidad	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Na</i>	<i>N</i>	<i>N loci</i>	Referencia
<i>Alouatta palliata</i>						
México	0.14	0.14	1.6	8	8	Ellsworth y Hoelzer, 2006
México, Oeste	0.34	0.41	3.3	140	12	Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015
México, Este	0.29	0.22	4.42	140	19	Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015
Los Tuxtlas, México	0.26	0.44	4.4	99	12	Alcocer Rodríguez, 2015
Los Tuxtlas, México	0.14	0.23	2.88	61	13	Jasso-del Toro <i>et al.</i> , 2016
Tabasco, México	0.26	0.53	3.55	67	10	Villanueva-García, 2017
México	0.21	0.29	3.19	70	29	Melo-Carillo <i>et al.</i> , 2020
México	0.34	0.56	6.00	128	9	Presente estudio
Isla de Ometepe, Nicaragua	0.16	-	1.83	29	12	Winkler <i>et al.</i> , 2004
México, Costa Rica, Colombia	-	0.45	4.67	48	9	Ruíz-García <i>et al.</i> , 2007
Costa Rica	0.33	0.34	4.4	89	8	Ellsworth y Hoelzer, 2006
Panamá	0.51	0.59	4.9	20	8	Ellsworth y Hoelzer, 2006
Isla Barro Colorado, Panamá	0.47	0.48	9.9	42-50	12	Milton <i>et al.</i> , 2009
<i>A. pigra</i>						
Belice	0.43	-	2.5	10	12	Winkler <i>et al.</i> , 2004
Belice	0.45	0.50	3.8	28	8	Ellsworth y Hoelzer, 2006
Palenque, México	0.59	0.57	4.2	49	19	Van Belle <i>et al.</i> , 2012
<i>A. caraya</i>						
Argentina y Bolivia	-	0.55	3.14	20	9	Ruíz-García <i>et al.</i> , 2007
Argentina y Paraguay	-	0.44	3.16	138	10	Oklander <i>et al.</i> , 2017

Esta historia biogeográfica sugiere que las poblaciones de *A. palliata* pasaron por un proceso de cuello de botella en su colonización de Mesoamérica. Lo anterior concuerda con los pequeños tamaños efectivos poblacionales contemporáneos (N_e) observados en las poblaciones de estudio, aunque para tener un panorama más completo de su historia evolutiva sería importante estimar los tamaños efectivos históricos. De hecho, Solórzano-García *et al.* (2021) documentan evidencia de expansión poblacional después de un posible cuello de botella histórico en esta especie. El cuello de botella también podría verse reflejado en una reducción de la diversidad genética, aunque, contrario a lo esperado, los valores moderadamente altos de diversidad genética observados en este estudio (y ver Solórzano-García *et al.*, 2021), en comparación a otros estudios del país, pueden estar relacionados con el hecho de que abarcamos un área geográfica más extensa y mayor número de individuos y de loci analizados, en comparación con otros estudios de la especie. El no encontrar variación en un locus especie-específico (Ap68, Tabla 2), a pesar de tener muestreada gran parte de la distribución de la subespecie, y que el cluster geográficamente más cercano al centro de origen de la especie (Centro-Este) sea el que presente mayor número de alelos privados ($P_a=6$; Tabla 3), también pueden ser índices de la pérdida de diversidad genética en las poblaciones boreales de la especie.

La hipótesis de las poblaciones centrales-periféricas (CPH, por sus siglas en inglés) de Mayr (1963) predice que las poblaciones en el límite de su distribución presentan una reducción de la variabilidad genética por un menor flujo génico e incremento de la presión de selección; aunque dicho patrón puede ser sutil en muchos casos (Eckert *et al.* 2008) o más frecuente en poblaciones recién establecidas o con dispersores activos y baja migración (Dai y Fu 2011). Considerando la historia biogeográfica de *A. palliata* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Ford, 2006; Ruiz-García *et al.*, 2017; Solórzano-García *et al.*, 2021), nuestros resultados concuerdan con las predicciones de la CPH, ya que, siendo la especie con distribución más norteña del género, presenta menor diversidad genética (menor número promedio de alelos), sobre todo en las poblaciones más al norte (Los Tuxtlas). Mientras que las poblaciones de Panamá (Tabla 8) muestran los valores más altos de diversidad (H_o , H_e , N_a) (Ellsworth y Hoelzer, 2006; Milton *et al.*, 2009). *Alouatta caraya*, la especie distribuida al extremo más austral, presenta también un número bajo de alelos y niveles de heterocigosis similares a los de *A. palliata* (Ruiz-García *et al.*, 2007; Oklander *et al.*, 2017; Tabla 8), de manera que las especies en los límites norte y sur tienen la menor diversidad.

Según la hipótesis biogeográfica de Ford (2006), la especie hermana de *A. palliata*, el mono aullador negro *A. pigra*, debería de haber sufrido una mayor reducción histórica de sus poblaciones al ser desplazados tras la colonización de *A. palliata*, disminuyendo así su diversidad genética. Ello se corrobora al comparar la diversidad genética de *A. p. mexicana* con lo reportado en diferentes estudios para *A. pigra* (Winkler *et al.*, 2004; Ellsworth y Hoelzer, 2006; Van Belle *et al.*, 2012), donde se observan valores de diversidad genética similares, o incluso menores (N_e), a los del mono aullador de manto (Tabla 8). Sin embargo, hay que tomar estas comparaciones con precaución, ya que los tamaños de muestra y de loci de cada estudio difieren.

VIII.2 La fragmentación y sus consecuencias

La composición y estructura del paisaje influye directamente en la distribución de las poblaciones silvestres y en sus patrones de dispersión y de migración, con efectos directos sobre las características genéticas de los individuos (Cushman *et al.*, 2016). La fragmentación del paisaje puede llegar a aislar funcionalmente a las poblaciones, lo que genera diferenciación y estructura genética al reducirse el flujo génico por un aumento en el costo del movimiento entre parches (Allendorf *et al.*, 2013). Así, al aumentar el aislamiento de las poblaciones, y si el organismo presenta poca vagilidad, es posible que se disminuya el tamaño efectivo y la diversidad genética y se incremente la endogamia. En estos casos se puede afectar la adecuación y potencialmente la supervivencia de las poblaciones a largo plazo (Allendorf *et al.*, 2013; Cushman *et al.*, 2016). La fragmentación también altera las características bióticas y abióticas cerca de los bordes del hábitat, lo que puede tener consecuencias negativas sobre la adecuación de algunas especies (Cushman *et al.*, 2016).

Se han documentado cambios en las comunidades de mamíferos asociados con la fragmentación del hábitat (Garmendia *et al.*, 2013), con una consecuente reducción de la variación genética, incremento de la susceptibilidad a enfermedades y disminución de la viabilidad de las poblaciones (Crispo *et al.*, 2011; Knapp, 2013). Sin embargo, también se habla de que la fragmentación puede incrementar el flujo génico y disminuir la estructura genética local, si el organismo se ve favorecido con la nueva estructura del ecosistema (Knapp, 2013; Fähring *et al.*, 2019). Algunas especies de primates, dada su flexibilidad conductual, poseen ciertas ventajas para sobrellevar algunas consecuencias de la fragmentación y el deterioro ambiental, por ejemplo, adaptando su dieta y cambiando sus patrones de actividad (Nowak y Lee, 2013).

Los monos aulladores (*Alouatta* sp.) se consideran organismos relativamente tolerantes a la perturbación del hábitat (Bicca-Marques, 2003; Garber *et al.*, 2006; Lecompte *et al.*, 2017),

sobre todo por persistir en parches donde otras especies de primates neotropicales no pueden (Gilbert, 2003; Boyle *et al.*, 2013; Carretero-Pinzón, 2013). Aunque es importante definir y cuantificar adecuadamente la fragmentación, ya que las respuestas de los primates pueden variar dramáticamente entre paisajes con diferente configuración y cantidad y calidad de hábitat (Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2013). La fragmentación parece afectar de manera diferencial ciertas características de los monos aulladores, mediado por el contexto regional del paisaje donde habitan (Galán-Acedo *et al.*, 2021).

Se ha cuestionado si la presencia de vegetación secundaria puede beneficiar las poblaciones de *A. palliata mexicana* (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2005). No obstante, existe evidencia de que altos niveles de fragmentación, degradación y pérdida de hábitat pueden llegar a afectar negativamente sus poblaciones (Arroyo-Rodríguez y Salvador-Mandujano, 2006; Arroyo-Rodríguez y Dias, 2010; Puig-Lagunes *et al.*, 2016). La variabilidad en los componentes de la vegetación del hábitat causada por causas antropogénicas puede generar diferentes estrategias de alimentación en esta subespecie (Asensio *et al.*, 2007), provocando un aumento en el estrés fisiológico de las poblaciones que habitan en fragmentos más pequeños y con menor disponibilidad de alimento (Dunn *et al.*, 2013b). Hay que considerar que otras consecuencias de la fragmentación del hábitat como las genéticas pueden tardar en observarse, sobre todo en cuanto a cambios en la diversidad genética (heterocigosis).

Sin embargo, evaluar los patrones de diferenciación y estructura poblacional con base en información genética es una buena estrategia para determinar el impacto de la fragmentación y pérdida de hábitat en las poblaciones de primates silvestres (Knapp, 2013). En nuestro caso, se esperaría que la estructura y diferenciación genética de las poblaciones silvestres del mono aullador de manto en México responda a factores históricos (barreras geográficas como montañas y ríos), y a factores contemporáneos de destrucción y fragmentación del hábitat. Las poblaciones analizadas abarcan una gran parte de su distribución natural (Figura 2), la cual presenta una orografía compleja y además ha sufrido graves procesos de deforestación desde los años 40's del siglo pasado hasta la actualidad (Toledo, 1978; Mendoza *et al.*, 2005; IHNE, 2007; Pérez-Sánchez, 2007). Efectivamente, nuestros resultados muestran una estructuración significativa de las poblaciones de *A. p. mexicana*, diferenciadas en tres grupos genéticos por procesos de aislamiento geográfico y pérdida de hábitat.

El grupo genético más diferenciado (Norte) incluye a las poblaciones presentes en el norte de la Reserva de la Biósfera Los Tuxtlas (Figura 4, Tabla 5). Esta región representa el límite boreal de la distribución de la especie y se encuentra relativamente aislada del resto de las poblaciones por una serie de cadenas montañosas de origen volcánico, principalmente la Sierra

de Santa Marta y el volcán San Martín Tuxtla. La zona de los Tuxtlas ha perdido cerca del 60% de su cobertura forestal en las últimas décadas (Vega-Vela *et al.*, 2018), con tasas de deforestación que van de 0.8% hasta 4% anual (Dirzo y García, 1992; Von Thaden *et al.*, 2020), y una alta fragmentación (Mendoza *et al.*, 2005). Sin embargo, no detectamos diferenciación genética al interior de Los Tuxtlas (Anexo 7), probablemente por lo reciente (evolutivamente) de estos eventos. Esto también se puede deber a la presencia de dispersión y flujo genético entre las poblaciones a pesar de la fragmentación, como se indica en algunos estudios realizados en la zona (Cristóbal-Azkarate *et al.* 2004; Cristóbal-Azkarate *et al.* 2017). La región de los Tuxtlas está dentro de un área natural protegida, por lo que algunas de las presiones antropogénicas se han visto disminuidas en las últimas décadas, haciendo más lentos los procesos de transformación del hábitat. Cabe destacar que en esta área del norte de la reserva existe un amplio uso de cercas vivas, las cuales sirven como corredores para los monos logrando conectar algunos parches (Harvey *et al.*, 2004; Asensio *et al.*, 2009).

El grupo genético Centro-Oeste se compone por las poblaciones del otro lado de la Reserva de la Biósfera los Tuxtlas, cruzando la Sierra de Santa Marta, en la región del mismo nombre, junto con unas poblaciones de la región de Uxpanapa (Figura 4). El valle de Uxpanapa en Veracruz, cerca de la frontera con Tabasco, Oaxaca y Chiapas, ha pasado por un proceso de colonización masivo a partir de la década de los 70's, generando una tasa de deforestación de 2.02% anual pasando de un 75% de su territorio comprendido por selva en 1975 a sólo 37% en 2009 (Hernández *et al.*, 2013). Estos procesos ya se reflejan en diferenciación genética, donde dos poblaciones, Ramos Millán y Plan de Arroyo, están genéticamente más relacionadas con las poblaciones de Comalcalco y Pichucalco, formando otro grupo genético, Centro-Este (Figura 4, Tabla 5, Anexo7).

La alta diferenciación genética ($R_{ST}=0.325$) entre las poblaciones de Ramos Millán (Centro-Este) y Murillo Vidal (Centro-Oeste) en la región de Uxpanapa, a pesar de estar cerca geográficamente, puede deberse a que están separadas por el río Uxpanapa (Díaz-Muñoz, 2011). En cambio, la diferenciación genética observada entre Murillo Vidal (Centro-Oeste) y Plan de Arroyo (Centro-Este), de la misma región de Uxpanapa (Figura 4), aunque también es alta ($R_{ST}=0.246$), se explica más bien por una baja conectividad entre las poblaciones a causa de la excesiva deforestación en la zona, que genera un alto aislamiento de los parches. El origen genético mixto de la región del valle de Uxpanapa seguramente es un reflejo del flujo histórico que existió entre las poblaciones silvestres de mono aullador de manto antes de la destrucción y fragmentación de su hábitat. El resto de las poblaciones silvestres del grupo genético Centro-Este (regiones de Comalcalco y Pichucalco), habitan un área con pocas barreras geográficas

pero con alta intervención antrópica, sobre todo a partir de los años 50's del siglo pasado con procesos de fragmentación y cambio de uso de suelo (IHNE, 2007; Pérez-Sánchez, 2007).

Todas las regiones y la mayoría de las poblaciones estudiadas presentaron índices significativos de endogamia, con los valores más altos en las poblaciones dentro de Los Tuxtlas y Uxpanapa (Tabla 4), dos de las zonas que han sufrido más fragmentación y pérdida de hábitat. Estas poblaciones también presentaron los mayores porcentajes de parentesco entre individuos del mismo grupo (Tabla 6). Por lo tanto, aunque no presentan una diversidad genética significativamente baja, los efectos de la fragmentación se evidencian por la endogamia y la relación entre individuos de un mismo grupo, posiblemente asociadas con el tamaño de los fragmentos y su grado de aislamiento. Sin embargo, es probable que *A. p. mexicana* tienda a exhibir estos niveles de endogamia de manera "normal" por una alta filopatría en sus poblaciones naturales o porque los individuos están usando estrategias alternativas para permanecer con familiares cercanos (Nidiffer y Cortés-Ortiz, 2015).

VIII.3 Historia de tres poblaciones en semicautiverio

Las poblaciones de especies amenazadas que son pequeñas y permanecen aisladas por muchas generaciones son más propensas a la extinción que poblaciones más grandes y estables (Frankham *et al.*, 2010). Éstas generalmente presentan una menor diversidad genética por acción de la deriva génica, que disminuye la eficacia de la selección y permite proporciones elevadas de variación genética deletérea (Frankham, 1997; Makino *et al.*, 2018) y están más expuestas a estocasticidad ambiental y demográfica (Keller y Waller, 2002). Al restringirse las oportunidades de apareamiento se incrementa la reproducción entre parientes cercanos, generando depresión por endogamia y disminución de la adecuación de la progenie (Keller y Waller, 2002; Frankham *et al.*, 2010). La depresión por endogamia afecta factores reproductivos y demográficos que pueden desencadenar diversos problemas en la población, llevándolos al vórtex de la extinción (Höglund, 2009). Antiguamente se pensaba que las consecuencias de la depresión por endogamia en poblaciones silvestres eran poco comunes, debido a los mecanismos naturales para evitar la endogamia y a la acción de la selección en contra de las mutaciones deletéreas recesivas, que genera una purga genética (Keller y Waller, 2002). Sin embargo, ahora se sabe que todas las especies responden a la endogamia, pero de maneras distintas (Lacy, 1993).

Las poblaciones en semicautiverio de este estudio cumplen las características de poblaciones pequeñas y aisladas, pero con la peculiaridad de que fueron creadas mediante la translocación de individuos provenientes de localidades nativas. Efectivamente, las poblaciones del ZooMAT e Isla Agaltepec mostraron niveles relativamente bajos de diversidad genética (N_a y

Ra) en comparación con las poblaciones silvestres, aunque los niveles de heterocigosis fueron similares. Es interesante notar además que los monos en semicautiverio presentaron una mayor proporción de la población en EHW, es decir que no están siendo afectadas por ninguna fuerza evolutiva.

La población de Agaltepec es genéticamente parecida a aquéllas del grupo genético Centro-Este, y la del ZooMAT a las del Centro-Oeste, aunque ambas con niveles altos de admixta, es decir con un origen mezclado (Figura 4), lo cual no concuerda del todo con la información que está documentada sobre el origen de éstas. ZooMAT debería estar en el grupo Centro-Este, de la Venta, Tabasco y Chiapas (Cuarón, 1997; Aguilar-Melo *et al.*, 2013), mientras que Agaltepec debería estar en el mismo grupo genético que Mirador Pilapa (Centro-Oeste), una de sus supuestas poblaciones de origen (Rodríguez-Luna *et al.*, 2003). Ello debe ser resultado del pool genético histórico que comparten estas poblaciones, aunado a su divergencia desde la creación de las poblaciones cautivas. Hay que resaltar además que en el caso del ZooMAT, a lo largo de los años se han agregado individuos de otras poblaciones nativas, lo que puede explicar su tamaño efectivo contemporáneo (Tabla 7) y su mezcla de grupos genéticos (Figura 4).

Las relaciones de parentesco en las poblaciones en semicautiverio fueron de las más altas y con altos niveles de endogamia, como se había previsto. Sin embargo, los niveles similares al resto de las poblaciones estudiadas ponen en evidencia el alto riesgo en el que se encuentran las poblaciones silvestres, o pueden ser una evidencia de que la filopatría en *A. palliata* es más común de lo que se piensa. Crnokrak y Roff (1999) encontraron un menor índice de depresión por endogamia en poblaciones de mamíferos en cautiverio, posiblemente por un manejo humano en su reproducción, como las introducciones de individuos de otras localidades a estas poblaciones de monos. Se ha visto que individuos nacidos en cautiverio pueden presentar menor adecuación en condiciones silvestres (Willoughby *et al.*, 2017), ya que hay adaptaciones genéticas al cautiverio que pueden llegar a ser menos ventajosas en poblaciones reintroducidas (Frankham, 2008). Por ello, aunado al aislamiento y la diversidad genética baja, se podría esperar depresión por endogamia en estas poblaciones, sin embargo, para confirmar si este proceso está ocurriendo es necesario evaluar los posibles efectos en la adecuación de los individuos y poblaciones.

VIII.4 Implicaciones para la conservación

Alouatta palliata mexicana está considerada en peligro de extinción, con el fundamento de sus poblaciones pueden disminuir en al menos un 50% en el curso de 30 años (2018-2048), y cerca del 19% de su hábitat habrá desaparecido para esa fecha, además de las recurrentes amenazas

de cacería y tráfico ilegal (Cuarón *et al.*, 2020). Por ello, esta especie de primate se encuentra gravemente amenazada en nuestro país. El presente estudio contribuye con algunos de los objetivos para los subcomponentes de investigación científica y del manejo de poblaciones del Programa de Acción para la Conservación de las Especies: Primates de SEMARNAT (CONANP, 2012), dado que realizamos estudios genéticos encaminados a fortalecer el conocimiento y conservación de las poblaciones silvestres de esta especie de primate. Proponemos que las poblaciones del mono aullador de manto en México deben ser consideradas como una sola Unidad Evolutiva Significativa (ESU, por sus siglas en inglés), ya que presentan aislamiento geográfico y diferenciación genética del resto de las poblaciones de la especie, por lo que pueden ya tener procesos de adaptación distintos (Casacci *et al.*, 2014; Solórzano-García *et al.* 2021). Asimismo, debido al principio precautorio y a la estructura y diferenciación poblacional observadas, proponemos que cada cluster genético identificado sea considerado una Unidad de Manejo (*sensu* Green, 2005), para así asegurar el mantenimiento de la mayor diversidad genética posible en la especie (Barbosa *et al.*, 2018).

Es importante tener en cuenta que las poblaciones de *A. palliata mexicana* han sufrido procesos de erosión genética, ya que presentan diversidad genética moderada junto con altos niveles de endogamia y limitado flujo génico. Ello asociado con procesos históricos que involucran tamaños efectivos poblacionales pequeños y, más recientemente, por procesos de aislamiento consecuencia de la fragmentación y destrucción de su hábitat. Por todo ello, enfatizamos que deben realizarse esfuerzos locales para la preservación de los remanentes naturales del hábitat de esta especie. Dado que el mono aullador también puede vivir en parches de bosque secundario y agroecosistemas (Estrada *et al.*, 2012), utilizar cercas vivas y cruzar caminos a través de puentes de dosel (Asensio *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2013; Hernández-Pérez, 2015), se incentiva también a crear corredores biológicos con estas características que conecten distintos parches del ecosistema, con el objetivo de incrementar el flujo génico y reducir los niveles de endogamia y parentesco intrapoblacional. La concientización y educación ambiental de las comunidades donde se distribuye el mono aullador es clave para la conservación de la especie (Franquesa-Soler *et al.*, 2020), ya que el impacto de los cambios en el paisaje está influenciado por contextos regionales (Galán-Acedo *et al.*, 2021).

Asimismo, realizar más estudios con un tamaño de muestra mayor y abarcando poblaciones no incluidas en este trabajo, además de calcular tamaños efectivos poblacionales históricos, puede ayudarnos a conocer de manera más certera el estado de las poblaciones silvestres del país. Es urgente evaluar las características del paisaje que determinan los patrones genéticos observados, que contribuyan al desarrollo de mejores planes de manejo y conservación

de las poblaciones silvestres de la especie. La información de este estudio sirve además para la creación de una base de datos que ayude a rastrear las poblaciones de origen de individuos de mono aullador decomisados y la detección de rutas de tráfico ilegal, así como para la asignación de zonas adecuadas para la reintroducción de individuos a su hábitat natural (Oklander *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

IX. CONCLUSIONES

Las poblaciones silvestres del mono aullador de manto, *Alouatta palliata mexicana*, en México, presentan una diversidad genética moderadamente baja, índices de endogamia altos y flujo génico reducido, como consecuencia de poblaciones pequeñas y aisladas asociadas a su historia biogeográfica y más recientemente por la pérdida, transformación y fragmentación de su hábitat. Las poblaciones silvestres del país se encuentran estructuradas en tres grupos genéticos: Norte, Centro-Este y Centro-Oeste. Cada grupo debe ser considerado como una Unidad de Manejo para asegurar la conservación de su diversidad genética. Asimismo, las poblaciones en conjunto deben ser consideradas una Unidad Evolutiva Significativa. Las poblaciones en semicautiverio de *A. p. mexicana* presentaron niveles de endogamia y diversidad genética similares a las poblaciones silvestres, por lo que podrían ser considerados como reservorios para enriquecer el pool genético de las poblaciones silvestres en un futuro. Los resultados de este estudio reafirman el gran riesgo en el que se encuentra el mono aullador de manto, por lo que es de vital importancia realizar esfuerzos para asegurar la viabilidad de las poblaciones en su hábitat natural, sobre todo la preservación del hábitat remanente y el incremento de la conectividad del paisaje, además de la educación ambiental en las comunidades donde habita.

REFERENCIAS

- Abadía-Cardoso, A., Freimer, N.B., Deiner, K. y J.C. Garza. 2017. Molecular population genetics of the northern elephant seal *Mirounga angustirostris*. *Journal of Heredity*, 108(6): 618-627.
- Adamack, A.T. y B. Gruber. 2014. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5: 384-387.
- Agapow, P.M. y A. Burt. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1: 101-102.
- Aguilar-Melo, A.R., Andresen, E., Cristóbal-Azkarate, J., Arroyo-Rodríguez, V., Chavira, R., Schondué, J., Serio-Silva, J.C. y A.D. Cuarón. 2013. Behavioral and physiological responses to subgroup size and number of people in howler monkeys inhabiting a forest fragment used for natural-based tourism. *American Journal of Primatology*, 75: 1108-1116.
- Alcocer-Rodríguez, M. 2015. Evolución demográfica de *Alouatta palliata mexicana* en fragmentos de selva: migración, parentesco y características del hábitat que determinan su persistencia. Tesis Doctorado. Universitat de Barcelona, Barcelona, España.
- Allendorf, F.W., Luikart, G. y Aitken, S.N. 2013. *Conservation and the Genetics of Population*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc: UK.
- Argüello-Sánchez, L. 2012. Genética de la conservación en *Alouatta palliata mexicana*. Evaluación del efecto de la fragmentación del hábitat y sus poblaciones en Veracruz. Tesis Maestría. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México.
- Argüello-Sánchez, L y L.M. García-Feria. 2014. La genética como herramienta para el estudio y conservación del género *Alouatta* en México. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(2): 387-394.
- Arroyo-Rodríguez, V. y S. Mandujano. 2006. Forest fragmentation modifies habitat quality for *Alouatta palliata*. *International Journal of Primatology*, 27(4): 1079-1096.
- Arroyo-Rodríguez, V. y P.A.D. Días. 2010. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: a review. *American Journal of Primatology*, 72: 1-16.
- Arroyo-Rodríguez, V., Cuesta-del Moral, E., Mandujano, S., Chapman, C.A., Reyna-Hurtado, R. y L. Fahrig. 2013. Chapter 2. Assessing habitat fragmentation effects on primates: the importance of evaluating questions at the correct scale, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience* de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.). Springer: Nueva York.
- Asensio, N., Cristobal-Azkarate, J., Dias, P.A.D., Vea, J.J. y E. Rodríguez-Luna. 2007. Foraging habits of *Alouatta palliata mexicana* in three forest fragments. *Folia Primatologica*, 78: 141-153.

- Asensio, N., Arroyo-Rodríguez, V., Dunn, J.C. y J. Cristóbal-Azkarate. 2009. Conservation value of landscape supplementation for howler monkeys living in forest patches. *Biotropica*, 41: 768-773.
- Barbosa, S., Mestre, F., White, T.A., Paupério, J., Alves, P.C. y Searle, J.B. 2018. Integrative approaches to guide conservation decisions: Using genomics to define conservation units and functional corridors. *Molecular Ecology*, 27(17): 3452-3465.
- Bicca-Marques, J.C. 2003. How do howler monkeys cope with habitat fragmentation?, en *Primates in Fragments: Ecology and Conservation* de Marsh, L.K. (ed.). Springer: Nueva York.
- Boyle, S.A., Lenz, B.B., Gilbert, K.A., Sprionello, W.R., Gómez, M.S., Setz, E.Z.F., Marajó dos Reis, A., da Silva, O.F., Keuroghlian, A. y F. Pinto. Chapter 5. Primates of the biological dynamics of forest fragments: a history, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience* de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.). Springer: Nueva York.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- Callen, D.F.M, Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. y G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52: 922-927.
- Carretero-Pinzón, X. 2013. Chapter 12. An eight-year life history of a primate community in the Colombian llanos, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience* de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.). Springer: Nueva York.
- Casacci, L.P., Barbero, F. y E. Balletto. 2014. The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology*, 81(2):182-193.
- Chakraborty, R., Zhong, Y., Jin, L. y B. Budowle. 1994. Nondetectability of restriction fragments and independence of DNA fragment sizes within and between loci In RFLP typing of DNA. *American Journal of Human Genetics*, 55: 391-401.
- Chapman, C.A. y C.A. Peres. 2001. Primate conservation in the new millennium: the role of scientists. *Evolutionary Anthropology*, 10: 16-33.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3): 621-631.
- Chybicki, I. y J. Burczyk. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *The Journal of Heredity*, 100(1): 106-113.
- Clancy, S. 2008. Genetic recombination. *Nature Education*, 1(1): 40.
- CONABIO-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2011. Fichas de especies prioritarias. Mono Aullador Pardo (*Alouatta palliata*). Comisión Nacional de Áreas

Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.

CONABIO – Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2011b. *Alouatta palliata* (mono aullador de manto). Distribución potencial. Calixto-Pérez, E. *et al.* Catálogo de Metadatos Geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

CONANP - Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2012. Programa de acción para la conservación de las especies: primates, mono Araña (*Ateles geoffroyi*) y monos aulladores (*Alouatta palliata*, *Alouatta pigra*). Oropeza-Hernández P. y E. Rendón Hernández (eds.).CONANP/SEMARNAT. México.

Cortés-Ortiz, L., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I. y Ruiz-García, M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 64-81.

Cortés-Ortiz, L., Duda Jr., T.F., Canales-Espinosa, D., García-Orduña, F., Rodríguez-Luna, E. y E. Bermingham. 2007. Hybridization in large-bodied new world primates. *Genetics*, 176: 2421-2425.

Cortés-Ortiz, L., Mondragón, E. y Cabotage, J. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of Mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other Neotropical primates. *Conservation Genetics Resources*, 2: 21-26.

Cortés-Ortiz, L., Rylands, A.B. y R.A. Mittermeier. 2015. The taxonomy of howler monkeys: integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies, en *Howler Monkeys. Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* de Kowalewski, M.K., Garber, P.A., Cortés-Ortiz, L., Urbani, B. y D. Youlatos (eds.). Springer: Nueva York.

Crnokrak, P. y D.A. Roff. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity*, 83: 260-270.

Cristóbal-Azkarate, J., Dias, P.A.D. y J.J. Veà. 2004. Causes of intraspecific aggression in *Alouatta palliata mexicana*: evidence from injuries, demography and habitat. *International Journal of Primatology*, 25(4): 939-953.

Cristóbal-Azkarate, J., Veà, J.J., Asensio, N. y E. Rodríguez-Luna. 2005. Biogeographical and floristic predictors of the presence and abundance of mantled howlers (*Alouatta palliata mexicana*) in rainforest fragments at Los Tuxtlas, Mexico. *American Journal of Primatology*, 67: 209-222.

Cristóbal-Azkarate, J. y V. Arroyo-Rodríguez. 2007. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *American Journal of Primatology*, 69: 1013-1029.

- Cristóbal-Azkarate, J. y J.C. Dunn. 2013. Chapter 6. Lessons from Los Tuxtlas: 30 years of research into primates in fragments, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.)*. Springer: Nueva York.
- Cristóbal-Azkarate, J., Dunn, J.C., Domingo Balcells, C. y J. Veà Baró. 2017. A demographic history of a population of howler monkeys (*Alouatta palliata*) living in a fragmented landscape in Mexico. *Peer J*, 5: e3547.
- Crispo, E., Moore, J.S., Lee-Yaw, J.A., Gray, S.M. y B.C. Haller. 2011. Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals. *Bioessays*, 33: 508-518.
- Cuarón, A.D. 1997. Conspecific aggression and predation: costs for a solitary mantled howler monkey. *Folia Primatologica*, 68: 100-105.
- Cuarón, A.D., Shedden, A., Rodríguez-Luna, E., de Grammont, P.C. y A. Link. 2020. *Alouatta palliata* ssp. *Mexicana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T925A17978896.
- Cushman, S.A., McRae, B.H. y K. McGarigal. 2016. Chapter 2. Basics of landscape ecology: an introduction to landscapes and population processes for landscape geneticists, en *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications de Balkenhol, N., Cushman, S.A., Storfer, A.T. y L.P. Waits (eds.)*. John Wiley and Sons, Inc: UK.
- Dai, Q. y Fu J.Z. 2011. When central populations exhibit more genetic diversity than peripheral populations: A simulation study. *Chinese Science Bulletin*, 56(24): 2531-2540.
- DeSalle, R. y G. Amato. 2009. Chapter 1. The expansion of conservation genetics, en *Conservation Genetics in the Age of Genomics de Amato, G., Ryder, O., Rosenbaum, H. y DeSalle, R. (eds.)*. Columbia University Press: Nueva York.
- Di Fiore, A. y C.J. Campbell. 2007. The atelines: variation in ecology, behavior, and social organization, en *Primates in Perspective de Campbell, C., Fuentes, A., MacKinnon, K.C., Panger, M. y S. Beader (eds.)*. Oxford University Press: Oxford.
- Díaz-Muñoz, S.L. 2011. Role of recent and old riverine barriers in fine-scale population genetic structure of Geoffroy's tamarin (*Saguinus geoffroyi*) in the Panama Canal watershed. *Ecology and Evolution*, 2(2): 298-309.
- Dirzo, R. y M. C. García. 1992. Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a Neotropical area in southeast Mexico. *Conservation Biology*, 6: 84-90.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J. y Ovenden, J. R. (2014) NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 209-214.
- Dunn, J.C., Shedden-González, A., Cristóbal-Azkarate, J., Cortés-Ortiz, L., Rodríguez-Luna, E. y Knapp, L.A. 2013. Limited genetic diversity in the critically endangered Mexican howler monkey

- (*Alouatta palliata mexicana*) in the Selva Zoque, México. *Primates*. DOI 10.1007/s10329-013-0399-6
- Dunn, J.C., Cristóbal-Azkarate, J., Schulte-Herbrüggen, B., Chavira, R. y J.J. Veà. 2013b. Travel time predicts fecal glucocorticoid levels in free-ranging howlers (*Alouatta palliata*). *International Journal of Primatology*, DOI: 10.1007/s10764-013-9657-0.
- Earl, D.A. y B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource*, 4: 359-361.
- Eckert, C.G., Samis, E. y S.C. Loughheed. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17: 1170-1188.
- El Mousadik, A. y R.J. Petit. 1996. High levels of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical Applied Genetics*, 92: 832-839.
- Ellegreen, H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*, 24: 400-402.
- Ellsworth, J.A. y G.A. Hoelzer. 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Molecular Ecology*, 7: 657-666.
- Ellsworth, J.A. y G.A. Hoelzer. 2006. Chapter three: genetic evidence on the historical biogeography of Central American howler monkeys, en *Primate Biogeography. Developments in Primatology: Progress and Prospects* de Lehman, S.M. y J.G. Fleagle (eds.). Springer: Boston.
- Estrada, A., Raboy, B.E. y L.C. Oliveira. 2012. Agroecosystems and primate conservation in the tropics: A review. *American Journal of Primatology*, 74: 696-711.
- Estrada, A., Garber, P.A., Rylands, A.B., Roos, C., Fernandez-Duque, E., Di Fiore, A., ... B. Li. 2017. Impeding extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Science Advances*, 3(1): e16000946.
- Evanno, G., Regnaut, S. y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G. y S. Schneider. 2005. Arlequin (versión 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:47-50.
- Fahring, L., Arroyo-Rodríguez, V., Bennet, J.R., Boucher-Lalonde, V., Cazetta, E., Currie, D.J., Eigenbrod, F., Ford, A.T., Harrison, S.P., Jaeger, J.A.G., Koper, N., Martin, A.E., Martin, J., Metzger, J.P., Morrison, P., Rhodes, J.R., Saunders, D.A., Simberloff, D., Smith, A.C.,

- Tischendorf, L., Vellend, M. y J.I. Watling. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological Conservation*, 230: 179-186.
- Ford, S.M. 2006. Chapter three: the biogeographic history of mesoamerican primates, en *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates. Distribution, Ecology, Behavior, and Conservation* de Estrada, A., Garber, P.A., Pavelka, M.S.M. y L. Luecke (eds). Springer: Nueva York.
- Frankel, O.H. 1974. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics*, 78(1): 53-65.
- Frankel, O.H. y M.E. Soulé. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press: UK.
- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78: 311-327.
- Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17: 325-333.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., McInnes, K.H. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Second Edition. Cambridge University Press: UK.
- Franquesa-Soler, M., Jorge-Sales, L., Aristizabal, J.F., Moreno-Casasola, P. Y J.C. Serio-Silva. 2020. Evidence-based conservation education in Mexican communities: Connecting arts and science. *PLoS ONE*, 15:1-18.
- Fuentes, E. y A. Estrada. 2003. Reporte preliminar sobre el uso de recursos alimenticios por una tropa de monos aulladores *Alouatta palliata*, en el Parque La Venta, Tabasco, México. *Neotropical Primates*, 11(1): 24-29.
- Futuyma, D.J. y M. Kirkpatrick. 2017. *Evolution*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, Massachusetts, EE.UU.
- Galán-Acedo, C., Arroyo-Rodríguez, V., Andresen, E. y P.A.D. Dias. 2021. Regional context mediates the response of Mexican primates to landscape structure in fragmented rainforests. *Biological Conservation*, 255: 109006.
- Garber, P.A., Estrada, A. y M.S.M. Pavelka. 2006. New perspectives in the study of Mesoamerican primates: concluding comments and conservation priorities, en *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates: Distribution, Ecology, Behavior and Conservation* de Estrada, A., Garber, P.A., Pavelka, M. y L. Luecke (eds). Springer: Nueva York.
- Garmendía, A., Arroyo-Rodríguez, V., Estrada, A., Naranjo, E.J. y K.E. Stoner. 2013. Landscape and Patch Attributes Impacting Medium- and Large-Sized Terrestrial Mammals in a Fragmented Rain Forest. *Journal of Tropical Ecology*, 29: 331-344.
- Gilbert, K.A. 2003. Primates and fragmentation of the Amazon forest, en *Primates in Fragments: Ecology and Conservation* de Marsh, L.K. (ed.). Springer: Nueva York.

- Gonçalves, E.C., Silva, A., Barbosa, M.S. y M.P.C. Schneider. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes*, 4: 406-408.
- Green, D.M. 2005. Designatable units for status assessment of endangered species. *Conservation Biology*, 19(6): 1813-1820.
- Guillot, G., Santos, F. y A. Estoup. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: A new algorithm to deal with null alleles and friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, 24(11):1406-1407.
- Hall, E.R. 1981. *The Mammals of North America*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc: Nueva York.
- Hamilton, M.B. 2009. *Population Genetics*. John Wiley & Sons, Inc: UK.
- Hardy, G.H. 1908. Mendeleian proportions in a mixed population. *Science*. N.S. Vol. XXVIII: 49-50.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, Massachusetts, EE.UU.
- Harvey, C.A., Tucker, N.I.J. y A. Estrada. 2004. Chapter eleven: live fences, isolated trees, and windbreaks: tools for conserving biodiversity in fragmented landscapes, en *Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes* de Schroth, G. *et al* (eds.). Island Press: Washington.
- Hedrick, P.W. 2011. *Genetics of Populations*. Fourth Edition. Jones & Bartlett Publishers, MA, EE.UU.
- Hernández, I.U., Ellis, E. A. y C.A. Gallo. 2013. Aplicaciones de teledetección y sistemas de información geográfica para el análisis de deforestación y deterioro de selvas tropicales en la región Uxpanapa, Veracruz. *GeoFocus (Informes y Aplicaciones)*, 13: 1-24.
- Hernández-Pérez, E. 2015. Rope bridges: a strategy for enhancing habitat connectivity of the black howler monkey (*Alouatta pigra*). *Neotropical Primates*, 22:94-96.
- Höglund, J. 2009. *Evolutionary Conservation Genetics*. Oxford University Press: UK.
- Hurlbert, S.H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52: 577-586.
- Instituto de Historia Natural y Ecología (IHNE). 2007. Programa de Manejo de la Zona Sujeta a Conservación Ecológica Finca Santa Ana. Gobierno de Chiapas: Chiapas.
- Jaso-del Toro, C., Márquez-Valdelamar, L. y Mondragón-Ceballos, R. 2016. Diversidad genética en grupos de monos aulladores de manto (*Alouatta palliata mexicana*) en la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 1069-1079.

- Johnson, M.T.J. y J. Munshi-South. 2017. Evolution of life in urban environments. *Science*, 358(6363): eaam8327.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P. y M.L. Taper. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6: 576-579.
- Kamvar, Z.N., Tabimar, J.F., Grünwald, N.J. (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*: e281.
- Keller, L.F. y D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(5): 230-241.
- Knapp, L.A. 2013. Chapter 25. Molecular genetic tools for evaluating the consequences of habitat fragmentation, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience* de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.). Springer: Nueva York.
- Lacy, R.C. 1993. Impacts of inbreeding in natural and captive populations of vertebrates: Implications for conservation. *Perspectives in Biology and Medicine*, 36(3): 480-496.
- Lecompte, E., Bouanani, M., de Thoisy, B. y B. Crouau-Roy. 2017. How do rivers, geographic distance, and dispersal behavior influence genetic structure in two sympatric New World monkeys? *American Journal of Primatology*, 79(7): e22660.
- Leigh, D.M., Hendry, A.P., Vázquez-Domínguez, E. y V.L. Friesen. 2019. Estimated six per cent loss of genetic variation in wild populations since the industrial revolution. *Evolutionary Applications*, 12: 1505-1512.
- Lynch-Alfaro, J.W., Cortés-Ortiz, L., Di Fiore, A. y J.P. Boubli. 2015. Special issue: Comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82: 518-529.
- Makino, T., Rubin, C.J., Cameiro, M., Axelsson, E., Andersson, L. y M.T. Webster. 2018. Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants. *Genome Biology and Evolution*, 10(1): 276-290.
- Mandujano, S. y L.A. Escobedo-Morales. 2008. Population viability analysis of howler monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) in a highly fragmented landscape in Los Tuxtlas, Mexico. *Tropical Conservation Science*, 1: 43-62.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press: Cambridge.
- Melo-Carrillo, A., Dunn, J.C. y L. Cortés-Ortiz. 2020. Low genetic diversity and limited genetic structure across the range of the critically endangered Mexican howler monkey (*Alouatta palliata mexicana*). *American Journal of Primatology*, 82: e23160.
- Mendoza, E., Fay, J. y R. Dirzo. 2005. A quantitative analysis of forest fragmentation in Los Tuxtlas, southeast Mexico: patterns and implications for conservation. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78: 451-467.

- Milton, K., Lozier, J.D. y E.A. Lacey. 2009. Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics*, 10: 347-358.
- Nash, H.C., Wirdateti, Low, G.H., Choo, S.W., Chong, J.L., Semiadi, G., Hari, R., Sulaiman, M.H., Turvey, S.T., Evans, T.A. y Rheindt, F.E. 2018. Conservation genomics reveals possible illegal trade routes and admixture across pangolin lineages in Southeast Asia. *Conservation Genetics*, 19: 1083-1095.
- Nidiffer, M.D. y L. Cortés-Ortiz. 2015. Intragroup genetic relatedness in two howler monkey species (*Alouatta pigra* and *A. palliata*): implications for understanding social systems and dispersal. *American Journal of Primatology*, 77: 1333-1345.
- Nowak, K. y P.C. Lee. 2013. Chapter 14. "Specialist" primates can be flexible in response to habitat alteration, en *Primates in Fragments. Complexity and Resilience* de Marsh, L.K. y C.A. Chapman (eds.). Springer: Nueva York.
- Oklander, L.I., Marino, M., Zunino, G.E. y D. Corach. 2004. Preservation and extraction of DNA from feces in howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Neotropical Primates*, 12(2)
- Oklander, L.I., Miño, C.I., Fernández, G., Caputo, M. y D. Corach. 2017. Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. *PLOS ONE*: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185867>
- Oklander, L.I., Caputo, M., Solari, A. y D. Corach. 2020. Genetic assignment of illegally trafficked neotropical primates and implications for reintroduction programs. *Scientific Reports*, 10: 3676.
- Oliveira, F.B., Molina, E.C. y G. Marroig. 2009. Paleogeography of the south Atlantic: a route for primates and rodents into the new world?, en *South American Primates. Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation* de Garber, P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J.C., Heymann, E.W. y K.B. Strier (eds.). Springer: Nueva York.
- Paradis, E. *pegas*: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3): 419-420.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reserch- an update. *Bioinformatics*, 28(19): 2537-2539.
- Pérez Sánchez, J.M. 2007. Desarrollo local en el trópico mexicano. Los camellones chontales de Tucta, Tabasco. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, México.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Puig-Lagunes, A.A., Canales-Espinosa, Rangel-Negrín, A. y P.A.D. Días. 2016. The influence of spatial attributes on fragment occupancy and population structure in the mexican mantled

- howler (*Alouatta palliata mexicana*). International Journal of Primatology, DOI: 10.1007/s10764-016-9930-0.
- R Core Team. 2019. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Raguet-Schofield, M. y R. Pavé. 2015. Chapter 11: An ontogenetic framework for *Alouatta*: infant development and evaluating models of life history, en Howler Monkeys. Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology de Kowalewski, M.K., Garber, P.A., Cortés-Ortiz, L., Urbani, B. y D. Youlatos (eds.). Springer: Nueva York.
- Rodríguez-Luna, E., Domínguez-Domínguez, L.E., Morales-Mávil, J.E. y M. Martínez-Morales. 2003. Foraging strategy changes in an *Alouatta palliata mexicana* troop released on an island. En: Primates in fragments: Ecology and conservation de L.K. Marsh (ed.). Kluwer Academics/Plenum Publishers: Nueva York.
- Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for spetwise mutation processes. Genetics, 142(2): 1357-1362.
- Rowe, N. 1996. The tropical guide to the living primates. Pogonian Press, Nueva York, EE.UU: 263 p.
- Ruiz-García, M., Escobar-Armel, P., Alvarez, D., Mudry, M., Ascunce, M., Gutierrez-Espeleta y J.M. Shostell. 2007. Genetic Variability in four *Alouatta* species measured by means of nine DNA microsatellite markers: genetic structure and recent bottlenecks. Folia Primatologica, 78: 73-87.
- Ruiz-García, M., Cerón, A., Sánchez-Castillo, S., Rueda-Zozaya, P., Pinedo-Castro, M., Gutierrez-Espeleta, G. y J.M. Shostell. 2017. Phylogeography of the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*; Atelidae, Primates) across its geographical range by means of mitochondrial genetic analyses and new insights about the phylogeny of *Alouatta*. Folia Primatologica, 88: 421-454.
- Rylands, A.B., Groves, C.P., Mittermeier, R.A., Cortes-Ortiz, L. y Hines, J.H. 2006. Taxonomy and distribution of Mesoamerican primates, en Estrada, A., Garber, P.H., Pavelka, M. y Lueck, L. (eds.). New perspectives in the Study of Mesoamerican primates. Springer Press, Nueva York: 29-79.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1ra Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: México.
- Schweizer, R.M., Vonholdt, B.M., Harrigan, R., Knowles, J.C., Musiani, M., Coltman, D., Novembre, J. y R.K. Wayne. 2016. Genetic subdivision and candidate genes under selection in North American grey wolves. Molecular Ecology, 25: 380-402.

- Scott Mills, L. 2013. Conservation of Wildlife Populations. Demography, Genetics, and Management. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc: UK.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental – Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre – Categoría de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio – Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de diciembre de 2010. 38 p.
- Shaffer, H.B., Gidis, M., McCartney-Melstad, E., Neal, K.M., Oyamaguchi, H.M., Tellez, M. y E.M. Toffelmier. 2015. Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. Annual Review of Animal Biosciences, 3: 113-38.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139(1): 457-462.
- Solórzano-García, B., Zubillaga, D., Piñero, D. y E. Vázquez-Domínguez. En prensa. Conservation implications of living in forest remnants: Inbreeding and genetic structure of the northernmost mantled howler monkeys. Biotropica.
- Srbek-Araujo, A.C., Haag, T., Garcia Chiarello, A., Salzano, F.M. y E. Eizirik. 2018. Worrisome isolation: noninvasive genetic analyses shed light on the critical status of a remnant jaguar population. Journal of Mammalogy, 99(2): 397-407.
- Templeton, A.R. 2006. Population Genetics and Microevolutionary Theory. John Wiley & Sons, Inc: UK.
- Teixeira, F.Z., Printes, R.C., Godoy-Fagundes, J.C., Alonso, A.C. y A. Kindel. 2013. Canopy bridges as road overpasses for wildlife in urban fragmented landscapes. Biota Neotropical, 13:7-23.
- Tobón, W., Urquiza-Haas, T., Ramos-Fernández, G., Calixto-Pérez, E., Alarcón, J., Kolb, M. y Koleff, P. 2012. Prioridades para la conservación de los primates en México. CONABIO. Consultado el 10 de abril de 2020 en: http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/prioridades_primates.pdf
- Toledo, V.M. 1978. Uxpanapa: ecocidio y capitalismo en el trópico. Revista nexos. Consultado el 20 de abril de 2021 en: <https://www.nexos.com.mx/?p=3236>
- Van Belle, S., Estrada, A., Strier, K.B. y A. Di Fiore. 2012. Genetic structure and kinship patterns in a population of black howler monkeys, *Alouatta pigra*, at Palenque national park, Mexico. American Journal of Primatology, 74: 948-957.
- Vázquez-Domínguez, E. y R. Vega. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos?, en Genética y Mamíferos Mexicanos

- Presente y Futuro de Vázquez-Domínguez, E. y D.J. Hafner (eds.). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No 32.
- Vega-Vela, V., Muñoz-Robles, A., Rodríguez-Luna, E., López-Acosta, J.C. y R. Sema-Lagunes. 2018. Análisis de la fragmentación del paisaje de la Reserva de la Biósfera Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(14): 227-238.
- Verhoeven, K.J.F., Simonsen, L. y L.M. McIntyre. 2005. Implementing false discovery rate control: increasing your power. *Oikos*, 108: 643-647.
- Villanueva-García, C. 2017. Ecología molecular y diversidad parasitaria de poblaciones silvestres de las especies de mono aullador *Alouatta palliata* y *A. pigra* en Mesoamérica. Tesis Doctorado. Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Von Thaden, J.J., Laborde, J., Guevara, S. y P. Mokondoko-Delgadillo. 2020. Dinámica de los cambios en el uso de suelo y cobertura vegetal en la Reserva de la Biósfera Los Tuxtlas (2006-2016). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91: e913190.
- Waits, L.P., Luikart, G.L. y P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.
- Waples, R.S. y C. Do. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3: 244-262.
- Weinberg, W. 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterl. Ändische Naturkunde in Württemberg*, 64: 368-382.
- Willoughby, J.R., Ivy, J.A., Lacy, R.C., Doyle, J.M. y J. Andrew De Woody. 2017. Inbreeding and selection shape genomic diversity in captive populations: Implications for the conservation of endangered species. *PLoS ONE*, 12(4): e0175996.
- Winkler, L.A., Zhang, X., Ferrell, R., Wagner, R., Dahl, J., Peter, G. y R. Sohn. 2004. Geographic microsatellite variability in Central American howling monkeys. *International Journal of Primatology*, 25(1): 197-210.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(4): 323-54.
- Zhang, H., Ades, G., Miller, M.P., Yang, F., Lai, K. Y G.A. Fischer. 2020. Genetic identification of African pangolins and their origin in illegal trade. *Global Ecology and Conservation*, 23: e01119.

ANEXO 1. Protocolo modificado de extracción de ADN de excretas con Stool ADN isolation kit #27600 de Norgen Biotek Corp.

Preparar el lisado: Agregar ~200 mg de muestra fecal a un tubo con cuentas de 2 mL, añadir 1 mL de buffer de lisis y poner brevemente al vortex para mezclar. Agregar 100 µL de aditivo de lisis A y volver a mezclar con el vortex. Poner los tubos en un TissueLyser (Qiagen) y realizar 2 ciclos de 20,000 RPM por 1:30 min y 3 ciclos de 25,000 RPM por 30 s. Centrifugar los tubos por 2 min a 14,000 RPM. Transferir hasta 600 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga esterilizado de 1.5 mL y agregar 100 µL de buffer vinculante I, mezclar invirtiendo el tubo unas cuantas veces, e incubar por 10 min en hielo. Centrifugar el lisado 2 min a 14,000 RPM y transferir hasta 500 µL de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga esterilizado de 2 mL. Agregar el mismo volumen de etanol (70%) al lisado colectado y mezclar en el vortex.



Unir a la columna: Ensamblar una columna giratoria con un tubo de colecta. Aplicar 600 µL del lisado clarificado con etanol a una columna y centrifugar por 1 min a 14,000 RPM. Desechar el líquido que cae y re-ensamblar la columna con el tubo. Si queda lisado restante, agregar a la columna y volver a centrifugar por 1 min a 14,000 RPM.



Lavar la columna: Aplicar 500 µL de buffer vinculante C a la columna y centrifugar por 1 min a 10,000 RPM. Descartar el líquido que cae y re-ensamblar la columna con el tubo. Añadir 500µL de solución de lavado A y centrifugar por 1 min a 10,000 RPM. Volver a descartar el líquido que cae y otra vez re-ensamblar la columna con el tubo. Repetir el lavado con solución de lavado A y centrifugar la columna por 2 min a 10,000 RPM para secar eficientemente la resina. Descartar el tubo de colecta.



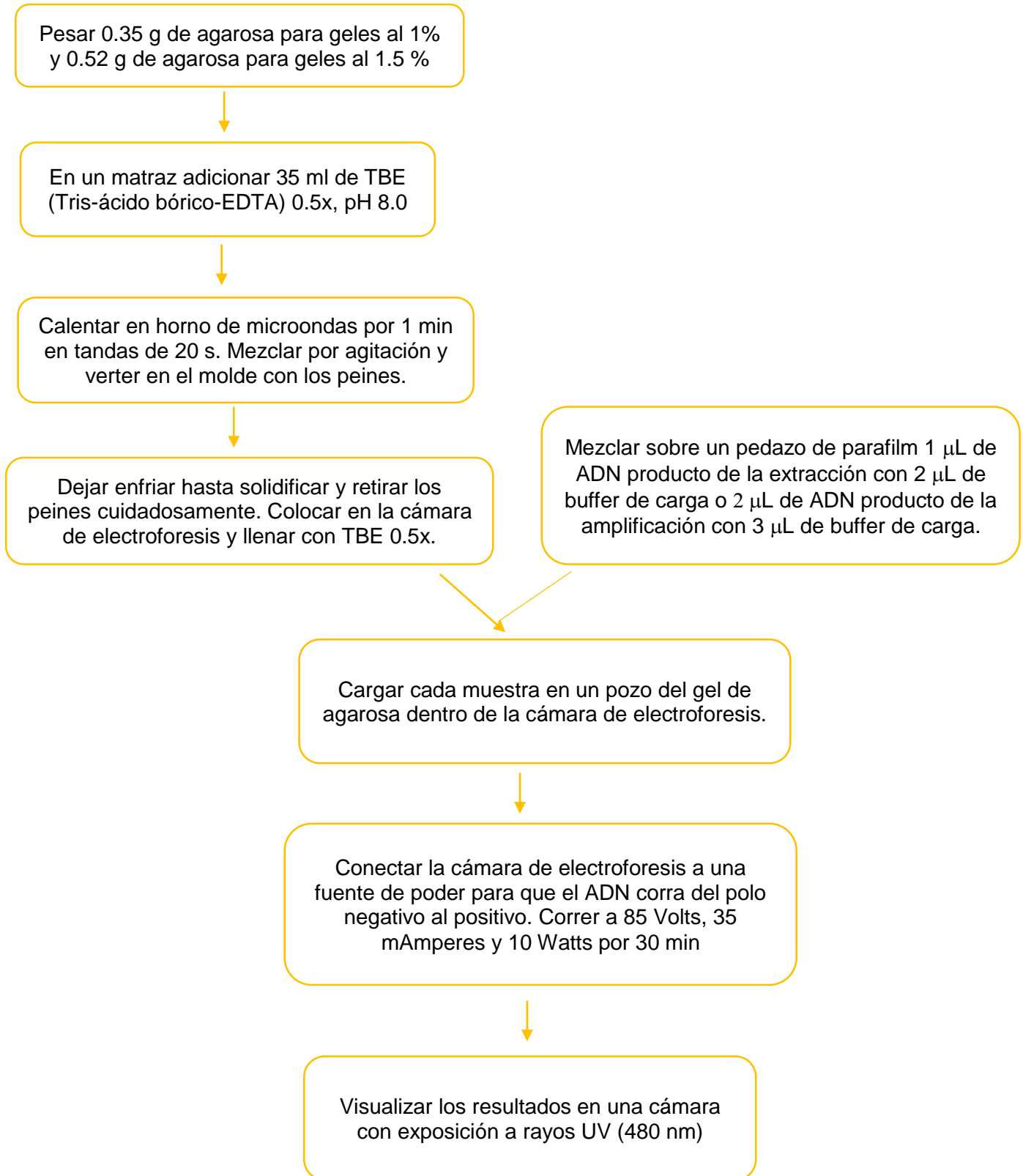
Realizar la elución del ADN: Poner la columna en un tubo de elución de 1.7 mL y agregar 100 µL de buffer de elución B a la columna e incubar a la temperatura del cuarto por 1 min. Centrifugar por 1 min a 10,000 RPM



Almacenar ADN a 4°C por unos pocos días o a -20° C para un almacenaje prolongado.

NOTA: Buffer de lisis L, aditivo de lisis A, buffer vinculante I, buffer vinculante C, solución de lavado A, buffer de elución B, mini columnas de centrifuga, cuentas, tubos de colecta y tubos de elución (1.7 mL) vienen incluidos dentro del Kit de Norgen Biotek Cop.

ANEXO 2. Protocolo de preparación de geles de agarosa y realización de electroforesis para visualizar la integridad del ADN y los productos.



ANEXO 3. Características de los primers empleados para la amplificación de 11 loci de microsatélites, de los cuales el Api09 no se pudo amplificar y el Ap68 resultó monomórfico para las muestras analizadas en este trabajo.

Locus	Motivo	Primer		Tamaño del producto (pb)		Fluorescencia
		Forward	Reverse	Reportado	Este estudio	
Apm01_a	(TG) ₂₅	CAC GTG TGT CCA GCT TGT CT	ATT CTG CTG CCC TTG AGT TC	208-220	204-210	6-FAM™
Apm04_a	(AC) ₂₁	TGA GAG TGA GCA CCT GCC TA	CAG CCC TGA TCA CAA AGT GT	239-249	240-250	HEX™
Apm09_a	(CA) ₁₆	CAG GGT TCC TCT TTC ACT GG	TTG GGA TCA CAA GTG CTT CA	176-179	170-184	6-FAM™
Api07^a	(CA) ₁₆	TGC TTT CAT GCC AAC TCA AG	CTC AAA ACC CTC ACA GTG ACA A	115-117	113-125	HEX™
Api08^a	(CA) ₁₇	GCT TCC TCT TCC CTT CTG CT	GGA GCC CTG AAT TCT TTT GC	277-279	271-285	6-FAM™
Api09^a	(CA) ₁₅	ACT TGC TGT GTG ACC TTC AG	AAT GTC TAT CCA GCA GCC TCT	467-471	NA	HEX™
Api11^a	(CA) ₁₅	CTC CAA ACA GTG GTG CAC AG	GCT GCC CAC TAG AGA ACC AA	253-261	257-269	6-FAM™
Ap74^b	(TG) ₁₉	TGC ACC TCA TCT CTT TCT CTG	CAT CTT TGT TTT CCT CAT AGC	152-156	146-160	6-FAM™
Ap68^b	(TG) ₁₇	TGT TGG TAT AAT CTT TCC TA	ACA TAC ACC TTT GAG TTT CT	193-195	192	HEX™
Ab04^c	(GA) ₂ AA(GA) ₁₂ AG	AGC GCC TCT CCT GGT TTT TAC	AAA AAT TCC CAA ACC CCA CC	177-187	171-185	HEX™
D6S26_{0^b}	(CA) ₂₃	TTT TCA CTA TCA ATG GCA GC	TTC ATT TTC AGC AGC AAT TT	177-179	174-186	6-FAM™

^a(Cortés-Ortiz *et al.*, 2010); ^b(Ellsworth y Hoesler, 1998); ^c(Gonçalves *et al.*, 2004). Los tamaños de producto fueron reportados por Cortés-Ortiz *et al.*, 2010. NA: No aplica.

ANEXO 4. Resultados obtenidos del análisis de frecuencia de alelos nulos en los loci de microsatélite amplificados en este estudio.

ANEXO 4.1 Resultado de la frecuencia de alelos nulos global y por región, de cada uno de los loci de microsatélite utilizados en el estudio, calculados con el método de Brookfield *et al.* 1996 en PopGenReport v2.0 (Adamack y Gruber, 2014)

	Apm01	Apm04	Apm09	Api07	Api08	Api11	Ap74	Ab04	D6S260
Tuxtlas Norte	0.04	0.28	NA	0.06	-0.07	0.12	0.05	0.12	0.08
Santa Marta	-0.15	0.33	-0.02	0.13	0.39	0.19	0.18	0.41	0.24
Uxpanapa	-0.11	0.35	-0.02	0.26	0.35	0.26	0.24	0.34	0.08
Tabasco	-0.15	0.46	0.15	0	0.28	-0.05	0.1	0.41	0.06
Pichucalco	-0.01	-0.05	-0.03	0.14	0.34	-0.03	0.05	0.21	0.06
Agaltepec	-0.17	0.25	-0.02	0.07	0.12	0.06	0.44	0.19	-0.04
ZooMAT	0.27	0.3	-0.13	-0.04	0.13	0.02	0.19	0.28	-0.01
Global	-0.08	0.35	0.04	0.12	0.24	0.14	0.15	0.4	0.18

ANEXO 4.2 Resultado de la frecuencia de alelos nulos global y por región, de cada uno de los loci de microsatélite utilizados en el estudio, calculados con base en un algoritmo de Estimación-Maximización implementado en el software FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007).

	Apm01	Apm04	Apm09	Api07	Api08	Api11	Ap74	Ab04	D6S260
Tuxtlas Norte	0.07	0.22	0	0.07	0	0.15	0.06	0.14	0.08
Santa Marta	0	0.25	0	0.14	0.28	0.17	0.15	0.29	0.19
Uxpanapa	0	0.25	0	0.19	0.27	0.23	0.2	0.26	0.1
Tabasco	0	0.32	0.15	0	0.23	0	0.12	0.3	0.07
Pichucalco	0	0	0	0.16	0.28	0	0.05	0.17	0.08
Agaltepec	0	0.19	0	0.07	0.14	0	0.31	0.18	0.04
ZooMAT	0.2	0.24	0	0	0.14	0.02	0.18	0.22	0
Global	0	0.26	0.05	0.11	0.21	0.14	0.16	0.28	0.15

ANEXO 5. Resumen de los resultados obtenidos del análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg realizado en el paquete pegas v0.12 (Paradis, 2010).

ANEXO 5.1. Proporción de loci fuera del EHW.

	Chi cuadrada	MC	Chi cuadrada (FDR)	MC (FDR)
Apm01	0.571	0.714	0.286	0.428
Apm04	0.714	0.857	0.714	0.714
Apm09	0.143	0.143	0.143	0.143
Api07	0.286	0.286	0.143	0.286
Api08	0.714	0.571	0.571	0.571
Api11	0.571	0.428	0.428	0.428
Ap74	0.426	0.714	0.428	0.428
Ab04	1.000	1.000	0.714	0.857
D6S260	0.571	0.428	0.571	0.286

ANEXO 5.2. Proporción de poblaciones fuera del EHW.

	Chi cuadrada	MC	Chi cuadrada (FDR)	MC (FDR)
Tuxtlas Norte	0.667	0.667	0.556	0.556
Santa Marta	0.778	0.889	0.778	0.889
Uxpanapa	0.778	0.889	0.556	0.667
Tabasco	0.778	0.667	0.778	0.556
Pichucalco	0.222	0.222	0.222	0.222
Agaltepec	0.444	0.333	0.111	0.111
ZooMAT	0.222	0.333	0.111	0.222

ANEXO 6. Diversidad genética de las poblaciones de mono aullador de manto (*A. p. mexicana*) mostrada por localidad. Las localidades con $n < 5$ fueron eliminadas para este análisis. n: número de individuos, Pol: número de loci polimórficos, PA: número de alelos privados, Na: número promedio de alelos, RA: riqueza alélica rarificada, Ho: heterocigosis observada, uHe: heterocigosis esperada imparcial.

Región	Localidad	n	Pol	PA	Na	RA	Ho	uHe
Uxpanapa	Plan de Arroyo	10	9	2	3.556 ± 0.294	2.813	0.400 ± 0.082	0.527 ± 0.052
	Murillo Vidal	6	8	0	2.889 ± 0.389	2.652	0.315 ± 0.094	0.517 ± 0.079
Comalcalco	Hacienda la Luz	10	9	0	3.111 ± 0.351	2.613	0.367 ± 0.069	0.508 ± 0.059
	Zona Arqueológica	9	9	2	3.667 ± 0.289	2.961	0.383 ± 0.085	0.564 ± 0.030
Pichucalco	Pichucalco	10	9	0	3.889 ± 0.512	2.904	0.378 ± 0.081	0.487 ± 0.066
	Mirador Pilapa	10	9	1	3.667 ± 0.500	2.888	0.322 ± 0.072	0.522 ± 0.077
Santa Marta	Playa	5	9	0	3.000 ± 0.289	2.823	0.378 ± 0.097	0.570 ± 0.067
	Zapoapan	10	9	0	3.889 ± 0.351	3.051	0.367 ± 0.088	0.553 ± 0.065
Tuxtlas	Estación de Biología	8	8	0	2.222 ± 0.222	2.021	0.292 ± 0.098	0.370 ± 0.072
	Balzapote	11	7	0	2.778 ± 0.364	2.229	0.313 ± 0.076	0.381 ± 0.081
	Montepío	11	8	0	2.667 ± 0.333	2.379	0.374 ± 0.081	0.477 ± 0.068
Pob. Art,	Agaltepec	9	9	0	2.889 ± 0.261	2.529	0.358 ± 0.080	0.492 ± 0.061
Pob. Art.	ZooMAT	9	9	0	3.333 ± 0.408	2.621	0.309 ± 0.055	0.466 ± 0.058

ANEXO 7. Niveles de diferenciación genética de las poblaciones de *Alouatta palliata mexicana* analizadas en este estudio. Se muestra la diferenciación entre localidades. Por debajo de la diagonal se muestran los valores de RST (negro) y por encima los valores de FST (gris). * p=0.05

	MP1	BA	EB	ZAP	PL	MAG	MIP	VA	PA	MV	RM	JA	HL	ZA	VE	PCH	AGA	ZMT
MP1		0.049*	0.08*	0.08*	0.14*	0.192	0.209*	0.032	0.166*	0.174*	0.269*	0.366*	0.163*	0.138*	0.205*	0.149*	0.102*	0.121*
BA	-0.03		0.084*	0.098*	0.209*	0.325*	0.302*	-0.005	0.155*	0.305*	0.304*	0.465*	0.214*	0.208*	0.264*	0.185*	0.133*	0.182*
EB	0.053	0.058		0.169*	0.243*	0.371*	0.252*	0.078*	0.22*	0.297*	0.342*	0.528*	0.176*	0.157*	0.317*	0.184*	0.131*	0.222*
ZAP	0.174*	0.21*	0.258*		0.01*	0.148	0.174*	0.002	0.031	0.152*	0.117*	0.303*	0.112*	0.088*	0.121*	0.07*	0.034*	0.153*
PL	0.317*	0.369*	0.42*	0.031		-0.127	0.147*	0.104*	0.206*	0.196*	0.297*	0.315*	0.178*	0.164*	0.164	0.182*	0.161*	0.073*
MAG	0.558*	0.674*	0.784*	0.153*	-0.149		0.164*	0.218*	0.256*	0.293*	0.514*	0.566	0.229*	0.191*	0.222	0.222*	0.212*	0.078
MIP	0.308*	0.355*	0.36*	0.084*	0.149*	0.25*		0.191*	0.215*	0.14*	0.275*	0.231*	0.175*	0.128*	0.22*	0.159*	0.137*	0.167*
VA	-0	0.019	0.105*	-0.015	0.106	0.405	0.114*		0.074*	0.232*	0.192*	0.422*	0.112*	0.104*	0.139	0.067*	0.025	0.097*
PA	0.134*	0.165*	0.183*	0.031	0.169*	0.301*	0.064*	-0.015		0.211*	0.101*	0.334*	0.104*	0.081*	0.081*	0.057*	0.03	0.23*
MV	0.421*	0.487*	0.514*	0.145*	0.249*	0.447*	0.033	0.226*	0.156*		0.313*	0.347*	0.209*	0.17*	0.24*	0.192*	0.168*	0.24*
RM	0.474*	0.527*	0.573*	0.241*	0.173*	0.524	0.173*	0.28*	0.246*	0.325*		0.656	0.055	0.123*	0.411*	0.035	0.134*	0.285*
JA	0.466	0.574*	0.733*	0.019	0.029	0.776	0.009	0.224	0.093	-0.071	0.334		0.434*	0.358*	0.652	0.391	0.361*	0.315*
HL	0.251*	0.256*	0.237*	0.146*	0.131*	0.282	0.153*	0.083	0.12*	0.285*	-0.015	0.181		0.033*	0.142	0.021	0.062*	0.181*
ZA	0.292*	0.318*	0.292*	0.083*	0.13*	0.168	0.063*	0.102*	0.032	0.178*	0.134	0.092	0.076*		0.165	0.056*	0.052*	0.206*
VE	-0.03	0.081	0.247*	-0.234	-0.065	0.679	-0.17	-0.329	-0.264	-0.08	0.248	0.682	-0.065	-0.116		0.096	0.099	0.179*
PCH	0.337*	0.362*	0.301*	0.201*	0.263*	0.391*	0.095*	0.174*	0.102*	0.253*	0.103	0.278	0.063*	0.014	-0.007		0.009	0.192*
AGA	0.098*	0.141*	0.161*	0.073*	0.23*	0.402*	0.077*	-0.021	0.009	0.168*	0.331*	0.192	0.189*	0.14*	-0.32	0.17*		0.191*
ZMT	0.362*	0.423*	0.518*	0.103*	0.095*	0.48*	0.08*	0.169*	0.162*	0.214*	0.227*	0.174	0.133*	0.192*	0.049	0.265*	0.205*	-