

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OSO ANDINO (*Tremarctos ornatus*) EN DOS  
ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DE CUSCO (PARQUE NACIONAL MANU  
Y SANTUARIO HISTÓRICO DE MACHUPICCHU)**

**PRESENTADO POR:**

Bach. Roger Quispe Mamani

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO**

**ASESOR:**

M. Sc. Jorge Acurio Saavedra

**FINANCIADO POR CONVENIO CONCYTEC-**

**FONDECYT-UNSAAC**

**CUSCO – PERÚ**

**2024**

# INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: Diversidad Genética del Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en dos Áreas Naturales Protegidas de Cusco (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico de Machupicchu).

presentado por: Bach. Roger Quispe Mamani con DNI Nro.: 72037697 presentado por: ..... con DNI Nro.: ..... para optar el título profesional/grado académico de Biólogo

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 7%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 30 de setiembre de 2024



Firma

Post firma Jorge Acurio Saavedra

Nro. de DNI 23983840

ORCID del Asesor 0000-0001-9184-1662

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oíd: 27259: 385026037

NOMBRE DEL TRABAJO

**Tesis Roger.docx**

AUTOR

**Roger Quispe Mamani**

RECUENTO DE PALABRAS

**29359 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**163207 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**169 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**35.6MB**

FECHA DE ENTREGA

**Sep 24, 2024 9:00 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Sep 24, 2024 9:03 PM GMT-5****● 7% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al altísimo, por la vida y salud que tengo, lo cual me permite culminar la presente tesis de investigación.

A la Universidad Nacional San Antonio Abad (UNSAAC) por el financiamiento a través del convenio CONCYTEC – UNSAAC, según contrato de subvención N° 006-2018-UNSAAC, esquema financiero E053-2017- UNSAAC-02 “Tesis de Título profesional”, para optar al título de Biólogo.

A todos los docentes de la Escuela Profesional (EPB) de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad por las enseñanzas impartidas en el Pregrado, asimismo, al equipo del laboratorio de Genética Molecular de la E.P. de Biología, al M. Sc. Jorge Acurio Saavedra por la mentoría en la presente tesis, por su infinita paciencia, profesionalismo, enseñanza, y sugerencias para la culminación de la tesis.

A la Dirección General de Áreas Naturales Protegidas (DGANP), por el permiso otorgado para la ejecución de este proyecto de investigación. Al Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas del Santuario Histórico de Machupicchu y Especialistas en Fauna (SERNANP MACHUPICCHU), por el apoyo logístico, al personal guardaparque que apoyó en la colecta de datos, asimismo al Servicio Nacional de Áreas Naturales protegidas del Parque Nacional de Manu (SERNANP-MANU).

Con profundo agradecimiento a mis queridos padres por su apoyo en todo el proceso de mi formación profesional, a mis hermanos(as) por el apoyo incondicional y a todos (as) los amigos (as) quienes aportaron con entusiasmo en este trabajo.

## DEDICATORIA

*Con mucho aprecio y amor a mis honorables padres Modesto y Cayetana. Por su apoyo absoluto en todo el proceso de formación profesional y en la finalización de la presente tesis, que sin su ayuda no hubiera sido posible.*

*A mi hija Antonella quien es mi motivación, asimismo a mis hermanos (as), Germania, Víctor, Marcelino, Felipe, Pierina, Vilma y Elsa por su motivación constante y apoyo moral. Asimismo, a mi cónyuge Yudith, a mis familiares y amigos que me apoyaron.*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	xiii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	xv
JUSTIFICACIÓN .....	xvi
OBJETIVOS .....	xviii
OBJETIVO GENERAL.....	xviii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	xviii
HIPÓTESIS.....	xix
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1 ANTECEDENTES .....	1
1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	1
1.2 ANTECEDENTES NACIONALES Y LOCALES.....	3
CAPÍTULO II .....	4
MARCO CONCEPTUAL.....	4
2 GENERALIDADES .....	4
2.1 HISTORIA NATURAL DEL OSO ANDINO.....	4
2.1.1 FILOGENIA DE LOS ÚRSIDOS .....	5
2.1.2 TAXONOMÍA DEL OSO ANDINO.....	9
2.1.3 IMPORTANCIA DEL OSO .....	10
2.1.4 DISTRIBUCIÓN.....	12
2.1.5 TAMAÑO POBLACIONAL .....	13
2.1.6 ESTADO DE CONSERVACIÓN .....	15
2.2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO .....	17
2.2.1 ADN mt.....	18
2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA .....	20
2.4 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	21
2.5 DIVERSIDAD NUCLEOTIDICA.....	22

2.6	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA.....	23
2.7	TEST DE NEUTRALIDAD.....	24
2.8	ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	25
2.8.1	Las Mutaciones .....	26
2.8.2	La deriva genética .....	28
2.8.3	La migración .....	29
2.8.4	Flujo genético.....	30
2.8.5	Selección Natural .....	31
2.9	ÍNDICE DE FIJACIÓN (Fst).....	32
2.10	ESTUDIOS GENÉTICOS APLICADOS AL OSO ANDINO .....	33
2.11	MARCADORES MITOCONDRIALES .....	34
2.12	MUESTREO NO INVASIVO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS.....	35
2.13	TRABAJO DE LABORATORIO.....	36
2.13.1	EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL .....	36
2.13.2	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO. ....	37
2.13.3	SÍNTESIS DE PRIMERS PARA LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN <sub>mt</sub> DE <i>Tremarctos ornatus</i> .....	39
2.13.4	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN <sub>mt</sub> MEDIANTE PCR CONVENCIONAL .....	39
2.13.5	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA	41
2.13.6	SECUENCIAMIENTO DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN <sub>mt</sub> MEDIANTE MÉTODO SANGER.....	42
2.13.7	ANÁLISIS BIOINFOMÁTICO DE LA SECUENCIACIÓN SANGER .....	44
CAPÍTULO III.....		45
MATERIALES Y MÉTODOS .....		45
3	ÁREA DE ESTUDIO .....	45
3.1.1	UBICACIÓN POLÍTICA .....	45
3.1.2	UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	45
3.1.3	RUTAS DE ACCESO.....	46
3.2	MATERIALES.....	48
3.2.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	48

3.2.2	MATERIALES DE LABORATORIO.....	48
3.2.3	MATERIALES DE CAMPO.....	52
3.3	METODOLOGÍA.....	54
3.3.1	TRABAJO DE CAMPO.....	54
3.3.2	TRABAJO DE LABORATORIO.....	60
3.3.3	ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN SANGER.....	69
	CAPÍTULO IV.....	75
	RESULTADOS.....	75
4	TRABAJO DE CAMPO.....	75
4.1	COLECTA DE MUESTRAS NO INVASIVAS.....	75
4.2	TRABAJO DE LABORATORIO.....	76
4.2.1	EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL A PARTIR DE PELO DE OSO ANDINO.....	76
4.2.2	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN <sub>mt</sub> DE OSO ANDINO.....	76
4.2.3	ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES DE ADN <sub>mt</sub> .....	77
4.2.4	SECUENCIAMIENTO DE LA REGION D-LOOP DEL ADN <sub>mt</sub> DEL OSO ANDINO.....	78
4.3	OBTENCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE LAS SECUENCIAS CONSENSO.....	79
4.3.1	ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS CONCENSO DEL ADN <sub>mt</sub> DE OSO ANDINO.....	80
4.3.2	SITIOS POLIMÓRFICOS DEL ADN <sub>mt</sub> REGIÓN D-LOOP DEL OSO ANDINO.....	80
4.4	ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	82
4.4.1	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA.....	82
4.4.2	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA.....	82
4.4.3	TEST DE NEUTRALIDAD (D).....	83
4.4.4	ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	83
4.4.5	FILOGENIA DE OSO ANDINO DEL PNM Y SHM.....	84
4.4.6	RED DE HAPLOTIPOS ENCONTRADOS.....	84
	CAPÍTULO V.....	86
	DISCUSIÓN.....	86
5	EXTRACCIÓN DE ADN.....	86

5.1	IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS CONSENSO.....	87
5.2	ÍNDICE DE DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA .....	88
5.3	ÍNDICE DE DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA.....	89
5.4	TEST DE NEUTRALIDAD.....	90
5.5	ESTRUCTURACIÓN DE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS .....	92
5.6	SITIOS POLIMORFICOS .....	93
5.7	RED DE HAPLOTIPOS .....	94
	CONCLUSIÓN .....	95
	RECOMENDACIONES .....	96
	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA .....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Secuencia de Primers utilizados en la Investigación.....	65
<b>Tabla 2</b> Reactivos utilizados en la amplificación de la región D-loop del ADNmt del oso andino.....	66
<b>Tabla 3</b> Colecta de muestras en las dos ANPs .....	75
<b>Tabla 4</b> Concentración y pureza del ADN total extraído .....	76
<b>Tabla 5</b> Concentración y pureza de los amlicones .....	77
<b>Tabla 6</b> Porcentajes de identidad de las secuencias consenso en Blast de NCBI .....	79
<b>Tabla 7</b> Sitios variables en las secuencias consenso de la región D-loop del ADNmt del oso andino.....	81
<b>Tabla 8</b> Composición nucleotídica de las secuencias consenso de las dos ANPs.....	81
<b>Tabla 9</b> Procedencia de los haplotipos encontrados.....	82
<b>Tabla 10</b> Índices estimados para determinar la diversidad genética y flujo genético .....	83
<b>Tabla 11</b> Distancias genéticas entre los individuos muestreados.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Filogenia de los osos existentes en la actualidad.....	6
<b>Figura 2</b> Árbol de filogenia con especies intermedias .....	7
<b>Figura 3</b> Filogenia completa de los osos extintos y existentes .....	8
<b>Figura 4</b> Oso andino en la cultura andina y su expresión en danzas.....	11
<b>Figura 5</b> Imagen del oso andino.....	15
<b>Figura 6</b> Presencia del oso andino dentro del SHM.....	16
<b>Figura 7</b> Mapa genético del ADNmt.....	20
<b>Figura 8</b> Proceso de secuenciación sanger.....	44
<b>Figura 9</b> Mapa del área de estudio .....	47
<b>Figura 10</b> Trampa pelo al inicio de la investigación.....	55
<b>Figura 11</b> Trampa pelo adaptada a la geografía del lugar.....	57
<b>Figura 12</b> Electroforesis con las muestras cargadas.....	68
<b>Figura 13</b> Electroforesis de los 10 amplicones .....	77
<b>Figura 14</b> Electroferograma de la muestra TOSHM-10.....	78
<b>Figura 15</b> Alineamiento en ClustalX de las secuencias consenso. ....	80
<b>Figura 16</b> Árbol de filogenia de región D-loop del ADNmt de los osos muestreados.....	84
<b>Figura 17</b> Red de haplotipos a partir de la región D-loop del ADNmt de los osos del PNM y SHM. ....	85

## RESUMEN

El oso andino es indicador de la calidad de ecosistemas andinos, es dispersor de semillas y mantiene el equilibrio ecológico de la biodiversidad en los Andes. El presente trabajo representa una investigación primigenia sobre diversidad genética del oso andino desarrollada en el Parque Nacional del Manu y el Santuario Histórico de Machupicchu - Perú. El objetivo fue determinar la diversidad genética a partir de los individuos muestreados, mediante la secuenciación de 10 muestras de la región D-loop del ADNmt, específicamente la región hipervariable II. De estas, 9 muestras proporcionaron datos para evaluar la diversidad genética, las muestras fueron colectadas de manera no invasiva. Los resultados mostraron que la diversidad nucleotídica fue  $\pi = 0,01358 \pm 0,01091$  en el Parque Nacional del Manu y  $\pi = 0,01753 \pm 0,01080$  en el Santuario Histórico de Machupicchu. La diversidad haplotípica fue  $Hd = 1$  para el Parque Nacional del Manu y  $Hd = 0,933$  para el Santuario Histórico de Machupicchu. El índice  $Fst = 0,04853 \pm 0,0007$  para ambas áreas protegidas. Los valores del test de neutralidad indicaron  $D = -0,4072 \pm 0,069$  para el Parque Nacional del Manu y  $D = -1,0636 \pm 0,031$  para el Santuario Histórico de Machupicchu. La investigación sugiere que la proximidad geográfica y la continuidad de ecosistemas entre las áreas naturales protegidas facilitan un contacto genético limitado, lo que contribuye a la estructuración genética moderada y al bajo flujo genético observado.

**Palabras clave:** *Tremarctos ornatus*, oso andino, región HVII-ADNmt, diversidad genética.

## INTRODUCCIÓN

El oso andino (*Tremarctos ornatus*), es uno de las ocho especies de osos existentes en el planeta, único úrsido que habita los andes tropicales (Rojas-VeraPinto, Zegarra, Gutierrez , & Beraún, 2019); con amplia distribución a lo largo del gradiente altitudinal y las tres cadenas de la cordillera de los andes, comprendida entre los 250 hasta los 4750 m. de altitud abarca territorios desde el sur de Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y norte de Argentina (Figuroa, 2015); cabe mencionar que la mayor parte del área de distribución conocida del oso andino (casi el 70%) se encuentra entre Perú y Bolivia (SERNANP et al., 2014), aun así, tiene una tendencia decreciente, debido a la pérdida de espacios geográficos por donde el oso andino se desplaza (SERFOR, 2016, 2019). En el Perú tiene una población alrededor de 5750 individuos, la que sería, la población más numerosa en su rango de distribución (Peyton, 1999; SERFOR, 2016, 2019) un macho puede cubrir áreas de hasta 61 km<sup>2</sup> y tener un desplazamiento diario de hasta 54 km por día (Castellanos & et al., 2011).

El oso andino tiene una importancia ecológica y cultural trascendental para el Perú y en especial para el Cusco (Chauca, 2018), a pesar de que existe denodados esfuerzos de conservación (SERNANP et al., 2014), la especie necesita salir del estado vulnerable en la que se encuentra, debido a diversos factores como las actividades antrópicas (Rojas-VeraPinto, Zegarra, Gutierrez , & Beraún, 2019). La finalidad del presente estudio fue conocer los aspectos genéticos y poder plantear programas de conservación más específicos, debido a que no existe información disponible sobre la diversidad genética del oso andino del Parque Nacional del Manu y mucho menos del Santuario Histórico de Machupicchu (SERFOR, 2019), para la toma de decisiones apropiadas, ya que en los últimos 30 años el hábitat del oso andino está siendo fragmentado (SERFOR, 2016), lo que hace que se pierdan los corredores biológicos, por donde se desplaza y

por ende, esto implicaría la pérdida del flujo genético entre las dos poblaciones (Garrido-Pérez, 2020).

El presente trabajo de investigación se desarrolla bajo el enfoque conservacionista, a fin de conocer y debelar la supervivencia del oso andino a largo plazo, dentro de las dos áreas naturales protegidas, para ello, se plantea como objetivo: determinar la diversidad genética del oso andino en las dos ANPs, tomando en consideración varios índices de diversidad tales como: diversidad genética ( $\pi$ ), diversidad haplotípica ( $H_d$ ), test de Tajima ( $D$ ), test de  $F_{st}$ , es así que los osos de cada ANP fueron considerados como una unidad de muestreo a fin de determinar el flujo genético entre estas y entender los aspectos de la genética de poblaciones de la especie en estudio, por lo que, se utilizó como marcador molecular la región hipervariable II del ADN mitocondrial del oso andino, con un aproximado de 600 pb.

Se trabajó con 10 muestras no invasivas colectadas de las dos ANPs, a partir de los cuales se extrajo el ADNmt, posteriormente se amplificó mediante PCR convencional la región D-loop del ADN mitocondrial del oso andino, para lo cual se utilizó los primers TORmt2F y TORmt2R desarrollados por Bruque (2016), los amplicones fueron enviados y secuenciados por el método Sanger en Macrogen de Corea del Sur, lográndose secuenciar 9 de los 10 enviados con buenos resultados y 1 con defectos en la cola del electroferograma, a partir de dichos resultados se establecieron los diferentes índices de diversidad genética para las dos ANPs, utilizando programas bioinformáticos como: Software Chromas, ClustalX, Software Aliviw, Cap3, NCBI, Blast de NCBI, Software Mega-X V6, DnaSP6exe, Software Arlequin, y Popart1.7.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

EL Parque Nacional del Manu (PNM) y Santuario Histórico de Machupicchu (SHM) son Áreas Naturales Protegidas (ANP); ambos, los más importantes de la Región Cusco, por ende, de Perú, presentan individuos de *Tremarctos ornatus* (SERNANP et al., 2014), las cuales están experimentando fuerte amenaza por las actividades antrópicas en sus Zonas de Amortiguamiento (Rojas-Verapinto et al., 2019), esto hace que las poblaciones de osos tengan tendencia decreciente y junto a ello se corre el riesgo de pérdida de diversidad genética, pérdida de flujo genético, estructuración de las poblaciones (SERFOR, 2019), por ende en el futuro se reduciría las probabilidades de cruzamiento entre los osos presentes en ambas ANPs, sumado a ello no existe información disponible sobre la diversidad genética del oso andino a nivel nacional y mucho menos del Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu para la toma de decisiones apropiadas (SERFOR, 2016, 2019), por lo tanto es necesario conocer la diversidad genética, flujo genético, estructura poblacional, en dicho zona de estudio y crear una línea base con dichos datos para futuras investigaciones y proponer estrategias de conservación como la creación de corredores biológicos amparados por ley, puentes biológicos y programas de conservación de acuerdo a las necesidades de la población y proponer a las entidades responsables (SERFOR, 2019). Por ello se plantea las siguientes preguntas:

¿Cuál es la diversidad genética del oso andino en el Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu?

¿Cómo será el flujo genético entre los grupos muestreados?

¿Cuál será el haplotipo más dominante entre los individuos muestreados?

## JUSTIFICACIÓN

El oso andino (*Tremarctos ornatus*) es la última especie viviente de la subfamilia Tremarctinae, se encuentra distribuida exclusivamente en América de Sur y actualmente se encuentra en estado vulnerable (Peyton, 1999). A pesar de que las dos áreas naturales protegidas (PNM y SHM) se encuentran en el mismo corredor biológico, se encuentran bastante distantes a 70 km una de la otra y la distancia tomando en cuenta las curvas de nivel sería aproximadamente de 150 a 180 km, se encuentran separados por dos cordilleras y por los ríos Urubamba y Paucartambo que son barreras naturales, que están presentes entre las dos ANPs.

El presente trabajo de investigación se desarrolla bajo el enfoque conservacionista a fin de conocer los índices de diversidad genética del oso andino, flujo genético y patrones filogenéticos, ya que, estos datos de la especie brindan información relevante como la plasticidad para sobrevivir ante cambios ambientales inesperados, fluctuaciones demográficas e impactos humanos. Por otro lado, la caracterización genética de las poblaciones de oso andino es útil en la caracterización de los corredores biológicos y para la toma de decisiones de dónde enfocar los mayores esfuerzos de conservación. Por este motivo, son necesarios estudios sobre diversidad genética, que llenen vacíos de información y aspectos importantes para la gestión adecuada de la especie (SERFOR, 2016, 2019).

El oso andino tiene una importancia ecológica y cultural trascendental para el Perú y en especial para Cusco, a pesar de que existe denodados esfuerzos de conservación, la especie necesita salir del estado vulnerable en la que se encuentra, debido a diversos factores como las actividades antrópicas. Es por ello que esta investigación está orientado a realizar el estudio de diversidad genética, con la finalidad de conocer de más cerca los aspectos genéticos y poder plantear programas de conservación más específicos, debido a que no existe información disponible, sobre

la diversidad genética del oso andino del Parque Nacional de Manu y mucho menos del Santuario Histórico de Machupicchu, para la toma de decisiones apropiadas, ya que en los últimos 30 años, el hábitat del oso andino está siendo reducida (Rojas-VeraPinto, Zegarra, Gutierrez , & Beraún, 2019), lo que hace que se pierdan los corredores biológicos por donde se desplaza el oso andino (Judith Figueroa & Stucchi, 2013), esto implicaría la pérdida del flujo genético entre los individuos muestreados en ambas ANPs (Garrido-Pérez, 2020), por ello se planteó como objetivo: determinar la diversidad genética del oso andino en las dos ANPs, tomando en consideración varios índices de diversidad tales como: diversidad genética ( $\pi$ ), diversidad haplotípica ( $H_d$ ), test de Tajima ( $D$ ), test de  $F_{st}$ . Los osos en su conjunto de cada ANP fueron considerados como un grupo de muestreo a fin de determinar el flujo genético entre ambos grupos, para ello se utilizó como marcador molecular la región hipervariable II del ADN mitocondrial del oso andino con un aproximado de 600 pb.

Según el plan nacional de conservación del oso andino al 2029, existe la urgencia de conocer de cerca la diversidad genética a nivel nacional, conectividad entre poblaciones del oso andino (SERFOR, 2016, 2019).

Las investigaciones en el oso andino, a nivel molecular en otros países están bastante avanzadas, mientras que, en las áreas naturales del Perú, falta realizar una investigación más exhaustiva, por esta razón, para poder contribuir con el Plan Nacional de conservación del oso andino se desarrolla la presente investigación primigenia en el Perú, de acuerdo con la línea de acción N.º 1 Investigación in Situ, del ítem 1.1.5. del Plan Nacional de Conservación del oso andino, donde se tiene planificado, caracterizar genéticamente a la especie y determinar la viabilidad de las poblaciones (SERFOR, 2016).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética del oso andino, a partir de individuos muestreados en el Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu, Cusco, a través del análisis del gen de la región D-loop de ADNmt de *Tremarctos ornatus*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los índices de diversidad genética mediante los índices de  $\pi$ , Hd, y D a partir de los individuos muestreados de *Tremarctos ornatus* presente en las dos ANPs, Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu a partir del análisis del gen de la región D-loop del ADN mitocondrial del oso andino.
- Estimar el flujo genético mediante el índice Fst entre los dos grupos muestreados de *Tremarctos ornatus* del Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu.
- Calcular la red de haplotipos a partir de los individuos muestreados en el Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu.

## **HIPÓTESIS**

La diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en el Parque Nacional del Manu será significativamente diferente de la observada en el Santuario Histórico de Machupicchu debido a las variaciones en el flujo genético y a las características ecológicas y geográficas particulares de cada área natural protegida.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1 ANTECEDENTES

#### 1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

**BRUQUE, (2016).** Realizó un estudio sobre la diversidad genética del oso andino al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito - Ecuador, utilizando como marcador molecular al gen D-loop del ADNmt del oso andino, además, diseñó los primers TORmt2F y TORmt2R, su muestra estuvo constituida por 13 osos distintos, asimismo reportó los siguientes datos importantes para la conservación de la especie,  $Hd = 0,7051$ ;  $\pi = 0,01224$ ; 5 haplotipos, 10 sitios polimórficos, con estos datos concluyó que la población de osos en el área de estudio era capaz de reproducirse aunque con una baja diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

**ARIAS, J. (2017).** En su tesis de maestría en la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia, logró secuenciar el ADN de “245” muestras de oso andino, las que provinieron de la mayoría del rango de distribución del oso andino, utilizó marcadores mitocondriales (COI, 12srRNA Y NADH5), con ello logró determinar índices de diversidad genética, la estructuración y filogenia, asimismo, determinó los eventos que ocurrieron a lo largo de la historia evolutiva del oso andino. Llegando a los siguientes resultados; la diversidad genética en todo su rango de distribución resultó  $\pi = 0,0177$  con margen de error de  $\pm 0,0015$ , un  $Hd = 0,890$  con margen de corrección de  $\pm 0,016$ , encontrando un total de 87 haplotipos, asimismo menciona la existencia de dos acervos genéticos, una de ellas corresponde al corredor biológico Vilcabamba – Amboró, mientras para el acervo presente en el sur encontró los siguientes datos:  $\pi = 0,0118 \pm 0,0020$ , un  $Hd = 0,935 \pm 0,036$ ; también menciona en sus resultados que los dos acervos están en expansión poblacional a partir del pleistoceno tardío.

**CUEVA, et. al. (2018).** En su estudio evaluó el estado genético del oso andino del Distrito Metropolitano de Quito - Ecuador, utilizando como “marcador molecular” el gen de la región D-loop del ADNmt. Trabajó con 38 muestras, Obteniendo los siguientes resultados: los niveles de diversidad genética fueron bajos ( $\pi = 0,00197 \pm 0,00156$ ), diversidad haplotípica fue de ( $H = 0,705 \pm 0,037$ ) Los análisis filogenéticos sugieren que estos haplotipos se agrupan en un solo grupo monofilético. En total encontró 4 haplotipos.

**MORETA, E. (2020).** En su investigación realizó el análisis de la diversidad genética del oso andino de 27 muestras provenientes de la sierra sur de Ecuador, para ello utilizó como “marcador molecular” el ADNmt la región D-loop, obteniendo el valor de diversidad genética ( $\pi = 0,00691$ ) y diversidad Haplotípica de ( $Hd = 0,526 \pm 0,00804$ ), asimismo, reportó la presencia de 3 haplotipos para el área de estudio y uno de ellos es nuevo, como también menciona la existencia de dos acervos en Ecuador.

**RUIZ-GARCÍA et al., (2020).** Realizaron su estudio en 6 genes mitocondriales una de ellos fue la región D-loop, con el objetivo de determinar los niveles de diversidad genética de los osos del Ecuador, el tamaño muestral fue de “108” individuos distintos, encontrando los siguientes resultados: la diversidad nucleotídica resultó ( $\pi = 0,0104$  con un margen de error  $\pm 0,0013$ ) y una diversidad Haplotípica de ( $Hd = 0,845$  con un margen de error  $\pm 0,033$ ), mientras en valor del test de Tajima fue ( $D = - 2,37$ ), con dichos resultados concluyeron que la población está en crecimiento, además realizaron comparaciones entre las poblaciones de muestreo los valores de  $\pi$  los cuales resultaron significativas y fueron mayores para las poblaciones presentes al sur de Ecuador, finalmente indican que la expansión habría empezado en el pleistoceno tardío aproximadamente 30 a 20 mil años.

**VALLEJO, D. (2021).** En su trabajo de tesis titulado "Estudio preliminar de la diversidad de haplotipos del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en la provincia de Zamora-Chinchipe mediante el análisis de la región D-Loop mitocondrial", se estudiaron 12 individuos de oso andino provenientes de dicha provincia. Durante el estudio, se identificaron dos nuevos haplotipos, HTOZ1 y HTOZ2, específicamente para esta región. Los resultados revelaron índices de diversidad  $Hd = 0,530$  y  $\pi = 0,00115$ , indicativos de una baja diversidad genética. Además, se observó un valor positivo en el índice de Test de neutralidad, lo que sugiere una posible reducción poblacional en esta especie.

## **1.2 ANTECEDENTES NACIONALES Y LOCALES**

Las investigaciones en el oso andino a nivel molecular en otros países están bastante avanzadas, mientras en las áreas naturales protegidas del Perú falta realizar una investigación más exhaustiva, las ANPs como el Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu no cuentan con información previa sobre diversidad genética, (SERNANP et al., 2014), por esta razón para poder contribuir al Plan Nacional de conservación del oso andino en Perú, de acuerdo a la línea de acción N.º 1 Investigación in Situ, del ítem 1.1.5. tiene planificado Caracterizar genéticamente a la especie y determinar la viabilidad de las poblaciones (SERFOR, 2016), por ende, esta investigación es primigenia, teniendo como objetivo determinar los índices de diversidad genética de las poblaciones de oso andino del Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu, Cusco, a través del análisis del gen de la región D-loop de ADNmt.

## CAPÍTULO II

### MARCO CONCEPTUAL

## 2 GENERALIDADES

### 2.1 HISTORIA NATURAL DEL OSO ANDINO

El oso andino (*Tremarctos ornatus*), es parte importante de la cosmovisión tanto andina como amazónica (Chaucca, 2018). Se les considera mediadores entre el mundo de los vivos y los muertos, los indígenas Matsigenkas lo consideran como creador de la vida, es el único oso que habita en Sudamérica y es endémico de los Andes tropicales, son tanto terrestres como arbóreos, de dieta omnívoro, aunque la carne representa una pequeña parte de su dieta, son muy buenos nadadores y trepadores, construyen plataformas encima de los árboles donde toman siestas y llevan su comida para digerir (Figueroa, 2013). Son solitarios, pero parecen dejar mensajes con sus feromonas en los árboles para otros individuos como señal, no hibernan, se encuentran distribuidos a lo largo de Sudamérica desde el sur de Panamá hasta el norte de Argentina, abarcan altitudes desde los 250 msnm hasta los 4750 msnm (Peyton, 1999).

Presentan dimorfismo sexual, los machos pueden llegar a medir de 1,5 a 2 metros (erguidos sobre sus dos patas traseras) u 80cm sobre sus cuatro patas, llegando a pesar entre 145 a 170 kg, mientras las hembras pueden llegar a medir de 1,4 a 1,6 m, su peso oscila entre 60 a 100 kg (SERFOR, 2019). Presentan un pelaje largo y espeso, de color negro uniforme, con manchas amarillentas en el rostro y pecho que varían en cada individuo (Rojas-Verapinto et al., 2019). Pueden llegar a vivir más de 36 años en cautividad, presentan el olfato bien desarrollado, son animales diurnos, generalmente solitarios, aunque, en ocasiones se les observó consumiendo en los maizales en grupos de hasta 10 individuos (Figueroa & Stuchi, 2012).

Presentan un número cromosómico de  $2n = 52$  cromosomas, mientras en los demás úrsidos actuales presentan 74 cromosomas (Soibelzon, 2002). Alcanzan la madurez sexual en los machos entre los 4 a 8 años, mientras las hembras entre los 4 a 7 años, su periodo de gestación demora 160 a 250 días debido a que son animales de implantación tardía (Soibelzon, 2002).

### **2.1.1 FILOGENIA DE LOS ÚRSIDOS**

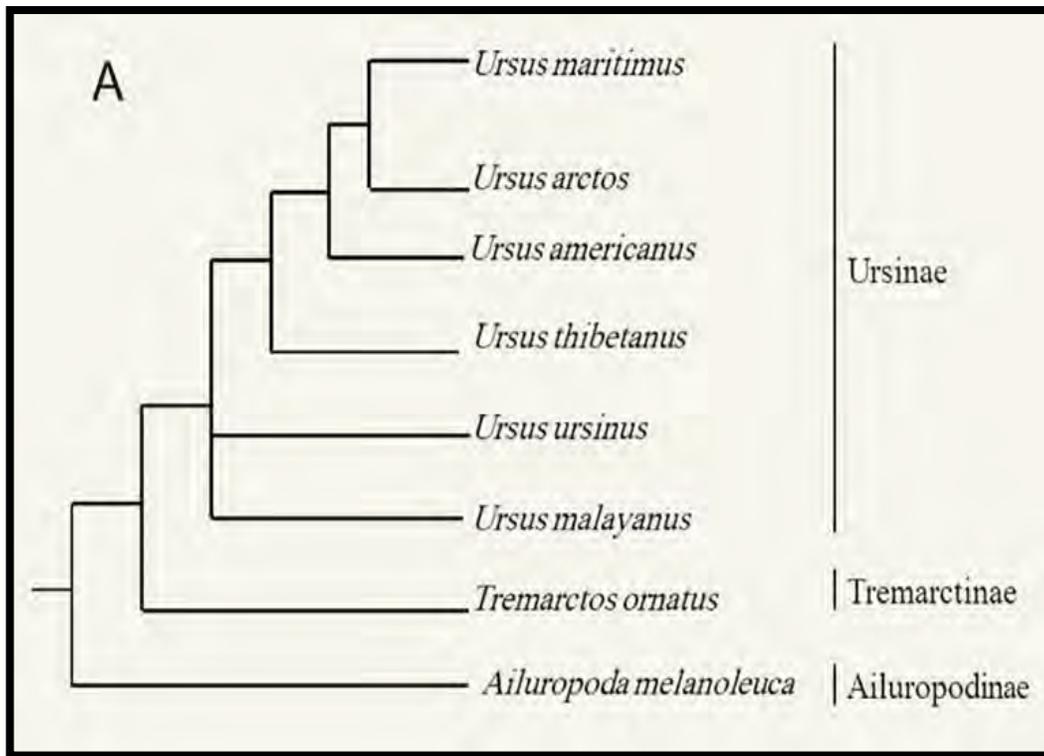
La separación del ancestro de los osos en las ocho especies que existen en la actualidad ocurrió a lo largo de 20 millones de años debido a factores naturales de fragmentación y aislamiento. Sin embargo, desde mediados del siglo XX, las actividades antropogénicas han acelerado dramáticamente el proceso de fragmentación de algunas poblaciones de osos modernos, haciéndolas más vulnerables a factores demográficos y estocásticos ambientales, así como factores genéticos, como la deriva génica y la endogamia, incrementando su riesgo de extinción (Juárez-Casillas & Cora, 2011).

Los osos son especialmente vulnerables a cambios en su hábitat y de sus fuentes de alimento, por lo tanto, son importantes indicadores de la calidad del ambiente y la salud del ecosistema donde viven. Sin embargo, para planear programas de conservación es necesario, entre otras cosas, conocer cuál es la situación actual de la especie respecto a su diversidad genética (Juárez-Casillas & Cora, 2011).

El linaje más antiguo es el panda gigante, seguido por el grupo que originó al oso de anteojos y, por último, aparece una divergencia politípica que culminó con la aparición de los miembros de la subfamilia Ursinae (Juárez-Casillas & Cora, 2011).

## Figura 1

*Filogenia de los osos existentes en la actualidad*

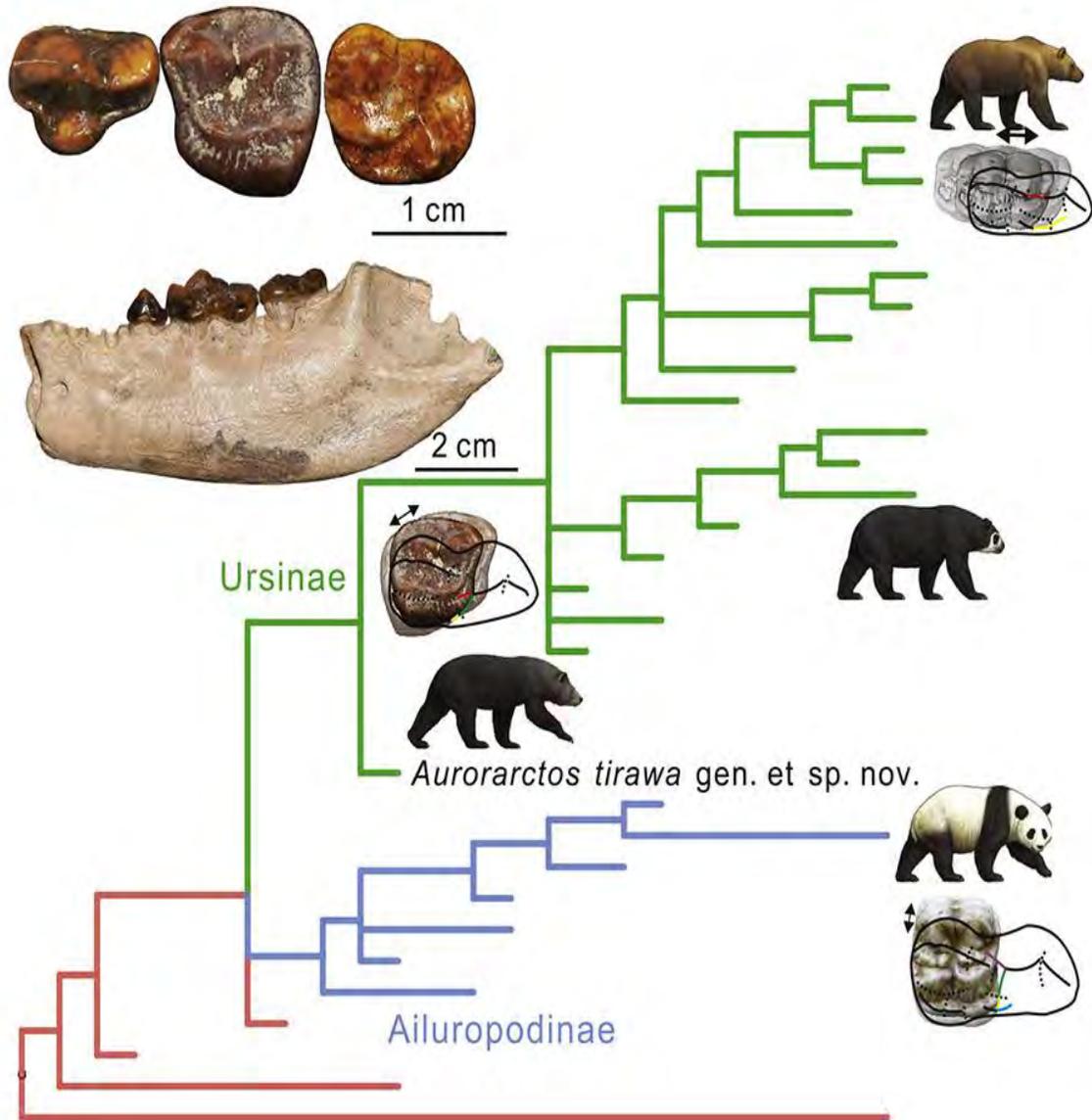


*Imagen obtenida de (Juárez-Casillas & Cora, 2011).*

Los investigadores (Jiangzuo & Flynn, 2020), realizaron un estudio de filogenia de todos los osos vivos y con ello demostraron que la filogenia de los osos va modificándose cada vez que aparecen nuevos géneros y familias intermedias que dieron origen a los osos actuales que conocemos, una de esas especies intermedias encontradas en la investigación de (Jiangzuo & Flynn, 2020) es *Aurorarctos tirawa*, de dieta herbívora – omnívora. Esto sugiere que el origen de una dieta herbívora-omnívora en los osos actuales evolucionó a través de una etapa de transición, ejemplificada por *Ballusia*, de una dieta insectívora-omnívora, y que la especialización herbívora-omnívora de los ursinos ya había sido adquirida por la aparición de los primeros representantes de Ursinae, *Aurorarctos tirawa*.

**Figura 2**

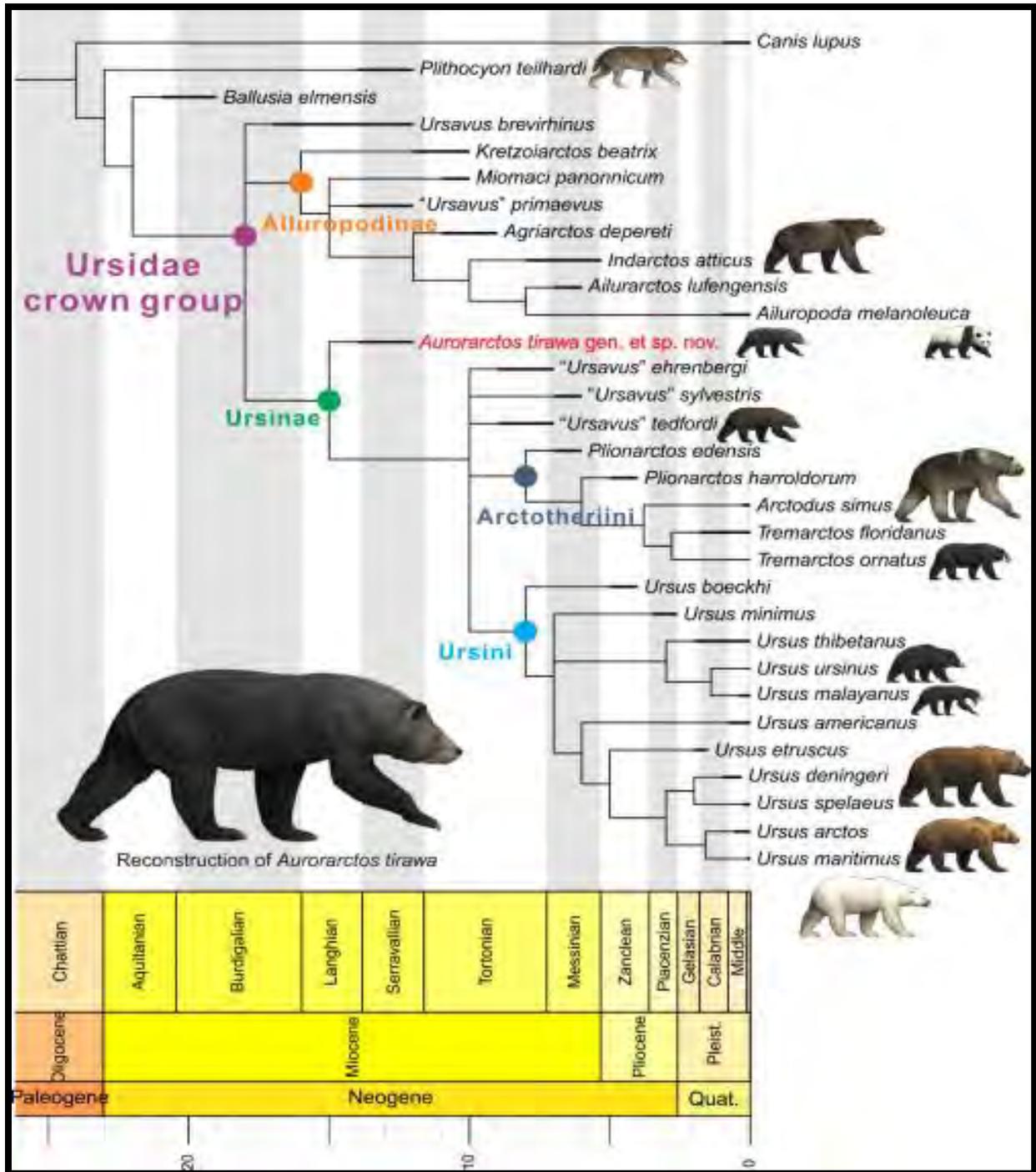
*Árbol de filogenia con especies intermedias*



*Imagen tomada de (Jiangzuo & Flynn, 2020), utilizaron como grupo externo a *Canis lupus*, donde incluyo como principal grupo a Ursinae, dicho estudio realizó a partir de fósiles de cráneo dentales, incluyendo un total de 31 taxones, realizado los análisis demostró que *Aurorarctos tirawa*, es un ancestro común del oso andino actual y los demás úrsidos existentes, debido a que el *Aurorarctos tirawa* resulto tener dieta herbívoro-omnívoro. Para armar el árbol utilizo la inferencia bayesiana.*

**Figura 3**

*Filogenia completa de los osos extintos y existentes*



Es esta figura se muestra la filogenia completa de los osos extintos y los existentes en la actualidad, donde resalta la presencia de *Aurorarctos tirawa*, como especie intermedia entre el oso andino y los osos actuales.

Según (Arnaudo & Rodriguez, 2010) indican que la familia Tremarctinae se originó durante el Mioceno medio en el centro este de América del Norte y arribaron a América del Sur durante el evento biogeográfico conocido como Gran Intercambio Biótico Americano. América del Sur fue invadida al menos dos veces por osos tremarctinos. La primera en el Pleistoceno temprano, cuando se registra por primera vez la presencia de *Arctotherium burmeister* en la región pampeana. La segunda invasión sucedió al menos 6000 años con la entrada de *Tremarctos ornatus* (Cuvier), el único Ursidae que habita América del Sur actualmente. La especie hermana de *T. ornatus*, *T. floridanus* Gidley se registra desde el Plioceno tardío hasta el Pleistoceno terminal en América del Norte y Central. La falta de registro fósil de *T. ornatus* tanto en América del Norte como del Sur podría tener dos explicaciones que no son mutuamente excluyentes: 1) *T. ornatus* se diferenció de su especie hermana, *T. floridanus*, en tiempos post-pleistocénicos. Al respecto se considera que *T. ornatus* pudo haberse diferenciado a partir de un pequeño número de individuos, por efecto fundador, que quedaron aislados de las poblaciones originales de *T. floridanus* que habitaban América Central y que luego hayan colonizado la región andina de América del Sur. 2) La falta de registro fósil en América del Sur (anterior a los 6000 años AP) puede deberse a que los ambientes donde actualmente habita *T. ornatus* no son adecuados para la fosilización.

### **2.1.2 TAXONOMÍA DEL OSO ANDINO**

El oso andino o *Tremarctos ornatus* (Cuvier, 1825), comúnmente conocido como, oso frontino, ucumari o Pablito, es un mamífero de la familia Ursidae. Única especie del género *Tremarctos*. Tiene tamaño mediano en comparación con otros osos, su coloración es uniforme, negra o café negruzco, con pelo áspero (Del Moral & Lameda, 2011). El hocico es corto, de color café claro o blanco, con manchas blanquecinas que se extienden alrededor de los ojos y la nariz a través de las mejillas, bajando por el cuello hasta el pecho y que varía mucho entre individuos (Stucchi & Figueroa, 2013). Posee cinco dedos con garras largas y curvas no retráctiles, y las

plantas de las patas poseen pelos interdigitales que le ayudan a trepar árboles (Judith Figueroa et al., 2016) De hábitos diurnos, solitarios, omnívoros, terrestres y trepadores, su alimentación es predominantemente vegetariana (Quispe-Mamani, 2016), único úrsido autóctono actual de Sudamérica, se distribuye en la cordillera de los Andes.

Dominio: Eucaria  
Reino: animalia  
Filo: Chordata  
Subfilo: Vertebrata  
Clase: Mammalia  
Subclase: Tharia  
Infraclasse: Placentalia  
Superorden: Laurasiatheria  
Orden: Carnívora  
Familia: Ursidae  
Subfamilia: Tremarctinae  
Género: Tremarctos  
Especie: *Tremarctos ornatus*

Taxonomía del oso andino de acuerdo con Cuvier 1825 (NaturalistaCO, 2023).

### 2.1.3 IMPORTANCIA DEL OSO

El oso andino conocido también como ukuku, isnachi, ukumari, Pablito (Chaucca, 2018; J. Figueroa, 2013; Rojas-Verapinto et al., 2019), viene siendo amenazado por diversas actividades antrópicas, entre ellas el conflicto oso-humano (Rojas-Verapinto et al., 2019), la casería ilegal, (J. Figueroa, 2014) apertura de nuevas fronteras agrícolas, proyectos de gran envergadura las que van disminuyendo el hábitat natural de dicha especie (Judith Figueroa et al., 2016, p. 1).

El oso andino en Perú tiene una importancia trascendental, desde épocas del imperio inca hasta estos días, tal es así, que en tiempos incaicos se realizaba la festividad del chaqo, “captura del oso andino”,(J. Figueroa, 2013) en la actualidad se realizan festividades en diferentes localidades y una de las más conocidas es la peregrinación hacia el Santuario de Qoyllurit'i, de las

diferentes naciones (provincias), acuden al paraje del Sinaq'ara vestidos de pablitos o ukukus para rendir culto y pleitesía al señor de Qoyllurit'i (Chauca, 2018).

*“En la cultura inca el oso andino fue ampliamente conocido por los pobladores del Tahuantinsuyo – debido a la gran amplitud de su territorio, a la ubicación de sus principales ciudades en la sierra y bosques de neblina y al eficiente método de cacería (chaco), que permitía obtener osos para su mantenimiento en cautiverio (Cieza de León 1880[1553 ]: 58; Murua 2001 [1616]: Libro I capítulo XLIII; Garcilaso de la Vega 1609: 5-capítulo VII, Libro 5 capítulo X; Cobo 1892 [1653]: 143 )” (J. Figueroa, 2013, p. 50).*

El oso andino por su amplio rango de distribución altitudinal es considerado un buen dispersor de semillas, por ello, se le atribuye un rol importante en la recuperación y regeneración de los bosques, sumado a su aspecto carismático y al peligro que afrontan sus poblaciones ubicándola dentro de la categoría de Vulnerable (IUCN, 2024), esta especie tiene las características de “especie sombrilla” (Vela-Vargas et al., 2011).

#### **Figura 4**

*Oso andino en la cultura andina y su expresión en danzas*



*La imagen representa la importancia y la consideración que se tiene en la actualidad al oso andino en la cosmovisión andina, representa al oso raptor, dicha estatua se encuentra en la plazoleta Kukuli de la Provincia de Paucartambo – Cusco – Perú. Fotografía propia.*

#### 2.1.4 DISTRIBUCIÓN

El oso andino o ukuku (*Tremarctos ornatus*) es la única especie representante actual de la subfamilia Tremarctinae, habitante del bosque neotropical, con un amplio rango de distribución espacial y altitudinal en las tres cadenas de la cordillera de los andes occidental, central y oriental (SERFOR, 2019), que abarca desde los 250 hasta los 4750 msnm (Peyton, 1999; Figueroa 2012a), se encuentra distribuido desde el norte de Argentina, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela y sur de Panamá (Del Moral & Lamedá, 2011).

En el Perú, esta especie ocupa una gran variedad de ecosistemas desde los bosques secos, bosques montanos húmedos, bosques súper húmedos, estepas, páramos y puna (SERFOR, 2016). No obstante, el oso andino prefiere bosques húmedos entre los 1900 a 2350 m (Bosque Nublado) por la abundancia de alimento que proporciona, también porque utiliza como zonas de refugio (Figueroa, 2012). En época de estiaje se desplaza desde el bosque nublado hacia la puna en busca de alimentos entre los que destaca las bromelias y las ericáceas (Judith Figueroa, 2012; Quispe-Mamani, 2016), cabe mencionar que la mayor parte del área de distribución conocida del oso andino casi el 70% se encuentra entre Perú y Bolivia (Wallace et al., 2008), aun así, su tamaño poblacional tiene una tendencia decreciente por la casería ilegal, conflicto oso – humano, disminución de espacios geográficos donde el oso andino se desplazaba y alimentaba (SERFOR, 2019).

Los bosques más importantes para el oso andino, en tamaño y variedad de recursos, estaría dentro de Santuario Nacional de Megantoni, Parque Nacional del Manu, RC Amarakaeri y Japu–Ukumari Llaqta, por tener mayor intervalo altitudinal y áreas en buen estado de conservación (Judith Figueroa & Stucchi, 2013) y finalmente con la creación de la ACR Q`eros Kosñipata

mediante Decreto Supremo N° 015-2021-MINAM favorecerá la conectividad entre áreas naturales protegidas.

En el Santuario Histórico de Machupicchu, el 95% de su territorio está ocupado por el oso andino (Museum et al., 2004; SERNANP et al., 2014). Estos resultados señalan que esta ANP es más que un corredor: es un área que aporta una importante extensión de territorio para el oso andino como especie, en conjunto con su Zona de Amortiguamiento y el Área de Conservación Regional de Choquequirao (Huaypar Loayza, 2018; Rojas-Verapinto et al., 2019).

Castellanos en el 2011, en su investigación realizada en Ecuador encontró que los machos presentan un área de vida anual de 59 km<sup>2</sup>, esto da a entender que se desplazan por grandes áreas, y las hembras de 15 km<sup>2</sup>, (Castellanos & et al., 2011) a partir de esta información se puede predecir que a pesar de la fragmentación de hábitat que existe, el oso es capaz de desplazarse grandes distancias para alimentarse, reproducirse, por ende ocurren las migraciones de un sitio a otro, haciendo que existencia la conectividad entre distintos ecosistemas.

### **2.1.5 TAMAÑO POBLACIONAL**

Según estudios realizados por Peyton en 1999, se calcula que existen en libertad alrededor de 18,250 ejemplares en el rango de distribución del oso andino en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Sur de Panamá y norte de Argentina (SERFOR, 2016, 2019).

En el Perú, la población de oso andino estimada es alrededor de 5,750 individuos (Peyton, 1999; SERFOR, 2019), constituyéndose como el país que probablemente ostente la mayor cantidad de osos a nivel de Sudamérica.

El estudio de Peyton (1999) identifica 9 núcleos poblacionales en la cordillera occidental, 5 núcleos en la cordillera central y 6 núcleos en la cordillera oriental. En los últimos 30 años, se

ha producido una importante disminución del hábitat natural de la especie, por lo que algunos de estos núcleos han sido fragmentados (SERFOR, 2016), por ende la población de osos tiene una tendencia decreciente debido a la casería ilegal, conflicto oso – humano, pérdida de ejemplares portadores de nuevos haplotipos y otros.

Las principales amenazas para el oso andino en el SHM son el tamaño reducido del área, el posible aislamiento del SHM en relación a otras áreas silvestres, la fragmentación de los tipos de hábitat usados por la especie dentro del SHM y la frágil conexión del santuario con las áreas silvestres contiguas debido al avance de la intervención humana y el subsecuente cambio de uso de la tierra (SERNANP et al., 2014). Desde la creación de la ACR Choquequirao este corredor biológico es considerada como zona de refrescamiento genético, permitiendo así, que muchas especies puedan tener flujo genético, especialmente el oso andino, de esta manera se está asegurando la continuidad de los procesos ecológicos con otras áreas naturales protegidas cercanas como el Santuario Histórico de Machupicchu, Santuario Nacional de Ampay y Parque Nacional del Manu (Judith Figueroa et al., 2016; SERFOR, 2019). Los resultados se verán en un mediano a largo plazo, al incrementar la población del oso andino, de esta manera tener poblaciones viables y ecológicamente funcionales. Actualmente no se cuenta con la metodología apropiada para saber cuántos osos hay en Machupicchu (SERNANP et al., 2014). En este caso, queda claro que se desconoce el tamaño de la población actual y no se cuenta con las herramientas necesarias para realizar un análisis poblacional (SERFOR, 2019). Sin embargo, y dado que no se tiene por el momento una alternativa viable, se puede asumir que, de no existir mortalidad inducida por humanos, el tamaño de la población de osos en el Complejo Natural Cultural Machupicchu-Choquequirao será el adecuado o se incrementará (SERNANP et al., 2014).

## Figura 5

*Imagen del oso andino*



*Oso andino mostrando sus características y descansando al lado de bromelias, la imagen fue tomada por un guardaparque (SERNANP Machupicchu, 2024).*

### 2.1.6 ESTADO DE CONSERVACIÓN

En el Perú, de acuerdo con lo dispuesto en el Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI, que aprueba la Lista de clasificación y categorización de las especies amenazadas de fauna silvestre del Perú, la especie *Tremarctos ornatus* es una especie categorizada como “Vulnerable” (VU), por lo que se prohíbe su caza, captura, tenencia, transporte o exportación con fines comerciales (SERNANP et al., 2014). En el ámbito internacional esta especie se encuentra incluido dentro del apéndice I de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres del 2004), es considerado por la IUCN como una especie vulnerable y

por el DS N° 034-2004-AG del Perú, como una especie en peligro (Minagri, 2004). Este Apéndice incluye las especies sobre las que se cierne el mayor grado de peligro de extinción debido al comercio internacional, así mismo se encuentra en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), por sus siglas en inglés, considera al oso andino en la categoría de Vulnerable (SERNANP et al., 2014).

Dentro del Santuario Histórico de Machupicchu desde la creación del ACR Choquequirao el hábitat del oso andino aumentó considerablemente, esto favorece en la conservación de la especie (SERNANP et al., 2014), mientras que dentro del Parque Nacional del Manu, hay pocas investigaciones realizadas para conocer el tamaño poblacional por ser una ANP muy extensa.

### **Figura 6**

*Presencia del oso andino dentro del SHM*



*Al ser el oso andino muy esquivo a los turistas que visitan el ANP, los lugareños tuvieron una idea de representarlo mediante una estatua como símbolo de presencia del oso andino, la estatua se encuentra entre Hidroeléctrica – Aguas Calientes.*

## 2.2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

El ácido desoxirribonucleico conocido por las siglas ADN es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus; también es responsable de la transmisión hereditaria. La función principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información para construir otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de ARN (Watson, 2007). Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, pero las otras secuencias de ADN tienen propósitos estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética (Watson et al., 2000).

Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Cada nucleótido, a su tiempo, está formado por un glúcido (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina A, timina T, citosina C o guanina G) y un grupo fosfato, derivado del ácido fosfórico (Illana, 2014). Lo que distingue a un polinucleótido de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando solo la secuencia de sus bases (Watson, 2007). La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética, siguiendo el criterio de complementariedad: A-T y G-C (Strathern, 2017). Esto se debe a que la adenina y la guanina son de mayor tamaño que la timina y la citosina, por lo que este criterio permite cumplir una uniformidad (Illana, 2014). En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas conexiones denominadas puentes de hidrógeno (Watson, 2007).

Para que la información que contiene el ADN pueda ser utilizada por la maquinaria celular deben copiarse los nucleótidos de manera complementaria, más cortos y con unas unidades

diferentes, llamados ARN (Watson, 2007). Las moléculas de ARN se copian exactamente del ADN mediante un proceso denominado transcripción (Illana, 2014). Una vez procesadas en el núcleo celular, las moléculas de ARN pueden salir al citoplasma para su utilización posterior (Illana, 2014; Watson, 2007; Watson et al., 2000). La información contenida en el ARN se interpreta usando el código genético, que especifica la secuencia de los aminoácidos de las proteínas, según una correspondencia de un triplete de nucleótidos (codón) para cada aminoácido (Watson et al., 2000).

La mayor parte del ADN se encuentra en el núcleo celular (ADN nuclear), pero también se puede encontrar una pequeña cantidad de ADN en las mitocondrias (ADN mitocondrial o ADNmt) (Illana, 2014). Las mitocondrias son organelos que se encuentran en el citoplasma dentro de las células (Strathern, 2017).

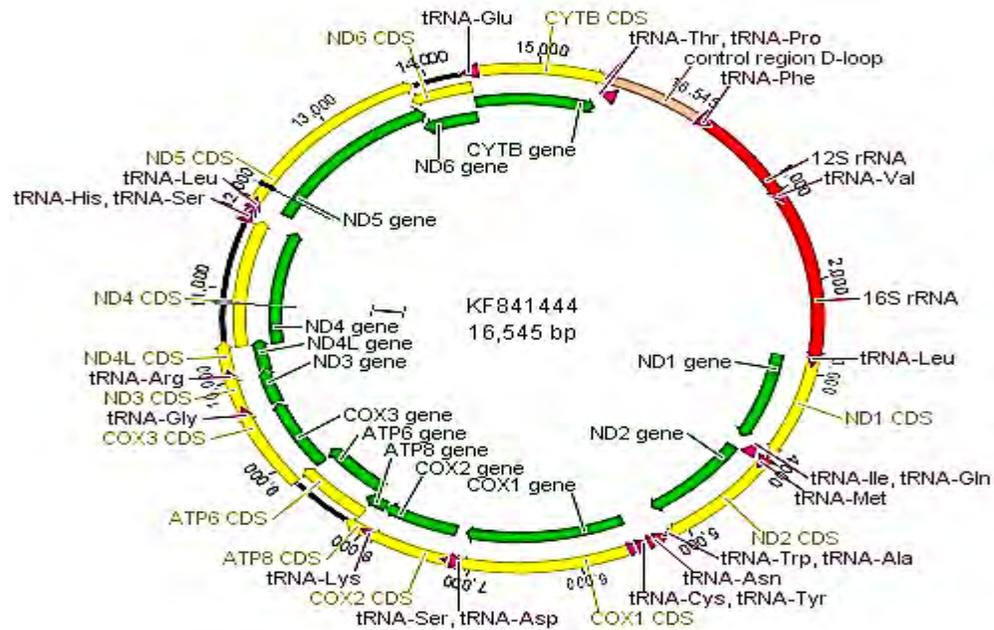
### **2.2.1 ADN mt**

Las mitocondrias son organelos celulares ubicados en el citoplasma e intervienen fundamentalmente en los procesos de generación de energía, la respiración celular (Salazar et al., 2019). Cuenta con su propio material genético y representa una molécula de ADN circular bicatenario y se presenta en múltiples copias (>1000) en una misma célula. Más del 93% del ADN mitocondrial es codificante (frente a tan sólo el 1,5% del ADN nuclear) y sus 37 genes, varios de ellos superpuestos sobre la misma secuencia, no tienen intrones (Scotto & Valdivia, 2000). Sólo tiene 16,500 pares de bases aproximadamente (De Oliviera et al., 2013). Y codifica diferentes proteínas que son específicas de la mitocondria (Scotto & Valdivia, 2000). Algunas de las enzimas de esas vías, y algunas de las proteínas que son necesarias para el funcionamiento de dichas vías, son codificadas por el ADN mitocondrial. Uno de los aspectos más relevantes de las mitocondrias es que sólo proceden de la madre, ya que el espermatozoide sólo aporta el núcleo al nuevo

organismo recién constituido (Fresia et al., 2007). Por lo tanto, el material genético mitocondrial de cualquier individuo se hereda exclusivamente por vía materna (Scotto & Valdivia, 2000). Se han descrito múltiples marcadores de este tipo localizados en las regiones codificantes del ADN mitocondrial. Su interés radica en que es utilizado como marcador molecular en diversas investigaciones de filogenia así como también para determinar el flujo genético, debido a la forma de transmisión de la información genética mitocondrial que permiten establecer relaciones de maternidad entre individuos de la misma especie, incluso cuando el material genético disponible no está bien conservado (Illana, 2014). Dentro del genoma mitocondrial se encuentra la región control o D-loop en la que existen 2 zonas, denominadas “regiones hipervariables” (HSV1 y HSV2), en donde se acumulan de forma preferente los polimorfismos. Las secuencias de la región control pueden ser analizadas fácilmente y utilizarse para comparar las muestras de diferentes individuos (Scotto & Valdivia, 2000). La principal utilidad en el campo de la investigación es su uso como marcador molecular y en el ámbito forense en el esclarecimiento de relaciones de parentesco por vía materna. El análisis de la secuencia genómica se usa para estudiar las relaciones filogenéticas, en muchos organismos. Por este motivo se utiliza para determinar variabilidad en poblaciones naturales (para ver si hay o no endogamia), información útil para la conservación de especies en peligro de extinción (De Oliviera et al., 2013).

**Figura 7**

*Mapa genético del ADNmt*



(Researchgate, 2023): *Diagrama del mtDNA. Se representan la posición de los 37 genes, la región de control (D-Loop) y los orígenes de replicación de las cadenas pesada (OH, PH) y ligera (OL, PL). Genes que han sido reportados con metilación o transcripción diferencial se encuentran subrayados.*

### 2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse, se refiere a la diversidad en las frecuencias de los genes. La variabilidad genética puede referirse a las diferencias entre individuos o las diferencias entre poblaciones debido a que los individuos de una misma especie no son idénticos. Si bien, son reconocibles como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, función y comportamiento, por lo que existirán variaciones dentro de la especie (National Human Genome Research Institute, 2023).

La variabilidad genética se origina por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas) ya que permite la evolución de las especies, debido a que en cada generación solamente una fracción de la población sobrevive y se reproduce transmitiendo características particulares a su progenie, en cambio, los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética especie (National Human Genome Research Institute, 2023).

Los casos más evidentes de variabilidad genética de las especies son las especies domesticadas, en donde los seres humanos utilizamos la variabilidad para crear razas y variedades de maíces, frijoles, manzanas, calabazas, caballos, vacas, borregos, perros y gatos, entre otros. Gran parte de la variación en los individuos proviene de los genes, es decir, es variabilidad genética. Por ejemplo, los jaguares del pantanal en Brasil son casi del doble del tamaño (100 kilos) que los jaguares mexicanos (entre 30 y 50 kilos) y sin embargo son la misma especie *Panthera onca* (Caicedo et al., 2019).

## **2.4 DIVERSIDAD GENÉTICA**

La diversidad genética se refiere a la variación hereditaria (variaciones heredables) que existe entre los individuos de una población y entre poblaciones de una determinada especie o grupo de especies (National Human Genome Research Institute, 2023).

La diversidad genética contribuye a la capacidad de las comunidades ecológicas para resistir o recuperarse de los disturbios y cambios ambientales, asimismo, adaptarse o no a las condiciones y cambios de su entorno (Ruiz-garcía et al., 2020). Puede ser que las mutaciones les confieran ciertas ventajas evolutivas o también puede llevarlos a la extinción, debido a que son heredados de generación a generación (Salazar et al., 2019).

La diversidad genética es el resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones (alelos) de las unidades de herencia (genes) de los individuos de una especie (Salazar et al., 2019). Las diferencias heredables constituyen la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldean la variada complejidad de los seres vivos. El resto de la diversidad genética deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones (Cabrero & Camacho, 2003). Debido a lo anterior es importantes conservar la diversidad genética para el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies, dicha diversidad representa el reservorio de las posibles respuestas al medio (físico y biológico), posibilitando con ello su adaptación a los cambios del mismo (Cristina et al., 2008).

## 2.5 DIVERSIDAD NUCLEOTIDICA

La diversidad de nucleótidos es un concepto en genética molecular que se usa para medir el grado de polimorfismo dentro de una población. Una medida comúnmente utilizada de la diversidad de nucleótidos fue introducida por primera vez por Nei y Li en 1979. Esta medida se define como el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN en todos los pares posibles en la población de muestra y se denota con  $\pi$  (Nei & Li, 1979).

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} = 2 * \sum_{i=2}^n \sum_{j=1}^{i-1} x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde  $x_i$  y  $x_j$  son las frecuencias respectivas de las secuencias  $i$  y  $j$ ,  $\pi_{ij}$  es el número de diferencias de nucleótidos por sitio de nucleótidos entre las secuencias  $i$  y  $j$ ,  $n$  es el número de secuencias en la muestra (Nei & Li, 1979).

La diversidad de nucleótidos es una medida de la variación genética. Suele asociarse con otras medidas estadísticas de la diversidad de la población y es similar a la heterocigosidad esperada. Esta estadística puede usarse para monitorear la diversidad dentro o entre poblaciones, para examinar la variación genética en especies relacionadas, o para determinar relaciones evolutivas. La diversidad de nucleótidos puede calcularse examinando las secuencias de ADN directamente, o puede estimarse a partir de datos de marcadores moleculares, como datos de ADN polimórfico amplificado aleatorio, ADN mitocondrial regiones conservadas y datos de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (Nei & Li, 1979).

## **2.6 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA**

Un haplotipo es una agrupación física de variantes genómicas (o polimorfismos) que tienden a heredarse juntas (Miranda et al., 2000). Un haplotipo específico generalmente refleja una combinación única de variantes que residen cerca unas de otras en un cromosoma (National Human Genome Research Institute, 2023).

Los valores que puede tomar el índice de diversidad haplotípica son de: 0 a 1, en donde 0 refleja la nula existencia de alelos raros, mientras 1 refleja que existen muchos alelos raros, por ende, un crecimiento de la población (Arias Vásquez, 2017).

La diversidad haplotípica es también conocida como frecuencia alélica se refiere a qué tan a menudo aparece un alelo particular en una población (Miranda et al., 2000). Por ejemplo, si todos los alelos de una población de plantas de chícharo son morados,  $W$ , la frecuencia alélica de  $W$  sería del 100%, o 1. Sin embargo, si la mitad de los alelos fueran  $W$  y la otra mitad  $w$ , cada alelo tendría una frecuencia alélica del 50% o 0,5. La frecuencia alélica se refiere a qué tan común es un alelo en una población (Arano, 2022). Esto se determina contando cuántas veces aparece un alelo en la

población y dividiendo esta cifra entre el número total de copias del gen (Biodiversidad Mexicana, 2023).

$$\text{frecuencia del alelo } A = \frac{\text{número de copias del alelo } A \text{ en la población}}{\text{número total de copias del gen en la población}}$$

## 2.7 TEST DE NEUTRALIDAD

La D de Tajima es una estadística de prueba genética poblacional creado por el investigador japonés Fumio Tajima y que lleva su nombre. La D de Tajima se calcula como la diferencia entre dos medidas de diversidad genética: el número medio de diferencias por pares y el número de sitios segregantes, cada uno de ellos escalado de manera que se espera que sean iguales en una población de tamaño constante en evolución neutral (Tajima, 1989).

El propósito de la prueba D de Tajima es distinguir entre una secuencia de ADN que evoluciona aleatoriamente ("neutralmente") y una que evoluciona bajo un proceso no aleatorio, incluida la selección direccional o la selección de equilibrio, la expansión o contracción demográfica. Una secuencia de ADN que evoluciona aleatoriamente contiene mutaciones que no afectan la aptitud y la supervivencia de un organismo. Las mutaciones que evolucionan aleatoriamente se denominan "neutrales", mientras que las mutaciones bajo selección son "no neutrales" (Fu & Li, 1993).

La fuerza de la deriva genética depende del tamaño de la población. Si una población tiene un tamaño constante con una tasa de mutación constante, la población alcanzará un equilibrio de frecuencias genéticas. Este equilibrio tiene propiedades importantes, incluido el número de sitios segregantes y el número de diferencias de nucleótidos entre los pares muestreados (se denominan diferencias por pares). Para estandarizar las diferencias por pares, se utiliza la media

o el número "promedio" de diferencias por pares. Esto es simplemente la suma de las diferencias por pares dividida por el número de pares y, a menudo, se simboliza por  $\pi$  (Elgvin et al., 2017).

El test de Tajima sirve para identificar secuencias que no se ajustan al modelo de la teoría neutral en el equilibrio entre mutación y deriva genética . Para realizar la prueba en una secuencia de ADN o gen, es necesario secuenciar ADN homólogo de al menos 3 individuos. La estadística de Tajima calcula una medida estandarizada del número total de sitios segregantes (estos son sitios de ADN que son polimórficos ) en el ADN muestreado y el número promedio de mutaciones entre pares en la muestra (Tajima, 1989).

Una D de Tajima negativa significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación con lo esperado, lo que indica una expansión del tamaño de la población (por ejemplo, después de un cuello de botella o un barrido selectivo). Una D de Tajima positiva significa niveles bajos de polimorfismos de baja y alta frecuencia, lo que indica una disminución en el tamaño de la población y/o una selección equilibrada. Sin embargo, es imposible calcular un "valor p" convencional asociado con cualquier valor D de Tajima que se obtenga de una muestra (Tajima, 1989).

## **2.8 ESTRUCTURA POBLACIONAL**

Se entiende por estructura genética de una especie a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie. La estructura genética de una población concreta viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre los 5 factores que condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección natural (National Human Genome Research Institute, 2023).

Casi todas las especies comprenden una o más poblaciones de individuos que se cruzan entre sí, formando una comunidad de intercambio genético denominada población mendeliana. Esta población es el sustrato básico donde se forja la evolución (Gutierrez, 2004). En el seno de la población se da el hecho inevitable de que algunos individuos dejan más descendientes que otros. Como que el único componente que se transmite de generación en generación es el material genético (los genes), el que un individuo deje más descendientes implica que sus variantes génicas (alelos) estarán más representadas en la siguiente generación (Ruiz-García, 2007). Por tanto, desde el punto de vista de la población, la evolución es en último término un cambio acumulativo e irreversible de las proporciones de las diferentes variantes de los genes en las poblaciones (Biodiversidad Mexicana, 2023).

### **2.8.1 Las Mutaciones**

La mutación es la fuente fundamental de variación genética ya que conduce a cambios directos en la secuencia de ADN (Fontdevila & Moya, 1999; Paz & López, 2014; Rodriguez et al., 2016) y a la creación de nuevos alelos en las poblaciones (Lardoeyt, 2016; Mantella & Hohl, 2021; Wiley, 2016). Las poblaciones con más alelos raros tienen mayor diversidad génica (Ruiz-garcía et al., 2020), por tanto, mayores posibilidades de crear nuevas especies. Las tasas de mutación son normalmente bajas, ocurren en largos periodos de tiempo (National Human Genome Research Institute, 2023).

Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de estas variantes suelen ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie (Paz & López, 2014). La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética (Instituto Nacional del Cancer, 2023). Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio

ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al reto ambiental (Lardoeyt, 2016; Lessa, 2005; Mantella & Hohl, 2021; Wiley, 2016).

La mutación crea nuevas variaciones genéticas en el patrimonio genético, es cómo surgen por primera vez los alelos nuevos (Wiley, 2016). En las especies que se reproducen sexualmente, las mutaciones que importan para la evolución son las que ocurren en los gametos (Lardoeyt, 2016). Solo estas mutaciones se pueden pasar a la descendencia (Fontdevila & Moya, 1999). Para cualquier gen dado, la posibilidad de que ocurra una mutación en un gameto dado es muy baja. Por lo tanto, las mutaciones por sí solas no tienen mucho efecto en las frecuencias alélicas. Sin embargo, las mutaciones proporcionan la variación genética necesaria para que otras fuerzas de la evolución actúen (UNAM, 2023).

Las mutaciones del ADN mitocondrial, también son heredables de las madres a los hijos, la región D-loop es no codificante en la mitocondria (Fernandez, 2005), donde se va acumulando las mutaciones génicas a lo largo del tiempo ya que no se recombina (Silva et al., 2011), lo cual se convierte en una información muy valiosa para estudio de filogenia, flujo genético entre poblaciones, estructura poblacional y estudio de tasa de mutación (Ruiz-García et al., 2020).

Las mutaciones suelen ser de dos tipos: somáticas y germinales (Rodriguez et al., 2016), las que ocurren en la región D-loop del ADN mitocondrial son mutaciones génicas somáticas (Fernandez, 2005). Las mutaciones pueden ser génicas, cromosómicas o genómicas, pudiendo ocurrir de manera espontánea o inducida. Las mutaciones génicas se dan por la sustitución de bases (transiciones o transversiones), inserciones o deleciones de nucleótidos (Fontdevila & Moya, 1999).

### **2.8.2 La deriva genética**

La deriva genética es un mecanismo de evolución caracterizado por fluctuaciones aleatorias en la frecuencia de una versión determinada de un gen (alelo) en una población (Cabrero & Camacho, 2003). La deriva genética, es una fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las frecuencias alélicas de las especies en el tiempo (Ruiz-garcía & Ruiz-garcía, 2007). Es un efecto estocástico que es consecuencia del muestreo aleatorio en la reproducción y de la pérdida de unos alelos por azar y no por selección natural. Se trata de un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra (Ruiz-García, 2007). Normalmente se da una pérdida de los alelos menos frecuentes y una fijación de los más frecuentes, resultando una disminución en la diversidad genética de la población. A partir de un cierto tamaño mínimo de las poblaciones, este efecto deja de tener importancia y se estabilizan las frecuencias génicas, si no hay procesos de selección ni mutaciones, según el equilibrio de Hardy-Weinberg (Cabrero & Camacho, 2003).

Al igual que la selección natural, actúa sobre las poblaciones, alterando la frecuencia de los alelos (frecuencia alélica) y la predominancia de los caracteres sobre los miembros de una población, y cambiando la diversidad genética del grupo (Eguiarte & Souza, 2010). Los efectos de la deriva se acentúan en poblaciones de tamaño pequeño (como puede ocurrir en el efecto de cuello de botella o el efecto fundador), y resultan en cambios que no son necesariamente adaptativos, la deriva hace que dos o más poblaciones de la misma especie tiendan a diferenciarse genéticamente (Loo, 2011).

Debido a que las poblaciones son finitas en número, las frecuencias génicas pueden cambiar por un puro proceso de azar conocido como “deriva genética” (Cabrero & Camacho, 2003). En las poblaciones, cuanto mayor sea el número de individuos que dan origen a la siguiente

generación más cerca estará la frecuencia observada (en la generación descendiente) de la frecuencia esperada (la de la generación parental) (Fontdevila & Moya, 1999). Por el contrario, si para comenzar una nueva generación se eligen tan sólo unos pocos progenitores, esa muestra tan pequeña puede no ser representativa de su generación y, por tanto, las frecuencias alélicas de la generación siguiente pueden desviarse mucho de las de la generación anterior (Wiley, 2016).

### **2.8.3 La migración**

Es el intercambio de genes entre poblaciones se da debido a la migración de los individuos de una población a otra, donde los genes se van recombinando (Loo, 2011). Si dos poblaciones difieren en las frecuencias de los alelos de algunos de sus genes, entonces el intercambio de individuos entre las poblaciones producirá un cambio de las frecuencias de los genes en cada una de las poblaciones (Cabrero & Camacho, 2003).

La migración es una fuerza direccional de cambio de las frecuencias génicas (Cabrero & Camacho, 2003). El proceso de migración consiste en el intercambio de individuos reproductores entre poblaciones distintas que, en principio, tendrán distintas frecuencias génicas (Garrido-Pérez, 2020). El nombre que se da al proceso concreto de intercambio de individuos depende de la población de referencia. Cuando una población pierde individuos, porque pasan a otra población cercana, el proceso se llama emigración y cuando ésta misma población recibe reproductores de alguna población vecina el proceso se llama inmigración (Ruiz-García, 2007).

En términos evolutivos, la migración es importante en la medida en que contribuye al flujo genético, que no es más que el intercambio de información genética (alelos) entre poblaciones (Mantella & Hohl, 2021). Al llegar a una nueva población los organismos migrantes introducen en la misma alelos específicos que hasta entonces sólo estaban

presentes en los miembros de la población de origen, pues las mutaciones de manera aleatoria por las que habían surgido sólo habían tenido lugar en esta última población (Cabrero & Camacho, 2003). Por tanto, tras un proceso de migración los alelos endémicos de una población pueden extenderse en la población de llegada (Lessa, 2005). Desde un punto de vista genético la migración tiende a homogeneizar las distintas poblaciones de una misma especie, ya que disminuye el número de variantes alélicas características de cada una de ellas (Península et al., 2020).

#### **2.8.4 Flujo genético**

Las poblaciones raramente son sistemas cerrados, por lo general, existe cierta cantidad de transferencia de genes, lo cual es más probable cuando las poblaciones se encuentran estrechamente relacionadas espacial y genéticamente (Cabrero & Camacho, 2003). Entre las poblaciones adyacentes de una especie, el flujo de genes puede ser grande, por lo que es de esperar que las poblaciones contiguas posean una composición génica más semejante que las que están más alejadas geográficamente (Garrido-Pérez, 2020). Por ello, la migración entre grupos geográficamente aislados es un suceso de gran importancia porque los complejos génicos de adaptación se rompen, las frecuencias alélicas se alteran, en general, todas las diferencias genéticas entre las poblaciones se reducen (Cabrero & Camacho, 2003). La eficacia del intercambio de genes depende de la estructura de las dos poblaciones (emigrante y receptora) y, más específicamente, de la cantidad de migración (índice de migración) y de la magnitud de la diferencia en frecuencias génicas entre las dos poblaciones (Fontdevila & Moya, 1999).

El flujo génico es el proceso mediante el cual determinados alelos (genes) o individuos (genotipos) son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente (Cristina et al.,

2008). Según este planteamiento, el flujo génico facilita el movimiento de alelos (genes y genotipos) mutantes entre poblaciones separadas, además, puede incrementar sustancialmente la frecuencia génica (Cabrero & Camacho, 2003).

### **2.8.5 Selección Natural**

La selección natural es la fuerza evolutiva por la cual los miembros de una población que poseen adaptaciones más exitosas al ambiente tienen mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse, es uno de los factores de la evolución (Cabrero & Camacho, 2003). Sin embargo, la selección natural es el único proceso conocido que permite explicar la complejidad inherente a la vida, las adaptaciones de los organismos y por eso ocupa una posición central en la biología evolutiva (Fontdevila & Moya, 1999). La selección natural es incluso un principio más fundamental que la misma vida, "la 'supervivencia de los más aptos', la selección natural es la principal fuerza que conduce los cambios de frecuencias de alelos mutantes (Wiley, 2016).

La selección natural no se refiere realmente a la supervivencia sino a la reproducción (Cabrero & Camacho, 2003). Es cierto que un organismo debe sobrevivir por lo menos durante un tiempo para que pueda reproducirse; la única manera en que sus genes continuarán en el futuro es mediante una reproducción exitosa (Lardoeyt, 2016). Cuando muere un organismo que no logra reproducirse, sus genes terminan con él (Cabrero & Camacho, 2003). El organismo que se reproduce, sigue vivo en cierto sentido por medio de los genes que ha pasado a sus descendientes (Garrido-Pérez, 2020). La selección natural es el impacto de cualquier factor del ambiente que tiende a producir un cambio evolutivo a través de un favorecimiento diferencial de la reproducción de ciertos individuos con ciertos genes (García et al., 2007). La selección natural no produce

cambio genético, sino que una vez que el cambio ha ocurrido (por mutación) actúa favoreciendo a unos alelos sobre otros (Cabrero & Camacho, 2003).

El papel de la selección radica en que los distintos individuos de una población difieren en viabilidad y/o fecundidad y, por lo tanto, contribuyen con número diferente de descendientes (y por tanto de genes) a la siguiente generación (Cabrero & Camacho, 2003). La consecuencia primaria de la selección es el cambio de las frecuencias génicas, pudiendo admitirse que en grandes poblaciones la selección es probablemente la fuerza más importante responsable del cambio de las frecuencias génicas (Ruiz-García & Payan, 2003).

## **2.9 ÍNDICE DE FIJACIÓN ( $F_{ST}$ ).**

El índice de fijación ( $F_{ST}$ ) es una medida de la diferenciación de la población debido a la estructura genética. Desarrollado como un caso especial de las estadísticas F de Wright, es una de las estadísticas más utilizadas en genética de poblaciones. La definición de Wright ilustra que  $F_{ST}$  mide la cantidad de variación genética que puede explicarse por la estructura de la población. Esto también puede considerarse como la fracción de la diversidad total que no es consecuencia de la diversidad promedio dentro de las subpoblaciones, donde la diversidad se mide por la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar sean diferentes (Kitada et al., 2007).

Esta comparación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones se usa con frecuencia en genética de poblaciones aplicadas. Los valores van de 0 a 1. Un valor cero implica panmixis completa; es decir, que las dos poblaciones se cruzan libremente. Un valor de 1 implica que toda la variación genética se explica por la estructura de la población y que las dos poblaciones no comparten ninguna diversidad genética. Cuando el  $F_{ST}$  toma valores de 0,01 a 0,05 se considera baja estructuración lo que indica, alto flujo genético, por lo que se considera una sola

población. En cambio, cuando toma valores de 0,05-0,25 se considera moderado flujo genético y una moderada estructuración de la población. Si toma valores de 0,25 a 1 se considera una población estructurada, lo que indica que hay bajos niveles de flujo genético (Holsinger & Weir, 2009).

## **2.10 ESTUDIOS GENÉTICOS APLICADOS AL OSO ANDINO**

En las últimas décadas se han realizado varias investigaciones en genética de poblaciones del oso andino, utilizando marcadores moleculares como son los microsatélites nucleares (Ruiz-García 2003, 2006, 2007, 2013; Ruiz García et al. 2003, 2005, 2020a, 2020b; Viteri y Waits 2009), los cuales se centraron principalmente en los niveles de diversidad genética de las poblaciones de esta especie (Cueva et al., 2018), de igual manera realizaron un análisis de la población para determinar un posible equilibrio de Hardy-Weinberg, la asignación geográfica (Arias Vásquez, 2017) y los posibles tamaños históricos efectivos de la población para el rango general de la especie (Moreta, 2020; Ruiz-garcía et al., 2020).

Por otro lado, surgieron otras investigaciones gracias a los avances moleculares, en la que se están utilizando ADN mitocondrial del oso andino como marcador molecular para realizar estudios de diversidad genética (Arias Vásquez, 2017; Bruque Gutierrez, 2016; Cueva et al., 2018; Moreta, 2020; Ruiz-garcía et al., 2020), en especies en estado vulnerable, obteniendo muestras de manera no invasiva del oso andino para no llevar al estrés al individuo (Molina, 2015).

En la última década la utilización del ADNmt como marcador molecular en estudios aplicados al oso andino tomó mayor relevancia, debido a su efectividad en el estudio de filogeografía (Arias Vásquez, 2017), posible estructuración de las poblaciones del oso andino (Ruiz-garcía et al., 2020), para determinar los diferentes índices de diversidad, como el test de neutralidad,  $F_{st}$ ,  $H_d$ , diversidad nucleotídica (Arias Vásquez, 2017; Bruque Gutierrez, 2016;

Cueva et al., 2018; Moreta, 2020; Ruiz-garcía et al., 2020), a partir de estos índices se han determinado la estructura poblacional, patrones filogeográficos, asimismo, Ruiz-García et al. 2020<sup>a</sup>, analizó 302 especímenes de osos andinos a tres genes mitocondriales (ND5, ARNr de 12 s, y COI) incluyendo especímenes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia y describiendo patrones geográficos a nivel macro geográfico, Más recientemente, Ruiz-García et al. (2020b) llevó a cabo un estudio, utilizando los mismos genes mitocondriales y de microsatélites para describir la estructura genética del oso andino en Colombia, encontrando algunas evidencias de diferencias significativas en la estructura espacial (Ruiz-garcía et al., 2020).

## **2.11 MARCADORES MITOCONDRIALES**

Los avances moleculares han permitido tener herramientas muy eficaces para realizar análisis filogenéticos y filogeográficos, (Ruiz-garcía et al., 2020) una de estas herramientas es el ADN mitocondrial (mtDNA), al ser un marcador molecular comúnmente utilizados para estudios de genética de poblaciones en animales en estado vulnerable y en peligro de extinción (Bruque Gutierrez, 2016; Ruiz-garcía et al., 2020). El ADN mitocondrial es bicatenario, circular, de herencia materna, tiene un alto número de copias por célula (> 1000) por lo que puede ser utilizado en muestras degradadas, lo cual es útil para la reconstrucción de relaciones históricas entre poblaciones a partir de la distribución y frecuencia de haplotipos, no sufre recombinaciones, se pueden obtener de varias fuentes como son dientes, huesos, tejidos, pelos a pesar de que éstos se encuentren contaminados o con una antigüedad considerable, carecen de intrones, más del 93% es codificante en comparación al 1,5% del ADN nuclear (Fernandez, 2005). Dentro del genoma mitocondrial existe una región de control (D-Loop) en el que existen dos zonas denominadas “regiones hipervariables” (región hipervariable I = HPVI y región hipervariable II = HPVII), en donde se acumulan los polimorfismos (Varela et al., 2009). Las mutaciones generadas en esta

región no codificante (D-loop) del mt DNA son neutrales, por lo que son atribuidos a eventos demográficos, debido a la alta tasa de mutación evolucionan rápidamente, por esta razón es la secuencia más estudiada para el análisis de Diversidad Genética (Jimenez & Collada, 2000).

## **2.12 MUESTREO NO INVASIVO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS**

En muchos hábitats la fauna silvestre no puede ser observada fácilmente, pero, todos los animales dejan signos de su presencia y actividad, lo que ha permitido desarrollar técnicas no invasivas de muestreo genético (Huerta & Centeno-Cuadros, 2021), mediante esta técnica, los pelos, plumas, heces, orina, cáscaras de huevo, escamas, tejido blando y duro de animales dejados por ellos y/o hasta especímenes de museo y fósiles, son potenciales fuentes de ADN tanto nuclear como mitocondrial (Nardelli et al., 2011).

La obtención de datos genéticos convencionales suele ser costosa, en cambio el muestreo no invasivo se convierte en él más eficaz debido a que no se necesita capturar al animal lo que le llevaría al estrés a los animales en estudio, es por ello que esta técnica se convierte en una (Gonzalez & Arenas-castro, 2017) alternativa aceptable para la realización de estudios genéticos en animales en peligro de extinción (Nardelli et al., 2011; Waits, Sullivan, Brien, et al., 1999) para poder identificar individuos, realizar análisis de parentesco, variabilidad genética, análisis filogeográfico en numerosas especies, establecer relaciones de paternidad (Cristina et al., 2008), para estimar el tamaño poblacional, el rango de hábitat de los individuos y para la determinación del sexo (MINAM, 2015).

La utilización de técnicas de muestreo no invasivas puede conducir a errores en la genotipificación de los individuos (Huerta & Centeno-Cuadros, 2021), en algunos casos, por la incertidumbre acerca del animal del cual proviene la muestra, la degradación de la muestra al permanecer expuesta al ambiente por un periodo prolongado, la presencia de inhibidores de la

reacción en cadena de la polimerasa (Gonzalez & Arenas-castro, 2017), pero hoy en día, estos inconvenientes son comprendidos y se han desarrollado diversas estrategias para limitarlos y reducir su impacto en los análisis posteriores como es la utilización de cámaras trampa para detectar la procedencia de las muestras, así como la utilización de trampas pelo (Molina, 2015).

## **2.13 TRABAJO DE LABORATORIO**

### **2.13.1 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL**

La extracción de ADN, es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades de ADN, es posible amplificar genes específicos utilizando técnicas como la PCR (Checa Rojas, 2017). En especies en peligro de extinción es muy poco probable encontrar ADN abundante, es por ello se recurre a técnicas como la PCR para amplificarla y maximizar su utilidad en pasos posteriores (Ríos-sánchez et al., 2016). EL ADN mt es una fuente de información, como un base de datos por explorar, para poder estudiarlo, primero se tiene que extraer mediante métodos físicos y químicos, el ADN extraído servirá como materia prima para los pasos posteriores de la investigación como es la PCR, electroforesis, secuenciamiento, todo esto con el objetivo de determinar flujo genético entre dos poblaciones, armar árboles filogenéticos, estudios de variabilidad genética, estructura poblacional y otros, con fines de conservación de la especie en estudio (Huerta & Centeno-Cuadros, 2021).

Se le llama extracción al método por el cual se obtiene el ADN a partir de material biológico utilizando técnicas físicas y químicas (Huerta & Centeno-Cuadros, 2021). La extracción consiste en la separación y purificación del ADN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo. En todo proceso de extracción de ADN, se debe tener en cuenta la utilización de guantes de nitrilo para proteger la muestra de degradación, con mayor razón en especies en peligro de extinción, ya que si la echamos a perder no habrá otra oportunidad, porque las muestras de este

tipo son muy difíciles de conseguir, porque se trata de especímenes únicos, además de que nos protegemos de la contaminación en caso de muestras biológicas infecciosas.

Las etapas más importantes en la extracción de ADN son: la lisis celular, procesos físico o químico donde se rompen las membranas celulares para liberar sus componentes celulares, seguida de la degradación de proteína usando proteasas, seguido del proceso de separación físico o químico de los diferentes componentes celulares, utilizando una centrifuga. Seguida del proceso de degradación de ARN con ARNasa para evitar contaminación, finalmente se debe cuantificar utilizando un espectrofotómetro.

Para optimizar la extracción de ADN, el proceso debe realizarse a baja temperatura, lo que se consigue manteniendo los recipientes utilizados en una bandeja con hielo (Cabria et al., 2009). La baja temperatura ralentiza la actividad enzimática, evitando que las moléculas biológicas, como el ADN, sean degradadas tras la ruptura de las membranas celulares que conlleva la liberación de los componentes subcelulares (Salazar et al., 2019). En este punto cabe recordar que los lisosomas (en células animales) contienen enzimas que al ser liberadas provocan la degradación de las biomoléculas (Checa Rojas, 2017).

### **2.13.2 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO.**

La cuantificación de ADN extraído es importante debido a que nos indica cual es la calidad del producto obtenido, asimismo, nos informa la concentración a la que se encuentra (DeNovix, 2021). A partir de dichos resultados podemos volver a extraer, si fuera necesario el caso, con ciertas modificaciones, hasta obtener los resultados deseados dentro de los parámetros de calidad y concentración los cuales se miden mediante la utilización de un espectrofotómetro (New England BiolLabs Inc., 2021). Todos los materiales y reactivos utilizados para la extracción deben estar

limpios y esterilizados ya que es un error frecuente que se suele cometer en el proceso de extracción de ADN.

La cuantificación del ADN es un método preanalítico de gran importancia para muchos métodos de análisis de biología molecular, e incluso puede determinar su éxito o fracaso de la investigación. También es una técnica rutinaria que inicia procedimientos para investigación tales como secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa convencional o a tiempo real, clonación o transfección.

Relación  $A_{260}/A_{280}$ : Las proteínas tienen una mayor absorción a 280 nm que a 260 nm. La relación entre las absorbancias a 260 ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) es ampliamente aceptada como un método para evaluar la contaminación con proteínas de una muestra de ADN purificado. La relación  $A_{260}/A_{280}$  de una muestra que contiene ADN puro sin contaminación por proteínas debe estar entre 1,8 y 2,0, con valores por debajo de 1,8 indicando contaminación por proteínas y relaciones por encima de 2,0 indicando contaminación por ARN. Una relación  $A_{260}/A_{280}$  baja también puede ser indicativa de la presencia de fenol, un aditivo usado en algunos métodos de purificación de ADN (DeNovix, 2021).

Las proteínas no son el único contaminante posible en las muestras de ADN purificado. Algunos contaminantes comunes causan un aumento relativo en la absorbancia a 230 nm en comparación con 260 nm, y por lo tanto la relación  $A_{260}/A_{230}$  también es útil para evaluar la pureza del ADN. La proporción  $A_{260}/A_{230}$  del ADN puro es 1,8. Una proporción menor indica contaminación por fenol, EDTA, tiocianato de guanidina, Triton X-100 o carbohidratos. La contaminación con proteínas también aumenta esta proporción, pero la proporción  $A_{260}/A_{280}$  normalmente se prefiere como un indicador de contaminación de proteínas, ya que no se ve afectada por una gama tan amplia de posibles contaminantes (DeNovix, 2021).

### **2.13.3 SÍNTESIS DE PRIMERS PARA LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN<sub>mt</sub> DE *Tremarctos ornatus***

Los primers son secuencias cortas de moléculas de ácidos nucleicos (entre 18 a 24 pares de bases) que son utilizados para la amplificación de un gen o un fragmento de ADN de interés, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Riveroll, 2022). De tal forma que los cebadores o primers, son uno de los principales ingredientes para una reacción de PCR, y de ellos depende la especificidad, porque al unirse complementariamente a las dos cadenas de ADN de la secuencia molde, fijan por así decirlo las coordenadas donde se llevará a cabo la reacción (Vera et al., 2012).

Para poder obtener un par de primers eficientes, se necesita un análisis cuidadoso de la región de interés porque hay muchos factores, que pueden influir, por ejemplo, los primers podrían ser complementarios entre ellos o formar estructuras secundarias, lo que podría resultar en obtener amplificaciones de fragmentos no deseados fuera del blanco de la región de interés. Sin embargo, gracias al diseño asistido por computadora, es relativamente fácil poder obtener un par de buenos primers. Reglas para el diseño de los primers: Carácter único: Asegura que solo exista un sitio de unión al ADN molde, Tamaño: de 18 a 24 pares de base, Composición de bases: %GC de 50-60 evita regiones ricas en (A+T) y (C+G), evitar tener más de 3 bases GC en los extremos del primer, T<sub>m</sub> se prefieren valores entre 55 y 80 C, Asegurarse que no existe una diferencia de T<sub>m</sub> mayor de 2 o 3 unidades entre ellos, Minimizar el efecto de las estructuras secundarias (Riveroll, 2022).

### **2.13.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN<sub>mt</sub> MEDIANTE PCR CONVENCIONAL**

La PCR es un método utilizado en biología molecular que permite obtener un gran número de copias de un trozo de ADN a partir de una cantidad muy pequeña de esta

biomolécula. El método fue desarrollado en la forma que conocemos por los bioquímicos Cary Banks Mullis y Michael Smith en los años 90, quienes lo patentaron (Tamay de Dios et al., 2013).

Para que pueda darse la PCR, el ADN molde es fundamental, se trata del fragmento de ADN que queremos amplificar (Abm, 2022). Otro componente importante es el Desoxirribonucleótidos-trifosfato, el ADN está compuesto por 4 tipos de nucleótidos, formados por 4 bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina (Salazar et al., 2019). Es de esperar, entonces, que estos 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato sean indispensables para poder obtener nuevas moléculas de ADN, Los cebadores o primers son oligonucleótidos, secuencias cortas de ADN, que se unen a la molécula de ADN molde y sirven como punto de inicio para comenzar la síntesis de ADN (Abm, 2022). En la PCR necesitamos dos cebadores, cada uno complementario a una cadena del ADN que buscamos amplificar. Estos oligonucleótidos determinan la región del ADN a amplificar (Riveroll, 2022). En la PCR se pueden utilizar diferentes ADN polimerasas, obtenidas de varios organismos. Sin embargo, la más utilizada dada su efectividad, es la ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, también llamada Polimerasa Taq. Esta polimerasa es idónea para la PCR por su resistencia a las altas temperaturas que se utilizan en el proceso (Abm, 2022).

La PCR se compone de varios ciclos, cada ciclo comprende estas tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. De este modo, si comenzamos con una única molécula de ADN en la muestra, obtendremos 2 en el primer ciclo, 4 en el segundo ciclo (Ríos-sánchez et al., 2016). En la primera parte del ciclo de una PCR, se desnaturalizan la molécula de ADN de la muestra. Esto significa que las dos cadenas

que forman cada molécula se separan, dando lugar a dos moléculas de ADN monocatenario. Normalmente, este primer paso se logra realizar mediante un aumento de temperatura de la solución (aproximadamente a 95°). El siguiente paso de un ciclo de la PCR implica la unión de los cebadores al ADN blanco (Gómez Ochoa de Alda et al., 2019), en este paso, se disminuye la temperatura de la solución para favorecer la unión de los cebadores al ADN monocatenario que habíamos obtenido en el proceso anterior. Los cebadores se unen al ADN de forma específica, así que solo se amplifica la región de interés (Salazar et al., 2019).

### **2.13.5 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA**

La electroforesis es un método de separación de biomoléculas como el ADN o ARN de acuerdo a su tamaño, permitiendo además su aislamiento cortando la zona de interés (Salazar et al., 2019). La electroforesis en ácidos nucleicos es muy versátil, porque permite una observación directa de cada fragmento, separando directamente en el gel, ya que, su tinción mediante un compuesto llamado bromuro de etidio, hace visible al ADN o ARN (fluoresce) mediante la emisión de luz ultravioleta (EDVOTEK, 2016). Cuando una corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa, el ADN tiene una carga negativa y migra hacia el ánodo o polo positivo, (Montalvo Navarro & Lugo Flores, 2019). La agarosa es un polímero lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa (Salazar et al., 2019).

La electroforesis en gel de agarosa, es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos (EDVOTEK, 2016). Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa (Salazar et al., 2019). Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de ADN o ARN sometidas a

electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa (EDVOTEK, 2016). Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma (Padilla et al., 2011). Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis (Contreras et al., 1993). La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (EDVOTEK, 2016). Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema (Salazar et al., 2019). En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta (Padilla et al., 2011). Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular (EDVOTEK, 2016).

#### **2.13.6 SECUENCIAMIENTO DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADN<sub>mt</sub> MEDIANTE MÉTODO SANGER**

Se trata de una técnica desarrollada por el bioquímico británico Frederick Sanger y sus colegas en 1977. La secuenciación de ADN es el proceso que determina la secuencia de bases de los nucleótidos (As, Ts, Cs y Gs) de un fragmento de ADN. Secuenciación de Sanger conocido como método por terminación de cadena, se secuencian regiones de ADN de hasta 900 pares de bases. La secuenciación de Sanger consiste en hacer muchas copias de una región blanco de ADN. Sus ingredientes son similares a los necesarios para la replicación del ADN en un organismo o para la reacción en cadena de la polimerasa, que copia el ADN *in vitro* (Salazar et al., 2019). Los ingredientes son: Una enzima ADN polimerasa, Un cebador, que es un fragmento pequeño de ADN monocatenario que se une al molde de ADN y actúa como un "iniciador" de la polimerasa,

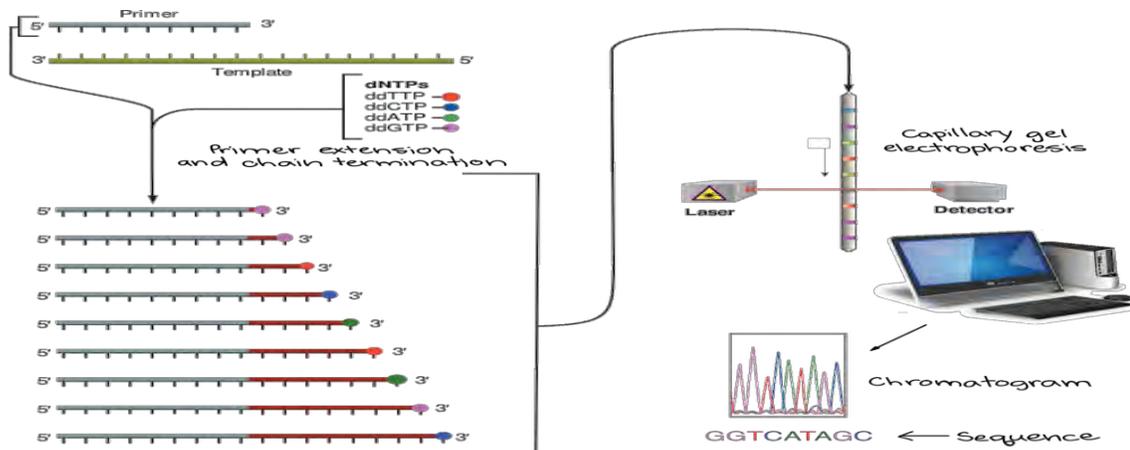
los cuatro nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), contiene un ingrediente único: Versiones didesoxi, o terminadores de la cadena, marcado con pigmentos de color diferente (Frederick Sanger, 1988).

Método de secuenciación de Sanger: La muestra de ADN que se secuenciará se combina en un tubo con el cebador, la ADN polimerasa y los nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). También se añaden los cuatro nucleótidos didesoxi terminadores de la cadena, marcados con su pigmento, pero en cantidades mucho más pequeñas que los nucleótidos normales. Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar el molde de ADN (separar las cadenas) y luego se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla. Una vez que se ha unido el cebador, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar ADN nuevo a partir del cebador. La ADN polimerasa añadirá nucleótidos a la cadena hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi en lugar de uno normal (F Sanger & Nicklen, 1977).

Cuando la reacción termina, los fragmentos se hacen pasar a través de un tubo largo y delgado que contiene gel. Los fragmentos cortos se mueven rápidamente a través de los poros del gel, mientras que los fragmentos largos se mueven más lentamente, un láser lo ilumina y permite la detección del pigmento asociado. De esta manera, se puede reconstruir nucleótido por nucleótido la secuencia del fragmento de ADN original a partir de los colores de los pigmentos registrados uno tras otro por el detector (Frederick Sanger, 1988).

## Figura 8

### Proceso de secuenciación sanger



Fuente: obtenido de "Secuenciación de Sanger", de Estevezj (CC BY-SA 3.0-2023).

### 2.13.7 ANÁLISIS BIOINFOMÁTICO DE LA SECUENCIACIÓN SANGER

La bioinformática tiene un papel central en muchas áreas de la investigación en biología, como en genómica, específicamente secuenciación de genomas, mapeo, anotación y comparación de genomas, así como, forma parte de los estudios de evolución y filogenia (Vera et al., 2012).

El análisis de secuencias incluye búsqueda en las bases de datos, alineamiento de secuencias, descubrimiento de motivos y patrones en proteínas, predicción de genes y regiones promotoras, regulación, reconstrucción de relaciones evolutivas, ensamblaje de genomas y su comparación. Es por ello que existen diversas bases de datos biológicas y programas bioinformáticos que permiten buscar, visualizar, editar y analizar secuencias de nucleótidos (Portillo et al., 2022).

Siendo GenBank una base de datos pública de secuencias de nucleótidos, bibliografía de apoyo y anotación biológica y a partir de 1992 es mantenida por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Pinzón, 2007).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3 ÁREA DE ESTUDIO**

##### **3.1.1 UBICACIÓN POLÍTICA**

Las Áreas Naturales protegidas Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu, se ubican en los departamentos de Cusco y Madre de Dios. El Santuario Histórico de Machu Picchu se ubica en la provincia de Urubamba del departamento de Cusco, mientras que el Parque Nacional del Manu está ubicado parcialmente en los departamentos de Madre de Dios y Cusco, entre las provincias del Manu y Paucartambo.

##### **3.1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

La presente investigación se desarrolló en el corredor Biológico de Vilcabamba – Amboró ubicado en el sur este del Perú, el Parque Nacional del Manu es un espacio natural protegido localizado en el sureste del Perú, se encuentra en la margen derecha de la cordillera Vilcanota con un área de 1 909 806 ha, se divide en 3 grandes zonas: el Parque Nacional, el área reservada y la zona de amortiguamiento, mientras que el Santuario Histórico de Machupicchu comprende un extenso paisaje cultural y natural localizado en diversos ecosistemas, en el que también existen otros sitios arqueológicos conectados por caminos que conducen a la ciudad inca, se encuentra en la cordillera de Urubamba, las dos ANPs están separados por barreras naturales como el Río Paucartambo y río Urubamba.

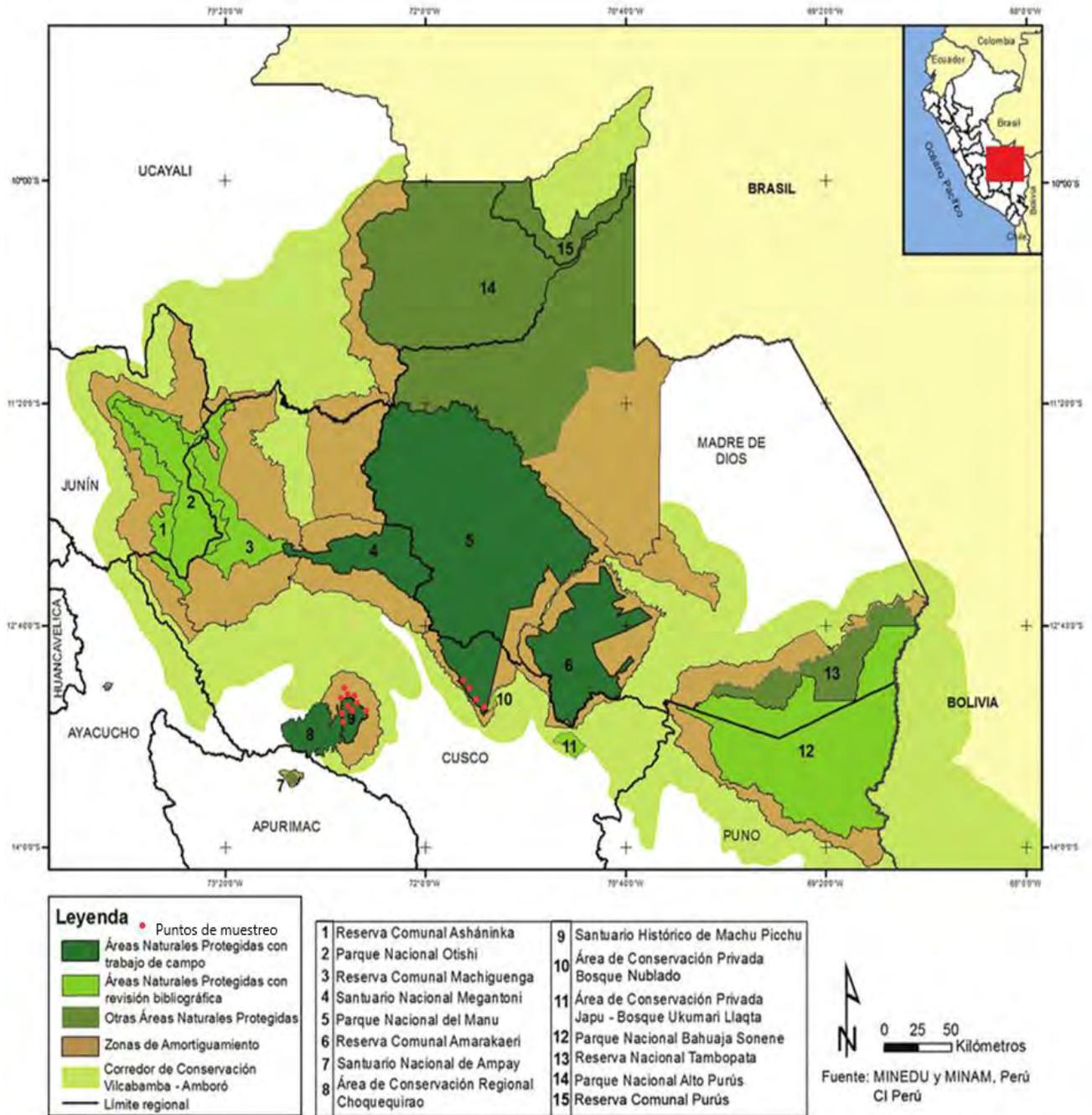
### **3.1.3 RUTAS DE ACCESO**

La ruta I más accesible vía terrestre al Parque Nacional del Manu es siguiendo la ruta Cusco – Paucartambo - Acjanaco - Tres Cruces, mientras la Ruta II corresponde a Cusco-Atalaya - Santa Cruz – Pusharo es para dirigirse hasta los puestos de control al interior del Parque.

La ruta de acceso al Santuario Histórico de Machupicchu vía línea férrea: Cusco – Ollantaytambo – Aguas Calientes el pueblo más cercano a Machu Picchu, por ello también es conocido como Machu Picchu Pueblo. Existen otras rutas alternas para poder llegar al Santuario Histórico de Machupicchu vía terrestre: Cusco – Santa María – Santa Teresa – Hidroeléctrica – Aguas Calientes, otra de las rutas alternas es el camino inca: Cusco – Ollantaytambo – Km 82 – Camino Inca – Llaqta Inca de Machupicchu.

**Figura 9**

*Mapa del área de estudio*



*En el mapa se observa el Corredor Biológico Vilcabamba – Amboró, parte Peruana, donde se observa las dos Áreas Naturales Protegidas en la parte central, Tomada de (Figuroa & Stucchi, 2013).*

## **3.2 MATERIALES**

### **3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

El material biológico está conformado por el pelo del oso andino, colectados mediante técnicas de muestreo no invasivas, en las dos áreas naturales protegidas, dicha colecta se desarrolló dentro del PNM y SHM. Las muestras fueron debidamente codificados y rotulados (código de la muestra, lugar de procedencia, coordenadas UTM, tipo de muestras, fecha de colecta, colector).

### **3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO.**

#### **3.2.2.1 EQUIPOS.**

- Termoblock marca Thermo Scientific modelo digital Shaing Drybath.
- Destilador de agua marca GFL modelo gel 2004
- Centrífuga marca Thermo Scientific modelo micro C117
- Ultra congeladora eléctrica vertical de -86<sup>0</sup>c marca Thermo Scientific modelo UXF40086D
- Ultra congeladora eléctrica vertical de -30<sup>0</sup>c marca Thermo Scientific modelo REVCO
- Incubadora convencional marca Memmert modelo IF55
- Campana de Extracción Metálica marca BIOBASE modelo FH1500
- Cubeta Horizontal De Electroforesis
- Cuantificador de ADN (espectrofotómetro Marca Denovix ds-11).
- Autoclave marca BENCHMARK modelo BIOCLAVE B4000 16L.
- Balanza de precisión, marca A&D, modelo FX 500i.
- Vórtex mixer marca Thermo Scientific modelo LP mixer
- Microscopio marca CARL ZEISS modelo PRIMOTECH D/A.

- Cabina de trabajo HEPA-UV3 PCR Marca UVP Modelo Workstation.
- Microcentrífuga de PCR Marca VWR Modelo SPINNER
- Termociclador BioSystems Modelo ProFlex PCR System
- Vórtex Marca Thermo Scientific Modelo LP Mixer
- Cámara electroforética Marca Bio Rad Modelo Sub-CellGT
- Plancha De Calentamiento Con Agitación Marca Thermo Scientific Modelo SP 131635.
- Balanza De Precisión, Marca A&D, Modelo FX 500i.
- Cabina De Seguridad Biológica Clase II Tipo A2 Thermo Scientific Serie 1300.
- Foto-documentador (Trans-iliminador Marca Vilber Modelo Ecx-726-Mx).
- Laptop Lenovo i5 RAM 16GB, almacenamiento de 1TB.
- Disco externo de 1 TB marca Toshiba.

### 3.2.2.2 **REACTIVOS**

- Alcohol etanol de 70%
- Alcohol etanol de 90%
- Agua destilada
- Buffer TE 1X (Tris-EDTA)
- Agua De PCR
- Master Mix (Abm 2X PCR Taq MasterMix cat# G013)
- Agarosa
- Buffer TE 1X
- Ladder 5000bp (Marcador De Peso Molecular)
- Buffer De Carga (Azul De Bromofenol).

- Bromuro De Etidio

### **3.2.2.3 CONSUMIBLES Y FUNGIBLES**

- Pinzas de disección del tipo E (para cubreobjetos y membranas)
- Bisturí médico clásico
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Columna de Purificación de ADN
- Tubo de recolección
- Papel de aluminio
- Tijeras
- Papel toalla
- Guantes de nitrilo
- Barbijo KN95
- Tips De 0,2-2 $\mu$ L
- Tips De 0,5ul- 10 $\mu$ L
- Tips De 20ul- 200 $\mu$ L
- Tips De 100ul- 1000 $\mu$ L
- Strip Tubo De PCR (Tubo Eppendorf De 0,2 mL)
- Tubo Eppendorf De 1,5 mL
- Guantes De Nitrilo
- Barbijo NK95
- Racks (soporte de laboratorio para microtubos)
- Agitador Magnético (Magneto)
- Aspirador De Pipeta

- Peine De Electroforesis
- Pipetas De 0,2-2 $\mu$ L
- Pipeta De 2  $\mu$ l-20 $\mu$ L
- Pipeta De 0,5 $\mu$ l- 10 $\mu$ L
- Pipeta De 20 $\mu$ l- 200 $\mu$ L
- Pipeta De 100 $\mu$ l- 1000 $\mu$ L
- Envase Para descarte de puntas

#### **3.2.2.4 MATERIALES DE VIDRIO**

- Matraz Erlenmeyer de 100 mL
- Pipeta De Vidrio 1mL

#### **3.2.2.5 PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS**

- Software MEGA-X versión 6
- Software Chromas versión 2.6.6
- Cap3 versión 2009
- GenBank versión 2022
- Software ClustalX versión 2.1-win
- Software Aliview.exe versión 3.0 (GPLv3)
- DnaSP versión 6.5
- Software Arlequin versión 3.5.2.2
- Dambe.exe versión 7.0
- Popart versión 1.7

### **3.2.2.6 KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN<sub>mt</sub> Y PRIMERS.**

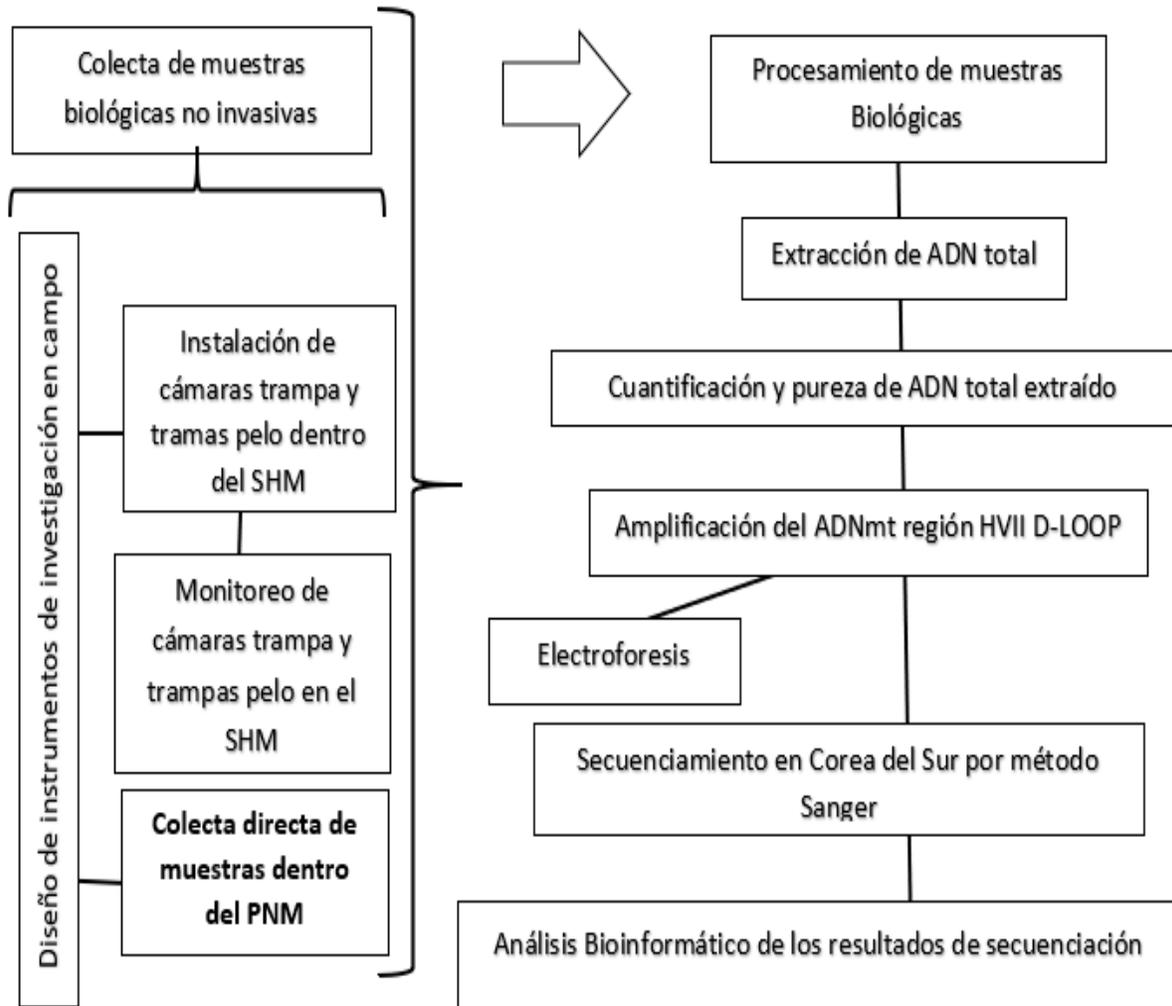
- Monarch® Genomic DNA Purification Kit de New England Biolabs.
- Primers: TORmt2F y TORmt2R: Fuente Bruque (2016)

### **3.2.3 MATERIALES DE CAMPO**

Los materiales utilizados son:

- GPS marca Garmin S.64
- Cámara trampa marca Bushnell
- Trampas pelos
- Cebos atrayentes (esencia de mora, esencia de vainilla, esencia de anís)
- Alicata
- Clavos en U
- Martillo
- Alambre de púas
- Cuaderno de campo
- Lápiz
- Guantes de nitrilo
- Pinzas estériles.
- Cinta métrica.
- Cámara fotográfica Marca Canon modelo EOS Rebel.
- Carpa, matra, sleeping, bolsas herméticas, etc.

## FLUJOGRAMA PARA EL ESTUDIO DE DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OSO ANDINO



### **3.3 METODOLOGÍA**

La presente investigación es de tipo experimental, nivel de investigación aplicada, enfoque de la investigación descriptivo y analítico, el diseño de la investigación consta de dos etapas bien definidas, la primera etapa consistió en la colecta de muestras en campo y la segunda etapa trabajo de laboratorio y gabinete.

#### **3.3.1 TRABAJO DE CAMPO**

El trabajo de campo comprendió dos etapas entre los que se encuentran:

##### ***3.3.1.1 INSTALACIÓN DE TRAMPAS PELO Y CAMARAS TRAMPA.***

Con la debida autorización de parte de la Dirección General de Áreas Naturales Protegidas (DGANP), se viajó al área de estudio, para el reconocimiento e identificación de los senderos del oso andino, así como los lugares donde frecuenta el oso andino dentro del Santuario Histórico de Machupicchu. Una vez identificado los sitios posibles, se instalaron las cámaras trampa de la marca Bushnell y trampas pelo de elaboración propia. Los sitios escogidos comprenden lugares que ya fueron monitoreados con cámaras trampa y/o se conoce la presencia de oso andino, asimismo, se contó con la ayuda de especialistas que trabajan dentro de SERNANP Machupicchu y guardaparques.

La instalación de las 10 cámaras trampa y 10 trampas pelo dentro del Santuario Histórico de Machupichu, se ejecutó con la autorización del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SERNANP MACHUPICCHU), mediante la carta de ingreso N.º 123-2018-SERNANP-SHM/J (anexo 14).

## Figura 10

*Trampa pelo al inicio de la investigación*



*La Trampa pelo, se instaló alrededor de un árbol marcado por el oso andino para dejar su marcaje en el sector de Ahobamba dentro del Santuario Histórico de Machupicchu.*

Procedimiento para la instalación y modificación de trampas de pelo con cámara trampa:

- Identificación del área de estudio: Se seleccionó el área de estudio donde se realizó la captura de muestras de pelo de fauna silvestre, especialmente del oso andino.
- Evaluación de la topología del terreno: Se realizó una evaluación detallada de la topología del terreno para determinar las ubicaciones óptimas para la instalación de trampas de pelo.

- Diseño inicial de las trampas de pelo: Basado en el diseño estándar de la "trampa de pelo", se planificó un corral de aproximadamente 4m<sup>2</sup> (2x2 metros) con dos líneas de alambre de púas, según lo descrito por Molina (2015).
- Modificación de las trampas de pelo: Se adaptó las trampas de pelo según las topologías encontradas en el campo considerando la disposición de las líneas de alambre de púas y la ubicación de los árboles cercanos para evitar su corte.
- Instalación de las trampas de pelo modificadas: Colocar las trampas de pelo modificadas en los senderos por donde el oso andino se desplaza con mayor frecuencia. Ajustar la altura del alambre de púas a 0,5 metros y 1 metro del suelo, respectivamente, de acuerdo con la topología del lugar y la disponibilidad de árboles.
- Preparación del cebo atrayente: Se roció los árboles adyacentes con esencias de diferentes sabores, como esencia de mora, esencia de vainilla y esencia de anís, para utilizarlos como cebo atrayente para el oso andino.
- Instalación de la cámara trampa: Se colocó la cámara trampa en un punto estratégico que permitió obtener un panorama amplio del área donde se ubicó la trampa de pelo modificada. Esto facilitó la identificación de la procedencia de las muestras y la posible identificación de los osos.
- Monitoreo y recolección de muestras: Se realizó un monitoreo regular de las trampas de pelo modificadas y la cámara trampa. Luego se recolectó las muestras de pelo capturadas y se registró cualquier actividad de los osos o de otras especies.
- Registro de resultados: Se registró los resultados obtenidos durante el proceso de captura y análisis de muestras, incluyendo la ubicación de las trampas, las especies identificadas y cualquier otra observación relevante.

- Evaluación y ajuste: Se evaluó la efectividad del método de captura y se realizó ajustes necesarios en el diseño o la ubicación de las trampas para optimizar su eficacia en futuras investigaciones sobre el oso andino y otras especies de fauna silvestre.

### **Figura 11**

*Trampa pelo adaptada a la geografía del lugar*



*Se observa la Trampa pelo modificada, que fue instalada en el sendero del oso andino en el sector de Mandor dentro del Santuario Histórico de Machupicchu.*

Protocolo de colecta dentro del Santuario Histórico de Machupicchu:

- Se retiró la memoria de 32 GB de la cámara trampa.
- Se colocó la memoria de 32GB en otro dispositivo donde sea posible la verificación de las imágenes tomadas.
- Luego se verificó las imágenes que muestran fotos de oso, si hubiese presencia, se anotó el punto exacto por donde pasó el oso andino por el alambre.

- Se usó guantes de nitrilo estériles para evitar contaminar las muestras.
- Seguidamente se recogió las muestras con pinzas estériles los pelos.
- Se colocó en sobres de papel estéril los pelos.
- Se etiquetó los sobres de papel con datos de lugar y fecha de colecta, así como el nombre del recolector.
- Finalmente, los sobres de papel, se guardó en bolsas Ziplock con sello hermético.
- Se trasladó y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio hasta su procesamiento.

Procedimiento para la colecta de muestras de pelo del oso andino dentro del Parque Nacional de Manu:

- Planificación del recorrido: Se estableció el recorrido desde el puesto de control Acjanaco hasta el Puesto de control Kurkurpampa, con una distancia aproximada de 85 km dentro del Parque Nacional del Manu.
- Identificación de áreas de interés: Se identificó las áreas dentro del recorrido donde se sospeche la presencia del oso andino, especialmente senderos frecuentados y lugares con indicios indirectos como comederos y senderos.
- Inicio de la colecta: Se inició la colecta de muestras de pelo del oso andino desde el puesto de control Acjanaco, siguiendo el recorrido planificado.
- Revisión de indicios indirectos: Durante el recorrido, se revisó los indicios indirectos de la presencia del oso andino, tales como comederos, senderos y otros signos característicos de su actividad.

- **Colecta de pelos caídos:** Al encontrar indicios de la presencia del oso andino, se realizó la colecta de pelos caídos que puedan encontrarse en el entorno, especialmente en áreas donde se rosan con bromelias, árboles u otros elementos.
- **Métodos de colecta:** Se utilizó técnicas adecuadas para la recolección de pelos, como el uso de pinzas estériles y guantes de nitrilo, para evitar la contaminación de las muestras.
- **Almacenamiento de las muestras:** Se almacenó las muestras de pelos recolectados en recipientes adecuados y debidamente etiquetados, asegurando su integridad para su posterior análisis en laboratorio.
- **Registro de datos:** Se registró la ubicación exacta de cada muestra recolectada, así como cualquier información relevante sobre el entorno y las condiciones en las que se encontró.
- **Finalización del recorrido:** Se continuó con la colecta de muestras a lo largo del recorrido hasta llegar al Puesto de control Kurkurpampa.
- **Transporte de las muestras:** Una vez finalizada la colecta, se transportó las muestras de manera segura hasta el laboratorio.

### ***3.3.1.2 MONITOREO DE LAS TRAMPAS PELO***

El monitoreo de las trampas pelo y cámaras trampa, se realizó durante todo un año al interior del Santuario Histórico de Machupicchu (setiembre del 2018 a diciembre del 2019), en cada entrada se verificó la presencia de pelo de oso, así como se renovaron las pilas AA de las cámaras trampa para que siguiera tomando fotografías.

### **3.3.2 TRABAJO DE LABORATORIO**

#### **3.3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL**

En el proceso de extracción de ADNtotal se implemento pasos previos para optimizar dicho proceso, posterior a ello se siguió el protocolo que recomienda la compañía fabricante del Kit de extracción de ADNtotal. Para el procedimiento se utilizaron 10 muestras (pelos de oso andino en número variable) colectados de manera no invasiva en las ANPs en estudio.

##### **Lavado Inicial:**

- a. Se Colocó las muestras en tubos eppendorf de 1 ml
- b. Se lavó las muestras tres veces con agua destilada. Para cada lavado, se agregó suficiente agua destilada para cubrir las muestras, se mezcló suavemente.
- c. Se descartó el agua destilada después de cada lavado.

##### **Lavado con alcohol**

Después del tercer lavado con agua destilada, se agregó suficiente alcohol al 70% para cubrir las muestras, se mezcló suavemente y descartó el alcohol después del lavado.

##### **Segundo lavado con agua destilada**

- a. Se lavó las muestras una vez más con agua destilada como se describió en el paso 1.
- b. Se descartó el agua destilada después del lavado.

##### **Incubación de las muestras**

- a. Después del último lavado, se resuspendió las muestras en 1 ml de buffer TE (tris EDTA).
- b. Se incubó las muestras lavadas durante 72 horas a 37 °C para permitir la interacción con el buffer.

##### **Centrifugación y extracción del sobrenadante.**

- a. Después de la incubación, se centrifugó las muestras a 1200 g durante 3 minutos.

b. Con mucho cuidado, se extrajo 400  $\mu$ l de sobrenadante de cada muestra utilizando una pipeta y se transfirió a nuevos tubos limpios de centrifugación.

c. Los tubos con el sobrenadante extraído están listos para el proceso de extracción de ADN.

En todo el proceso se mantuvo un ambiente estéril y limpio para evitar contaminaciones cruzadas. Asegurándose de etiquetar correctamente todos los tubos y mantener un registro claro de las muestras y los pasos realizados.

Del siguiente procedimiento en adelante la extracción siguió el protocolo de Monarch <sup>®</sup>Kit Purificación de ADN con modificaciones:

### 1. Preparación de las Muestras:

- a) Se colocó 400  $\mu$ l de cada muestra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- b) Se añadió 3  $\mu$ l de proteinasa K y 200  $\mu$ l de tampón de lisis de tejidos a cada muestra.
- c) Las muestras se mezclaron en vórtex durante 10 segundos para homogenizar.

### 2. Incubación y Centrifugación:

- a) Las muestras se incubaron a 56 °C en un mezclador térmico a 1400 rpm durante 2 horas (se modificó de 50 minutos a 2 horas).
- b) Después de la incubación, se centrifugó cada muestra durante 3 minutos a velocidad máxima (12,000 G).
- c) Se transfirió el sobrenadante (400  $\mu$ l) a un nuevo tubo Eppendorf limpio.

### 3. Tratamiento con RNasa A:

- a) Se añadieron 3  $\mu$ l de RNasa A al lisado en el nuevo tubo.
- b) Se mezcló en vórtex durante 20 s (se modificó de 10 a 20 segundos).
- c) Se incubó a 56 °C con agitación a 1400 rpm durante 30 minutos (se modificó de 15 a 30 min).

#### **4. Purificación del ADN:**

- a) Se añadieron 400 µl de tampón de unión de ADN a la muestra.
- b) Se vortexeó durante 15 segundos.
- c) Se transfirió 600 µl de la mezcla del lisado a una columna de purificación de ADN en un tubo de recolección, evitando tocar la parte superior de la columna y sin transferir espuma.
- d) Se centrifugó durante 3 minutos a 1000 G y luego durante 1 minuto a velocidad máxima (12,000 G). Se desechó el flujo y el tubo de recolección.

#### **5. Lavado de la Columna:**

- a) Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección.
- b) Se añadió 500 µl de tampón de lavado de ADN a la columna.
- c) Se cerró la tapa y se agitó varias veces para que el tampón de lavado llegara a la tapa.
- d) Se centrifugó inmediatamente durante 1 minuto a velocidad máxima (12,000 G) y se desechó el flujo.

#### **6. Segundo Lavado de la Columna:**

- a) Se repitieron los pasos de lavado (5a-5d) una vez más.

#### **7. Elución del ADN:**

- a) Se colocó la columna de purificación de ADN en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- b) Se añadió 50 µl de tampón de elución de ADN precalentado (56 °C).
- c) Se cerró la tapa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- d) Se centrifugó durante 1 minuto a velocidad máxima (12,000 G) para la elución del ADN.

### **3.3.2.2 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO**

Este procedimiento describe cómo medir la concentración y pureza del ADN total extraído utilizando un espectrofotómetro marca Denovix DS11.

#### **Procedimiento:**

##### **Medición del Blanco:**

- a) Se pipeteó 2  $\mu$ L de solución (buffer de elución o agua de PCR) sobre la superficie inferior del espectrofotómetro.
- b) Se bajó el brazo superior y se presionó el botón "Blanco" (Black).
- c) Se retiró la solución de ambas superficies con un paño de laboratorio limpio y seco.

##### **Medición de la Muestra de ADN:**

- a) Se pipeteó 1  $\mu$ L de la muestra de ADN sobre la superficie inferior del espectrofotómetro.
- b) Se bajó el brazo superior y se presionó el botón "Measure".
- c) Se esperó unos segundos para que el espectrofotómetro realizara la medición.

##### **Interpretación de los Resultados:**

- a) Los resultados de la calidad del ADN estuvieron disponibles en la pantalla del espectrofotómetro.
- b) Se tomaron notas de los valores obtenidos para su análisis posterior

Los valores 260/280 generalmente son aceptados  $\sim$  1,8 y 1,9 para ADN (DeNovix, 2021).

Los valores de 260/230 para los ácidos nucleicos suelen oscilar entre 1,8 y 2,2 (DeNovix, 2021).

### **3.3.2.3 OBTENCIÓN DE LOS PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN<sub>mt</sub>.**

Para la obtención de los primers se siguió el siguiente procedimiento:

#### **Identificación de los Primers:**

- a. Se obtuvo la secuencia de los primers TORmt2F y TORmt2R reportados por (Bruque, 2016).

#### **Solicitud de Síntesis de Primers:**

- a. Se envió la secuencia de los primers a la compañía Macrogen en Corea del Sur para su síntesis.
- b. Se proporcionó información necesaria para la síntesis, como la secuencia de los primers y las especificaciones requeridas.

#### **Recepción de los Primers Sintetizados:**

- a. Los primers sintetizados llegaron al laboratorio de Genética Molecular de la escuela profesional de Biología – UNSAAC liofilizados en tubos individuales.

#### **Resuspensión de los Primers:**

- a. Se preparó agua de PCR o se utilizó agua estéril y libre de nucleasas.
- b. Se resuspendieron los primers liofilizados en agua de PCR o en agua estéril de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- c. Para poder suspenderlos, se centrifugó a 1000 RPM durante 20 segundos. Posteriormente, se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas, se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente y finalmente se agitó durante 20 segundos en vórtex. A partir de este proceso, se realizaron diluciones a 10 µM para el proceso de amplificación del ADN<sub>mt</sub>.

**Tabla 1**

*Secuencia de Primers utilizados en la Investigación*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm	%GC	Longitud (pb)
TORmt2F	TAGCTCCACCATCAACACCC	59,38	55	20
TORmt2R	ACTGCGACGAGACCTTTACG	60,11	55	20

*En la tabla se observa los cebadores, ambos tienen 20 pares de bases de longitud, con un 55% de proporción G≡C, lo que le confiere mayor estabilidad y una temperatura de desnaturalización próximo a 60°C.*

### **3.3.2.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADNmt MEDIANTE PCR CONVENCIONAL**

La amplificación de la región HVII del D-loop del ADN mitocondrial extraído de las muestras de pelo de oso andino, se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional), para ello se siguió el siguiente protocolo:

#### **Preparación de la Mezcla de Reacción:**

- a. La preparación de la mezcla siguió las instrucciones de la tabla 2, luego se mezcló suavemente los componentes mediante pipeteo y brevemente se centrifugó el tubo para asegurar una homogeneización adecuada.

#### **Configuración del Termociclador:**

- a. Se configuró las condiciones de amplificación de acuerdo con lo siguiente:

Desnaturalización inicial: 94°C durante 10 minutos

Ciclos de amplificación:

Desnaturalización: 35 ciclos a 94°C durante 50 segundos cada ciclo

Alineamiento: 68°C durante 50 segundos

Extensión: 72°C durante 50 segundos

Extensión final: 72°C durante 2 minutos

### **Ejecución de la PCR:**

- a. Se distribuyó la mezcla de reacción en los pocillos de la placa de PCR.
- b. Se colocó la placa en el termociclador y se cerró la tapa.
- c. Se inició el programa de amplificación y se siguieron las instrucciones del termociclador para completar el proceso.
- d. El volumen final de la reacción fue de 50  $\mu$ l.

**Tabla 2**

*Reactivos utilizados en la amplificación de la región D-loop del ADNmt del oso andino*

Reactivos	Volumen	Concentración
ADNmt	2 $\mu$ l	-
Primers TORmt2F	1 $\mu$ l	10 $\mu$ M
Primers TORmt2R	1 $\mu$ l	10 $\mu$ M
Master Mix	25 $\mu$ l	1X
Agua de PCR	21 $\mu$ l	-
Volumen final	50 $\mu$ l	

*Se observa los reactivos utilizados en el proceso de amplificación del ADNmt, así como su volumen y concentración.*

### **3.3.2.5 ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES EN GEL DE AGAROSA**

El producto de la amplificación fue evaluado mediante electroforesis para verificar la correcta aplicación de la región deseada.

### **Procedimiento de Electroforesis en Gel de Agarosa**

#### **Preparación del Gel de Agarosa:**

- a. Se pesaron 1,8 gramos de agarosa en una balanza analítica y se vertieron en un matraz.
- b. Se añadieron 100 mL de buffer TAE 1X al matraz que contenía la agarosa.

- c. Se fundió la agarosa utilizando una plancha de calentamiento con agitación constante hasta obtener una solución homogénea y transparente.
- d. Se dejó enfriar la solución fundida hasta alcanzar una temperatura entre 50°C y 60°C.
- e. Se vertió la solución de agarosa en la cubeta de electroforesis y se colocó el peine para formar los pocillos.
- f. Se permitió que la agarosa se enfriara y polimerizara completamente en la cubeta.

### **Montaje y Carga del Gel:**

- a. Se colocó la cubeta de electroforesis con el gel polimerizado en la cámara de electroforesis.
- b. Se añadió buffer de electroforesis (TAE 1X) en la cámara hasta cubrir el gel con el buffer una capa de 0,5 a 1 cm de altura.

### **Carga de Muestras:**

- a. En el primer pocillo de la cubeta, se cargaron 15 µl de un marcador de peso molecular (ladder) con un rango conocido de 50 a 1500 pares de bases.
- b. En los siguientes pocillos, se cargaron las muestras mezclando 3 µl de azul de bromofenol con 12 µl del producto de PCR amplificado.

### **Electroforesis:**

- Se tapó la cámara de electroforesis y se configuró la fuente de alimentación a 80 voltios durante 50 minutos para la corrida.

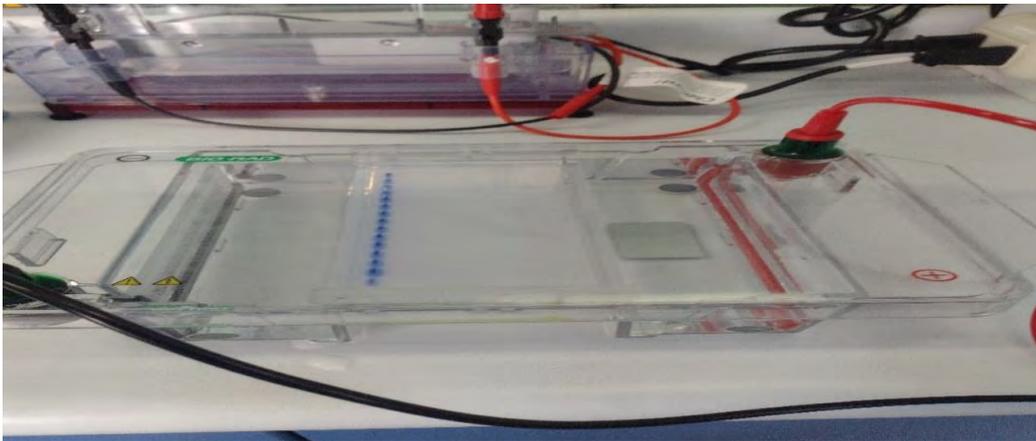
### **Tinción y Visualización del Gel:**

- a. Al finalizar la electroforesis, se retiró cuidadosamente el gel de la cubeta.
- b. Se incubó el gel en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml a temperatura ambiente dentro de una cabina de bioseguridad tipo II durante 20 minutos.
- c. Se transfirió el gel teñido al Trans-iluminador Marca Vilber Modelo Ecx-726-Mx asegurándose de manipularlo con precaución para evitar daños.
- d. Se analizaron y capturaron imágenes de las bandas de ADN utilizando radiación UV en el transiluminador.

Este procedimiento detallado cubrió desde la preparación del gel de agarosa hasta la visualización de las bandas de ADN amplificado utilizando bromuro de etidio y un fotodocumentador.

## Figura 12

*Electroforesis con las muestras cargadas*



*En la imagen se observa la cubeta junto al gel de agarosa debidamente cargada con las muestras en cada pocillo y los cantos el marcador de peso molecular.*

### 3.3.2.6 PREPARACIÓN Y ENVIÓ DE AMPLICONES PARA SU SECUENCIACIÓN

- a. Los productos de amplificación se enviaron a Corea del Sur, a la empresa Macrogen, para la secuenciación.
- b. Se envió 30  $\mu\text{l}$  de cada producto de PCR con concentraciones entre 30-40  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Se realizaron diluciones según sea necesario para cumplir con las especificaciones de la empresa.
- c. En total, se enviaron 10 muestras de ADN amplificado de la región HVII del D-LOOP del ADNmt, las cuales fueron secuenciadas en ambas direcciones (forward y reverse).
- d. Se enviaron los primers TORmt2F y TORmt2R, cada uno a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y un volumen de 7  $\mu\text{l}$  por muestra.
- e. Los amplicones se diluyeron utilizando agua de PCR para ajustar las concentraciones dentro del rango solicitado por la empresa (30-40  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ).

Este procedimiento detalla el envío y la preparación de muestras para secuenciación de productos de PCR, asegurando que todas las especificaciones de concentración y preparación de reactivos fueron cumplidas antes del envío a Macrogen.

### **3.3.3 ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN SANGER**

Este procedimiento detalla paso a paso el análisis de las secuencias obtenidas del secuenciamiento, desde la recepción de los datos crudos hasta la confirmación de la identidad de las secuencias consenso y el análisis de su alineamiento.

#### **a) Recepción, Verificación y Corrección de Data Cruda**

Este procedimiento detalla el proceso de verificación y corrección de secuencias utilizando el software Chromas, de tal forma que se asegura la precisión y fiabilidad de las secuencias analizadas antes de realizar cualquier interpretación de los datos secuenciados

- La data cruda del secuenciamiento fue recibida en varios formatos (fasta, phd, ab1, pdf, file).
- Los electroferogramas fueron visualizados utilizando el software Chromas de manera independiente para revisar la calidad de las secuencias. Se verificó que los picos del electroferograma correspondieran a los nucleótidos correctos y estuvieran en la posición adecuada.
- Ambas secuencias forward y reverse fueron abiertas en el software Chromas, cada una en ventanas paralelas.
- Para la secuencia reverse, se ejecutó la reversa complementaria navegando a "Edit – Reverse + Complement" en el menú del software Chromas.
- Las secuencias fueron revisadas visualmente para asegurarse de su exactitud.
- Se utilizó la función de búsqueda del software Chromas para corroborar secuencias sospechosas. En caso de que hubiera una base distinta en alguna de las secuencias, se

fue al comando "Find" e introdujo una secuencia de 5 a 10 bases adyacentes a la base sospechosa en la ventana de búsqueda.

- Se hizo clic en "Find First" para localizar la secuencia buscada y verificar su posición y exactitud.
- En caso de identificar algún error, se procedió a corregirlo según fuera necesario en el software Chromas.
- Cualquier corrección realizada durante la verificación de las secuencias fue documentada en un registro detallado.

#### b) **Exportación de Secuencias**

- La secuencia forward se exportó en formato fasta utilizando un block de notas.
- La secuencia reverse se complementó reversamente antes de exportarla en formato fasta al mismo block de notas
- El bloc de notas se guardó con el código de la muestra

#### c) **Obtención de Secuencia Consenso**

- Se utilizó el Software Cap3 (Sequence Assembly Program) para obtener la secuencia consenso, se cargó ambas secuencias (F y R) en formato fasta al programa Cap3.
- Se ejecutó la opción "submit", seguida por la opción "contigs" para obtener la secuencia consenso.
- La secuencia consenso se copió en formato fasta en un block de notas y se guardó con el nombre de la muestra.

#### d) **Confirmación de Identidad de Secuencias Consenso**

- Se realizó una búsqueda en la página web de NCBI la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).
- Se utilizó la opción Blastn con la base de datos estándar para comparar las secuencias con la región D-loop del mtDNA de *Tremarctos ornatus*.
- Los criterios de evaluación fueron: el porcentaje de identidad, cobertura y valor E.
- Los resultados de identidad guardamos en un archivo.

#### e) **Alineamiento de Secuencias Consenso**

- Se utilizó el Software ClustalX para alinear las secuencias consenso.
- Los archivos fasta se unieron en un solo archivo fasta para el alineamiento.

- Se importó el archivo en formato fasta que contenía las 10 secuencias consenso mediante la opción "File – Load Sequences" en ClustalX.
- Se seleccionó la opción "Alignment – Complete alignment" para obtener los resultados del alineamiento.
- El resultado se guardó automáticamente en formato aln y dnd.

**f) Evaluación de Calidad del Alineamiento**

- Se importó el archivo en formato aln en el Software Aliview para observar la calidad del alineamiento.
- Se cortaron los extremos (primers y cola sobrante) del alineamiento utilizando el comando "Selection" seguido por "Edit – Delete Selected".
- Se guardó el alineamiento en formato aln (File - Save as Clustal aln) y otro archivo en formato Nexus.

**Procedimiento para el Análisis Filogenético y Cálculo de Distancia Genética en Software Mega**

Este procedimiento detalla paso a paso cómo realizar el análisis filogenético y el cálculo de distancia genética utilizando el software Mega, asegurando la correcta manipulación y análisis de los datos de secuencias nucleotídicas.

**a. Conversión de Formato de Archivo:**

- Se abrió el software Mega, se navegó al menú "File" - "Convert File Format to Mega".
- Se seleccionó el archivo en formato aln a convertir, se seleccionó la opción "OK".
- Se asignó un nombre al archivo convertido y confirmó con "OK".

**Apertura del Archivo en Mega:**

- En el software Mega, se procedió a abrir un archivo seleccionando la opción "File" y luego "Open File". Posteriormente, se seleccionó el archivo convertido en formato Meg y se hizo clic en "Open". A continuación, se eligió la opción "Nucleotide sequences" y se confirmó con "OK". ¿Durante este proceso, emergió una ventana preguntando “la secuencia sintetiza proteína?” y se seleccionó la opción "no".

**c. Selección de Taxa y Agrupamiento:**

- En la interfaz de Mega, seleccionó el comando "Data" y eligió "Select taxa and group".
- Se organizó los grupos de muestreo por Área Natural Protegida.

- Se confirmó con "OK" para establecer los dos grupos de muestreo por ANP.

**d. Construcción del Árbol Filogenético:**

- Se seleccionó el comando "Phylogeny" en Mega.
- Se eligió la opción "Construct/Test Neighbor Joining tree".
- Se confirmó con "OK" para generar el árbol filogenético y el resultado se guardó en formato jpg.
- Como grupo externo se utilizó la secuencia de la región D-loop de *Arctotherium* sp., dicha secuencia fue obtenida de la base de datos de NCBI con código de accesoión NC\_030174.1.

**e. Cálculo de Distancia Genética:**

- Se utilizó el comando "Distance" en Mega.
- Se seleccionó "Model", en seguida la opción "compute composition distance", luego "ok".
- Los resultados se guardaron en formato excel.

**f. Guardado del Archivo:**

- Se guardó los archivos generados y el archivo principal en formato Mega.
- Los análisis de patrones evolutivos se realizaron en MEGA X. (Tamura, K. et, al. 2018).

### **3.3.3.1 CALCULO DE LOS ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA**

El procedimiento realizado para analizar los diversos índices de diversidad genética se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. Preparación del Software Arlequín:** Se utilizó el Software Arlequín para realizar los cálculos de los índices de diversidad genética. Se importó el formato MEG en Arlequín y se convirtió en formato ARP para facilitar los análisis.
- b. Apertura del archivo en formato ARP:** Se procedió a abrir el archivo en formato ARP en el Software Arlequín. Esto se realizó seleccionando la opción "File", luego "Open Project", eligiendo el archivo deseado y finalmente haciendo clic en "Abrir".
- c. Definición de los índices a calcular:** Una vez cargado el archivo en el programa, se definieron los índices moleculares que se tienen que calcular. Esto se llevó a cabo ajustando

las configuraciones del programa. Se seleccionaron las opciones pertinentes como el test de neutralidad, índices de diversidad molecular, estructura genética y diferenciación poblacional.

- d. **Inicio del cálculo:** Se inició el cálculo de los índices seleccionados. Esto se realizó haciendo clic en la opción "Start" una vez que se definieron todas las configuraciones necesarias.
- e. **Generación de resultados:** Finalmente, el programa generó un archivo con varias carpetas, incluyendo una denominada "archivo log". Para observar los resultados obtenidos, se abrió este archivo log en cualquier navegador web.

Este procedimiento permitió realizar un análisis exhaustivo de la diversidad genética utilizando el Software Arlequín, proporcionando resultados detallados que fueron fundamentales para el estudio genético realizado.

**a. Uso de software DnaSP6exe y comparación con Arlequin:**

- Para determinar los índices de diversidad genética y el flujo genético ( $F_{st}$ ) entre los individuos muestreados, se utilizó el software DnaSP6exe como alternativa a Arlequin.
- Se realizaron los cálculos necesarios y se compararon los resultados obtenidos con los generados por Arlequin para validar la consistencia entre ambos programas.

Este procedimiento garantizó una exploración exhaustiva de la diversidad genética y la estructura de haplotipos entre los individuos muestreados, integrando el uso de diferentes softwares para obtener una perspectiva completa y comparativa de los datos genéticos analizados.

### **3.3.3.2 CÁLCULO DE LA RED DE HAPLOTIPOS EN POPART 1.7:**

- a. Se utilizó el software PopArt 1,7 para calcular la red de haplotipos siguiendo estos pasos:
  - Se importó el archivo en formato MEG que contiene los haplotipos definidos.
  - Para hacerlo, se seleccionó la opción "File", luego "Open", se eligió el archivo deseado y se procedió a la siguiente fase.
  - Se utilizó la funcionalidad "Network" dentro de PopArt 1,7 y se seleccionó "Median Joining Network" para construir la red de haplotipos. (Clement, et., 2002).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4 TRABAJO DE CAMPO

##### 4.1 COLECTA DE MUESTRAS NO INVASIVAS

Dentro del Santuario Histórico de Machu Picchu, se logró coleccionar 6 muestras entre los años 2018 y 2019, mientras en el Parque Nacional del Manu se coleccionó 4 muestras de pelo de oso andino en el año 2022. Los detalles específicos, como el lugar de recolección, las coordenadas geográficas y la fecha de recolección, se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 3**

*Colecta de muestras en las dos ANPs*

ANP	Sector	Código de la muestra	ZONA	Coordenadas UTM		FECHA DE COLECTA
				(X, Y)		
PNM	Tres Cruces	TOPNM-04	19L	219916	8548530	26/01/2022
	Kurkorpampa	TOPNM-03		206746	8560558	28/01/2022
	Acjanaco	TOPNM-02		223650	8543646	27/01/2022
	Acjanaco	TOPNM-01		207847	8550114	27/01/2022
SHM	Qorihuayrachina	TOSHM-05	18L	777350	8539923	17/12/2018
	Mandor 1 (muralla inca)	TOSHM-06		767710	8545572	09/06/2019
	Mandor 2	TOSHM-07		766495	8545595	08/06/2019
	Intiwatana	TOSHM-08		763512	8540045	14/12/2018
	Ahobamba	TOSHM-09		763992	8539282	10/06/2019
	Torontoy Palomar	TOSHM-10		777350	8539923	10/06/2019
	San Gabriel 1	-		765607	8545595	-
	San Gabriel 2	-		765607	8545726	-
	Wiñaywayna	-		786276	85410114	-
	Torrepata	-		716120	8539888	-

*Se muestran las coordenadas UTM de los sitios de colecta dentro del Santuario Histórico de Machupicchu y Parque Nacional de Manu.*

## 4.2 TRABAJO DE LABORATORIO

### 4.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL A PARTIR DE PELO DE OSO ANDINO

Se logró extraer ADN total, a partir de muestras no invasivas colectadas. Las concentraciones variaron entre 5,3 ng/μL y 387,58 ng/μL, Se evaluó la pureza del ADN mediante las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 (DeNovix, 2021).

**Tabla 4**

*Concentración y pureza del ADN total extraído*

Código de la muestra	A260/280	A260/230	Concentración	Medida	MUESTRA
TOPNM-1	1,82	2,1	387,6	ng/μl	DNA
TOPNM-2	1,9	1,8	100,5	ng/μl	DNA
TOPNM-3	1,81	1,86	114,0	ng/μl	DNA
TOPNM-4	1,9	2,2	31,5	ng/μl	DNA
TOSHM-5	1,82	2,1	236,3	ng/μl	DNA
TOSHM-6	2	2,2	5,4	ng/μl	DNA
TOSHM-7	1,84	1,9	5,3	ng/μl	DNA
TOSHM-8	1,8	2,1	77,8	ng/μl	DNA
TOSHM-9	1,71	2,2	8,0	ng/μl	DNA
TOSHM-10	1,82	2	37,6	ng/μl	DNA

*Los resultados se encuentran dentro de los rangos permisibles de pureza y concentración (Anexo 6)*

### 4.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADNmt DE OSO ANDINO

Una vez obtenido los amplicones, se midió la concentración y pureza del ADNmt región D-loop, los resultados se visualizan en la tabla 5.

**Tabla 5**

*Concentración y pureza de los amplicones*

Código de la muestra	Concentración	Medida	260/280	260/230	Tipo de Muestra
TOPNM-01PCR	660,4	ng/μl	1,88	2,1	DNAmt
TOPNM-02PCR	309,9	ng/μl	1,84	2,1	DNAmt
TOPNM-03PCR	439,7	ng/μl	1,89	2,1	DNAmt
TOPNM-04PCR	189,1	ng/μl	1,86	2,0	DNAmt
TOSHM-05PCR	187,6	ng/μl	1,89	2,0	DNAmt
TOSHM-06PCR	445,6	ng/μl	1,82	2,1	DNAmt
TOSHM-07PCR	650,8	ng/μl	1,87	2,1	DNAmt
TOSHM-08PCR	180,5	ng/μl	1,87	2,0	DNAmt
TOSHM-09PCR	393,1	ng/μl	1,82	2,0	DNAmt
TOSHM-10PCR	438,8	ng/μl	1,88	2,1	DNAmt

*Todos los amplicones se encuentran dentro de los parámetros establecidos para la absorbancia de 260/280 y 260/230.*

#### 4.2.3 ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES DE ADNmt

Los fragmentos amplificados tuvieron el tamaño de 600pb, los primers fueron específicos para la región hipervariable II del ADN mitocondrial del oso andino.

**Figura 13**

*Electroforesis de los 10 amplicones*



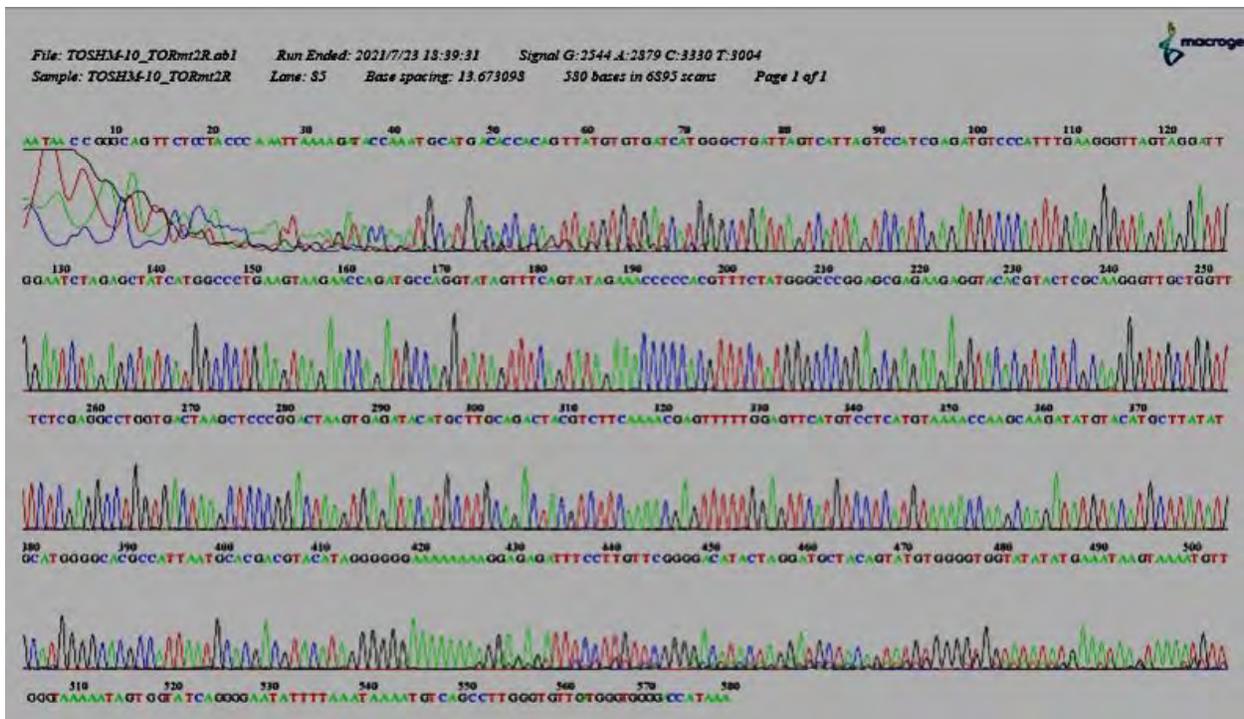
*En la parte superior se observan los pocillos en orden ascendente desde la muestra TOPNM-1 hasta TOSHM-10, los amplicones avanzaron uniformemente hasta la altura de 600 pb.*

#### 4.2.4 SECUENCIAMIENTO DE LA REGION D-LOOP DEL ADNmt DEL OSO ANDINO

Se logró secuenciar mediante el método Sanger, las 10 muestras enviadas de ADNmt amplificado de la región HVII del D-LOOP, las cuales fueron secuenciadas en ambas direcciones (forward y reverse), en la compañía Macrogen de Corea del Sur. La calidad de los datos crudos tuvo una señal clara y definida, con picos bien separados y mínima interferencia de ruido de fondo, secuencia clara, precisa y con una buena separación y forma de los picos correspondientes a las bases A, T, C y G. El tamaño de los fragmentos secuenciados tuvo 580 pb en la gran mayoría. En la figura siguiente se observa los resultados de la secuenciación en formato pdf de la muestra TOSHM-10.

**Figura 14**

*Electroferograma de la muestra TOSHM-10*



Se observa el electroferograma de la muestra TO-SHM-10, los picos de color rojo corresponden a Timina, el color negro corresponde a Guanina, el color verde corresponde a Adenina y el color azul corresponde a Citocina.

### 4.3 OBTENCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE LAS SECUENCIAS CONSENSO

Una vez obtenida las secuencias consenso (Anexo 1), las 10 secuencias consenso fueron sometidos a la confirmación de identidad, mediante el Blast de NCBI. De los cuales 9 tuvieron altos porcentajes de identidad, mayores a 95% para la región D-loop de *Tremarctos ornatus*, lo que sugiere que la secuencia consenso es muy similar a las secuencias de la base de datos, por lo que trata de la misma especie, mientras la muestra TOPNM-1 tuvo un bajo porcentaje de identidad del 83% para el genoma mitocondrial completo de *Tremarctos ornatus*, debido a ello para evitar resultados erróneos, se descartó esta secuencia consenso para análisis posteriores. En la tabla se observa los resultados de Blast de NCBI.

**Tabla 6**  
*Porcentajes de identidad de las secuencias consenso en Blast de NCBI*

Código de la muestra	Descripción	Nombre científico	Máximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Porcentaje de identidad	Adhesión
TOPNM-2	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcial mitocondrial	Tremarctos ornatus	774	774	74%	0	96,97%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOPNM-3	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	747	747	85%	0	95,89%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOPNM-4	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	767	767	85%	0	96,97%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOSHM-5	Tremarctos ornatus aislado HTOQ4 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	749	749	85%	0	96,43%	<a href="#">KX812515.1</a>
TOSHM-6	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	725	725	75%	0	95,67%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOSHM-7	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	745	745	75%	0	95,89%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOSHM-8	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	745	745	85%	0	95,89%	<a href="#">MT425202.1</a>
TOSHM-9	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcialmitocondrial	Tremarctos ornatus	736	736	75%	0	95,45%	MT425202.1
TOSHM-10	Tremarctos ornatus aislado HTOL1 D-loop secuencia parcial mitocondrial.	Tremarctos ornatus	745	745	85%	0	95,89%	MT425202.1

*El promedio de porcentaje de identidad fue 95.82% de para la región D-loop del ADNmt de Tremarctos ornatus, Fuente (NCBI, 2024).*

### 4.3.1 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS CONCENSO DEL ADNmt DE OSO ANDINO

Como producto del alineamiento se pudo recuperar un total de 540 pb en formato aln, dnd, con los cuales se realizó los análisis posteriores, se muestra un fragmento del alineamiento en la figura 15.

**Figura 15**

*Alineamiento en ClustalX de las secuencias consenso.*



*Se observa los sitios variables dentro del alineamiento de las secuencias consenso de la región D-loop del ADNmt del oso andino.*

### 4.3.2 SITIOS POLIMÓRFICOS DEL ADNmt REGIÓN D-LOOP DEL OSO ANDINO

En total se identificó 21 sitios polimórficos para los individuos muestreados de ambas ANPs. En el Parque Nacional del Manu, se identificó 11 sitios polimórficos (S), todos fueron por sustitución, de los cuales 5 fueron transversiones y 6 transiciones; mientras para el Santuario Histórico de Machupicchu se logró identificar 20 sitios polimórficos, de los cuales fueron 11 transversiones y 10 transiciones, se observa en la siguiente tabla.

**Tabla 7**

*Sitios variables en las secuencias consenso de la región D-loop del ADNmt del oso andino*

SITIOS POLIMORFICOS DE LA REGIÓN D-LOOP DEL ADNmt DE <i>Tremarctos ornatus</i>																							
POSICIÓN	13	21	27	30	32	39	50	61	66	69	84	188	202	248	306	324	358	429	486	495	504	TOTAL, DE SITIOS POLIMORFICOS	
SECUENCIA BASE	G	T	T	C	A	G	T	T	C	A	C	C	G	A	A	A	A	A	G	C	C		
TOSHM-8																						0	
TOSHM-9																						0	
TOSHM-6				A						A												2	
TOSHM-10	C			A			C															3	
TOSHM-7								A		A										C		3	
TOPNM-3											A						G			C		3	
TOPNM-4	C	C	C									G		G				G				6	
TOPNM-2	C						C					G			G	G	G	G				7	
TOSHM-5					T	C				T	T		G	T	G			G	G		T	T	11
	parte inicial 11 sitios											parte intermedia 6 sitios						parte final 4 sitios				X=3.8	

*En la parte inicial posee mayores sitios variables mientras la parte final solo presenta 4.*

La probabilidad de encontrar nucleótidos como citocina tanto en el PNM y SHM oscilan entre el 25% – 26 %, mientras para el nucleótido Timina se encuentra por 30%, en cambio, para la Adenina en ambas poblaciones se encuentra en 26%, finalmente, para el nucleótido Guanina oscila entre el 16 a 17%, dichos datos se encuentran en la siguiente tabla.

**Tabla 8**

*Composición nucleotídica de las secuencias consenso de las dos ANPs*

COMPOSICIÓN NUCLEÓTIDICA					
	PNM		SHM		TAMAÑO
BASE	PORCENTAJE		BASE	PORCENTAJE	
C	26,16%		C	25,90%	540 pb
T	30,05%		T	30,37%	
A	26,67%		A	26,82%	
G	17,13%		G	16,91%	
TOTAL	100%		TOTAL	100%	

## 4.4 ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Los índices de diversidad genética se calcularon a partir de las 9 secuencias consenso que tuvieron altos porcentajes de identidad, por encima del 95%.

### 4.4.1 DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA

La diversidad nucleotídica encontrada para los individuos muestreados del Parque Nacional de Manu resultó  $\pi = 0,01358 \pm 0,01091$ , en cambio, para el Santuario Histórico de Machupicchu la diversidad nucleotídica encontrada fue  $\pi = 0,01753 \pm 0,01080$ , ambos resultados mostraron un margen de error por debajo de 0,05 por lo tanto, los resultados son significantes.

### 4.4.2 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA

La diversidad haplotípica para las dos áreas naturales protegidas mostraron los siguientes resultados: para el Parque Nacional del Manu resultó  $Hd = 1 \pm 0,27$ , mientras para el Santuario Histórico de Machupicchu resultó  $Hd = 0,933 \pm 0,1217$ , en ambos resultados el margen de error se encuentra por encima de 0,05, por lo tanto, los resultados no son significantes.

**Tabla 9**

*Procedencia de los haplotipos encontrados*

HAPLOTIPO	CANTIDAD	CÓDIGO DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA	ÁREA NATURAL PROTEGIDA
H1	2	TOSHM-8, TOSHM-9	<i>Ahobamba, Intiwatana</i>	Santuario Histórico de Machupicchu
H2	1	TOSHM-6	<i>Muralla Inca</i>	Santuario Histórico de Machupicchu
H3	1	TOSHM-10	<i>Torontoy Palomar</i>	Santuario Histórico de Machupicchu
H4	1	TOSHM-7	<i>Mandor</i>	Santuario Histórico de Machupicchu
H5	1	TOPNM-3	<i>Kurkurpampa</i>	Parque Nacional de Manu
H6	1	TOPNM-4	<i>Tres Cruces</i>	Parque Nacional de Manu
H7	1	TOPNM-2	<i>Acjanaco</i>	Parque Nacional de Manu
H8	1	TOSHM-5	<i>Qoriwayrachina</i>	Santuario Histórico de Machupicchu

*Se observa los haplotipos encontrados y su procedencia, el haplotipo con mayor frecuencia es el haplotipo 1, las muestras que corresponden a dicho haplotipo son TOSHM-8 y TOSHM-9 pertenecientes al SHM.*

#### 4.4.3 TEST DE NEUTRALIDAD (D)

Para el Parque Nacional del Manu resultó  $D = -0,4072 \pm 0,069$ , mientras para el Santuario Histórico de Machupicchu resultó  $D = -1,0636 \pm 0,031$ , los resultados obtenidos para ambas áreas naturales protegidas indican, que solo del SHM es significativo, porque el margen de error se encuentra por debajo de 0,05, mientras del PNM se encuentra por encima del margen de error, lo que no apoya los resultados obtenidos, aparentemente los individuos muestreados estarían en un crecimiento o expansión en ambas ANPs.

#### 4.4.4 ESTRUCTURA POBLACIONAL

El estadístico  $F_{st}$ , determinó la estructura poblacional, entre los individuos muestreados del Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu, mostrando un valor  $F_{st} = 0,04853$ , el  $F_{st}$  corregido resultó  $F_{st} = 0,0546$ , Asimismo, para corroborar los resultados del  $F_{st}$ , se calculó el índice  $N_{st} = 0,04774$ , dichos resultados indican aparentemente que entre los individuos muestreados de ambas ANPs habría una moderada estructuración.

En la siguiente tabla se observa el resumen de los índices de diversidad genética encontrados para cada ANPs, donde (n: número de secuencias,  $\pi$ ): diversidad nucleotídica, S: número de sitios polimórficos,  $H_d$ : diversidad haplotípica, h: número de haplotipos, SD: desviación estándar o margen de error, D: Tajima test,  $F_{st}$ ,  $G_{st}$ : test para determinar la estructuración poblacional.

**Tabla 10**

*Índices estimados para determinar la diversidad genética y flujo genético*

ANP	CÓDIGO	n	$\pi$	SD	s	h	$H_d$	SD	Tajima D	SD	FST	Nst
PARQUE NACIONAL DE MANU	PNM	3	0,01358	+/- 0,0109	11	3	1	+/- 0,27	-0,4072	+/- 0,069	0,0546 +/- 0,0007	0,04774
SANTUARIO HISTÓRICO DE MACHUPICCHU	SHM	6	0,01753	+/-0,0108	20	5	0,933	+/- 0,12	-1,06365	+/- 0,031	0,0546 +/- 0,007	0,04774

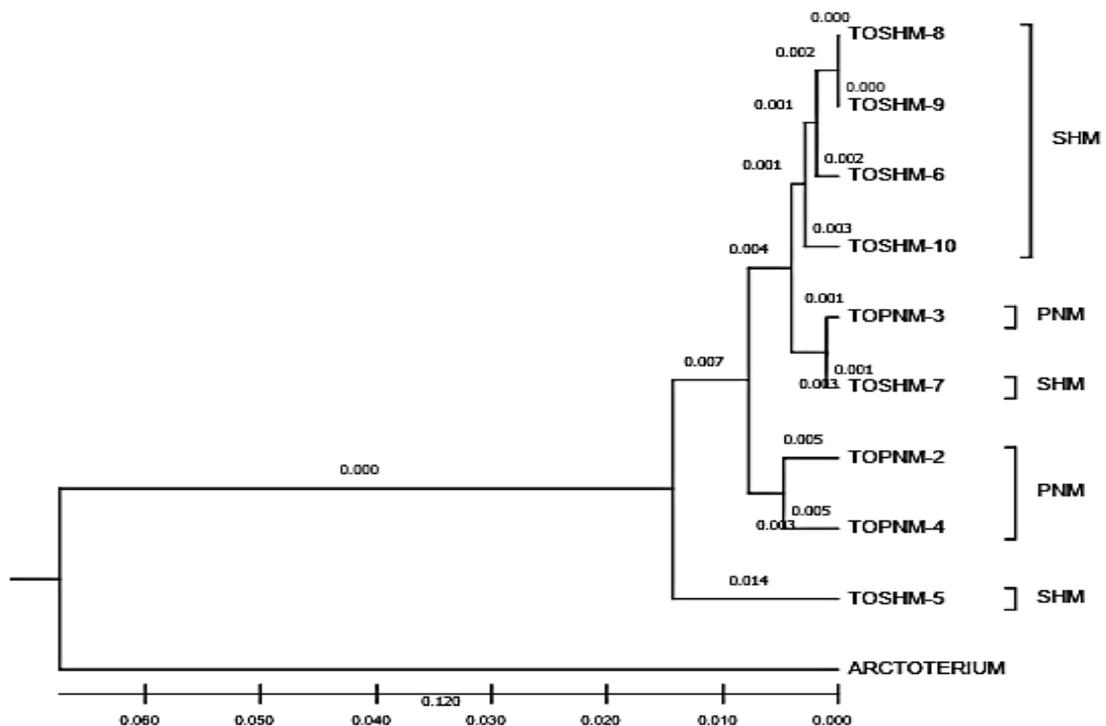
*Los índices  $\pi$ ,  $H_d$ , D se estimaron para determinar la diversidad genética,  $F_{st}$  y  $G_{st}$  para determinar flujo génico.*

#### 4.4.5 FILOGENIA DE OSO ANDINO DEL PNM Y SHM

En el diagrama, se observa el árbol filogenético, donde se observa 5 ramas y 5 nodos, el haplotipo más antiguo es TOSHM-5, a partir de ella se originaron los demás haplotipos, la mayor distancia genética existente se da entre el haplotipo TOSHM-8 y TOSHM-5, además de ello se utilizó como grupo externo el *Arctotherium sp.*

#### Figura 16

Árbol de filogenia a partir de región D-loop del ADNmt de los osos muestreados



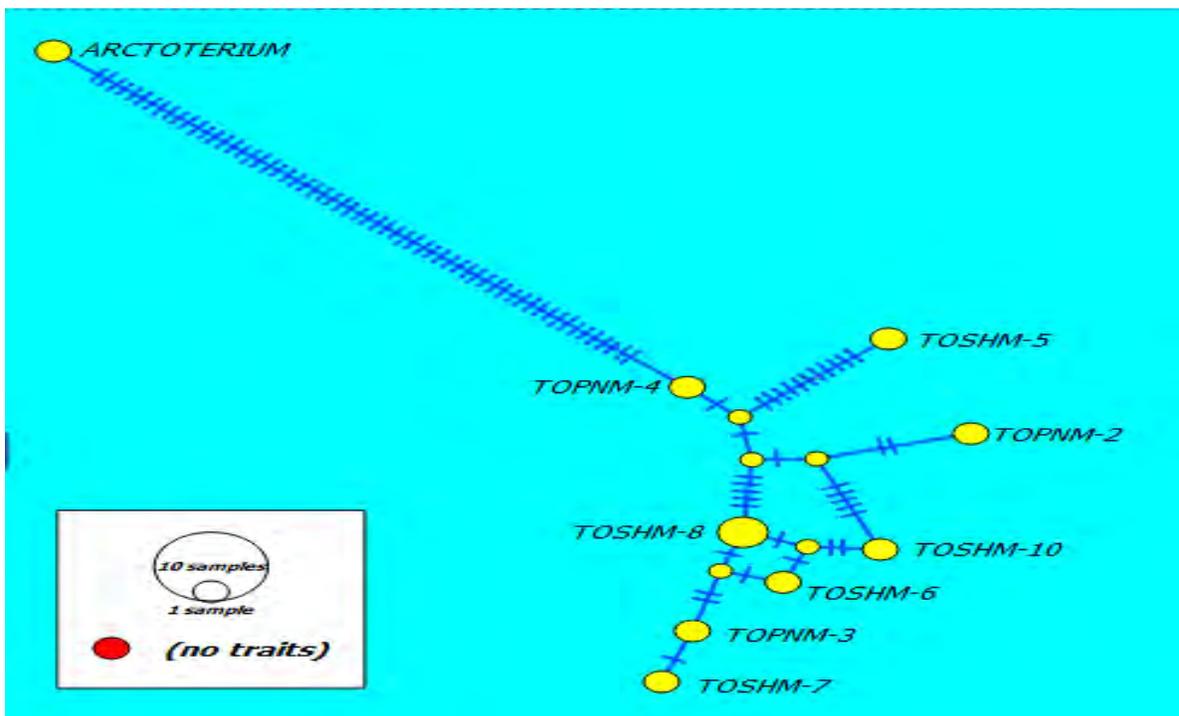
#### 4.4.6 RED DE HAPLOTIPOS ENCONTRADOS

En la red, cada guion representa un nucleótido, gracias a ello se observa de manera ramificada las distancias genéticas de los 8 haplotipos, y el grupo externo *Arctotherium*, la mayor distancia genética se observa entre el haplotipo TOSHM-8 y el haplotipo TOSHM-5. Mientras la menor distancia genética se observa entre el haplotipo TOSHM-8 y TOSHM-9. Asimismo, en la red se observa 5 haplotipos intermedios, los que originaron a los haplotipos encontrados en la

presente investigación. En esta investigación se encontraron 7 nuevos haplotipos los que se observan en el gráfico.

**Figura 17**

*Red de haplotipos a partir de la región D-loop del ADNmt de los osos del PNM y SHM.*



*Se observa una red ramificada con haplotipos intermedios*

**Tabla 11**

*Distancias genéticas entre los individuos muestreados.*

DISTANCIAS GENÉTICAS								
	TOSHM-8	TOSHM-9	TOSHM-6	TOSHM-10	TOPNM-2	TOPNM-3	TOPNM-4	TOSHM-7
TOSHM-8								
TOSHM-9	0,0000							
TOSHM-6	0,0037	0,0037						
TOSHM-10	0,0056	0,0056	0,0056					
TOPNM-2	0,015	0,015	0,0188	0,0131				
TOPNM-3	0,0056	0,0056	0,0056	0,0112	0,0169			
TOPNM-4	0,0131	0,0131	0,0169	0,015	0,0093	0,015		
TOSHM-7	0,0075	0,0075	0,0075	0,0131	0,0188	0,0019	0,0169	
TOSHM-5	0,0226	0,0226	0,0265	0,0284	0,0227	0,0246	0,0207	0,0265

*La mayor distancia genética se da entre TOSHM-5 y TOSHM-8, en cambio la menor distancia genética se dio entre TOSHM-8 y TOSHM-9.*

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

#### 5 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN extraído a partir de muestras de pelos de oso andino utilizando el kit de extracción Monarch Genomic DNA Purification Kit de New England Biolabs presentó concentraciones entre 5,3 y 387 ng/ $\mu$ L, con una pureza para la relación de absorbancia de 260/280 de 1,7 a 2. En el estudio previo realizado por Bruque en 2016, quien analizó 13 muestras de pelo de oso andino en el Norte de Ecuador, obtuvo concentraciones desde 0,2 hasta 12,3 ng/ $\mu$ L con el Kit Dneasy Blood & Tissue Mini Spin Column.

Trabajar con muestras no convencionales fue crucial en la investigación del oso andino, por diversas razones fundamentales. El uso de muestras no invasivas permitió explorar aspectos poco estudiados y demostró su aplicabilidad en una variedad de contextos y situaciones. Este enfoque no solo impulsó la innovación metodológica al desarrollar nuevos métodos de recolección de datos, sino que también aumentó significativamente la relevancia práctica del estudio. Las muestras no invasivas proporcionaron información crucial sobre la diversidad genética del oso andino, siendo igualmente relevantes que las muestras convencionales, pero sin poner en riesgo la vida de la especie ni requerir los recursos intensivos asociados con la captura directa. Este método es especialmente recomendable para estudios de diversidad genética en especies en peligro o vulnerables, como el oso andino, debido a su aplicación práctica y eficiencia en la recolección de datos.

## 5.1 IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS CONSENSO

Las secuencias consenso obtenidas para la región D-loop del ADNmt de *Tremarctos ornatus* (oso andino) fueron comparadas con la base de datos del NCBI, mostrando una identidad superior al 95%. Este alto porcentaje de identidad es significativo, dado que la longitud de la secuencia consenso es de 540 pares de base (pb), una longitud suficiente para realizar comparaciones fiables con la base de datos del NCBI. La alta identidad observada reduce la probabilidad de que los resultados sean atribuibles al azar, proporcionando una base sólida para la identificación de la especie. La precisión de la identificación también está influenciada por la calidad y la cobertura de la base de datos utilizada en el análisis BLAST. Bases de datos más completas y actualizadas permiten una identificación más precisa de las secuencias.

Un alineamiento extenso con alta identidad ofrece una evidencia más robusta para la identificación de la especie. Por otro lado, alineamientos cortos pueden no ser suficientes para una identificación precisa, incluso si el porcentaje de identidad es alto.

Aunque se recomienda que el porcentaje de identidad para una identificación precisa a nivel de especie supere el 98%, en este caso no se alcanza ese umbral debido a la alta variabilidad de la región D-loop del ADNmt del oso andino. Esta región, también conocida como la región de control, es propensa a acumular mutaciones a lo largo del tiempo por varias razones. En primer lugar, la región D-loop no codifica proteínas, por lo que las mutaciones en esta área no afectan directamente la estructura o función de las proteínas mitocondriales esenciales, permitiendo una acumulación más libre de mutaciones en comparación con las regiones codificantes. Además, la región D-loop contiene elementos reguladores cruciales para la replicación y transcripción del ADNmt, lo que puede influir en la tasa de mutación y en la variabilidad genética observada entre diferentes

individuos del oso andino. Por lo tanto, la variabilidad en la región D-loop del ADNmt del oso andino impide alcanzar un 100% de identidad con la base de datos del NCBI debido a las acumulaciones naturales de mutaciones en respuesta a presiones evolutivas y ambientales.

## 5.2 ÍNDICE DE DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA

En relación con los hallazgos de los índices de diversidad para ambas Áreas Naturales Protegidas (ANPs), se observó que el valor de  $\pi$  en este estudio fue el siguiente:  $\pi = 0,01358 \pm 0,01091$  para el Parque Nacional del Manu, y  $\pi = 0,01753 \pm 0,01080$  para el Santuario Histórico de Machu Picchu. Los márgenes de error de los resultados obtenidos para el SHM y PNM son inferiores a 0,05, lo que indica que estos hallazgos son estadísticamente significativos.

Estudios previos, como el realizado por Bruque (2016), revelaron un valor de  $\pi = 0,0122$  para el corredor ecológico del oso andino en Ecuador. En contraste, Arias (2017) encontró un valor de  $\pi = 0,0118$  para el grupo de los Andes del Sur, que incluye el sur peruano y osos del norte de Bolivia. Otro estudio llevado a cabo por Moreta (2020) mostró un valor de  $\pi = 0,00691$  en el sur de Ecuador. Además, Cueva et al. (2018) reportaron  $\pi = 0,0019$ , mientras que Ruiz-García et al. (2020) obtuvieron  $\pi = 0,0104$  para la población total de osos en Ecuador.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta investigación para el Santuario Histórico de Machu Picchu y el Parque Nacional del Manu, se observa una ligera diferencia en los valores de diversidad nucleotídica. Los resultados indican una ligera diferencia en ambas áreas protegidas en comparación con los reportados por otros investigadores. Sin embargo, los valores encontrados siguen estando por debajo de 0,5, lo que sugiere que la diversidad nucleotídica encontrada en la zona de estudio sigue considerándose baja. Este patrón sugiere que los osos han acumulado mutaciones en la región D-loop del ADN mitocondrial a lo largo del tiempo.

Además, estudios como el de Arias (2017) respaldan esta idea, al indicar que los osos de los Andes del Sur tienen una mayor acumulación de mutaciones, lo que puede explicar por qué las poblaciones en estudio presentan una ligera diferencia en cuanto a la diversidad nucleotídica, que las reportadas por otros autores.

### 5.3 ÍNDICE DE DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA

Los resultados de diversidad haplotípica obtenidos en esta investigación muestran un valor máximo de  $Hd = 1 \pm 0,27$  para el Parque Nacional del Manu y  $Hd = 0,933 \pm 0,1217$  para el Santuario Histórico de Machu Picchu. En comparación a estudios previos realizados en Ecuador, Colombia y Venezuela presentaron los siguientes resultados, Bruque (2016) encontró  $Hd = 0,7051$  para osos andinos en Ecuador, mientras que Arias (2017) reportó  $Hd = 0,935$  para el sur peruano y norte de Bolivia basado en 36 individuos. Otros estudios como el de Moreta (2020) identificaron  $Hd = 0,526$  en osos de Ecuador, y Cueva (2018) registró  $Hd = 0,705$  también en Ecuador. Por último, Ruiz-García et al. (2020) obtuvieron  $Hd = 0,895$  para los osos de Ecuador y Colombia.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, se observa una variación en los valores de diversidad haplotípica, siendo el único valor similar el reportado por Arias (2017) de  $Hd = 0,935$  para osos del sur peruano y norte de Bolivia. Esto sugiere que los individuos muestreados tanto en PNM como en SHM han experimentado un cuello de botella genético, lo cual implica que ha pasado suficiente tiempo para recuperar la diversidad haplotípica, pero no lo suficiente para acumular mutaciones en la región D-loop del ADN mitocondrial del oso andino.

La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) es una medida de la variabilidad genética en una población, indicando la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar posean haplotipos diferentes.

Un valor de Hd igual a 1 refleja una alta variabilidad genética. En el contexto específico de la región D-loop del ADN mitocondrial del oso andino, esta alta diversidad haplotípica podría explicarse por varios factores: Los osos andinos podrían haber tenido una diversidad genética considerable desde el principio, sugiriendo una población originalmente diversa, la segunda explicación podría ser que los osos muestreados podrían estar divididos en múltiples subpoblaciones con poco flujo genético entre ellas, lo que favorecería la diversidad haplotípica dentro de cada grupo, la tercera explicación es que la región D-loop del ADN mitocondrial es conocida por su alta tasa de mutación, lo que contribuye a la generación de numerosos haplotipos distintos. Otra de las posibles explicaciones podría deberse al tamaño poblacional grande que posee el Perú más de 5750 individuos, esto haría que se mantenga y generen nuevos haplotipos, lo cual puede contribuir a una alta diversidad haplotípica.

Ambas Áreas Naturales Protegidas se encuentran en la parte central del corredor biológico de Vilcabamba-Amboro, donde la continuidad de ecosistemas facilita el desplazamiento y la expansión poblacional del oso andino. Estos factores también pueden contribuir significativamente para explicar la máxima diversidad haplotípica encontrada en esta investigación. En el caso particular de la región D-loop del ADN mitocondrial del oso andino, la combinación de una alta tasa de mutación en esta región y eventos históricos de mezcla genética probablemente han sido factores clave para alcanzar una diversidad haplotípica tan elevada.

#### **5.4 TEST DE NEUTRALIDAD**

Los resultados del test de neutralidad, o test de Tajima D, para el Parque Nacional del Manu mostraron un valor negativo ( $D = -0,4072 \pm 0,069$ ), mientras que para el Santuario Histórico de Machu Picchu también se observó un valor negativo significativo ( $D = -1,06365 \pm 0,031$ ). Estos

resultados sugieren que los individuos muestreados en ambas Áreas Naturales Protegidas (ANPs) están experimentando un proceso de expansión.

El test de Tajima D evalúa la variación nucleotídica observada frente a la variación esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Un valor de D igual a cero ( $D = 0$ ) indica que no hay evidencia de selección; valores negativos ( $D < 0$ ) sugieren un exceso de alelos raros, lo cual es característico de una población en expansión. Por otro lado, valores positivos ( $D > 0$ ) indican una ausencia de alelos raros, asociada a una contracción poblacional.

En investigaciones previas realizadas por otros científicos, se encontraron diversos valores de D para poblaciones de osos andinos en diferentes regiones. Por ejemplo, Bruque Gutiérrez (2016) reportó  $D = -0,53$  para osos en el Distrito Metropolitano de Quito. Arias Vásquez (2017) encontró  $D = -0,084$  para osos del sur peruano y norte de Bolivia, mientras que Moreta (2020) identificó un  $D = +2,26$  para osos en el sur de Ecuador. En otro estudio, Ruiz-García et al. (2020) reportaron  $D = -2,39$  para la población de osos en Ecuador.

Comparando estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, los resultados muestran que los osos andinos del PNM y SHM está experimentando un período de crecimiento y expansión. Este proceso conlleva a la acumulación de mutaciones y la generación de nuevos alelos, lo que eventualmente resulta en índices de diversidad genética altos. Como han indicado Arias (2017) y Ruiz-García et al. (2020) en sus estudios, existen dos poblaciones claramente definidas de osos andinos, cuya divergencia se estima ocurrió hace aproximadamente 300,000 años durante el Pleistoceno. La población del norte incluye osos de Ecuador, Colombia, Venezuela y el norte y centro de Perú, mientras que el grupo del sur está compuesto por osos del sur peruano y norte de Bolivia.

Según los resultados de esta investigación, los osos muestreados en el PNM y SHM han acumulado mutaciones en la región D-loop del ADN mitocondrial durante un período más prolongado, lo que coincide con su estado de expansión y la formación de nuevos haplotipos en estas áreas protegidas.

## **5.5 ESTRUCTURACIÓN DE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS**

Los hallazgos de esta investigación revelan una moderada estructuración entre los individuos muestreados de ambas Áreas Naturales Protegidas (ANP), con un valor de  $F_{st} = 0,04853 \pm 0,0007$ . Considerando un factor de corrección  $n/n-1$  debido al número limitado de individuos muestreados, el valor corregido de  $F_{st}$  sería  $F_{st} = 0,0546$ . Este resultado apoya los hallazgos de altos índices de diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y bajos índices de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). Sugiere una moderada estructuración y bajo flujo genético entre ambas ANPs, respaldado por la red de haplotipos y el árbol filogenético. Por ejemplo, el individuo TOSHM-7 comparte características genéticas con TOPNM-3 a pesar de ser de ANPs distintas, mientras que TOPNM-2 y TOPNM-4 comparten características y pertenecen a una sola ANP, al igual que TOSHM-6 y TOSHM-10, y TOSHM-8 y TOSHM-9.

Estos patrones podrían sugerir que los individuos muestreados siguen un modelo de especiación parapátrica, donde dos poblaciones están geográficamente adyacentes, pero tienen una zona de contacto limitada. Este tipo de especiación implica la formación de nuevas especies con una zona de contacto, donde el flujo génico es bajo. En el presente estudio, el bajo flujo génico observado entre los individuos muestreados de ambas ANPs podría atribuirse a barreras naturales como cordilleras y ríos (Urubamba y Paucartambo) entre las ANPs, limitando el contacto genético a pesar de su proximidad geográfica en el corredor biológico Vilcabamba – Amboró. Además, la

capacidad del oso andino de desplazarse hasta 50 km por día facilitaría el contacto, a pesar de que la distancia lineal entre las dos ANPs es de 70 km y aproximadamente 150 a 180 km considerando las curvas de nivel. Este patrón sugiere que los osos andinos podrían seguir un modelo de especiación parapátrica, donde dos poblaciones geográficamente adyacentes pero separadas por barreras naturales mantienen un contacto genético limitado. Las cordilleras y ríos como el Urubamba y Paucartambo actúan como barreras efectivas que restringen la mezcla genética entre los osos andinos del PNM y SHM, a pesar de estar ubicados en el mismo corredor biológico Vilcabamba – Amboró.

En conclusión, la continuidad de ecosistemas y la geografía adyacente de las dos ANPs podrían estar facilitando un punto de contacto genético limitado, apoyando la estructuración moderada y el bajo flujo genético observado en nuestra investigación.

## **5.6 SITIOS POLIMORFICOS**

En total se identificó 21 sitios polimórficos para los individuos muestreados de ambas ANPs. Para el Parque Nacional de Manu, se identificó 11 sitios polimórficos (S), de los cuales todas fueron por sustitución: 5 transversiones y 6 transiciones; mientras para el Santuario Histórico de Machupicchu se logró identificar 20 sitios polimórficos, de los cuales fueron 11 transversiones y 10 transiciones, de acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los individuos muestreados del SHM presentan mayores sitios polimórficos que el PNM, asimismo esta diferencia se mantiene largamente con las poblaciones de osos de Ecuador y Colombia. A partir de dichos resultados podemos afirmar que efectivamente la población de osos del área de estudio lleva mayor tiempo acumulando mutaciones que los osos del norte de los andes, un resultado muy similar fue reportado por Arias en el 2017.

## 5.7 RED DE HAPLOTIPOS

En la presente investigación se encontró como dominante al haplotipo 1, cuya secuencia no presenta ninguna mutación en los 540 pb, los individuos muestreados TOSHM-8 y TOSHM-9, pertenecen a este haplotipo, las cuales provienen de Ahobamba e Intiwatana del Santuario Histórico de Machupicchu. Asimismo, se encontró 7 haplotipos únicos H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 los cuales son nuevos para la región D-loop (Anexos).

El haplotipo dominante, H1, destaca por su falta de mutaciones en una región de 540 pares de bases, lo que sugiere una estabilidad genética notable entre los individuos muestreados, específicamente, los individuos TOSHM-8 y TOSHM-9 son portadores de este haplotipo, ambos procedentes de Ahobamba e Intiwatana dentro del Santuario Histórico de Machu Picchu. Además del haplotipo dominante, se identificaron siete haplotipos adicionales (H2 a H8) que son únicos en la región D-loop del ADN mitocondrial. Estos haplotipos representan variantes genéticas nuevas y específicas, lo cual amplía nuestro entendimiento de la diversidad genética dentro del área estudiada. La presencia de múltiples haplotipos únicos sugiere una historia evolutiva compleja y posiblemente aislada respecto a otras. Este hallazgo podría tener implicaciones significativas tanto en términos de conservación genética como en la comprensión de los patrones de migración y colonización histórica en los Andes.

Estos hallazgos sugieren una historia evolutiva compleja y posiblemente aislada de otras poblaciones, lo que podría tener implicaciones importantes para la conservación genética y la comprensión de los patrones históricos de migración y colonización en los Andes centrales.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados de diversidad genética para el Parque Nacional del Manu y el Santuario Histórico de Machu Picchu muestran una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) baja y una alta diversidad haplotípica (Hd), similar a otros estudios realizados en el sur peruano y norte de Bolivia. Estas cifras sugieren que las poblaciones han experimentado un cuello de botella genético, donde ha habido suficiente tiempo para generar nuevos haplotipos, pero no para acumular mutaciones significativas en la región D-loop del ADN mitocondrial. Los valores negativos del test de Tajima D para ambas áreas confirman un proceso de expansión poblacional.
2. El análisis del estadístico Fst reveló una moderada estructuración ( $F_{st} = 0,04853 \pm 0,0007$ ) entre los individuos muestreados en ambas Áreas Naturales Protegidas (ANP), indicando un bajo flujo genético entre ellas. La continuidad de ecosistemas y la geografía adyacente de las dos ANPs genera un punto de contacto genético limitado, apoyando la estructuración moderada y el bajo flujo genético observado en la presente investigación.
3. La investigación revela la presencia predominante del haplotipo H1 sin mutaciones en una región específica del ADN mitocondrial entre los individuos TOSHM-8 y TOSHM-9 de Ahobamba e Intiwatana en el Santuario Histórico de Machu Picchu. Además, se descubrieron siete haplotipos adicionales (H2 a H8) que son exclusivos de la región D-loop, indicando una diversidad genética significativa en esta población.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda aumentar el número de individuos muestreados en ambas áreas protegidas y considerar la utilización de marcadores genéticos nucleares además del ADN mitocondrial para obtener una representación más completa de la diversidad genética y evitar sesgos.
2. Se recomienda la implementación de medidas que promuevan el flujo genético entre las dos ANPs y la evaluación de corredores genéticos viables entre ellas.
3. Se recomienda monitorear continuamente la moderada estructuración y estudiar la efectividad de los corredores biológicos para facilitar el movimiento de los osos y promover el intercambio genético.
4. Se recomienda Promover la educación y sensibilización sobre la importancia de la diversidad genética del oso andino en las comunidades locales, visitantes y responsables de las áreas naturales protegidas, fomentando la colaboración entre diferentes disciplinas científicas y autoridades locales, lo que garantizará que las decisiones de manejo contribuyan efectivamente a la conservación a largo plazo del oso andino.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Abm. (2022). *Manual del Kit SafeView™ Nucleic Acid Stains*. 2.
- Arano, V. (2022). Estructura Genética de *Dipsosaurus dorsalis* (Baird y Girard, 1852) en la península de Baja California. Un estudio comparando secuencias de ADN mitocondrial y Loci Microsatélites. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.*, 91.
- Arias Vásquez, Y. J. (2017). Análisis Filogeográfico del oso andino (*Tremarctos ornatus*) a través de todo su rango geográfico de distribución mediante tres genes mitocondriales. *Tesis de Maestría*, 1(1), 65.
- Arnaudo, E., & Rodriguez, S. (2010). Origen y evolución del oso de anteojos. *X congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía*, 1.
- Bruque Gutierrez, M. G. (2016). Análisis preliminar de diversidad genética de una población de osos andinos (*Tremarctos ornatus*) identificados en el Corredor Ecológico, al Noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito. Universidad San Francisco de Quito USFQ. *Tesis*, 1(1), 53.
- Cabrero, J., & Camacho, J. P. (2003). Fundamentos de genética de poblaciones. En *FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES* (pp. 84-126).
- Cabria, M., Chueca, L., Elejalde, M., Gómez-Moliner, B., Madeira, M., Razquin, O., Ruiz-González, A., & Vergara, M. (2009). Los estudios del ADN como apoyo a la biología de la conservación de la fauna. *Revista Internacional de los Estudios Vascos = Nazioarteko Eusko Ikaskuntzen Aldizkaria = Revue Internationale des Etudes Basques = International Journal on Basque Studies*, 54, 351-386.
- Castellanos, A., & et al. (2011). International Bear News. *International Bear News*, 18(3), 12-14.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.
- Chauca, R. (2018). Los pablitos de paucartambo. *Tesis*.
- Checa Rojas, Al. (2017). *Método : Gel de electroforesis Agarosa*. 0-5.
- Contreras, J., Rojas, M. O., Pinilla, G., & Wasserman, M. (1993). Comparación de métodos para la recuperación de ADN a partir de geles de agarosa. *Biomédica*, 13(3), 124. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v13i3.2057>
- Cristina, C. D. C., Canteros, E., Casas, A., Castañeda, A., Amanda, S., René, C., Omar, C.,

- Delgado, C. P., Luis, P. D., Ana, E. E., Escalante, E., Espinoza, B., Fleury, A., Flores, S., Gladis, R., Jorge, F., Islas, V., Esperanza, V., Fernando, M., ... Daniel, B. B. (2008). *La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. I*, 437-494.
- Cueva, D. F., Gutierrez, B., Bruque, G., M, S. M., Ursus, F., Cueva, D. F., & Gutiérrez, B. (2018). ADN mitocondrial revela baja diversidad genética en ecuatoriano Osos andinos. *BioOne research evolved*, 29(1), 43-50.
- Del Moral, J., & Lameda, F. (2011). Registros de ocurrencia del oso andino (*Tremarctos ornatus* Cuvier, 1825) en sus límites de distribución nororiental y austral. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat., n.s.*, 13(1): 7-1(1853-0400).
- DeNovix. (2021). *DS-11 Spectrophotometer User Guide*. info@denovix.com
- EDVOTEK. (2016). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. *The Biotechnology Education Company*, 16. www.edvotek.com/safety-data-sheets
- Eguiarte, L., & Souza, V. (2010). *El flujo génico y la estructura de las poblaciones. GENETICA DE POBLACIONES*. 1-28. <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/5flujoFIN2.pdf>
- Elgvin, T. O., Trier, C. N., Tørresen, O. K., Hagen, I. J., Lien, S., Nederbragt, A. J., Ravinet, M., Jensen, H., & Sætre, G. (2017). *The genomic mosaicism of hybrid speciation*. June, 1-16.
- Fernandez, E. (2005). Polimorfismos de DNA Mitocondrial en Poblaciones Antiguas de la Cuenca Mediterránea, Tesis Doctoral en la Universidad de Barcelona. En *Tesis Doctoral*.
- Figueroa. (2013). Composición de la dieta del oso andino *Tremarctos ornatus* (Carnivora: Ursidae) en nueve áreas naturales protegidas del Perú. *Therya*, 4(2), 327-359. <https://doi.org/10.12933/therya-13-108>
- Figueroa. (2015). New records of parasites in free-ranging Andean bears from Peru. *Ursus*, 26(1), 21-27. <https://doi.org/10.2192/ursus-d-14-00034.1>
- Figueroa, J. (2005). *Habitat use and diet of the Andean bear (Tremarctos ornatus) in the Yanachaga Chemillén National Park, Perú*. 1.
- Figueroa, J. (2013). *El hermano oso andino - Su presencia en la cultura de América. Asociación para la Investigación y Conservación de la Biodiversidad (AICB)*. Lima, Perú. 195.
- Figueroa, J. (2014). Tráfico de partes e individuos del oso andino *Tremarctos Ornatus* en el Perú. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(147), 177-190. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.62>

- Figuroa, J., & AICB. (2012). *Presencia del oso andino Tremarctos ornatus (carnivora: ursidae) en el bosque tropical amazónico del Perú*. 28(3), 594-606.
- Figuroa, Judith. (2012). Presencia del oso andino tremarctos ornatus (carnivora: ursidae) en el bosque tropical amazónico del Perú. *Acta Zoológica Mexicana*, 28(3), 594-606.
- Figuroa, Judith, & Stucchi, M. (2013). Presencia del oso andino Tremarctos ornatus (Carnivora: Ursidae) en el Corredor de Conservación Vilcabamba–Amboró, sureste del Perú. *Therya*, 4(3), 511-538. <https://doi.org/10.12933/therya-13-169>
- Figuroa, Judith, Stucchi, M., & Rojas-Verapinto, R. (2016). Modelación de la distribución del oso andino Tremarctos ornatus en el bosque seco del Marañón (Perú). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.008>
- Figuroa, & Stuchi, M. (2012). Algunos aspectos etológicos del *Tremarctos ornatus* (cuvier, 1825) (carnivora: ursidae) “oso andino” en cautiverio. *Saudi Med J*, 33, 210-347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Fontdevila, A., & Moya, A. (1999). Introducción a la genética de poblaciones, Antonio Fontdevila, Andrés Moya. En *Ciencias*.
- Fresia, P., Cristina, J., & Goñi, B. (2007). Primer análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax* en animales domésticos del Uruguay. <https://www.researchgate.net/publication/281445561>, September 2015.
- Fu, Y.-X., & Li, W. (1993). *Statistical Tests of Neutrality of Mutations*. 17.
- García, M. R., Murillo, A., Corrales, C., Aleán, N. R., & Prada, D. Á. (2007). *Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes*. 2(43), 115-130.
- Garrido-Pérez, E. (2020). La Biogeografía de Islas. *Investigación y Pensamiento Crítico*, 8(1), 84-92. <https://doi.org/10.37387/ipc.v8i1.128>
- Gómez Ochoa de Alda, J., Esteban Gallego, R., & Marcos-Merino, J. M. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: diseño, implementación y validación de una intervención activa interdisciplinar. *Educación Química*, 30(1), 42. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.67658>
- Gonzalez, M. A., & Arenas-castro, H. (2017). Recolección de tejidos Biológicos para análisis genéticos. En *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt* (Primera Ed). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-49824-4>

- Gutierrez, F. (2004). Conceptos básicos de genética de poblaciones. *Cornell University*, 3, 47.
- Holsinger, K. E., & Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 639-650. <https://doi.org/10.1038/nrg2611>
- Huaypar Loayza, K. (2018). Ocupación del oso andino (*Tremarctos ornatus*, Cuvier 1825) en el área de conservación regional Choquequirao , Cusco. *Tesis*.
- Huerta, A., & Centeno-Cuadros, A. (2021). *Aplicaciones de las técnicas de ADN Ambiental Al Estudio Y Conservación De Los Recursos Naturales*. December 2020, 6-14.
- Illana, J. C. (2014). Biología molecular y estructura del ADN. *Análisis de Química de la RSEQ*, 110(3), 234-234. <https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/564>
- Jiangzuo, Q., & Flynn, J. J. (2020). The Earliest Ursine Bear Demonstrates the Origin of Plant-Dominated Omnivory in Carnivora. *iScience*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101235>
- Jimenez, P., & Collada, C. (2000). *Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación*. 2, 237-248.
- Kitada, S., Kitakado, T., & Kishino, H. (2007). Empirical bayes inference of pairwise FST and its distribution in the genome. *Genetics*, 177(2), 861-873. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.077263>
- Lardoeyt, R. (2016). *Fundamentos de Genética Médica Poblacional* (D. B. Álvarez (ed.); EDITORIAL).
- Lessa, E. (2005). *Guía de estudio de genética de poblaciones*. Facultad de ciencias, laboratorio de evolución, Montevideo, Uruguay. 75.
- Loo, J. A. (2011). *Manual de genética de la conservación Principios aplicados de genética* (Primera Ed).
- Mantella, M., & Hohl, D. M. (2021). CAPÍTULO 6: Genética de poblaciones. *Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas*, 109-132.
- MINAM. (2015). Guía de inventario de la fauna silvestre/Ministerio del Ambiente, Dirección General de Evaluación, Valoración y Financiamiento del Patrimonio Natural. -- Lima. En *Lima*. <http://www.minam.gob.pe/patrimonio-natural/wp-content/uploads/sites/6/2013/10/GUÑA-A-DE-FAUNA-SILVESTRE.compressed.pdf>
- Miranda, M., Cañon, J., Hanset, R., Williams, J., & Dunner, S. (2000). *Identificación de los*

- distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovina europeas. Figura 1, 4-6.*
- Molina. (2015). INFORME FINAL Estudio preliminar sobre la variabilidad genética del oso andino al nor occidente del DMQ, y monitoreo participativo de la población de osos identificada en el corredor ecológico. Fondo Ambiental - Secretaría de Ambiente del Municipio del Di. *INFORME FINAL, 1(1)*, 1-30.
- Montalvo Navarro, C. A., & Lugo Flores, M. A. (2019). Electroforésis: Fundamentos, Avances Y Aplicaciones. *Epistemus, 13(26)*, 48-54. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v13i26.96>
- Moreta, E. A. (2020). Estudio de la diversidad genética del oso andino en el sur de la Sierra ecuatoriana mediante el análisis de la región D-Loop del ADN mitocondrial. Universidad San Francisco de Quito USFQ Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. *Tesis, 0(0)*, 47.
- Museum, T. F., Field, T., (CEDIA), C. para el D. del I. A., Herbario Vargas, U. N. S. A. A. del C., Marcos, M. de H. N. de la U. N. M. de S., & Centro de Conservación, I. y M. de Á. N. (CIMA-C. A. (2004). *Perú: Megantoni, Rapid Biological Inventories Report 15. Chicago, Illinois: The Field Museum.* (D. M. y/and J. S. Corine Vriesendorp, Lelis Rivera Chávez (ed.)). rapid biological inventories reports are published by.
- Nardelli, M., Túnez, J. I., Centrón, D., & Cassini, M. H. (2011). Técnicas de Muestreo no Invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia, 36*, 404-411.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(10)*, 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- New England BiolLabs Inc. (2021). Monarch ® Genomic DNA Purification Kit Table of Contents. Manual. *Instruction Manual*, 1-24.
- Padilla, C., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J., & García, C. (2011). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1-8.
- Paz, C., & López, A. (2014). *Genética Molecular y Citogenética Humana*.
- Península, L. A., Yucatán, D. E., & Pech, M. H. (2020). *Flujo genético e introgresión entre poblaciones domesticadas y silvestres del frijol lima (Phaseolus lunatus l.)*. [https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1859/1/PCB\\_M\\_Tesis\\_2020\\_Mauricio\\_Heredia\\_Pech.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1859/1/PCB_M_Tesis_2020_Mauricio_Heredia_Pech.pdf)
- Peyton, B. (1999). Status survey and conservation action plan. *IUCN*, 1-311.

- Pinzón, A. (2007). Introducción a la Bioinformática. *Centro de Bioinformática Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia*, 39.
- Portillo, T., Pérez, B., & Hernandez, M. (2022). Una Introducción a la Bioinformática. *Mensaje Bioquímico*, 46, 1-12. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Quispe-Mamani, R. (2016). *Estudio preliminar de la ecología del oso andino (Tremarctos ornatus) en el sector de Llaqtapata , cc . Totorani-Cusco, Universidad Nacional de San Antonio Abad, seminario de investigación.*
- Ríos-sánchez, E., Calleros, E., González-zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez-morales, R. (2016). *Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana*. 26(4), 56-65. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
- Rodriguez, R., Sortibrán, A., Guadalupe, M., & Téllez, O. (2016). *Conceptos básico de la genética* (M. P. Valls. (ed.); Primera ed). <https://recursos.db.uanl.mx/img/books/downloads/Conceptosbasicosdegenetica.pdf>
- Rojas-Verapinto, R., Zegarra, R., Gutierrez, R., & Beraun, Y. (2019). *Conviviendo con el oso andino en el Perú. Diagnostico y Pautas para el Manejo de los Conflictos Humano - Oso.: Vol. I.*
- Ruiz-García, M. (2007). . INTRODUCCIÓN 1.1. Teoría y dificultades Genética de poblaciones: Teoría y aplicación a la conservación de mamíferos neotropicales (oso andino y delfin rosado) Genetics of populations: Theory and application to the conservation of neotropical mammals (An. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol, 102(4), 99-126.
- Ruiz-garcía, M., Castellanos, A., Arias-vásquez, J. Y., Castellanos, A., Arias-vásquez, J. Y., Mark, J., Genética, S., Ruiz-garc-ia, M., B, A. C., Yanina, J., & Mark, J. (2020). *Genética del oso andino ( Tremarctos ornatus ; Ursidae , Carnivora ) en Ecuador : cuando las Cordilleras Andinas no son un Obstáculo. 1394*. <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1769088>
- Ruiz-García, M., Castellanos, A., Arias-Vásquez, J. Y., & Shostell, J. M. (2020). Genetics of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*; *Ursidae*, *Carnivora*) in Ecuador: when the Andean Cordilleras are not an Obstacle. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 31(5), 190-208. <https://doi.org/10.1080/24701394.2020.1769088>
- Ruiz-García, M., & Payan, E. (2003). *Genética de Poblaciones molecular aplicada al estudio de dos grandes carnívoros ( Tremarctos ornatus – Oso andino ... December.*

- Ruiz-garcía, M., & Ruiz-garcía, M. (2007). *Genética de Poblaciones : Teoría y aplicación a la conservación de mamíferos neotropicales ( Oso andino y delfín rosado )*. December 2007.
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2019). BIOLOGIA MOLECULAR: Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Número 9). [www.mhhe.com/med/salazar\\_bmfa1e](http://www.mhhe.com/med/salazar_bmfa1e)
- Sanger, F., & Nicklen, S. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating*. 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanger, Frederick. (1988). *SEQUIJENCES , SEQUENCES , AND*.
- Scotto, C., & Valdivia, R. (2000). Sistema mitocondrial animal (sismit): A computing software based in the molecular analysis of mitochondrial genomes of vertebrates. *Revista Peruana de Biología*, 7(1), 74-82.
- SERFOR. (2016). *Plan Nacional para la Conseracion del Oso Andino (Tremarctos ornatus).Periodo 2016-2026* (Vol. 1).
- SERFOR. (2019). *Plan Nacional de Conservación del oso andino en el Perú del 2019 - 2029*.
- SERNANP, GOBIERNO REGIONAL CUSCO, WCS, & INKATERRA. (2014). *Estrategia para la conservación del oso andino en el Santuario Histórico de Machupicchu y el área de conservación regional Choquequirao Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado-SERNANP Gobierno Regional del Cusco Wildlife Conservation*.
- Silva, A., Artiles, A., Suárez, W., & Silva, G. (2011). Secuencia y estructura de la región control mitocondrial del roedor Cubano *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae). *Biotecnología Aplicada*, 28(3), 130-141.
- Soibelzon, L. H. (2002). Los osos de América del Sur. *Museo de la Plata*, 3, 71-74. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/49826>
- Strathern, P. (2017). Crick, Watson y el ADN, los científicos y sus descubrimientos. [www.librosmaravillosos.com](http://www.librosmaravillosos.com), 4(1), 57.
- Stucchi, M., & Figueroa, J. (2013). Morfología cráneo–mandibular del oso andino *Tremarctos ornatus* (Carnivora: Ursidae). *Therya*, 4(3), 485-509. <https://doi.org/10.12933/therya-13-168>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Tecnología en salud. *Investigacion en Discapacidad*, 2(2), 70-78.

www.medigraphic.org.mx <http://www.medigraphic.com/rid> www.medigraphic.org.mx

- Varela, T. A., Aínsua, R. L., & Fariña, J. (2009). El ADN Mitocondrial Y Las Relaciones Filogenéticas de los últimos estadios del Género Homo. *Revista Real Academia Galega de Ciencias. Vol. XXVIII. Págs. 103-118 (2009), XXVIII, 276.*
- Vela-Vargas, I. M., Domínguez, G. V., Galindo, J., & Pérez-Torres, J. (2011). El oso andino sudamericano, su importancia y conservación. *Ciencia, 62(2), 44-51.*
- Vera, Z., Jimenez, P., & Franco-Lara, L. (2012). *Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias “ DNA barcode ” para la identificación a nivel de especie.* 196-209.
- Waits, L. P., Sullivan, J., Brien, S. J. O., & Ward, R. H. (1999). *Rápida radiación Eventos en la familia Ursidae indicado por Verosimilitud Fragmentos filogenético Estimación from Multiple de ADNmt.* 13(1), 82-92.
- Waits, L. P., Sullivan, J., O'Brien, S. J., & Ward, R. H. (1999). Rapid Radiation Events in the Family Ursidae Indicated by Likelihood Phylogenetic Estimation from Multiple Fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 13(1), 82-92.* <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0637>
- Wallace, R., Sociedad para la Conservación de la Vida Silvestre (Bolivia), & Simposio Internacional del Oso Andino (2nd: 2008: Lima, P. (2008). *Unidades de conservación prioritarias del oso andino en Bolivia y en Per* (Simposio I).
- Watson, J. D. (2007). *La doble hélice.* <https://cgrandola.files.wordpress.com/2008/04/jd-watson-la-doble-hc3a9lice.pdf>
- Watson, J. D., Editorial, A., & De, C. (2000). la doble hélice. *Alianza Editorial, colección de libro de bolsillo, Biología, Madrid, 2000, 205 pp., 820-823.*
- Wiley, J. (2016). Genética de poblaciones de Knud Christensen. En *Genética de poblaciones* (p. 117). <http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetica/genetik.pdf>
- Yabar Varas, C. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. serie de normas técnicas nº 38* (L. Lecca garcia & D. Cardenas Rojas (eds.)).
- Yerena Aguilar, C. E., & Ramírez Aguilera, J. (2018). Manual de Prácticas para Biología Molecular Aplicada. *Facultad de Química Farmaceutica Biológica - Universidad Veracruzana.*

ANEXOS

ANEXO 1. (A) Secuencias consenso del ADNmt región D-loop del oso andino

<p><b>TOPNM-2</b></p>	<p>TTTTTTTTATAGATCTCCCCCCTCAACACCCAAGGCTGACATTTTATTTTAACTAT  TCCCTGATACCACTATCTTACCCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATAC  TGTAGCATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTA  CGTCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTGGCTTGGTTTTA  CATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCA  CTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCAGTACGTGT  ACCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACTGG  CATCTGGTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAA  ATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTG  ATGCATTTGGTATCTTTAATTTGGGGGGGAAAACCTTGCTATGACTCACCTATGACCGT  ACACCCAAGGGTACATTTTAAATAAATACTTCCCTGAACCACTATTTTACCCAACATTT</p>
<p><b>TOPNM-3</b></p>	<p>TACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAGCATCCTAGTATGTCCCGAACAAGG  AAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCAT  ATAAGCATGTACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACACCAAAAACTCGTTT  TGAAAACGTAGTCTGCAACCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGCTTAGTCACCACGCCTC  GAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTTCTCCCTCCGGGCCCAAAAAACG  TGGGGGTTTCTATACAGAACTATACTGGGATCTGGTCTTACTTCACGGCCATGATAG  CTCTAAATCCAATCCTACAAACCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAAAGACTAAT  CAGCCCAAGATGAGAGATAACTGTGGAGTACATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGGGG  CTTTTTTACCCACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAGCATCCT</p>
<p><b>TOPNM-4</b></p>	<p>AGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATT  AATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACAT  GAACTCCAAAACTCGTTTTGAAGACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGG  AGCTTAGTCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCAGTACGTGTACCTCTTCTCG  CTCCGGGCCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTGAACTATACTGGCATCTGGTCT  TACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCT  CGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGATGCATTTGGT  ATCTTTAATTTTGGGGGGGAAAACCTTGCTATGACTCACCTATGACCGTAAAGGTCCACC  CCCCATAAA</p>
<p><b>TOSH-5</b></p>	<p>TTTTATGTCCCCCTCAACCCCCAGGGTGGACATTTTATTTAAAAATTTTTCCCGCCAA  CCATTTTTTTTACCCACATTTTATTTTTTTCTTATTTACCCCCCCCATATGGTAGCTTC  CTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCCGTGC  ATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGTCTGGTTTTTACATGAGG  ACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAGACGTAGTCCGCAAGCATGTATCTCACTTAGTC  CGGGAGCTTTAGTCACCCAGGCCTCGAGAAAACCAGCAACCCTTGCAGTACGTGTACCT  TTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAACGGGGGGGTTTCTATACTGAAACTAATACTGGCAT  TCGGTTTCTTATTCCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAAT  GGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATTAATAACAAAATGGGGGGGCCA  GGCTTTGGGTATTTTAAATTTTGGGGGGGAGAACTTTGTAAGACCTCACTAATAACCGAAA  GGGTCGCTCCAAAAAA</p>

TOSHM-6	<p>CCATTTTTTACCCACCATTTTATTTTTTCTTATTTACCCCCCCCCATATGGTAGCTTC  CTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCCTATGTACGTCCGTGC  ATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGTTTTTACATGAGG  ACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAGACGTAGTCCGCAAGCATGTATCTCACTTAGTC  CGGGAGCTTTAGTCACCCAGGCCTCGAGAAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTGTACCT  TTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAAACGGGGGGGTTTCTATACTGAAACTAATACTGGCAT  TCGGTTTCTTATTCCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAAT  GGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATTAACAAAAATGGGGGGGCCA  GGCTTTGGGTATTTTAAATTTGGGGGGGAACTTTGTAAGACCTCACTAATAACCGAAA  GGGTCGCTCCAAAAA</p>
TOSHM-7	<p>CCATTTTTTACCCACCATTTTATTTTTTCTTATTTACCCCCCCCCATATGGTAGCTTC  CTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCCTATGTACGTCCGTGC  ATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCTTGCTTGTTTTTACATGAGG  ACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAGACGTAGTCCGCAAGCATGTATCTCACTTAGTC  CGGGAGCTTTAGTCACCCAGGCCTCGAGAAAACCAGCAACCCTTGCGAGTACGTGTACCT  TTTCTCGCTCCGGGCCCATAGAAAACGGGGGGGTTTCTATACTGAAACTAATACTGGCAT  TCGGTTTCTTATTCCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCTTCAAAT  GGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATTAACAAAAATGGGGGGGCCA  GGCTTTGGGTATTTTAAATTTGGGGGGGAACTTTGTAAGACCTCACTAATAACCGAAA  GGGTCGCTCCAAAAA</p>
TOSHM-8	<p>AGTATGTCCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCCTATGTACGTCCGTGCATT  AATGGCGTGCCCCATGCATATAACCATGTACATATCTGGCTTGTTTTTACATGAGGACAT  GAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGG  AGCTTAGTCACCCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTTCTCG  CTCCGGGCCCATAAAAACGTGGGGGGTCTATACTGAAACTATACTGGCATCTGGTTCT  TACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCATCCTACTAACCCTTCAAATGGGACATCT  CGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGATTTGGT  ATCTTTTAAATTTGGGGGGGAAACTTGCTATGACTCACCTATGACCGTAAAGCCCCCCC  CCCCAATATAA</p>
TOSHM-9	<p>TATTTTGGCTCCACCCCTCAACACCCCAAGGCTGACATTTTATTTAAACTATTCCCTGA  TACCACTATTTTACCCAACATTTTACTTATTTTATATATACCACCCACATACTGTAGCA  TCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCCTATGTACGTCCGTG  CATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAACCATGTACATATCTGGCTTGTTTTTACATGAGG  ACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTC  CGGGAGCTTAGTCACCCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTT  CTCGCTCCGGGCCCATAAAAACGTGGGGGGTCTATACTGAAACTATACTGGCATCTGG  TTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCATCCTACTAACCCTTCAAATGGGAC  ATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCAAT  TGGTATCTTTTAAATTTGGGGGGGAAACTTGCTATGACTCACCTATGACCGTAAAGGTC  CCTCCCAATAACAA</p>
TOSHM-10	<p>ACCACTATTTTACCCAACATTTTACTTATTTTATATATACCACCCACATACTGTAGCA  TCCTAGTATGTCCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCCTATGTACGTCCGTG  CATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAACCATGTACATATCTGGCTTGTTTTTACATGAGG  ACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTC  CGGGAGCTTAGTCACCCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTT  CTCGCTCCGGGCCCATAAAAACGTGGGGGGTCTATACTGAAACTATACTGGCATCTGG  TTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCATCCTACTAACCCTTCAAATGGGAC  ATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGCAAT  TGGTATCTTTTAAATTTGGGGGGGAAACTTGCTATGACTCACCTATGACCGTAAAGGTC</p>

ANEXO 1 (B) Lista de Haplotipos encontrados

HAPLOTIPO	CANTIDAD	CÓDIGO DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA	ÁREA NATURAL PROTEGIDA
H1	2	TOSHM-8, TOSHM-9	Ahobamba, Intiwatana	Santuario Histórico de Machupicchu
H2	1	TOSHM-6	Muralla Inca	Santuario Histórico de Machupicchu
H3	1	TOSHM-10	Torontoy Palomar	Santuario Histórico de Machupicchu
H4	2	TOSHM-7	Mandor	Santuario Histórico de Machupicchu
H5	1	TOPNM-3	Kurkurpampa	Parque Nacional de Manu
H6	1	TOPNM-4	Tres Cruces	Parque Nacional de Manu
H7	1	TOPNM-2	Acjanaco	Parque Nacional de Manu
H8	1	TOSHM-5	Qoriwayrachina	Santuario Histórico de Machupicchu

En la tabla se observa los haplotipos encontrados en cada área natural protegida y su sitio de muestreo.

Hap\_1

ACACCCAAGGGTGACATTTTATTTAAACTATTCCTGATACCACTATTTTACCCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAG  
CATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATTAAATGGCGTGCCCATGCATATAACCATGT  
ACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGC  
TTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAAAACGTGGGGGTTTCTATACTGA  
AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAAT  
GACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_2

ACACCCAAGGGTGACATTTTATTTAAAATATTCCTGATACCACTATTTTACCCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCAACCCACATACTGTA  
GCATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATTAAATGGCGTGCCCATGCATATAACCATG  
TACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAG  
CTTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAAAACGTGGGGGTTTCTATACTG  
AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
TGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_3

ACACCCAAGGCTGACATTTTATTTAAAATATTCCTGATACCACTATTCTTACCCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAG  
CATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATTAAATGGCGTGCCCATGCATATAACCATGT  
ACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGC  
TTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAAGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAAAACGTGGGGGTTTCTATACTGA  
AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAAT  
GACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGCATGATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_4

ACACCCAAGGGTGACATTTTATTTAAACTATTCCTGATACCACTATTTTACCCAACAATTTACTTATTTTCATATATACCAACCCACATACTGTA  
GCATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTCTGCATTAAATGGCGTGCCCATGCATATAACCATG  
TACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAG

CTTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAGGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAAAACGTGGGGGTTTCTATACTG  
AAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
TGACTAATCACCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_5

ACACCCAAGGGTGACATTTTATTTAACTATTCCCTGATACCACTATCTTTACCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCAACCCACATACTGTA  
GCATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTGCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAACCATG  
TACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAACGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAG  
CTTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAGGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAAAACGTGGGGGTTTCTATACTG  
AAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
TGACTAATCACCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_6

ACACCCAAGGCTGACATTCTATTTAACTATTCCCTGATACCACTATTTTTACCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAG  
CATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTGCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGT  
ACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAGCGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGC  
TTAGTACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCAGGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTG  
AAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAAATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
TGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_7

ACACCCAAGGCTGACATTTTATTTAACTATTCCCTGATACCACTATTTTACCAACATTTTACTTATTTTCATATATACCACCCACATACTGTAG  
CATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTGCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGT  
ACATATCTGGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAGCGTAGTCTGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGC  
TTAGTACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGCAGGTACGTGTACCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTG  
AAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
TGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

Hap\_8

ACACCCAAGGGTGACATTTTATTTAAATTATTCCCTCATACCACTATTTTTACCAACATTTTACTTTTTTCATATATACCCCCACATACTGTAG  
CATCCTAGTATGTCCCGAACAAGGAAATCTCTCCTTTTTTTTCCCCCTATGTACGTGCGTGCATTAATGGCGTGCCCATGCATATAAGCATGT  
ACATATCTTGCTTGGTTTTACATGAGGACATGAACTCCAAAACTCGTTTTGAAAGCGTAGTCCGCAAGCATGTATCTCACTTAGTCCGGGAGC  
TTAGTACCAGGCCTCGAAAAACCAGCAACCCTTGCAGGTACGTGTACCTTTTCTCGCTCCGGGCCATAGAAACGTGGGGGTTTCTATACTGA  
AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACCCCTTCAAATGGGACATCTCGATGGACTAA  
GACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGACATGCATTTGGTATCTTTAATTTTGGGG

**ANEXO 2:** Sitios polimórficos en las secuencias consenso

SITIOS POLIMORFICOS																							
POSICIÓN	13	21	27	30	32	39	50	61	66	69	84	188	202	248	306	324	358	429	486	495	504	TOTAL, DE SITIOS POLIMORFICOS	
SECUENCIA BASE	G	T	T	C	A	G	T	T	C	A	C	C	G	A	A	A	A	A	G	C	C		
TOSHM-8																						0	
TOSHM-9																							0
TOSHM-6				A							A												2
TOSHM-10	C			A			C																3
TOSHM-7								A			A								C				3
TOPNM-3											A					G			C				3
TOPNM-4	C	C	C									G		G			G						6
TOPNM-2	C						C					G			G	G	G	G					7
TOSHM-5					T	C				T	T	G	T	G			G	G			T	T	11
11 SITIOS POLIMORFICOS EN LA PRIMERA PARTE												10 SITIOS POLIMORFICOS EN LA PARTE INTERMEDIA										X=3.8	

*En la siguiente tabla, se observa los sitios polimórficos, donde la mayor cantidad de mutaciones se dieron en la primera y en menor cantidad en la parte final. En promedio cada secuencia consenso tiene una tasa de mutación de 4.6 nucleótidos por cada 540 bases.*

**ANEXO 3:**

Instalación de las cámaras trampa y trampas pelo dentro del Santuario Histórico de Machupicchu.



*Imagen de la instalación de cámaras trampa en el sector de San Gabriel dentro del Santuario Histórico de Machupicchu.*



*Imagen de Instalación de trampas pelo en sector de Ahobamba, dentro del Santuario Histórico de Machupicchu*



Bushnell

06-08-2019 02:35:01

*Colecta de pelos de oso andino de las trampas pelo en el sector de Muralla Inca, dentro del Santuario Histórico de Machupicchu.*



*Sitio de muestreo Tres Cruces dentro del Parque Nacional de Manu, al fondo se observa el Apu Qhawaqñawi.*



*En la imagen se observa la colecta de pelos a partir de la trampa pelo en el sector de muralla inca, Santuario Histórico de Machupicchu.*



Bushnell

12-20-2018 07:07:14

*Imagen capturada por la cámara trampa del oso andino olfateando el cebo atrayente en el sector de Muralla Inca, dentro del Santuario Histórico de Machupicchu*



*Imagen tomada en el sector de Acjanaco dentro del Parque Nacional Manu.*



*Imagen tomada en el sector de Qélla q'asa cerca al puesto de control de Acjanaco un oso de dos patas.*

#### ANEXO 4

Almacenamiento de las muestras dentro del Laboratorio de Genética Molecular de la escuela Profesional de Biología de la UNSAAC hasta su procesamiento.



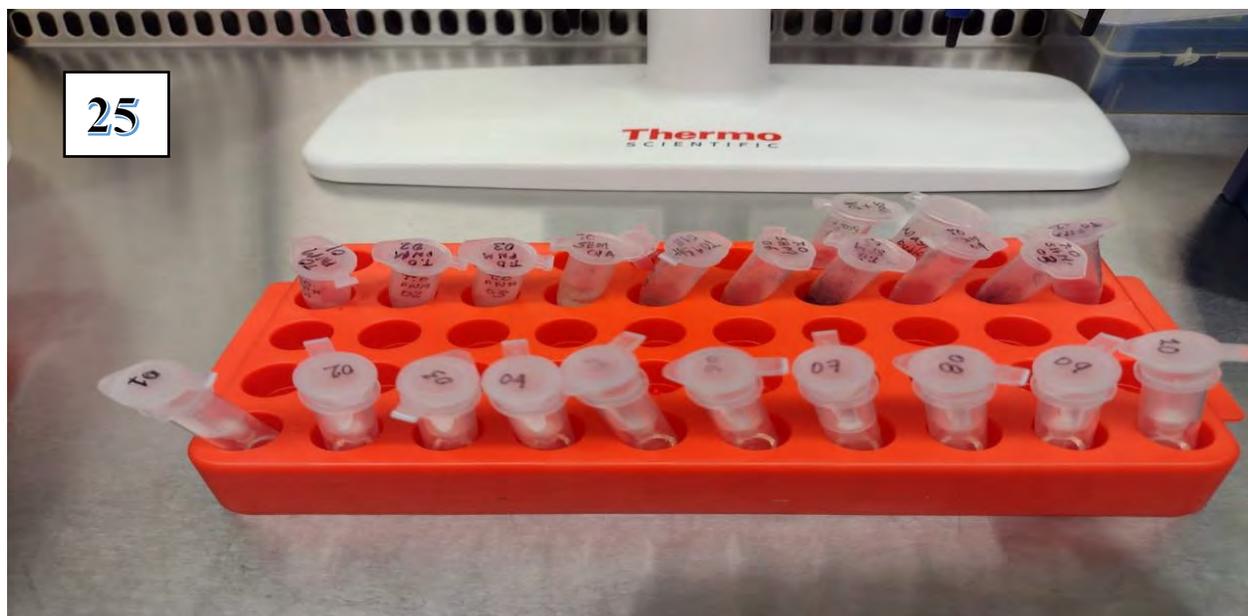
*Imagen (20) muestras almacenadas en la ultracongeladora de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, imagen (21 izquierda) ultracongeladora de  $-80^{\circ}\text{C}$ , la imagen 21 derecha muestra a la congeladora convencional donde se almacenó el kit de extracción de ADN.*

## ANEXO 5

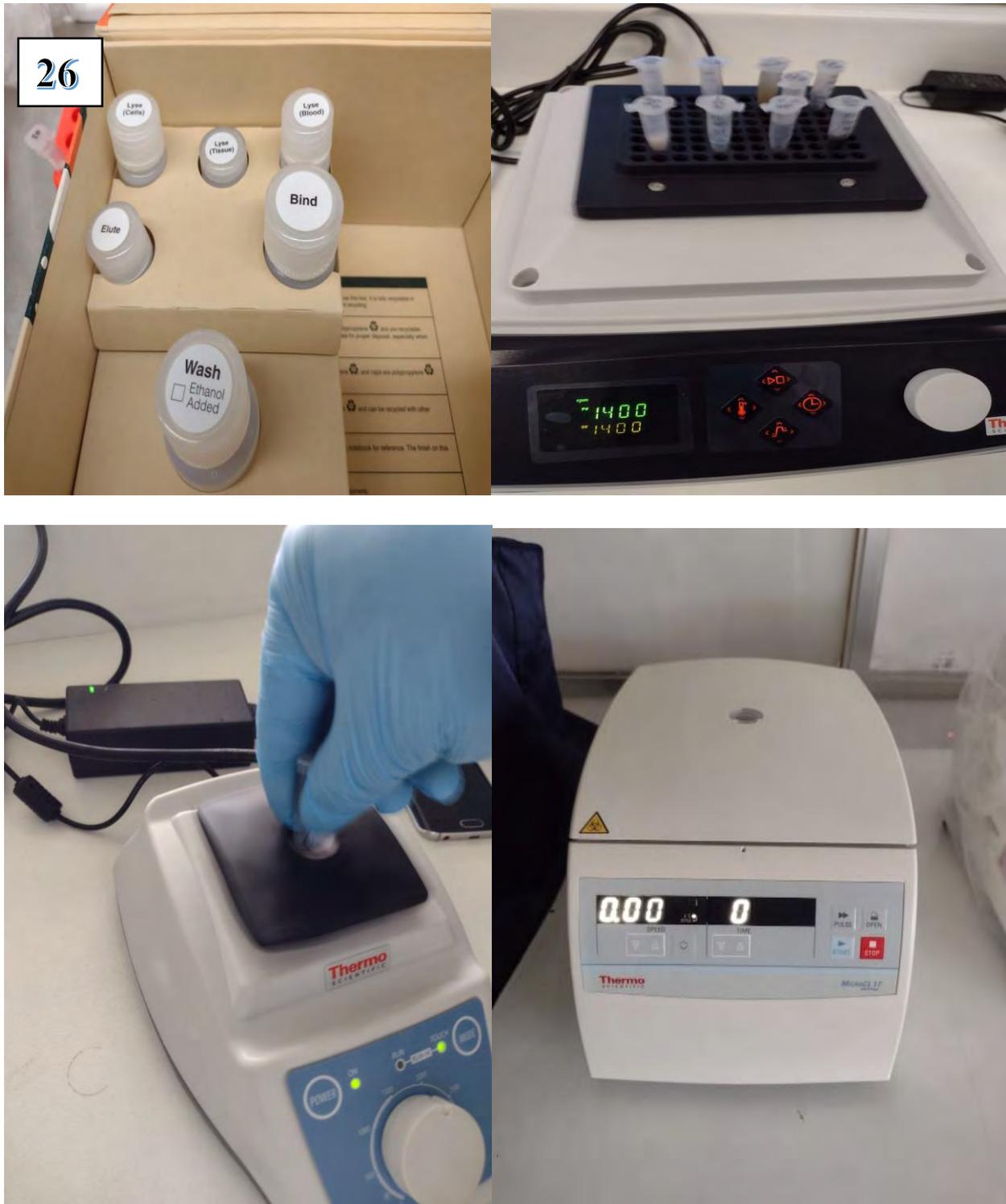
Equipos y reactivos utilizados en el laboratorio.



*Imagen (22) derecho se observa el autoclave, mientras en la izquierda se observa la incubadora convencional, Imagen (23) derecho kit utilizado en la extraccion de ADN, izquierdo se observa la congeladora de -30°C.*



*Imagen (24) Proceso de extracción de ADN en el campana de extracción, imagen (25) muestras codificadas en los tubos eppendorf.*



*Imagen (26) se observa el kit completo de extracción de ADN a partir del cual se estandarizó el protocolo de extracción, equipos utilizados en el proceso de extracción de ADN.*

## ANEXO 6

### Proceso de medición de la concentración y pureza de ADN

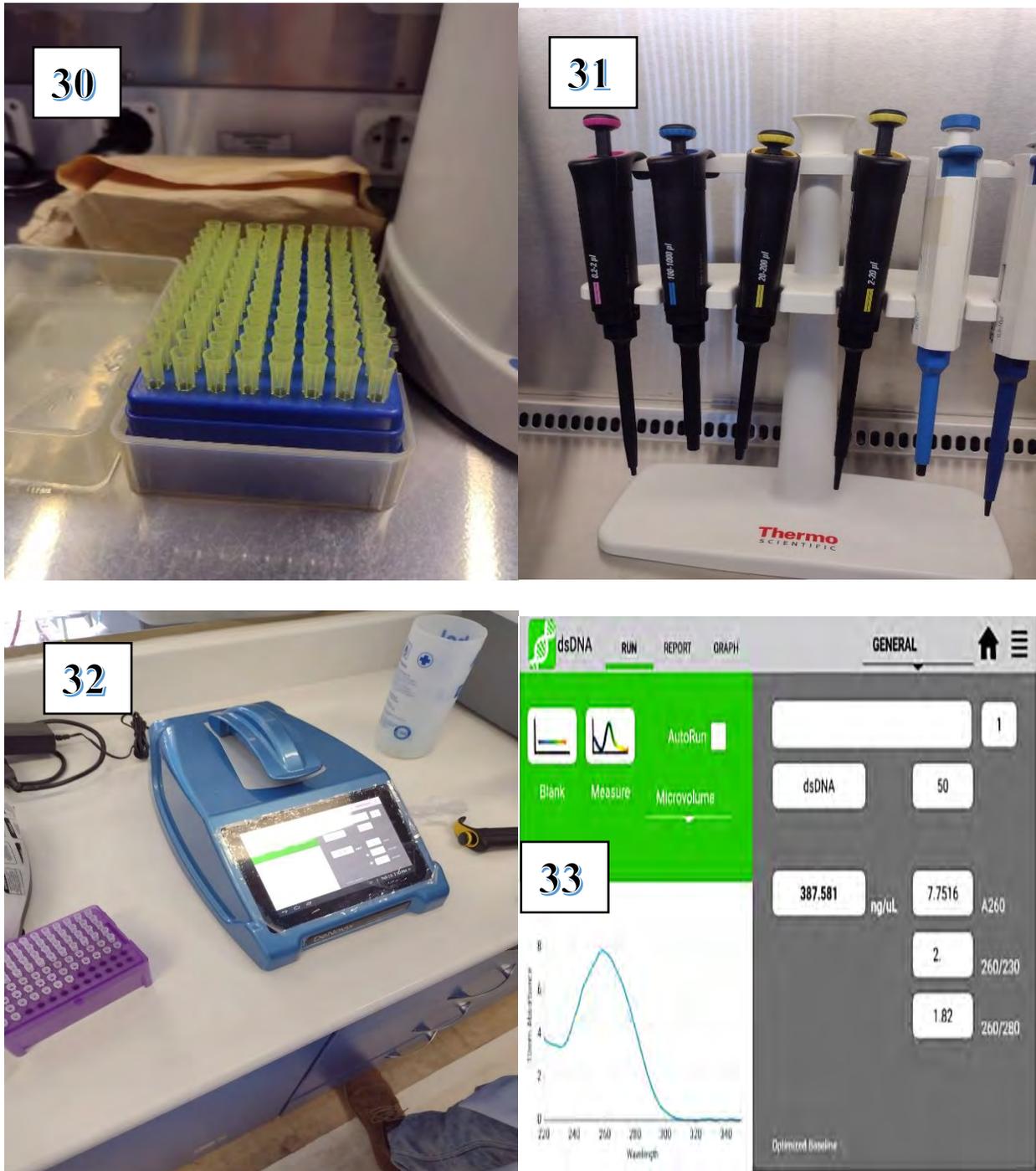
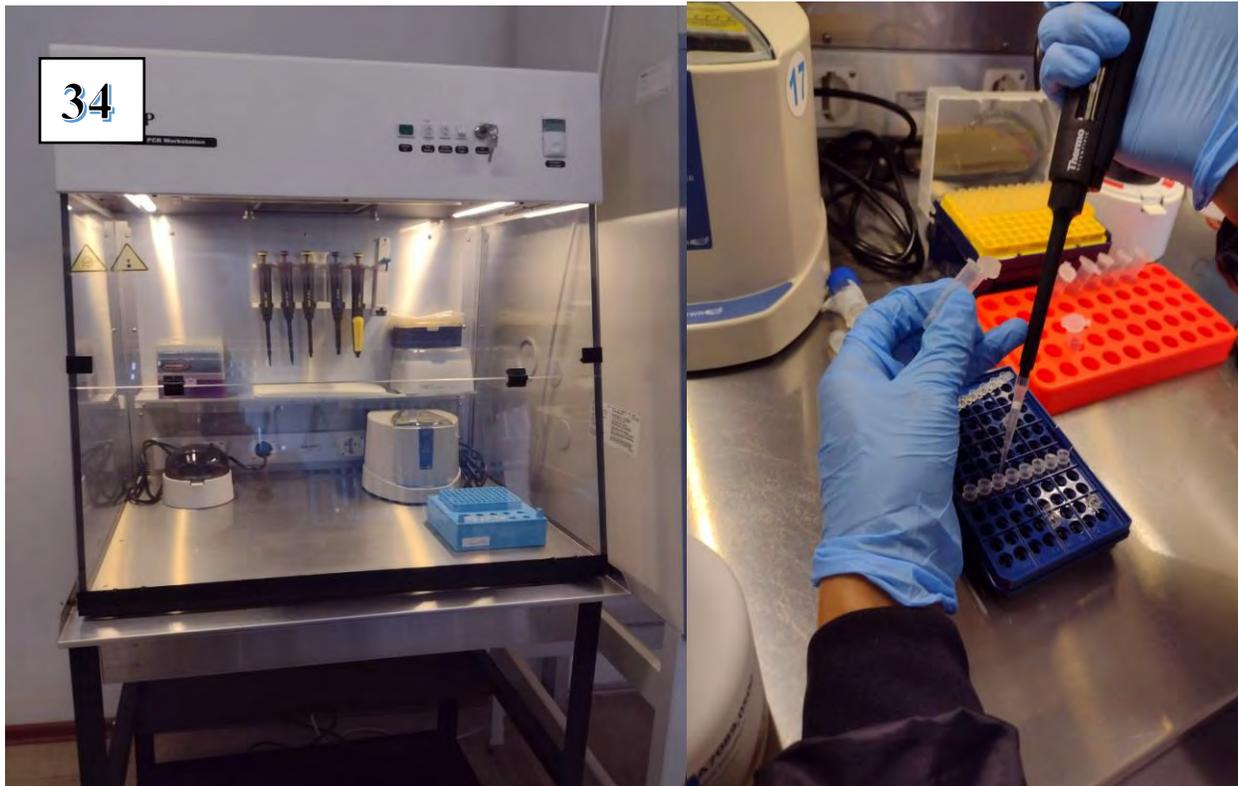


Imagen (30) muestra los tips o puntas de 10ul utilizados para medir la calidad y concentración del ADN, la imagen (31) muestra todas las pipetas necesarias en las actividades del laboratorio, la imagen (32) muestra en cuantificador de ADN, imagen (33) muestra los resultados exitosos de la cuantificación.

## ANEXO 7

Proceso de preparación para la reacción en cadena de la polimerasa.



*Imagen (34) muestra la cabina de PCR a la izquierda, mientras a la derecha se observa el proceso de preparación, imagen (35) izquierda muestra los primers utilizados en el proceso de la PCR, mientras a la derecha se observa las pipetas.*

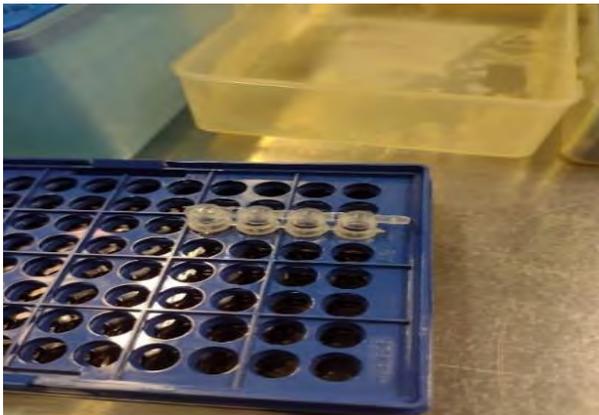
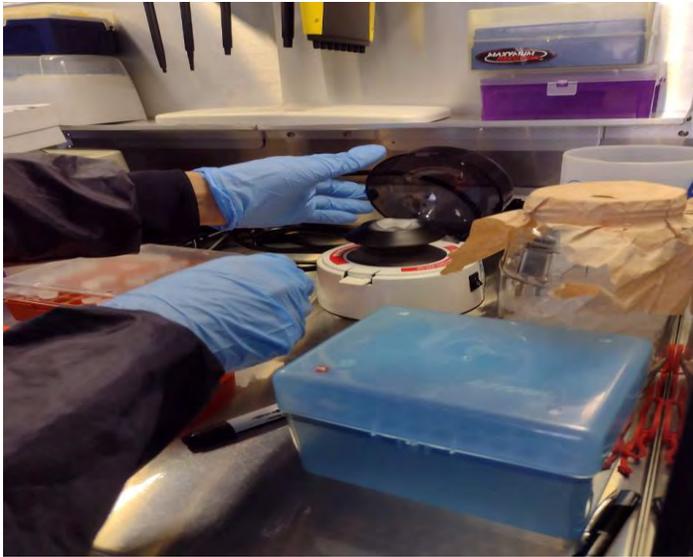
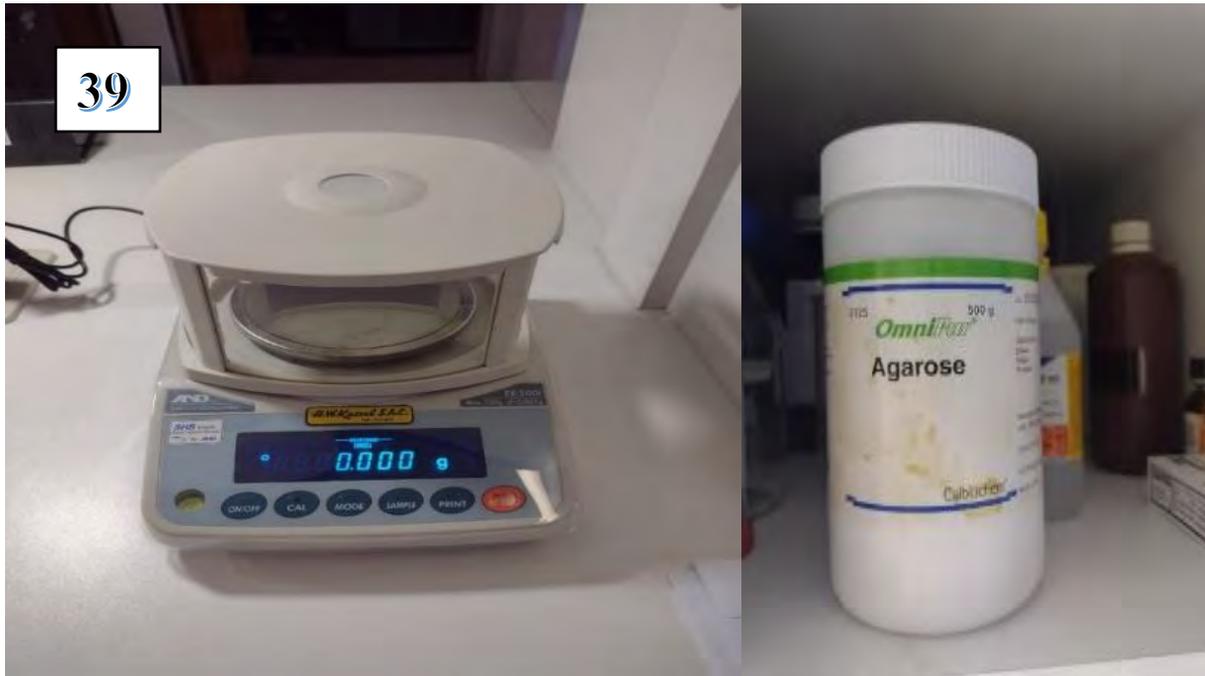


imagen (38) a la izquierda se observa los ciclos de la PCR, mientras a la derecha se observa el tiempo que duró la PCR.

## ANEXO 8

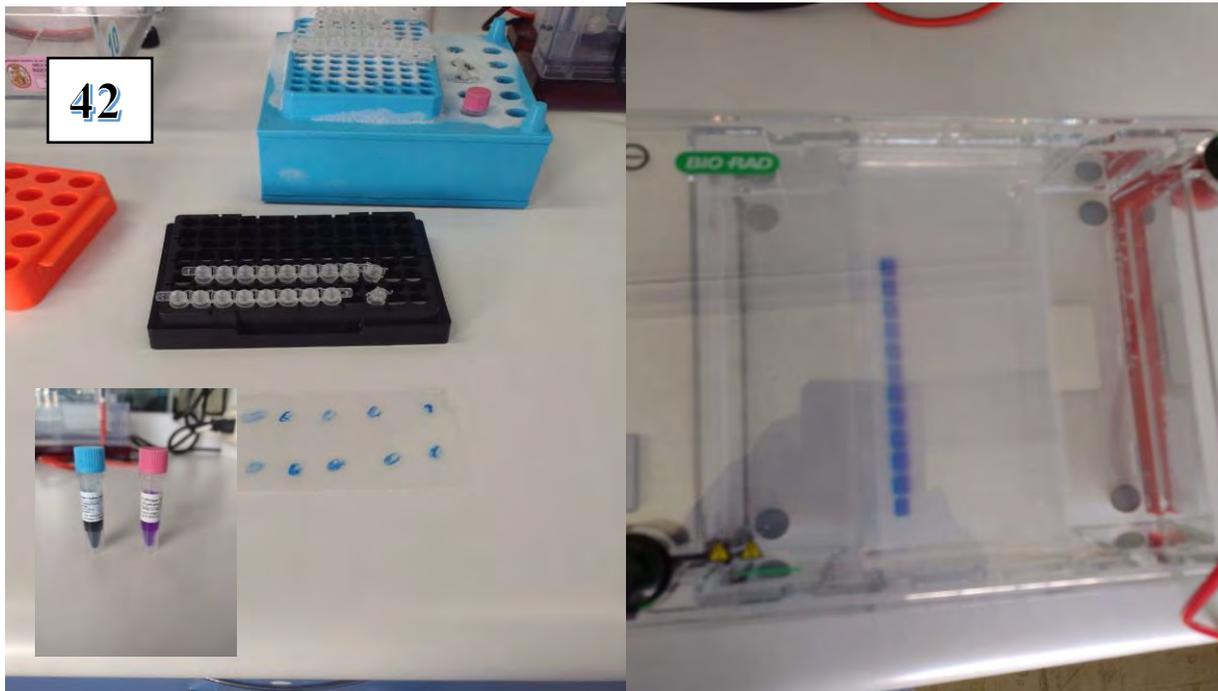
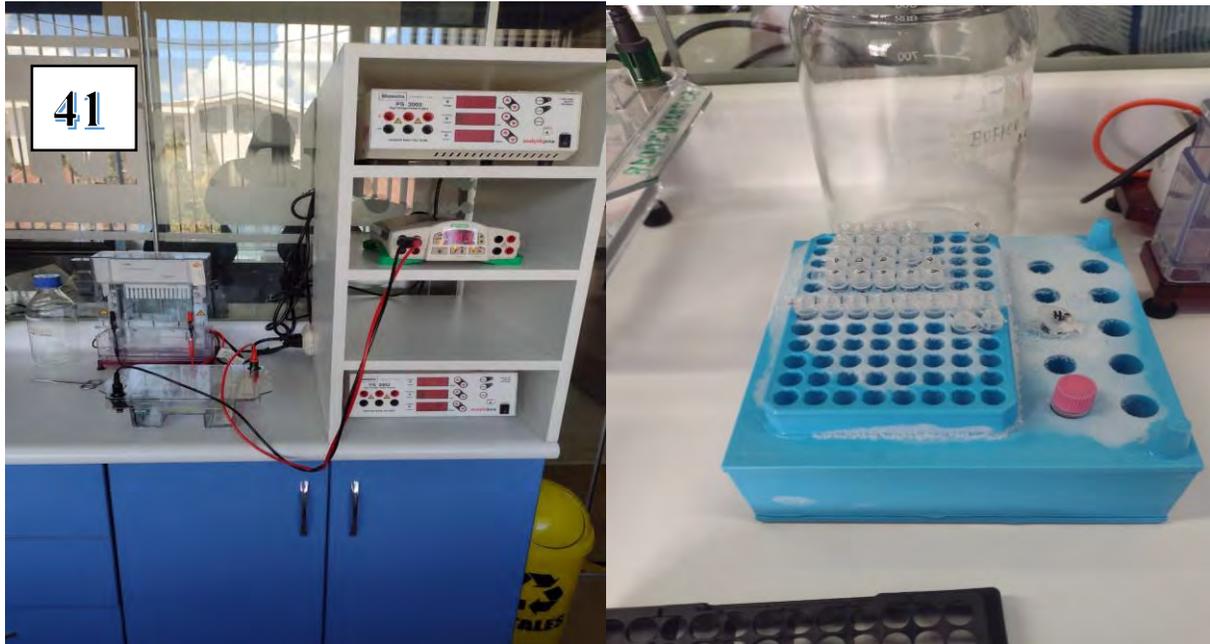
Preparación del gel de agarosa.



*Imagen (39) se logra observar la balanza analítica que se utiliza para pesar sustancias en cantidades muy pequeñas, a la derecha se observa la agarosa, en la imagen (40) se observa la plancha calentadora con su agitador magnético calentando la agarosa al 1.8% para ello se utilizó el buffer TAE al 1% con un volumen de 100 ml.*

## ANEXO 9

### Corrida de las bandas en la electroforesis



*Imagen (41) izquierdo equipo de electroforesis horizontal, derecho producto de PCR en un rack junto al marcador de peso molecular. Mientras en la imagen (42) izquierda se observa la preparación de las muestras y su posterior colocación en los posillos, derecha se observa la corrida de bandas en la electroforesis*

## ANEXO 10:

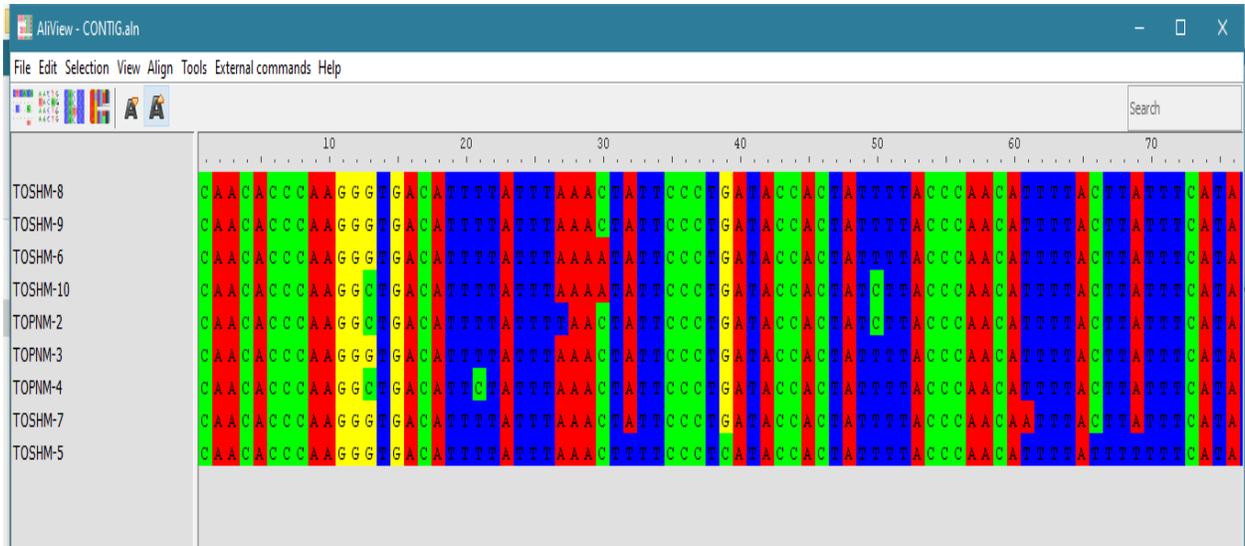
### Programas bioinformáticos



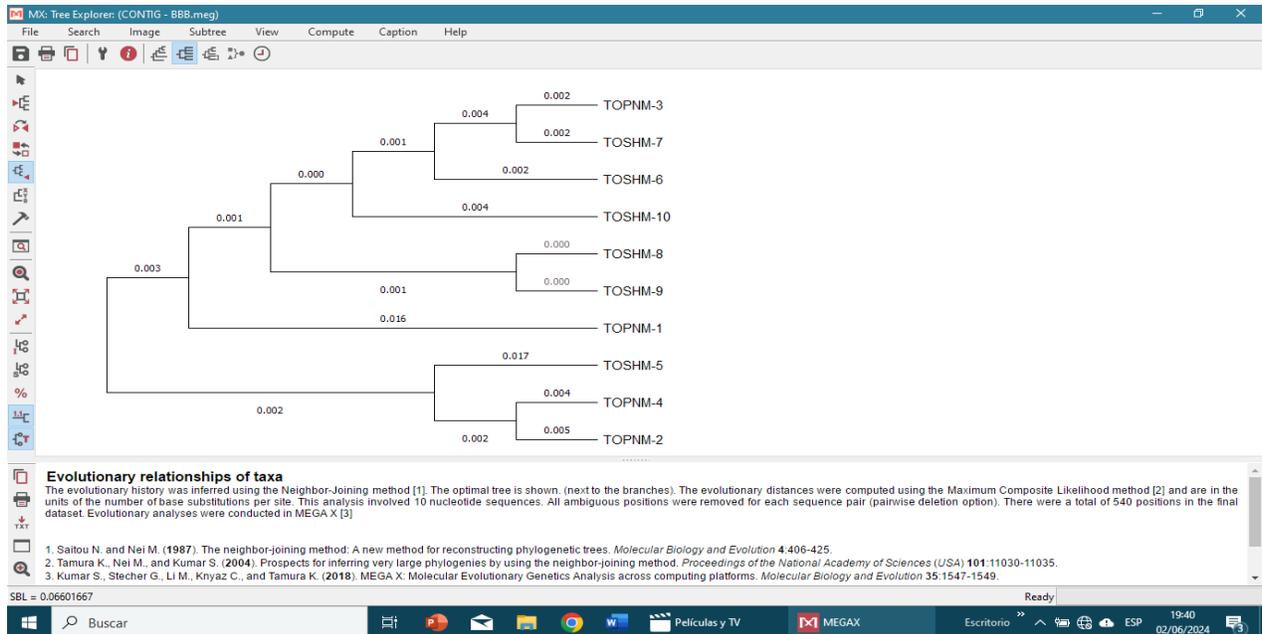
En la imagen se observa en el programa Chromas los resultados del secuenciamiento en ambas direcciones forward y reverse.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión
<input type="checkbox"/> Mitochondria de Tremarctos omatus _genoma completo	Tremarctos oma...	675	675	85%	0.0	91.31%	16682	MW556430.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus _genoma mitocondrial completo	Tremarctos oma...	675	675	85%	0.0	91.33%	16752	FM177764.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus aislado HTOQ4 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Tremarctos oma...	645	645	67%	1e-180	96.43%	456	KX812515.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus aislado HTOQ2 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Tremarctos oma...	645	645	67%	1e-180	96.42%	455	KX812513.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus aislado HTO1 L1 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Tremarctos oma...	645	645	73%	1e-180	94.10%	461	MT425202.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus aislado HTOQ3 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Tremarctos oma...	640	640	67%	6e-179	96.17%	456	KX812514.1
<input type="checkbox"/> Tremarctos omatus aislado HTOQ1 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Tremarctos oma...	640	640	67%	6e-179	96.16%	455	KX812512.1
<input type="checkbox"/> Mitochondria de Tremarctos omatus _genoma completo	Tremarctos oma...	617	617	85%	3e-172	89.13%	16766	EF196665.1
<input type="checkbox"/> Arctodus simus _genoma mitocondrial completo	Arctodus simus	545	545	67%	1e-150	91.86%	16754	FM177762.1
<input type="checkbox"/> Haplotipo de Ursus thibetanus Es14 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Ursus thibetanus	508	508	61%	2e-139	92.72%	615	HM135193.1
<input type="checkbox"/> Helarctos malayanus aislado gen del citocromo b (CYTB) T14 _cds parciales_ genes tRNA-Thr y tRNA-Pro...	Helarctos malay...	505	505	61%	2e-138	92.20%	1790	MW316401.1
<input type="checkbox"/> Helarctos malayanus aislado gen del citocromo b (CYTB) T12 _cds parciales_ genes tRNA-Thr y tRNA-Pro...	Helarctos malay...	505	505	61%	2e-138	92.22%	1800	MW316399.1
<input type="checkbox"/> Helarctos malayanus aislado gen del citocromo b (CYTB) T7 _cds parciales_ genes tRNA-Thr y tRNA-Pro...	Helarctos malay...	505	505	61%	2e-138	92.22%	1809	MW316394.1
<input type="checkbox"/> Haplotipo de Ursus thibetanus Es59 D-loop _secuencia parcial_ mitocondrial	Ursus thibetanus	503	503	61%	8e-138	92.44%	615	HM135191.1
<input type="checkbox"/> Arcotherium sp _mitochondria _genoma completo	Arcotherium sp.	501	501	63%	3e-137	91.15%	16532	KU886001.1
<input type="checkbox"/> Helarctos malayanus aislado gen del citocromo b (CYTB) T10 _cds parciales_ genes tRNA-Thr y tRNA-Pro...	Helarctos malay...	501	501	60%	3e-137	92.37%	1781	MW316393.1
<input type="checkbox"/> Helarctos malayanus aislado gen del citocromo b T8 (CYTB) _cds parciales_ genes tRNA-Thr y tRNA-Pro...	Helarctos malay...	501	501	60%	3e-137	92.37%	1781	MW316393.1

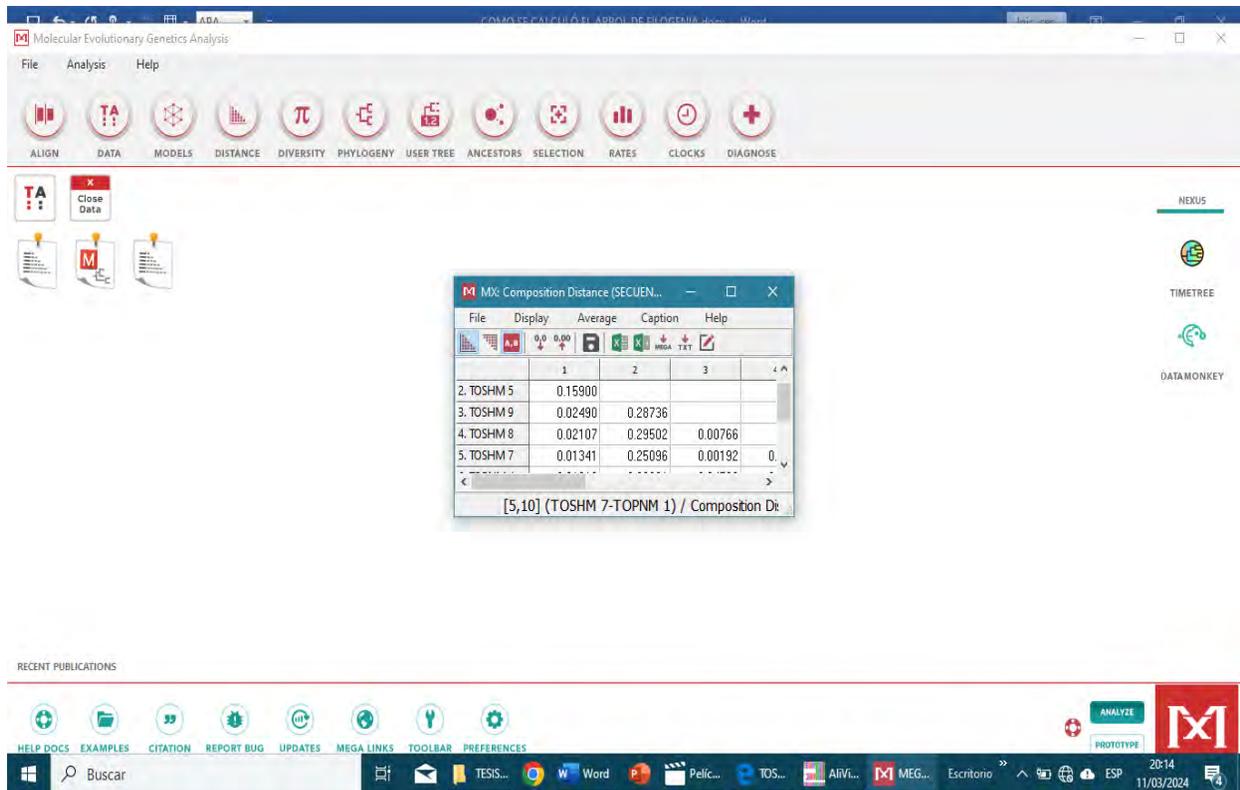
En la imagen se observa la confirmación de la identidad de la secuencia consenso, donde se confirma que el ADNmt secuenciado corresponde a oso andino.



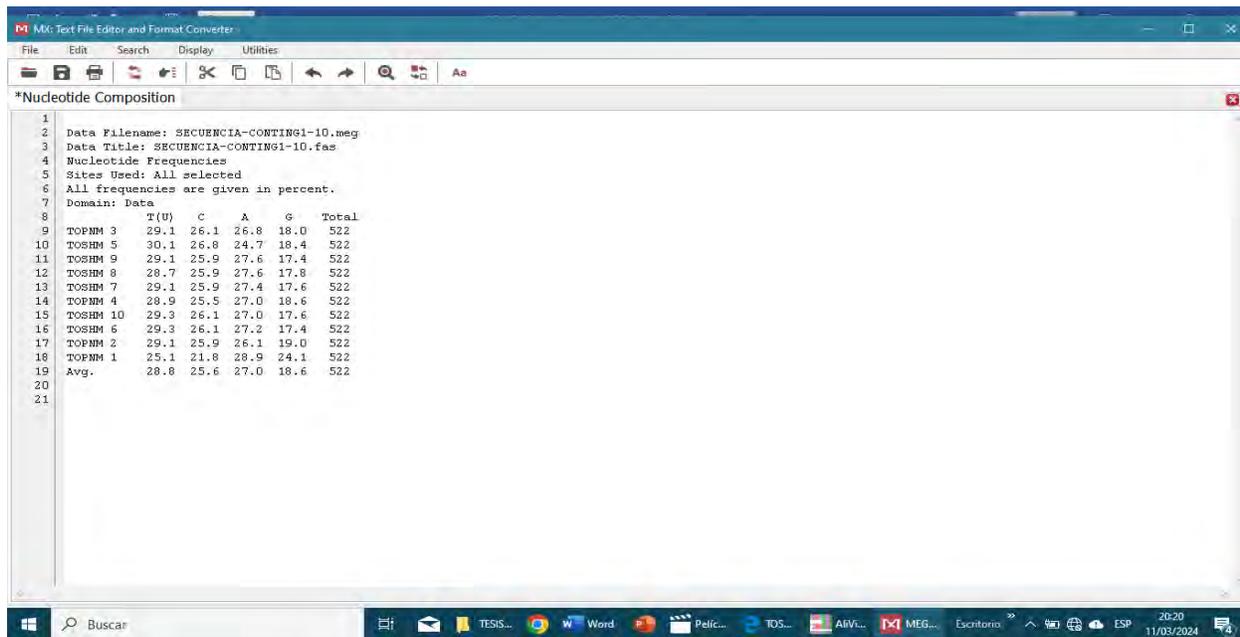
En la imagen se observa el alineamiento de las secuencias consenso, donde los extremos ya fueron cortados en el programa Aliviv.



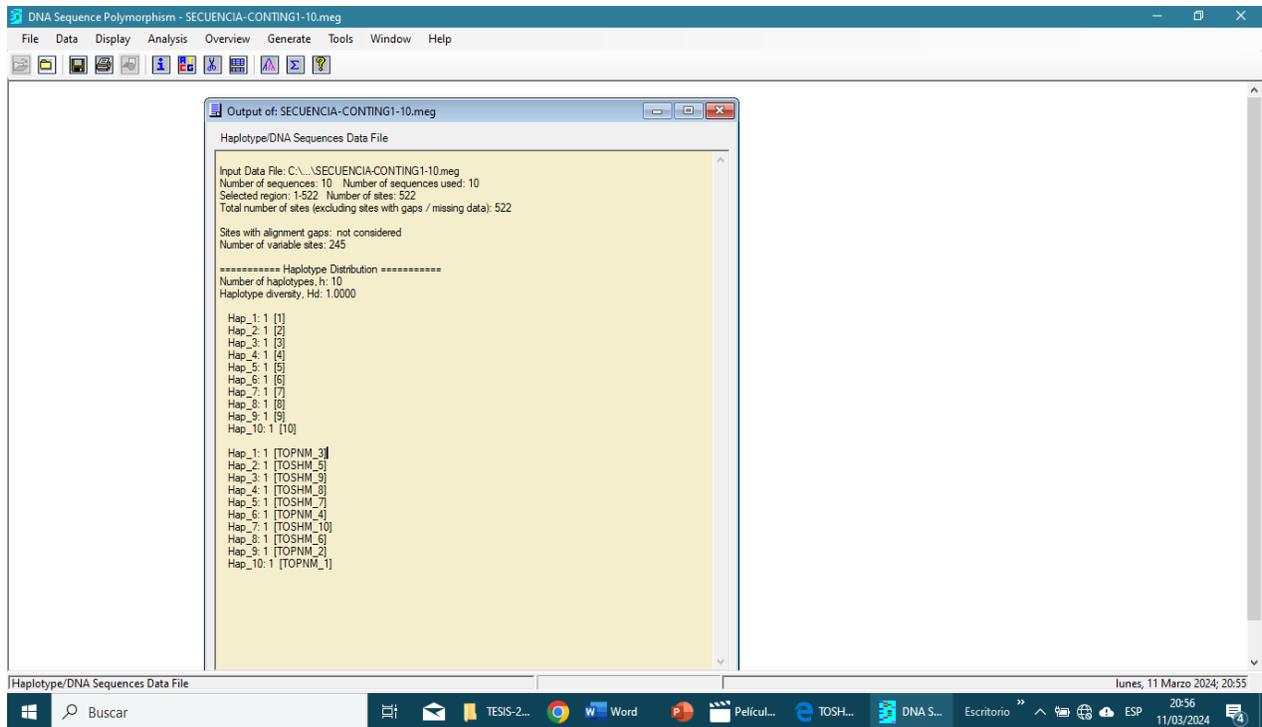
En la imagen se observa el cálculo del árbol de filogenia, dicho paso se ejecutó en el programa Mega.



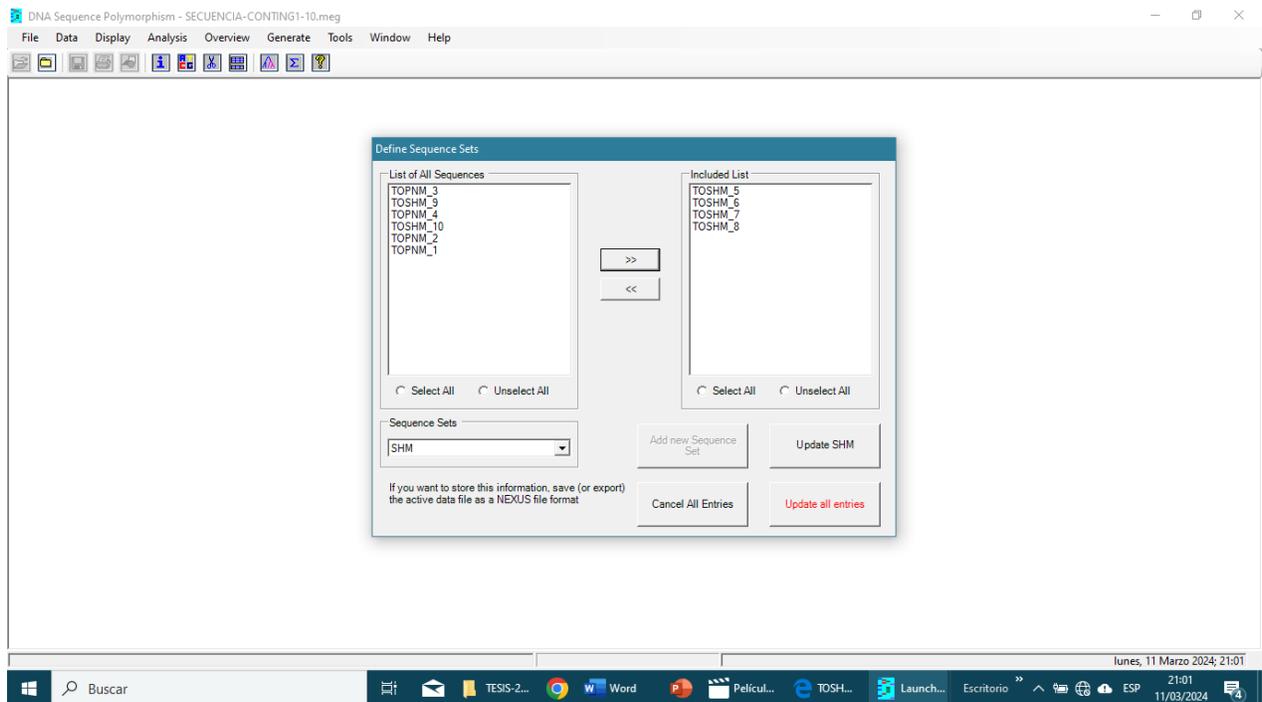
En la imagen se observa los resultados del cálculo de las distancias genéticas, para dicho paso se utilizó el programa Mega.



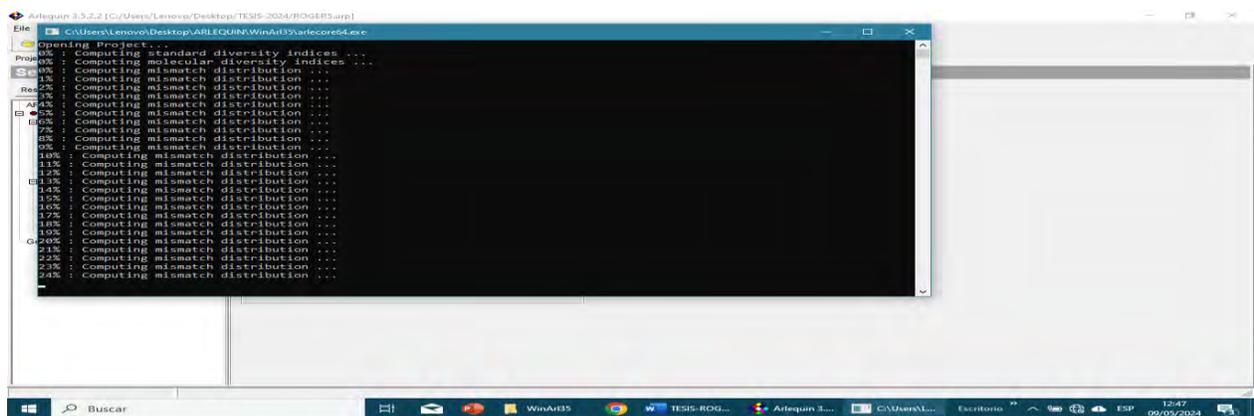
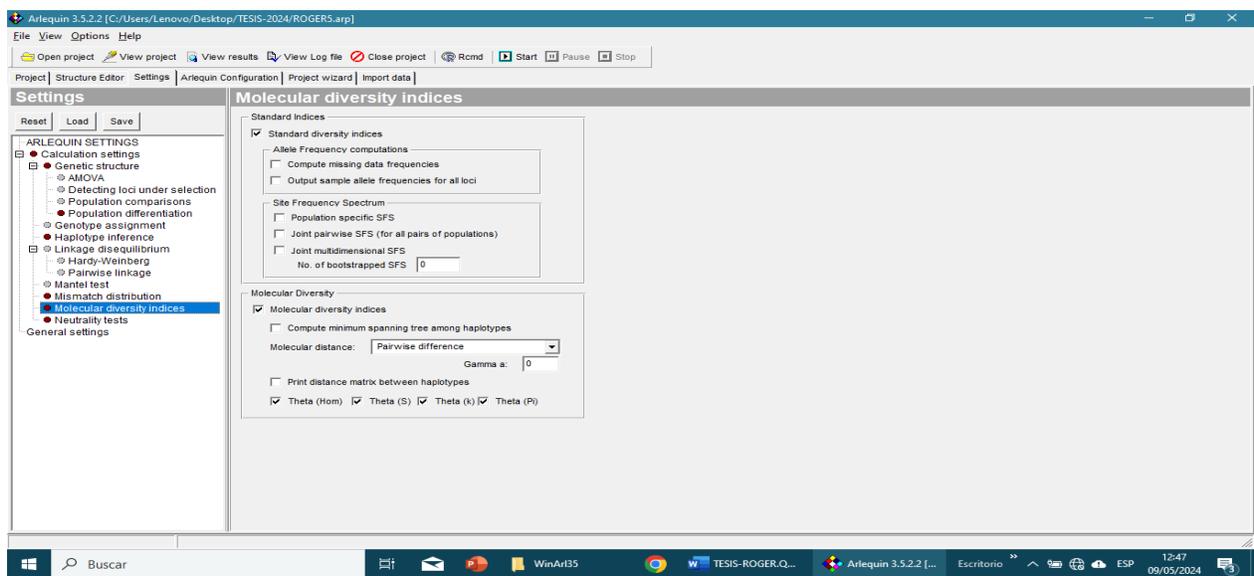
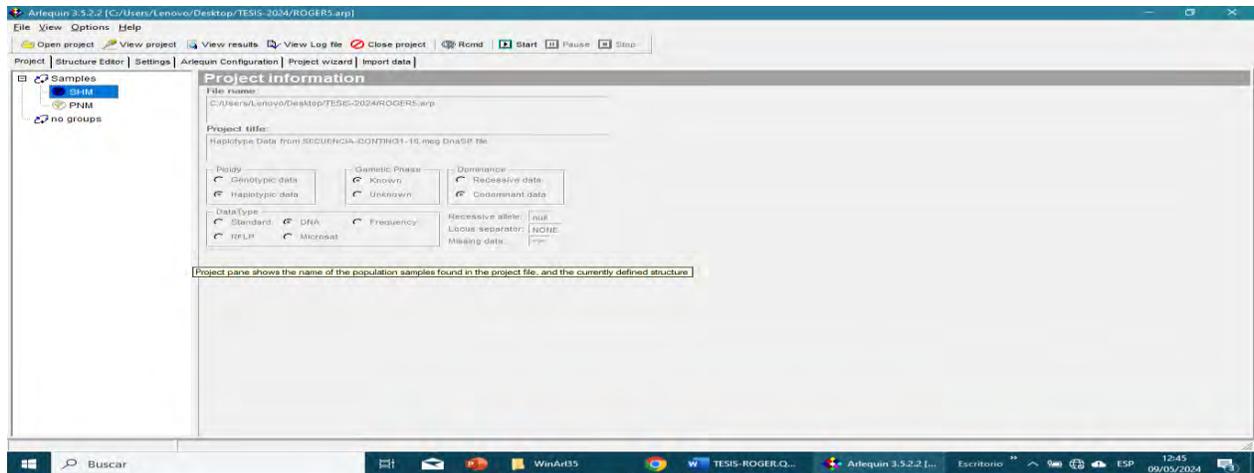
En la imagen se observa el cálculo de la composición nucleotídica de las 10 secuencias consenso, para dicho proceso se utilizó el programa Mega.



En la imagen se observa los resultados del cálculo del número de haplotipos encontrados, dicho proceso se realizó en el programa DnaSP6, donde el haplotipo mas antiguo resultó la muestra TOPNM-3.



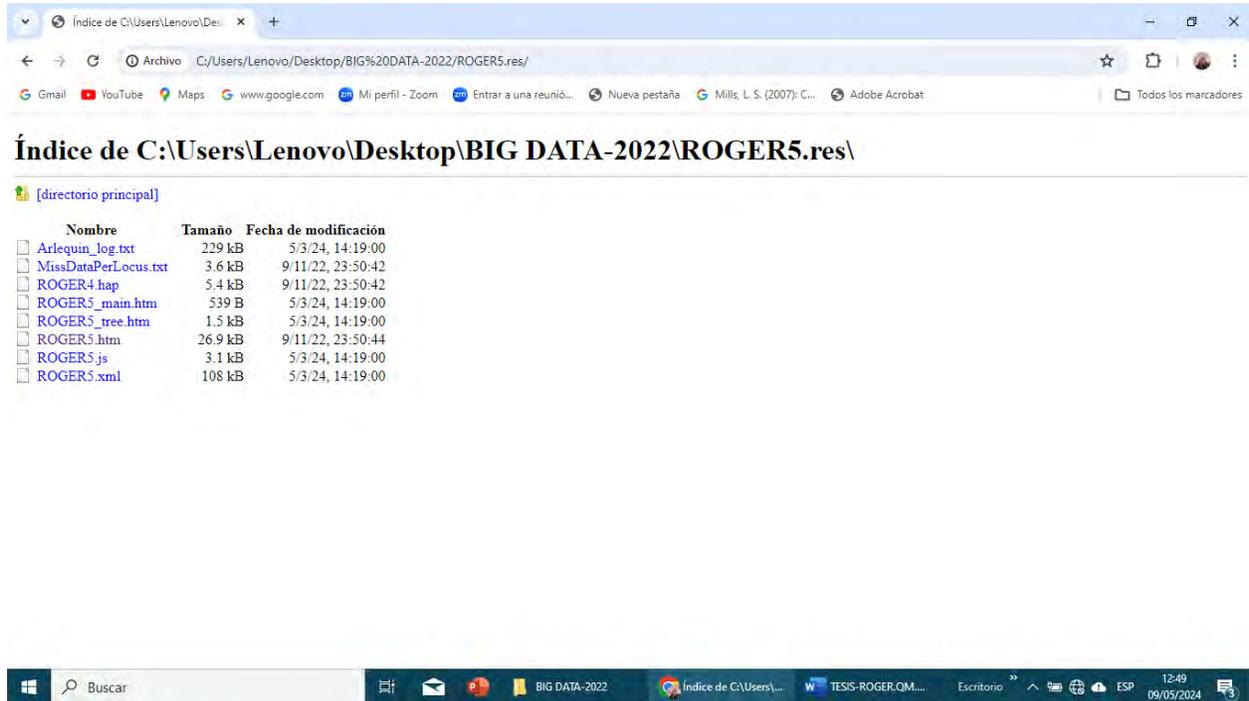
En la imagen se observa dándole estructura a cada población por ANP, para realizar el cálculo de flujo genético entre ambas poblaciones, dicho proceso se siguió en el programa DnaSP6.



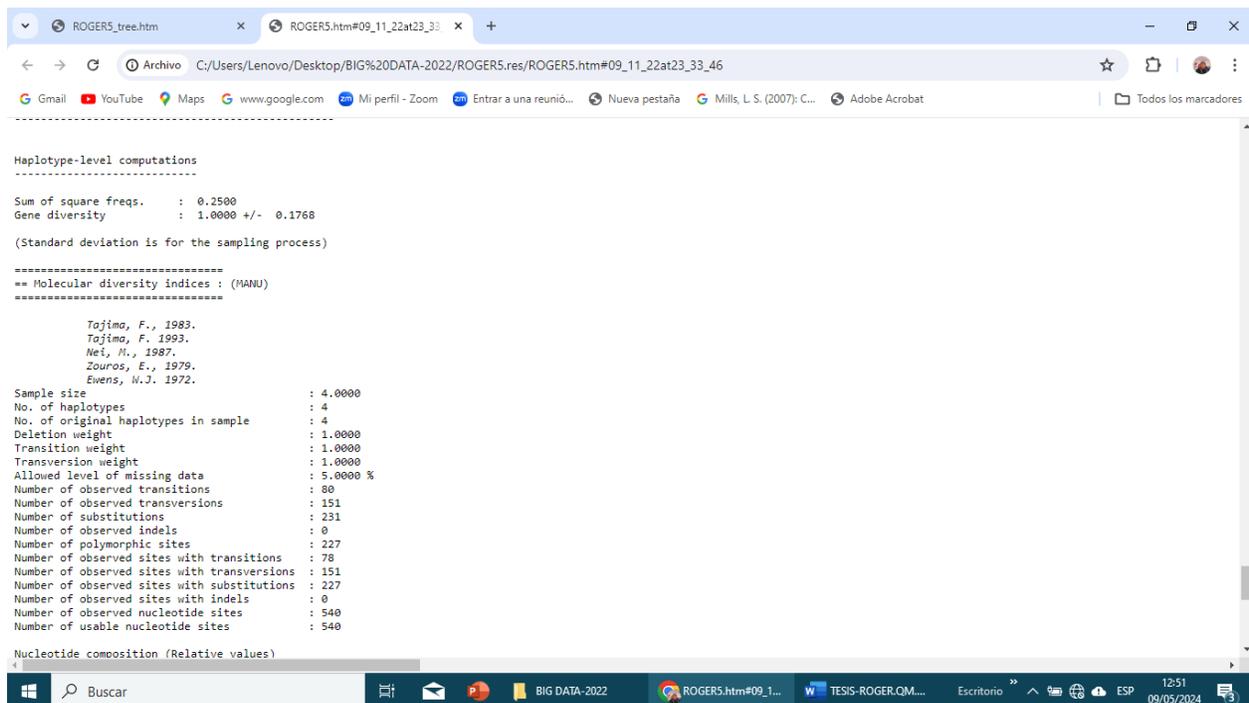
*El archivo importamos en el programa arlequin donde se define los cálculos que va a calcular y una vez listo presionamos Star, el programa nos genera una carpeta con los resultados.*

## ABNEXO 11:

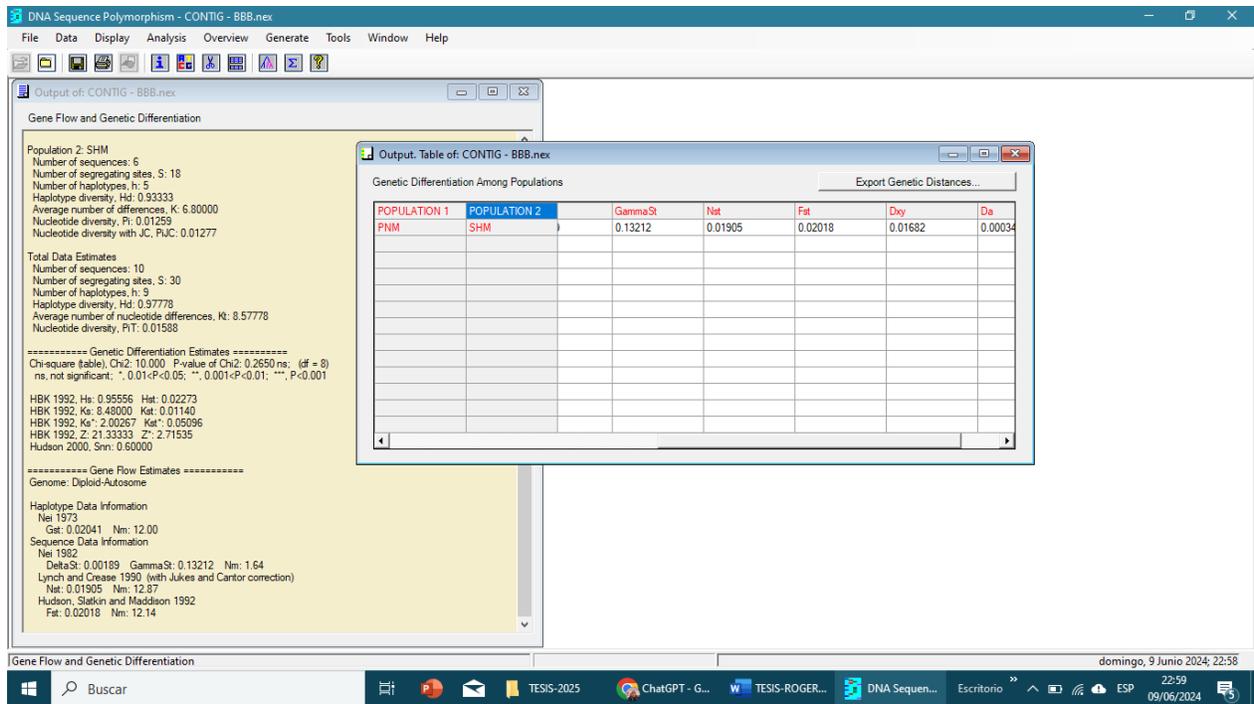
resultados del cálculo de los índices de diversidad



*El archivo generado en arlequin arrastramos a un navegador para visualizar los resultados.*

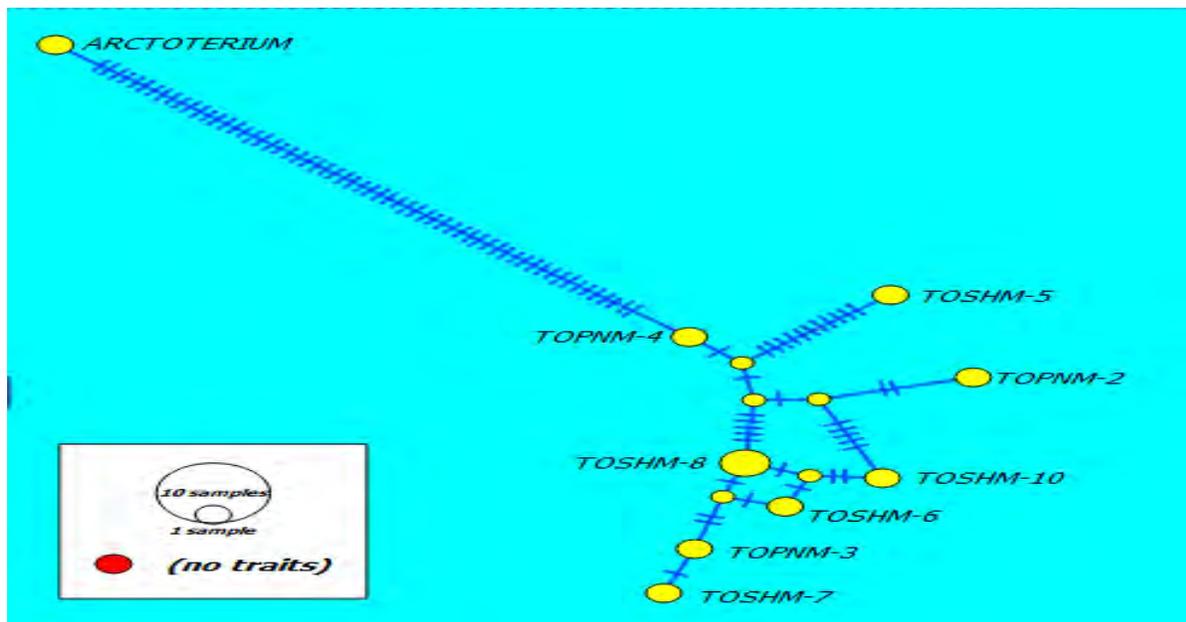


*En la imagen se observa los índices calculados en el programa Arlequin.*



En la imagen se observa los cálculos realizados para determinar  $F_{st}$ ,  $G_{st}$ ,  $N_{st}$  en el programa DNA sP6.

## ANEXO 12: red de haplotipos



En la imagen se observa el interfaz del programa PopART1.7, muestra resultados de la red de haplotipos encontrados, resultado el haplotipo 4 con dos individuos muestreados.

## ANEXO 13

Resolución de autorización de investigación dentro de Santuario Histórico de Machupicchu

**SERVICIO NACIONAL DE AREAS NATURALES PROTEGIDAS POR EL ESTADO –  
SERNANP  
DIRECCION DE GESTION DE LAS AREAS NATURALES PROTEGIDAS – DGANP**

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para mujeres y hombres"  
"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**MEMORANDUM (M) N° 277 -2018-SERNANP-DGANP**

PARA : **ERNESTO ESCALANTE VALENCIA**  
Jefe del Santuario Histórico de Machupicchu

**ERNESTO JOHN FLOREZ LEIVA**  
Jefe del Parque Nacional del Manu

ASUNTO : Remito Autorización para realizar investigación científica en ANP

REFERENCIA : Resolución Directoral N° 85-2018-SERNANP-DGANP

FECHA : 21 SET. 2018



Me dirijo a ustedes, para remitirles la Resolución Directoral N° 085-2018-SERNANP-DGANP, que autoriza el desarrollo de la investigación científica denominada "*Diversidad genética del oso andino (Tremarctos ornatus) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)*", que involucra a las ANP a sus cargos.

En tal sentido, se les solicita realizar las acciones de seguimiento y monitoreo de las actividades autorizadas mediante la Resolución Directoral en mención, en cumplimiento a lo establecido en el Artículo 4° y 6° de la indicada Resolución, así como el Artículo 28° de la R.P. N° 287-2015-SERNANP; bajo responsabilidad.

Atentamente,



**ING. JOSÉ CARLOS NIETO NAVARRETE**  
DIRECTOR DE GESTIÓN DE LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS  
SERNANP



JCNN/CSR/GCI  
Remito Autorización para realizar investigación científica en ANP  
CUT N° 22113 - 2018



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 85 2018-SERNANP-DGANP

Lima 14 SET. 2018

VISTO:

El Informe N° 470-2018-SERNANP-DGANP del 05 de setiembre de 2018, a través del cual se evalúa la solicitud presentada por el señor Roger Quispe Mamani, para realizar la investigación científica denominada "Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)".

CONSIDERANDO:

Que, de conformidad con el artículo 29° de la Ley N° 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas, el Estado reconoce la importancia de las Áreas Naturales Protegidas - ANP, para el desarrollo de la investigación científica básica y aplicada, la misma que sólo será autorizada si su desarrollo no afecta los objetivos primarios de conservación del Área Natural Protegida en la cual ésta se lleve a cabo y se respete la zonificación y condiciones establecidas en el Plan Maestro;

Que, el Plan Director de las Áreas Naturales Protegidas, aprobado mediante Decreto Supremo N° 016-2009-MINAM, señala que la investigación científica es considerada como uno de los objetivos de creación de las Áreas Naturales Protegidas y como una actividad inherente al Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado - SINANPE y su gestión, no contando dicha actividad con restricción alguna en la medida que cumpla la normatividad, no se contraponga con los objetivos de creación del Área Natural Protegida en cuestión y sus instrumentos de planificación;

Que, a través del Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, publicado el 23 de setiembre del 2015, se declara de interés nacional el desarrollo de investigaciones al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional, determinándose su gratuidad, así como los procedimientos de aprobación automática y evaluación previa para su otorgamiento;

Que, en el artículo 4° del mencionado Decreto Supremo, se prevé cinco supuestos en los que la autorización de investigación requiere de evaluación previa: a) ingreso a ámbitos de acceso restringido, b) la colecta o extracción de muestras biológicas, c) se prevea la alteración del entorno o instalación de infraestructura en el caso de áreas naturales protegidas de administración nacional, d) el uso de equipo o



infraestructura perteneciente a las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional, e) investigación en predios privados;

Que, mediante Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP del 23 de diciembre del 2015, se aprueban las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, estableciendo las normas y lineamientos que regulan las investigaciones realizadas al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional;

Que, la Resolución Ministerial N° 35-2017-MINAM del 03 de febrero del 2017, modifica, entre otros, el Procedimiento N° 4 del Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERNANP, aprobado por Decreto Supremo N° 002-2012-MINAM y modificado por Resolución Ministerial N° 152-2016-MINAM y Resolución Ministerial N° 315-2016-MINAM;

Que, con Resolución Presidencial N° 99-2017-SERNANP del 18 de abril 2017, se modifica el proceso "GAN-01-10-Otorgamiento del Certificado de Procedencia";

Que, el 01 de agosto de 2018, el señor Roger Quispe Mamani solicita autorización para realizar la investigación científica denominada "Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)", por el periodo de 01 año, el mismo se identifica con el CUT N° 22113, adjuntando, entre otros documentos, las fichas del personal involucrado;



Que, con Memorandum N° 235-2018-SERNANP-DGANP del 07 de agosto del 2018, la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas solicitó las opiniones técnicas a las jefaturas involucradas en la solicitud;

Que, el Oficio N° 471-2018-SERNANP-SHM/J del 13 de agosto de 2018, adjunta el Informe N° 46-2018-SERNANP-SHM-ATA, mediante los cuales la jefatura del Santuario Histórico de Machupicchu concluye que la investigación cumple con los requisitos establecidos en la Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP, siendo justificada su aprobación;



Que, el Oficio N° 138-2018-SERNANP-JPNM del 21 de agosto de 2018, adjunta el Informe N° 067-2018-SERNANP-PNM-E-JLJC, mediante los cuales la jefatura del Parque Nacional del Manu señala una observación que deberá ser subsanada por el administrado;

Que, mediante correo electrónico del 31 de agosto 2018, el administrado cumplió con levantar la observación señalada;

Que, a través del informe del visto, la Unidad Operativa Funcional Manejo de Recursos Naturales en Áreas Naturales Protegidas de la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas, concluye que el administrado cumplió con adjuntar todos los requisitos exigidos en el Texto Único de Procedimientos Administrativos.



Señala que la investigación se enmarca dentro de las prioridades de investigaciones identificadas por la jefatura del Santuario Histórico de Machupicchu y el Parque Nacional del Manu, emitiendo opinión favorable para su desarrollo;

Con el visto bueno de la Oficina de Asesoría Jurídica;

En uso de las atribuciones conferidas por el artículo 22° del Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP, aprobado mediante Decreto Supremo N° 006-2008-MINAM.

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Autorizar el desarrollo de la investigación científica denominada "Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)", a favor del señor Roger Quispe Mamani, cuyo ámbito involucra al Parque Nacional del Manu y al Santuario Histórico de Machupicchu, por el plazo de dos (02) años, contados a partir de la fecha de emisión de la presente Resolución.



**Artículo 2°.-** Autorizar el ingreso a las siguientes Áreas Naturales Protegidas: Parque Nacional del Manu y al Santuario Histórico de Machupicchu, según el siguiente detalle:



ANP	Sector	Zonificación
Parque Nacional del Manu.	Tres Cruces	Zona de Protección Estricta
	Curcurpamapa	Zona de Protección Estricta
	Acjanaco	Zona de Protección Estricta
Santuario Histórico de Machupicchu.	Ahobamba	Zona de Protección Estricta
	San Gabriel-Mandor	
	Wiñaywayna-Torrepata	Zona Silvestre
	Torontoy-Palomar	Zona de Recuperación

Se utilizará la infraestructura de las Áreas Naturales Protegidas próximas a los ámbitos del proyecto, previa coordinación con las respectivas Jefaturas.

**Artículo 3°.-** Autorizar el ingreso a las referidas Áreas Naturales Protegidas, a las siguientes personas, que conforman el equipo de investigadores:

N°	Nombres y Apellidos	Documento de identidad	Nacionalidad	Cargo	Institución
1	Roger Quispe Mamani.	72037697	Peruana	Responsable	UNSAAC

14	Modesto Quispe Bonifacio.	25120144	Peruana	Voluntario	Independiente
----	---------------------------	----------	---------	------------	---------------

**Artículo 4°.-** Autorizar la colecta de muestras biológicas correspondientes a pelos del oso andino (*Tremarctos ornatus*).

Precisar que la presente autorización no otorga derechos sobre los recursos genéticos contenidos en las muestras biológicas colectadas.



**Artículo 5°.-** El investigador identificado en el artículo 1° de esta Resolución, es responsable de conocer y cumplir las disposiciones contenidas en la Ley N° 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas y su Reglamento, aprobado mediante Decreto Supremo N° 038-2001-AG, el Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, así como en la Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP.

Asimismo, el investigador deberá cumplir con las normas que las Jefaturas y su personal dispongan durante el desarrollo de la investigación.

**Artículo 6°.-** El señor Roger Quispe Mamani autorizado en el artículo 1° de la presente Resolución, en su calidad de investigador responsable asume las siguientes obligaciones y compromisos:



- a. Presentar copia de la presente autorización al personal del ANP que lo solicite.
- b. No extraer muestras biológicas distintas a las autorizadas.
- c. Tramitar el certificado de procedencia, cuando se requiera trasladar las muestras de material biológico colectado fuera del ámbito de las ANP.
- d. Gestionar los permisos de exportación ante la autoridad competente, cuando se requiera enviar al extranjero parte del material biológico colectado.
- e. Comunicar al SERNANP cualquier eventualidad negativa que pudiera ocurrir durante el desarrollo del proyecto.
- f. Entregar una vez publicado los resultados de la investigación, una copia digital de la publicación al SERNANP y autorizar su registro en la biblioteca digital del SERNANP.
- g. Entregar a la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas 02 copias del informe final (incluye versión digital), conteniendo material



fotográfico y la lista de especies colectadas y/o registradas en formato MS Excel en el marco de la presente autorización, para la gestión del SINANPE y que justificó el apoyo del SERNANP

El incumplimiento injustificado de cualquiera de estos compromisos producirá el ingreso del investigador en la lista de investigadores inhabilitados para próximas autorizaciones emitidas por el SERNANP.

**Artículo 7°.-** La autorización a la que se refiere el artículo 1° caducará automáticamente al vencer el plazo concedido, por el incumplimiento injustificado de los compromisos adquiridos o por cualquier daño al patrimonio natural, sin perjuicio de las responsabilidades administrativas, civiles o penales que pudieran originarse.

**Artículo 8°.-** El SERNANP no será responsable por los accidentes o daños que pueda sufrir el equipo de investigadores durante el desarrollo de la investigación científica, quienes asumirán toda responsabilidad sobre su accionar.

**Artículo 9°.-** Encargar a las Jefaturas del Parque Nacional del Manu y del Santuario Histórico de Machupicchu, en el ámbito de sus competencias, la supervisión del cumplimiento de las obligaciones establecidas en el artículo 6° de la presente Resolución.

**Artículo 10°.-** Notificar la presente Resolución al señor Roger Quispe Mamani y a las Jefaturas del Parque Nacional del Manu y del Santuario Histórico de Machupicchu.

**Artículo 11°.-** Regístrese la presente Resolución en el Módulo de Seguimiento a las autorizaciones de investigación del SERNANP, en el archivo de autorizaciones de las ANP involucradas y publíquese en la página web del SERNANP ([www.sernanp.gob.pe](http://www.sernanp.gob.pe)).

Regístrese y comuníquese.



**José Carlos Nieto Navarrete**  
Director de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas  
SERNANP

**ANEXO 14:**

*Autorización de ingreso otorgado por la jefatura del SHM, firmado por los puestos de control como evidencia del trabajo de campo desarrollado.*

	<b>PERU</b>	<b>Ministerio del Ambiente</b>	<b>Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado</b>	<b>Santuario Histórico de Machupicchu</b>
---	-------------	--------------------------------	--	---

Cusco, 04 OCT 2018

**CARTA N° / 23 -2018-SERNANP- SHM/J**

**Bach. ROGER QUISPE MAMANI**  
**Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco**

Ciudad.-

Asunto: Remite Autorización de Ingreso

Referencia: Solicitud para autorización de ingreso de fecha 08 de octubre de 2018

Es grato dirigirme a usted para saludarlo y con la presente remitir adjunta la autorización de ingreso N° 061-2018-SERNANP-SHM/J, en atención al documento de la referencia.

Sin otro particular, hago propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi consideración.

Atentamente,





MINISTERIO DEL AMBIENTE  
SERNANP

*Mgt. Ernesto Escalante Valencia*  
JEFE DEL SANTUARIO HISTORICO DE MACHUPICCHU





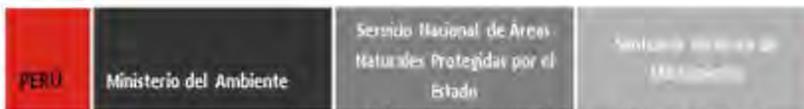


**Dirección:** Av. Oswaldo Baca N° 402, Urb. Megisterio 1ra. Etapa - Cusco  
**Teléfono:** 51 - 84 - 229297 // 51 - 84 - 222310  
**Email:** shmachupicchu@sernanp.gob.pe  
**Web:** www.sernanp.gob.pe



## ANEXO 15

### Certificado de procedencia de las muestras Biológicas del SHM.



BICENTENARIO  
PERÚ 2021

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres Y Hombres"  
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia"

N° SH03-0001

#### CERTIFICADO DE PROCEDENCIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS 01 -2021-SERNANP-SHM

**Nota:** Esta lista contiene información proporcionada por el responsable de la Investigación autorizada según Resolución

La Jefatura del Santuario Histórico de Machupicchu, certifica que las muestras biológicas de oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) han sido colectadas en el marco de una investigación desarrollada en el interior del Área Natural Protegida, según la declaración jurada del investigador, de acuerdo al siguiente detalle:

I. Datos del Responsable de la Investigación: <sup>(2)</sup>		
Nombre del Responsable de la Investigación <sup>(2.1)</sup>	Documento de Identidad (DNI, Pasaporte, Carnet de extranjería) <sup>(2.2)</sup>	Título de la Investigación <sup>(2.3)</sup>
Quispe Mamani, Roger	DNI N° 72037697	Diversidad genética del oso andino ( <i>Tremarctos ornatus</i> ) en dos áreas naturales protegidas del Cusco
Localidad <sup>(2.4)</sup>		
Q'oriwayrachina, Mandor, Aobamba, Intiwatana, Torontoy		
Autorización de investigación científica otorgada (N° R.D. o R.J.) <sup>(2.5)</sup>		Vigencia de la Autorización de investigación <sup>(2.6)</sup>
Resolución Directoral N° 85-2018-SERNANP-DGANP		Dos años (14 de setiembre del 2018 al 13 de setiembre del 2020)

II. Muestra Biológica <sup>(3)</sup>				
Tipo de muestra biológica <sup>(3.1)</sup>				
Muestras menor o igual a 5 especímenes <sup>(3.2)</sup>				
Especie/Taxón <sup>(3.3)</sup>	Cantidad <sup>(3.4)</sup>	Unidad de medida <sup>(3.5)</sup>	Condición <sup>(3.6)</sup>	Observación <sup>(3.7)</sup>
<i>Tremarctos ornatus</i>	02	Muestras de huesos metatarso	Procesado como producto de PCR	----
<i>Tremarctos ornatus</i>	37	Muestras de pelo	Procesado como producto de PCR	
<b>Total</b>	<b>39</b>			
Muestras mayores a 5 especies <sup>(3.8)</sup>		Observación <sup>(3.9)</sup>		
Individuos Completos				

Directoral N° 85-2018-SERNANP-DGANP, y tiene valor de declaración jurada.

Av. Oswaldo Baca N° 402, Urb. Magisterio 1ra. Etapa - Cusco  
Telefax: 51 - 84 - 229297 // 51 - 84 - 222310  
Email: shmachupicchu@sernanp.gob.pe



PERU

Ministerio del Ambiente

Servicio Nacional de Áreas  
Naturales Protegidas por el  
EstadoInstituto Nacional de  
InvestigaciónBICENTENARIO  
PERÚ 2021"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres Y Hombres"  
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia"

Partes o derivados de especies ----

**III. Datos de la persona responsable del Transporte de muestras biológicas <sup>(4)</sup>**

Nombres y Apellidos <sup>(4.1)</sup>	Documento de Identidad (DNI, Pasaporte, Carnet de extranjería) <sup>(4.2)</sup>	Nacionalidad <sup>(4.3)</sup>
Roger Quispe Mamani	DNI 72037697	Peruana

**IV. Destino de las Muestras Biológicas <sup>(5)</sup>**

Nacional:	<input checked="" type="checkbox"/>	Departamento/Ciudad:	Cusco
Internacional <sup>(5.1)</sup> :	<input type="checkbox"/>	País <sup>(5.2)</sup> :	
Institución Nacional donde serán depositadas las muestras biológicas <sup>(5.3)</sup>	Dirección <sup>(5.4)</sup>		
Universidad Nacional San Antonio de Abad del Cusco	Av. La Cultura-Cusco		
Institución Internacional donde serán identificadas las muestras biológicas	Dirección		

El presente documento certifica que el material biológico proviene del Santuario Histórico de Machupicchu, así mismo es equivalente a la Guía de Transporte Forestal y de Fauna Silvestre de acuerdo al DS N° 018-2015-MINAGRI y DS N° 019-2015-MINAGRI. Constituye una declaración jurada, siendo el titular del derecho responsable por la información proporcionada, en caso contrario se aplicarán los procedimientos y sanciones previstas en la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General.

Fecha de expedición: 17 de marzo de 2021

<sup>(5.1)</sup> En caso de requerir exportar las muestras, deberá tramitarse el permiso de exportación correspondiente ante la autoridad forestal competente.

En caso se hubiera colectado una especie no considerada en la autorización de investigación, deberá declararlo en el cuadro.

El Certificado de Procedencia deberá ser presentado **OBLIGATORIAMENTE** durante el transporte de los recursos, productos y subproductos fuera del ámbito de las Áreas Naturales Protegidas. Este documento equivale a la Guía de Transporte Forestal y/o de Fauna Silvestre.

Av. Oswaldo Baca N° 402, Urb. Magisterio 1ra. Etapa - Cusco  
Telefax: 51 – 84 – 229297 // 51 – 84 – 222310  
Email: [shmachupicchu@sernanp.gob.pe](mailto:shmachupicchu@sernanp.gob.pe)

## ANEXO 16

Carta de autorización N° 572-2021-SERNANP-DGANP, dicha carta autoriza la investigación en las dos ANPs.



PERÚ

Ministerio  
del Ambiente

Servicio Nacional de Áreas  
Naturales Protegidas por  
el Estado

Dirección de Gestión de  
las Áreas Naturales  
Protegidas



BICENTENARIO  
PERÚ 2021

"Decenio de la igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"  
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

Lima, 18 de octubre de 2021

### CARTA N° 572-2021-SERNANP-DGANP

Señor:

**ROGER QUISPE MAMANI**

A.P.V Las Perlas A-19. San Sebastián, Distrito de Cusco

[roy-qm@hotmail.com](mailto:roy-qm@hotmail.com)

Cusco -

**Asunto:** Procedimiento administrativo para autorizar investigación básica enmarcada en el Artículo 5 del Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM

**Referencia:** Solicitud s/n (03/09/2021)

Me dirijo a usted para saludarlo cordialmente en atención al documento de la referencia, respecto a su expediente de solicitud de autorización de investigación en áreas naturales protegidas para el desarrollo del estudio "*Diversidad genética del oso andino (Tremarctos ornatus) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)*", a desarrollarse en los ámbitos señalados.

Al respecto, de acuerdo con las características del proyecto en mención, se trata de una investigación sin fines comerciales, que se enmarca dentro de las exclusiones<sup>1</sup> del Reglamento de Acceso a Recursos Genéticos. En este sentido, se le solicita que pueda juntar información adicional para culminar la evaluación de su solicitud. Para ello, se adjunta al presente documento el Anexo I, donde se detalla los requisitos e información adicional que se estaría solicitando.

Finalmente, en caso necesite realizar alguna consulta al respecto, podrá comunicarse con el especialista Kenton De la Cruz, a la siguiente dirección electrónica [kdelaacruz@sernanp.gob.pe](mailto:kdelaacruz@sernanp.gob.pe). Asimismo, la información debe ser remitida al SERNANP a través de la Mesa de partes virtual para recepción de documentos online<sup>2</sup>.

Sin otro particular, expreso mis cordiales saludos.

Atentamente,



Firmado digitalmente por:  
NIETO NAVARRETE Jose  
Carlos FAU 20478053178 soft  
Motivo: En señal de  
conformidad  
Fecha: 19/10/2021 18:25:23-0500

Para visualizar los adjuntos del presente documento, ingrese al siguiente link:  
<http://foldersgd2.sernanp.gob.pe/index.php/s/bj9lSAyYqdIM0jq>

#### <sup>1</sup> Artículo 5.- Exclusiones

e) La investigación básica relacionada a la identificación, delimitación y clasificación de especies que involucren el uso de herramientas moleculares u otras herramientas modernas con fines taxonómicos, sistemáticos, filogeográficos, biogeográficos, evolutivos, de ecología molecular y de genética de la conservación, sin fines comerciales.

<sup>2</sup> <https://www.gob.pe/institucion/sernanp/campa%C3%B1as/1127-mesa-de-partes-virtual-para-recepcion-de-documentos-online>

**Dirección:** Calle Diecisiete N° 355, Urb. El Palomar - San Isidro. Lima-Perú.  
**Teléfonos:** (51 1) 717-7500 / 225-2803  
**Fax:** (51 1) 475-1555  
**Web:** [www.sernanp.gob.pe](http://www.sernanp.gob.pe)  
**Email:** [sernanp@sernanp.gob.pe](mailto:sernanp@sernanp.gob.pe)



Firmado digitalmente por:  
SANCHEZ ROJAS Carlos  
Felipe FAU 20478053178 hard  
Motivo: Soy el autor del  
documento  
Fecha: 19/10/2021 12:21:23-0500

## ANEXO 17

Resolución de autorización para realizar investigación dentro del PNM.



### RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 004-2022-SERNANP-DGANP

Lima, 11 de enero de 2022

#### VISTO:

El Informe N° 756-2021-SERNANP-DGANP del 29 de diciembre del 2021, a través del cual la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas emite opinión sobre la solicitud de autorización presentada por el señor Roger Quispe Mamani y;

#### CONSIDERANDO:

Que, de conformidad con el artículo 29° de la Ley N° 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas, el Estado reconoce la importancia de las Áreas Naturales Protegidas - ANP, para el desarrollo de la investigación científica básica y aplicada, la misma que sólo será autorizada si su desarrollo no afecta los objetivos primarios de conservación del Área Natural Protegida en la cual ésta se lleve a cabo y se respete la zonificación y condiciones establecidas en el Plan Maestro;

Que, el Plan Director de las Áreas Naturales Protegidas, aprobado mediante Decreto Supremo N° 016-2009-MINAM, señala que la investigación científica es considerada como uno de los objetivos de creación de las Áreas Naturales Protegidas y como una actividad inherente al Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado - SINANPE y su gestión, no contando dicha actividad con restricción alguna en la medida que cumpla la normatividad, no se contraponga con los objetivos de creación del Área Natural Protegida en cuestión y sus instrumentos de planificación;

Que, el Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, publicado el 23 de setiembre de 2015, declara de interés nacional el desarrollo de investigaciones al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional, determinándose su gratuidad, así como los procedimientos de aprobación automática y evaluación previa para su otorgamiento;

Que, mediante el Decreto Supremo N° 008-2020-SA y sus modificatorias, se declara la emergencia sanitaria a nivel nacional y dicta medidas de prevención y control del COVID-19;

Que, por Resolución Presidencial N° 079-2021-SERNANP, se aprueba el "Plan para la Vigilancia, Prevención y Control de COVID-19 en el Trabajo del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado - SERNANP";



Firmado por

LAZO HERRERA María Elena FAU 20478053178 hard

CN = LAZO HERRERA María Elena FAU  
20478053178 hard  
O = SERVICIO NACIONAL DE AREAS NATURALES  
PROTEGIDAS POR EL ESTADO - SERNANP  
C = PE



Que, el Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, aprobó el Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, vigente desde el 24 de julio del 2021, Reglamento que en su artículo 5, excluye del ámbito de aplicación del mismo a la investigación básica relacionada a la identificación, delimitación y clasificación de especies que involucren el uso de herramientas moleculares u otras herramientas modernas con fines taxonómicos, sistemáticos, filogeográficos, biogeográficos, evolutivos, de ecología molecular y de genética de la conservación, sin fines comerciales, por lo tanto en caso se requiera obtener el acceso a los recursos genéticos y sus derivados deberá solicitarlo conforme a las modalidades establecidas en el precitado Reglamento;

Que, previendo la excepción señalada en el párrafo precedente, a través del Informe N° 517-2021-SERNANP-DGANP se concluye que, las exclusiones identificadas en el inciso e) del artículo 5 del Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, pueden ser atendidas por el SERNANP, no pudiendo calificarse dentro del Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA N° 4, siendo necesario desarrollar un proceso exclusivo para estas investigaciones. Sin embargo; mientras se elabore el proceso respectivo, estas investigaciones pueden ser atendidas de manera similar a las investigaciones bajo dicho TUPA;

Que, mediante solicitud S/N del 23 de noviembre del 2021, el señor Roger Quispe Mamani, identificado con DNI N° 72037697, solicita autorización para realizar la investigación científica denominada "Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu)", a desarrollarse en el ámbito de las Áreas Naturales Protegidas en mención, por el periodo de doce (12) meses, el mismo se identifica con el expediente CUT N° 031590;

Que, con Memorandum Múltiple N° 366-2021-SERNANP-DGANP del 02 de diciembre del 2021, la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas (DGANP) solicitó las opiniones técnicas a las Jefaturas involucradas en la solicitud;

Que, por Oficio N° 651-2021-SERNANP-SHM/J y el Informe Técnico N° 08-2021-SERNANP-SHM-ACMR, la Jefatura del Santuario Histórico Machupicchu concluye que, el mismo está excluido del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y cumple con los requisitos establecidos en la Resolución Presidencial N° 214-2021-SERNANP;

Que, con Oficio N° 206-2021-SERNANP-JPNM y el Informe Técnico N° 53-2021-SERNANP-PNM-E-JAMO, la Jefatura del Parque Nacional Manu concluye que, el expediente cumple con los requisitos exigidos por el SERNANP;



Que, al enmarcarse el citado proyecto en el contexto de lo dispuesto en el literal e) del Artículo 5° del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, la DGANP señala que, mediante correo electrónico del 20 de diciembre de 2021 solicita al administrado la siguiente información complementaria: i) Aclarar el objetivo específico relacionado a la estandarización de extracción de ADN mitocondrial a partir de muestras de fauna en cautiverio, ii) Aclarar el número de muestras colectadas previamente en el Santuario Histórico de Machupicchu, y iii) Aclarar la metodología para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el proyecto, siendo atendido con la Carta s/n recibida el 21 de diciembre de 2021;

Que, a través del informe del visto, la Unidad Operativa Funcional de Manejo de Recursos Naturales en Áreas Naturales Protegidas de la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas, concluye que el administrado cumplió con adjuntar la información requerida para solicitar autorización de investigación científica en ANP en el marco del literal e) del Artículo 5° del DS N° 019-2021-MINAM. Señala que el proyecto de investigación, que implica la colecta de muestras biológicas ambientales y acceso a los recursos genéticos sin fines comerciales; es importante porque generará información sobre la diversidad genética de las poblaciones de oso andino, que servirá a su vez como una línea base para futuras investigaciones y poder establecer programas de conservación específicas de acuerdo con las necesidades de cada población in situ. Finalmente, se debe precisar que, según el esquema de investigación, se ha identificado como una investigación prioritaria, por lo que el ingreso a dichos ámbitos, se enmarcan de acuerdo con lo establecido en las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, además que la metodología descrita no genera impactos significativos a las ANP involucradas;

Que, de acuerdo con los principios de eficacia y celeridad, consagrados en el artículo IV del Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444 - Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; que sustentan al procedimiento administrativo y regulan las actuaciones de la función administrativa del Estado; corresponde atender el acto solicitado por el administrado;

Con el visto bueno de la Oficina de Asesoría Jurídica;

En uso de las atribuciones conferidas por el artículo 22° del Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP, aprobado mediante Decreto Supremo N° 006-2008-MINAM.

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Autorizar el desarrollo de la investigación científica denominada



“Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu)”, por el periodo de 12 meses contados a partir de la fecha de notificación de la presente Resolución, a desarrollarse en los ámbitos del Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu, teniendo como responsable al señor Roger Quispe Mamani, identificado con DNI N° 72037697.

**Artículo 2°.-** Precisar que el recurso biológico previamente colectado consiste en seis (06) muestras biológicas (número variable de pelo) de oso andino del Santuario Histórico de Machupicchu (Tabla N° 2), las cuales fueron colectadas en el marco de la Resolución Directoral N° 85-2018-SERNANP-DGANP emitida el 14 de setiembre de 2018 y cuenta con el Certificado de Procedencia de Muestras Biológicas 01-2021-SERNANP-SHM.

**Tabla N° 2. Georreferencia de las muestras colectadas en el Santuario Histórico de Machupicchu (SHM)**

N°	Sector	Tipo de muestra	Zona	Este	Norte
1	Qorihuayrachina	Hueso/pelo	18L	777350	8539923
2	Mandor 1 (muralla inca)	Pelo	18L	767710	8545572
3	Mandor 2	Pelo	18L	766495	8545595
4	Intiwatana	Pelo	18L	763512	8540045
5	Ahobamba	Pelo	18L	763992	8539282
6	Torontoy Palo-mar	Pelo	18L	777350	8539923

**Artículo 3°.-** Establecer que los puntos de referencia que serán autorizados para la colecta de muestras biológicas (pelo) de oso andino se ubican en el ámbito del Parque Nacional Manu del departamento de Cusco – Perú, según se detalla en el Anexo N° 3 del presente documento.

**Artículo 4°.-** Autorizar el desarrollo de la investigación “Diversidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu)”, a las siguientes personas, que conforman el equipo de investigadores:

N°	Nombres y Apellidos	Documento de identidad	Nacionalidad	Cargo	Institución
1	Roger Quispe Mamani	72037697	Peruana	Responsable	Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco



2	Juveal Camala Nina	72037672	Peruana	Voluntario	Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco
3	Isaias Cjuno Turpo	76603107	Peruana	Voluntario	Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

**Artículo 5°.** - Autorizar la colecta como máximo diez (10) muestras, las cuales comprenderán aproximadamente de treinta (30) pelos por muestra; según el siguiente detalle:

**Número máximo de muestras biológicas colectadas por punto de referencia**

Familia	Genero	Especie	Número máximo de muestras de pelos	Área Natural Protegida
Ursidae	Tremarctos	T. ornatus	10	Parque Nacional Manu

Precisar que la presente autorización se enmarca en el Artículo 5 del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados.

**Artículo 6°.** – El investigador responsable, identificado en el artículo 1° de esta Resolución y el equipo de investigadores, son responsables de conocer y cumplir las disposiciones contenidas en la Ley N° 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas y su Reglamento, aprobado mediante Decreto Supremo N° 038-2001-AG, así como las medidas de bioseguridad descritas en los Anexos 1 y 2 que forman parte de la presente Resolución.

Asimismo, deberán cumplir con las normas que las Jefaturas y su personal dispongan durante el desarrollo de la investigación, así como prever el correcto manejo de residuos sólidos generados por los integrantes del proyecto, en sus diversos tipos, durante su permanencia dentro del Área Natural Protegida, dando cumplimiento al Decreto Supremo N° 013-2018-MINAM que aprueba la reducción del plástico de un solo uso y promueve el consumo responsable en las entidades del Ejecutivo.

**Artículo 7°.** – El señor Roger Quispe Mamani identificado en el artículo 1° de la presente Resolución, en su calidad de investigador responsable asume las siguientes obligaciones y compromisos:



- a. Tramitar la autorización de ingreso ante las jefaturas de las Áreas Naturales Protegidas donde se desarrollará la investigación, de acuerdo con lo establecido en la Resolución Presidencial N° 169-2019-SERNANP y la Resolución Presidencial N° 079-2021-SERNANP.
- b. Presentar copia de la presente autorización al personal del ANP que lo solicite.
- c. No extraer muestras biológicas distintas a las autorizadas.
- d. Tramitar el certificado de procedencia, cuando se requiera trasladar las muestras de material biológico colectado fuera del ámbito de las ANP.
- e. Comunicar al SERNANP cualquier descubrimiento nuevo para la ciencia, debiendo entregar una copia del depósito del holotipo del nuevo taxa en una institución científica nacional.
- f. Gestionar los permisos de exportación ante la autoridad competente, cuando se requiera enviar al extranjero parte del material biológico colectado.
- g. Entregar una vez publicados los resultados de la investigación, una copia digital de la publicación al SERNANP y autorizar su registro en la biblioteca digital del SERNANP.
- h. Entregar a la Dirección de Gestión de las Áreas Naturales Protegidas 02 copias del informe final (incluye versión digital), conteniendo material fotográfico y la lista de especies registradas en formato MS Excel en el marco de la presente autorización, para la gestión del SINANPE y que justificó el apoyo del SERNANP

El incumplimiento injustificado de cualquiera de estos compromisos producirá el ingreso del investigador en la lista de investigadores inhabilitados para próximas autorizaciones emitidas por el SERNANP.

**Artículo 8°.-** La autorización a la que se refiere el artículo 1° caducará automáticamente al vencer el plazo concedido, por el incumplimiento injustificado de los compromisos adquiridos o por cualquier daño al patrimonio natural, sin perjuicio de las responsabilidades administrativas, civiles o penales que pudieran originarse.

**Artículo 9°.-** El SERNANP no será responsable por los accidentes o daños que pueda sufrir el equipo de investigadores durante el desarrollo de la investigación científica, quienes asumirán toda responsabilidad sobre su accionar.

**Artículo 10°.-** Encargar a las Jefaturas del Santuario Histórico de Machupicchu y del Parque Nacional Manu, en el ámbito de sus competencias, la supervisión del cumplimiento de las obligaciones establecidas en el artículo 6° y 7° de la presente Resolución.



**Artículo 11°.** - Notificar la presente Resolución al señor Roger Quispe Mamani y a las Jefaturas del Santuario Histórico de Machupicchu y en el Parque Nacional Manu.

**Artículo 12°.**- Regístrese la presente Resolución en el Módulo de Seguimiento a las autorizaciones de investigación del SERNANP, en el archivo de autorizaciones de las Áreas Naturales Protegidas involucradas y publíquese en la página institucional del SERNANP ([www.gob.pe/sernanp](http://www.gob.pe/sernanp)).

Regístrese y comuníquese.



Firmado digitalmente por:  
NIETO NAVARRETE Jose  
Carlos FAJ 20478053178 soft  
Motivo: En señal de  
conformidad  
Fecha: 11/01/2022 15:35:03-0500

## ANEXO 18

Autorización de ingreso al Parque Nacional de Manu otorgado por la jefatura del PNM, sellado por los puestos de control del PNM como evidencia del trabajo de campo.

	<b>PERU</b> Ministerio del Ambiente	Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado									
<b>PARQUE NACIONAL DEL MANU</b> SERNANP Puesto de Control y Vigilancia <b>ACJANACO</b>	<b>AUTORIZACION ESPECIAL N°004-2020-SERNANP-JPNM/INV</b>		<b>PARQUE NACIONAL DEL MANU</b> SERNANP Puesto de Control y Vigilancia <b>QURQUR PAMPA</b>								
A petición de Sr. Roger Quispe Mamani mediante <b>Solicitud</b> de ingreso S/N con fecha de registro 24 de enero de 2022 y de acuerdo a la Resolución Directoral N° 004-2022-SERNANP-DGANP, otorgado al Sr. Roger Quispe Mamani, investigador principal del proyecto "Diversidad genética del oso andino ( <i>Tremarctos ornatus</i> ) en dos Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu)", se autoriza ingresar al ámbito de los <b>Puesto de Vigilancia y Control de Acjanaco y Qurqurpampa</b> , ubicados al interior del Parque Nacional del Manu, con el objetivo de cumplir las actividades de la investigación indicada, por el periodo comprendido entre el 26 al 29 de enero de 2022, a las siguientes personas:											
28-01-22. 9:03 am RQ											
<table border="1"><thead><tr><th>Nombres y Apellidos</th><th>Nacionalidad</th><th>DNI/Pasaporte/CE</th><th>Cargo</th></tr></thead><tbody><tr><td>Roger Quispe Mamani</td><td>Peruano</td><td>72037697</td><td>Responsable</td></tr></tbody></table>				Nombres y Apellidos	Nacionalidad	DNI/Pasaporte/CE	Cargo	Roger Quispe Mamani	Peruano	72037697	Responsable
Nombres y Apellidos	Nacionalidad	DNI/Pasaporte/CE	Cargo								
Roger Quispe Mamani	Peruano	72037697	Responsable								
Asimismo se autoriza el ingreso a su personal de apoyo logístico.											
<table border="1"><thead><tr><th>Nombres y Apellidos</th><th>Nacionalidad</th><th>DNI/Pasaporte/CE</th><th>Cargo</th></tr></thead><tbody><tr><td>Modesto Quispe Bonifacio</td><td>Peruano</td><td>25120144</td><td>Personal de apoyo logístico</td></tr></tbody></table>				Nombres y Apellidos	Nacionalidad	DNI/Pasaporte/CE	Cargo	Modesto Quispe Bonifacio	Peruano	25120144	Personal de apoyo logístico
Nombres y Apellidos	Nacionalidad	DNI/Pasaporte/CE	Cargo								
Modesto Quispe Bonifacio	Peruano	25120144	Personal de apoyo logístico								
El responsable y su personal logístico se comprometen a:											
<ul style="list-style-type: none"><li>• Visitar sólo zonas autorizadas.</li><li>• No realizar actividades de fotografía y/o filmación con fines comerciales.</li><li>• No establecer contacto con indígenas en aislamiento y contacto inicial</li><li>• No efectuar actividades de caza, pesca o recolección de especies silvestres de flora y/o fauna que no estén autorizadas por la jefatura del ANP.</li><li>• No ingresar armas de fuego.</li><li>• Prever todo lo relacionado al transporte (movilidad y combustible), logística de campo y alimentación.</li><li>• Acatar las disposiciones que emita la Jefatura y el personal guardaparque del PARQUE NACIONAL DEL MANU.</li><li>• Otorgar las facilidades a las inspecciones que se efectúen por el personal guardaparque.</li><li>• No extraer materiales culturales, ni recolectar restos arqueológicos del ANP.</li><li>• No Ingresar bolsas de plástico de un solo uso, sorbetes de plástico y envases de tecnopor (poliestireno expandido) para bebidas y alimentos de consumo humano en el ámbito del ANP.</li><li>• No tener ningún tipo de contacto con las comunidades o poblaciones locales, sin contar con la autorizaciones de éstas y del personal de SERNANP</li><li>• Cumplir con los lineamientos establecidos en el "Plan para la Vigilancia, Prevención y Control de COVID-19 en el trabajo en el SERNANP", aprobado con la Resolución Presidencial N° 079-2021-SERNANP.</li></ul>											
Urb. Villa Miraflores G-7 San Jerónimo, Cusco -Perú	E-mail: <a href="mailto:el@manu.gob.pe">el@manu.gob.pe</a> <a href="mailto:peru@sernanp.gob.pe">peru@sernanp.gob.pe</a>										

## ANEXO 19

### Certificado de procedencia de las muestras biológicas N° 001-2022-SERNANP-PNM, del Parque Nacional de Manu.



Ministerio  
del Ambiente

Servicio Nacional  
de Áreas Naturales  
Protegidas por el Estado



N° PN03-0001

#### CERTIFICADO DE PROCEDENCIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS N° 001-2022-SERNANP-PNM

La Jefatura del Parque Nacional del Manu, certifica que las muestras biológicas de fauna silvestre han sido colectadas en el marco de una investigación desarrollada al interior del Área Natural Protegida, según la declaración jurada del investigador, de acuerdo al siguiente detalle:

I. Datos del Responsable de la Investigación: <sup>(2)</sup>		
Nombre del Responsable de la Investigación <sup>(2.1)</sup>	Documento de Identidad (DNI, Pasaporte, Carnet de extranjería) <sup>(2.2)</sup>	Título de la Investigación <sup>(2.3)</sup>
Roger Quispe Mamani	DNI: 72037697	"Diversidad genética del oso andino ( <i>Tremarctos ornatus</i> ) en dos Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Manu y Santuario Histórico Machupicchu)"
Localidad <sup>(2.4)</sup>		
Ámbito de los PVC de Qurqurpampa y Acanaco del Parque Nacional del Manu		
Autorización de investigación otorgada (N° R.D. o R.J.) <sup>(2.5)</sup>		Vigencia de la Autorización de investigación <sup>(2.6)</sup>
Resolución Directoral N.º 004-2022-SERNANP-DGANP		11 de enero de 2022 – 11 de enero de 2023

II. Muestra Biológica <sup>(3)</sup>				
Origen de la muestra biológica <sup>(3.1)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/>	Colectada por el titular de la investigación o su equipo	<input type="checkbox"/>	Hallazgo
Tipo de muestra biológica <sup>(3.2)</sup>	<input type="checkbox"/>	Ind. completos	<input checked="" type="checkbox"/>	Partes o derivados
<input type="checkbox"/>				
Nombre del personal que encontró la muestra (solo para el caso de hallazgos) <sup>(3.3)</sup>				
N° de informe del hallazgo <sup>(3.4)</sup>				
Muestras menor o igual a 5 especies <sup>(3.5)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/>	Coordenadas UTM <sup>(3.6)</sup>		
Especie/Taxón <sup>(3.7)</sup>	Cantidad <sup>(3.8)</sup>	Unidad de medida <sup>(3.9)</sup>	Condición <sup>(3.10)</sup>	Observación <sup>(3.11)</sup>
Oso andino ( <i>Tremarctos ornatus</i> )	32	Unidades de pelos	Preservados en 4 sobre de papel	TO-01-PNM, TO-02-PNM, TO-03-PNM y TO-04-PNM
<b>Total</b>	<b>32</b>			
Muestras mayores a 5 especies <sup>(3.12)</sup>	<b>Observación <sup>(3.13)</sup></b>			
Individuos Completos				
Partes o derivados de especies				
Productos y/o Subproductos demetabolismo				

III. Personal responsable del Transporte de muestras biológicas <sup>(4)</sup>		
Nombres y Apellidos <sup>(4.1)</sup>	Documento de Identidad (DNI, Pasaporte, Carnet de extranjería) <sup>(4.2)</sup>	Nacionalidad <sup>(4.3)</sup>
Roger Quispe Mamani	DNI: 72037697	Peruano

IV. Destino de las Muestras Biológicas <sup>(5)</sup>			
Nacional <sup>(5.1):</sup>	<input checked="" type="checkbox"/>	Departamento/Ciudad:	Cusco
Internacional <sup>(5.2):</sup>	<input type="checkbox"/>	País <sup>(5.3):</sup>	
Institución Nacional donde serán depositadas las muestras biológicas <sup>(5.4)</sup>		Dirección <sup>(5.5)</sup>	
Laboratorio de Genética y Genética Molecular de la Escuela Profesional de Biología - UNSAAC		Av. de La Cultura 773	

El presente documento certifica que el material biológico proviene del Parque Nacional del Manu; así mismo es equivalente a la Guía de Transportes Forestal y de Fauna Silvestre de acuerdo al DS N° 018-2015-MINAGRI y DS N° 019-2015-MINAGRI. La información contenida ha sido proporcionada a manera de declaración jurada por el solicitante del certificado, siendo el responsable de la veracidad de la información.

Fecha de expedición: 01 de febrero de 2022



Firmado digitalmente por:  
Nacional del Manu  
FAU 20478053178 hard  
Motto: Soy el autor del documento  
Fecha: 01/02/2022 17:59:58-0500

## ANEXO 20

*Constancia del depósito de muestras Biológicas en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**  
OFICIALIZACION DE FUNCIONAMIENTO RESOLUCION N° R-1482-2013-UNSAAC  
INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
RESOLUCION DE DIRECCION GENERAL N° 074-2017-SERFOR/DGGSPFFS

**CONSTANCIA DE DEPOSITO N°001-2021-MHNC-EP. BIOLOGIA-FAC.CIENCIAS-UNSAAC.**

La que suscribe, Curadora del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Mgt. ROCIO ORELLANA CUELLAR, emite la presente **CONSTANCIA DE RECEPCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO**, colectado con autorización dada mediante **RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 85-2018-SERNANP-DGANP**, teniendo como fines investigación científica en fauna silvestre denominada: **"Diversidad Genética del Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en dos áreas naturales protegidas de Cusco (Parque Nacional del Manu y Santuario Histórico de Machupicchu)"**, autorización emitida a favor del señor: **ROGER QUISPE MAMANI**; identificado con DNI N° 72037697, domiciliado en APV. Las Perlas A-19, San Sebastián, Cusco.

La colecta o muestreo, se llevó a cabo en los sectores de: Tres Cruces, Kunturpampa, Acjanaco, Qorihuayrachina, Mandor 1 (muralla inca), Mandor 2, Intiwatana, Ahobamba, Torontoy Palomar.

El señor en mención realizó la colecta de 09 muestras, utilizando métodos no invasivos (cámaras trampa y trampas pelo); las mismas que han sido recepcionadas por el Museo de Historia Natural el cual al ser parte de la Facultad de Ciencias y por razones de conservación, previa coordinación, mantiene las muestras en las instalaciones del Laboratorio Institucional de Genética Molecular (LGGM) de la Escuela Profesional de Biología – UNSAAC, donde además se viene realizando el trabajo de investigación, bajo el asesoramiento del responsable de dicho laboratorio M.Sc. Jorge Acurio Saavedra.

Se expide la constancia, a los 26 días del mes de febrero del año 2021.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL  
  
Mgt. Rocio Orellana Cuellar  
CURADORA

CC: ARCHIVO  
MUNSAAC

Correo : [munsaac@hotmail.com](mailto:munsaac@hotmail.com)  
Teléfonos : 984272864  
Dirección : Plaza de Armas S/N Cusco Perú

