

## GENÉTICA DE POBLACIONES DE MONOS AULLADORES (*Alouatta pigra*) EN HÁBITAT CONTINUO Y FRAGMENTADO EN LA SELVA LACANDONA, MÉXICO: UN ESTUDIO PRELIMINAR

### Population genetics of howler monkeys (*Alouatta pigra*) in continuous and fragmented habitats in the Lacandon jungle, Mexico: a preliminary study

Y García del Valle <sup>✉</sup>, A Estrada, E Espinoza, C Lorenzo, E Naranjo

(YGV) Posgrado, Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México  
monayasmi@primatesmx.com

(AE) Laboratorio de Primatología, Estación de saludos un minuto estoy enviando  
información Biología Los Tuxtlas, Instituto de Biología, UNAM

(EE) (CL) (EN) Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas

**Nota recibida:** 17 junio de 2005

**Nota aceptada:** 11 de octubre de 2005

**RESUMEN.** La variación genética en poblaciones de monos aulladores negros, *Alouatta pigra*, se estudió mediante técnicas no invasivas en la zona sur de la Reserva de la Biosfera Montes Azules (REBIMA) ubicada en la selva lacandona (331,200 ha), Chiapas, en la reserva ejidal de Reforma Agraria (RE: 1,700 ha a 2 km de la REBIMA), en dos fragmentos de selva en la misma reserva ejidal (1 y 20 ha), y en una población externa ubicada en la reserva forestal El Tormento (ET) en Campeche (1,400 ha) a 500 km al norte de las anteriores poblaciones. Con el microsatélite AP40 se amplificó el ADN para 47 de 59 muestras fecales recolectadas. La heterocigosidad promedio fue de 0.344 para las poblaciones de la REBIMA, de 0.305 para las de RE y de 0.341 para la población de ET. Estas diferencias no fueron significativas. Los valores medios del índice de consanguinidad ( $F_{IS}$ ) fueron negativos para las tres poblaciones (REBIMA, RE y ET), sugiriendo un nivel de consanguinidad bajo en éstas. La menor distancia genética fue aquella entre la REBIMA y RE (0.0022). Las mayores distancias fueron entre estas poblaciones y aquellas de los dos fragmentos de selva (0.200 y 0.3190), lo cual sugiere una diferenciación genética de estas últimas como resultado del aislamiento.

**Palabras clave:** *Alouatta pigra*, ADN, microsatélites, variación genética.

**ABSTRACT.** The genetic variation in black howler monkey (*Alouatta pigra*) populations was studied using non-invasive techniques in the southern area of the Montes Azules Biosphere Reserve (REBIMA) located in the Lacandon forest (331,200 ha) in Chiapas, in two forest fragments (1 and 20 ha) within the community reserve of Reforma Agraria (RE: 1,700 ha about 2 km from the REBIMA), and in an external population located in the forest reserve of El Tormento (ET) in the state of Campeche (1,400 ha) 500 km north of the other populations. The DNA of 47 of the 59 fecal samples collected was amplified using a microsatellite AP40. Average heterozygosity was 0.344 for the REBIMA populations, 0.305 for the RE populations and 0.341 for the ET population. These differences were non significant. Average values for the inbreeding index ( $F_{IS}$ ) were negative for the three populations (REBIMA, RE and ET) suggesting low levels of inbreeding within them. The smaller genetic distance (0.0022) was that between the REBIMA and RE populations. The largest genetic distances were those among these two populations and those between the two forest fragments (0.200 and 0.3190), which suggests a genetic differentiation in the latter as a result of isolation.

**Key words:** *Alouatta pigra*, DNA, microsatellites, genetic variation.

## INTRODUCCIÓN

Con el avance tecnológico en el desarrollo de técnicas moleculares, a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha permitido el análisis genético poblacional de diversos taxa (Taberlet P, Waits LP 1998. Trends in Ecology and Evolution 13: 26-27). Entre los marcadores

moleculares que se han desarrollado en los últimos años destacan los microsatélites o secuencias polimórficas de unidades de repetición cortas, de uno a seis pares de bases (pb). El empleo de técnicas no invasivas (por ejemplo heces) para extraer ADN han permitido que se lleven a cabo, estudios de variación genética, flujo génico y paternidad en poblaciones de primates en su hábitat natural, sin

estresarlos o tener contacto directo con ellos (Kohn MH, Wayne RK 1997. *Tree* 12: 223-227).

La fragmentación del hábitat es la causa principal de la extinción local de las poblaciones de primates. Estos procesos resultan en un decremento en el tamaño de las poblaciones, y en el aislamiento de los remanentes de la población (Estrada A, Mandujano S 2003. *Primates* 11: 147-156). Las consecuencias genéticas de estos cambios son la interrupción del flujo de genes en la población, disminución de la variación genética de las poblaciones y un incremento en la endogamia (Laurance WF, Lovejoy TE, Vasconcelos HL, Bruna EM, Dirham RK, Stouffer PC 2002. *Conservation Biology* 16: 605-618).

Las tres especies de primates distribuidos en México, *Alouatta palliata*, *Alouatta pigra* y *Ateles geoffroyi*, se encuentran en hábitat fragmentados (Estrada A, Mandujano S 2003. *Primates* 11: 147-156).

En muchos paisajes del sur de México, la selva remanente se presenta en forma de fragmentos aislados de vegetación, en algunos de los cuales han logrado persistir poblaciones del mono aullador negro *Alouatta pigra*, (Estrada A, Mendoza A, Castellanos L, Pacheco R, Van Belle S, García Y, Muñoz D 2002. *American Journal of Primatology* 58: 45-55). Por otro lado, el sistema de áreas naturales protegidas del país intenta resguardar áreas conservadas de los ecosistemas terrestres existentes, algunos representados en las Reservas de la Biosfera. El sureste del estado de Chiapas es un caso en punto, especialmente en la región de Marqués de Comillas. Ahí, el río Lacantún claramente separa la selva continua que constituye la Reserva de la Biosfera de Montes Azules (REBIMA) de los paisajes antropogénicos. En estos últimos existen fragmentos de selva aislados entre sí que varían en tamaño, distancia e historia de aislamiento, así como en manejo por parte de los habitantes locales. Tanto las selvas de la Reserva de la Biosfera como algunos fragmentos de selva en lado antropogénico del río Lacantún están habitados por poblaciones del mono aullador negro (Estrada A, Van Belle S, García del Valle Y 2004. *Neotropical Primates* 12:70-75). Hasta el momento se desconoce cómo son afectados genéticamente las poblaciones de

primates silvestres en el sur de México al fragmentarse su hábitat. En este trabajo se presentan los resultados de un estudio piloto basado en el uso de ADN fecal, sobre la variación y diferenciación genética en poblaciones de *A. pigra* en hábitat continuo y fragmentado en la región de Marqués de Comillas, Chiapas, México. También, se muestra información sobre la variación genética en una población de la misma especie ubicada a 500 km al norte de las poblaciones arriba mencionadas, en una reserva forestal "El Tomento" (ET) en el estado de Campeche.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Hábitat continuo

#### Reserva de la Biosfera Montes Azules:

La REBIMA se sitúa en la porción noroeste del estado de Chiapas y abarca 331 200 ha de extensión. Su relieve es heterogéneo, los ríos principales son Lacantún, Lacanjá, Tzendales y San Pedro, y la vegetación corresponde a selva alta perennifolia (Naranjo EJ 2002. *Population ecology and conservation of ungulates in the Lacandon forest, Mexico*. Tesis doctoral. El Colegio de la Frontera Sur). Reconocimientos recientes de la población de primates en un sector de 40 km de longitud a lo largo de la orilla de la REBIMA que colinda con el río Lacantún, desde el río Chajulillo hasta el río Tzendales (16° 05' 58" N 90° 57' 30" W; 16° 18' 06" N 90° 52' 36" W); indicaron la presencia de poblaciones de monos aulladores.

**Población en Campeche:** La reserva forestal "El Tomento" (ET) del INIFAP (1400 ha) está ubicada en el estado de Campeche, (18° 16' 25" N y 90° 43' 55" W, situado a 60 msnm). El tipo de vegetación que resguarda ET es la selva mediana subperennifolia y es habitada por una población de *A. pigra* (Barrueta T 2003. *Reconocimiento demográfico y dieta de Alouatta pigra en un fragmento de selva en El Tormento, Campeche, México*. Tesis de maestría. El Colegio de la Frontera Sur). Dicha población ya existía en este sitio cuando fue creada la reserva, hace 60 años.

### Hábitat fragmentado

Este se ubica en los terrenos de la comunidad agrícola "Reforma Agraria"(RE) en la porción este del municipio de Marqués de Comillas,

Chiapas; limita al norte con el ejido Zamora Pico de Oro; al sur y sureste, con el ejido José López Portillo y Adolfo López Mateos; al oeste, con el río Lacantún y, al este, con el ejido Nuevo San Isidro. El área de esta comunidad abarca alrededor de 3 500 ha, el ejido designó 1 700 ha de selva como reserva ejidal (RE). Dicha reserva fue aislada hace 10 años y en su seno existe una población de monos aulladores. Esta reserva se ubica a 2 km de la ribera sur del Río Lacantún y de la población de *A. pigra* en la REBIMA. En el resto del terreno comunitario, dominado por pastizales, existen fragmentos aislados de selva de tamaños variables. Dos de estos, uno de 1 ha y el otro de 20 ha de extensión y con una distancia hacia la RE de 1 a 1.5 km respectivamente, se ubican en la vecindad del asentamiento humano y resguardan cada uno un grupo de monos aulladores, por lo que fueron seleccionados para este estudio como población complementaria (Tabla 1).

### Muestreo de excretas

Las muestras de excretas de los monos aulladores se recolectaron durante enero y marzo de 2003. El excremento se recolectó fresco, siguiendo a los grupos hasta el momento de defecación de los individuos, se aseguró que las muestras fueran de un solo individuo, que se clasificó como adulto o juvenil y como macho o hembra. Las excretas fueron colocadas en frascos de plástico esterilizados

de 50 ml con tapa de rosca, llenados hasta 35 ml con un deshumificante sólido llamado "cero humedad". Posteriormente, la cantidad de deshumificante fue separada del excremento recolectado mediante un pequeño pedazo de papel filtro (Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain SR 1997. *Molecular Ecology* 6: 1091-1097). Cada excreta recolectada por individuo fue partida en cuatro, y cada segmento fue colocado en frascos diferentes. Cada frasco fue asignado con un número de identificación. Las muestras se transportaron al laboratorio y se almacenaron a temperatura ambiente (24° C) hasta el momento de extraer el ADN.

### Extracción y amplificación del ácido desoxiribonucleico (ADN)

La extracción de ADN se llevó a cabo en 59 muestras de excretas de individuos (pertenecientes a 13 tropas). De estas, 19 pertenecieron a la población de la REBIMA (cinco tropas), 14 a la RE (cuatro tropas) y 15 a la población de ET (cuatro tropas). En el caso de los fragmentos de selva, se recolectaron tres muestras del grupo de aulladores en el fragmento de 20 ha y seis del grupo en el fragmento de 1 ha.

La extracción de ADN de las excretas se logró mediante el uso de reactivos comerciales preparados (Bio-Rad Aqu pure Genomic DNA isolation kit). El ADN genómico de algunos individuos se observó en geles de agarosa al 1% P/V. Los marcadores moleculares seleccionados para la amplificación

**Tabla 1.** Sitios de estudio y rasgos demográficos de las poblaciones de monos aulladores (*Alouatta pigra*). La población total se estimó tomando como base la densidad y el área de cada sitio, excepto en el caso de la Reserva de la Biosfera Montes Azules (REBIMA) en donde la estimación se hizo para un área de 500 km<sup>2</sup> que colindó con el Río Lacantún.

**Table 1.** Study sites and demographic features of howler monkey (*Alouatta pigra*) populations. The total population was estimated considering the density and the area at each site, except in the case of the Montes Azules Biosphere Reserve (REBIMA) where the assessment was made for a 500 km<sup>2</sup> area adjacent to Río Lacantún.

Población	Área del sitio	Grupos	Grupos/km <sup>2</sup>	Tamaño medio de los grupos	Densidad (ind/km <sup>2</sup> )	Población Total estimada
REBIMA	331 200	49	0.10	5.5	14.4	7200
Reserva Ejidal	1700	12	0.91	5.1	13.3	225
El Tormento	1400	26	2.00	4.6	12.7	165
Fragmento 1 ha	1	1		6	600	
Fragmento 20 ha	20	1		11	55	

res moleculares seleccionados para la amplificación fueron: Ap6 5'-AGTGTTCATGGTTT-AGAT3' y 5'-GTTTAGCA-ATAATGTTGATG3', Ap405 5'-CCACGGTGGCAGAGGAGATTT3' y 5'-AGAGGCACGAAGACAAGGACA3', Ap68 5'-TGTTGGTATAATCTTTCCTA3' y 5'-ACATACACCTTTGAGTTTCT3', Ap74 5'-TGACCTCATCTCTTTCTCTG3' y 5'-CATCTTTGTTTTCCTCATAGC3' (Ellsworth JA, Hoelzer YG 1998. *Molecular Ecology* 7:

657-658). Estos cuatro marcadores microsatélites fueron desarrollados para la especie de mono aullador *Alouatta palliata*, y se usaron en este estudio debido a la inexistencia de marcadores para la especie *A. pigra*. Dichos marcadores han sido probados exitosamente con muestras de ADN de sangre de *A. palliata*, *A. pigra* y *A. seniculus* (Ellsworth JA, Hoelzer YG 1998. *Molecular Ecology* 7: 657-658). De estos, solamente se utilizó el Ap40 por contar con un mayor número de muestras amplificadas.

Las reacciones de PCR fueron realizadas con un volumen de 25 µl, con 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 2.5 µl de Buffer 10x, 1 µl de dNTPs 0.04 mM, 4 pmol de cada marcador, 16.5 µl de H<sub>2</sub>O, 2 µl de ADN y 0.04 unidades de Taq polimerasa. Las temperaturas utilizadas fueron: 95 °C durante 5 min.; a continuación 30 ciclos de 1 min. a 95 °C, 1 min. a la temperatura óptima de alineamiento (47 °C para AP6, 57 °C para AP40, 50 °C para AP68, 52 °C para AP74) y 1 min. a 72 °C; finalmente, 5 min. a 72 °C. Los productos de la amplificación se almacenaron a 4 °C hasta el momento en que fueron analizados. Las muestras fueron observadas para verificar si realmente se habían amplificado en un gel de agarosa al 2 % P/V teñidos con bromuro de etidio.

Las muestras amplificadas se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6.5 % en una cámara vertical de electroforesis, que permitió resolver diferencias hasta de una base. Después de la migración, durante 2 a 3 h, se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>). Cuando fueron analizados los geles y se distinguieron perfectamente los genotipos de las poblaciones estudiadas se procedió a determinar, por medio del programa POPGENE versión 32 (Yeh FC, Yang R, Boyle T 1999. *Popgene version 32: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis*. University of Alberta, Edmonton, Canada), el índice de heterocigosidad (Nei M 1973. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 70: 3321-3323), el coeficiente de consanguinidad (Fis) y las distancias genéticas (Nei M 1978. *Genetics* 89: 583-590).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 59 muestras fecales recolectadas,

correspondientes a individuos en los sitios estudiados, se obtuvieron 47 amplificaciones de ADN con el marcador AP40, 17 para la REBIMA, 11 para RE, 10 para ET, seis para el fragmento de 1 ha y tres para el fragmento de 20 ha.

La heterocigosidad promedio fue de 0.344 para la población en la REBIMA, de 0.305 para la RE y de 0.341 para ET y en ningún caso se observaron diferencias significativas entre la heterocigosidad observada y la esperada dentro de cada población (Tabla 2). El valor promedio de heterocigosidad obtenido para cada una de las poblaciones de monos aulladores estudiadas fue alto en comparación con lo registrado para poblaciones de *A. pigra* en hábitat fragmentado en Belice, donde la heterocigosidad promedio fue de 0.021 (James RA, Leberg P, Quattro J, Vrijenhoek R 1997. *American Journal of Physical Anthropology* 102: 329-336). Los autores de este estudio sugirieron la existencia de "cuellos de botella" en esta población, los cuales fueron generados por accidentes catastróficos como huracanes y episodios de fiebre amarilla, donde los individuos que conforman la población perdieron alelos bajando su nivel de heterocigosidad. En contraste, un estudio realizado con poblaciones de *A. pigra* en Belice, utilizando marcadores microsatélites (Ap40, Ap68, Ap74, Ap6), mostró una heterocigosidad promedio de 0.43 (Winkler AL, Zhang X, Ferrell R, Wagner R, Dahl J, Peter G, Sohn R 2004. *International Journal of Primatology* 25: 197-210), valor similar a los resultados obtenidos para las poblaciones examinadas en este trabajo. En otras especies de *Alouatta* también fueron citados niveles bajos de variabilidad genética, con intervalos de heterocigosidad promedio por locus de 0.089 a 0.106 en *A. seniculus* (Pope TR 1992. *Evolution* 46: 1112-1128), de 0.077 a 0.061 en *A. belzebul* (Melo ACA, Sampaio MIC, Schneider MPC, Schneider H 1992. *Primates* 33: 217-225) y de 0.01 en *A. palliata* (Malgrem LA, Brush AH 1978. *Isozymes and plasma proteins in eight troops of golden mantled howling monkeys (Alouatta palliata)*. En: Chivers D, Joysey K (eds) *Recent Advances in Primatology Volume III: Evolution*, Academic Press). Cabe mencionar que los valores promedio de heterocigosidad mencionados para las poblaciones/especies

anteriormente indicadas fueron obtenidas mediante proteínas e isoenzimas y éstas, por lo general, indican una baja variabilidad genética en comparación con lo registrado para análisis con marcadores microsatélites (Winkler AL, Zhang X, Ferrell R, Wagner R, Dahl J, Peter G, Sohn R 2004. International Journal of Primatology 25: 197-210).

Los valores medios del  $F_{IS}$  para la consanguinidad estimada dentro de las poblaciones fueron de -0.372 para población de la REBIMA, -

podría ser el resultado de que, a pesar del aislamiento, existe el flujo de individuos de un fragmento de selva a otro, ya sea usando franjas arbóreas de vegetación (por ejemplo cercas vivas) como corredores o parcelas agrícolas arboladas como "puentes" o cruzando pastizales, como fue observado en dichos sitios.

La matriz de distancias genéticas (Nei M 1978. Genetics 89: 583-590) mostró que las poblaciones de la REBIMA y de la RE tienen una relación

**Tabla 2.** Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) en las poblaciones de *Alouatta pigra* investigadas. Los datos que se presentan corresponden a individuos en cada una de las tropas indicadas para los cuales se lograron las amplificaciones de ADN. En el caso de los fragmentos, éstos sólo alojaban a una tropa cada uno ((1)  $p=0.600$   $df=7$ ; (2)  $p=0.804$   $df=5$ ; (3)  $p=0.625$   $df=5$ ) (d.e.=desviación estándar).

**Table 2.** Observed (Ho) and expected (He) heterozygosity in the *Alouatta pigra* populations under study. The data correspond to individuals in each troop for which successful DNA amplifications were achieved. The forest fragments harbored only one troop each ((1)  $p=0.600$   $df=7$ ; (2)  $p=0.804$   $df=5$ ; (3)  $p=0.625$   $df=5$ ) (s.d.=standard deviation).

Tropa	REBIMA			Reserva Ejidal			El Tormento		
	Ho	He	Media	Ho	He	Media	Ho	He	Media
1	0.333	0.278	0.306	0.667	0.500	0.417	0.000	0.000	0.000
2	0.667	0.500	0.584	0.429	0.376	0.511	0.533	0.444	0.489
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.375	0.438
4	0.500	0.375	0.438	0.000	0.000	0.263	0.500	0.375	0.438
5	0.409	0.375	0.392						
Media	0.382	0.306	0.344	0.274	0.219	0.305	0.383	0.299	0.341
+ d.e.	0.247	0.188	0.218	0.331	0.258	0.248	0.256	0.202	0.229
prueba de t		0.55 (1)			0.26 (2)			0.52 (3)	
	Fragmento 1 ha			Fragmento 20 ha					
	Ho	He	Media	Ho	He	Media			
	0.533	0.48	0.507	0.500	0.375	0.438			

0.416 para la población de la RE y de -0.292 para la población de ET, en lo que respecta a la población del fragmento de 1.0 ha el valor del coeficiente  $F_{IS}$  fue de -0.660 y en el de 20 ha el índice de fue de -0.333 (Tabla 3).

Los valores negativos del coeficiente de consanguinidad ( $F_{IS}$ ) para cada una de las poblaciones estudiadas indicaron que existe un déficit de homocigotos, lo que sugiere que las poblaciones de la RE y de ET no presentan un aislamiento reproductivo. Por otro lado, los valores negativos (-0.660 y -0.333) del  $F_{IS}$  en las poblaciones en los dos fragmentos estudiados presentaron también bajos niveles de consanguinidad. Esto

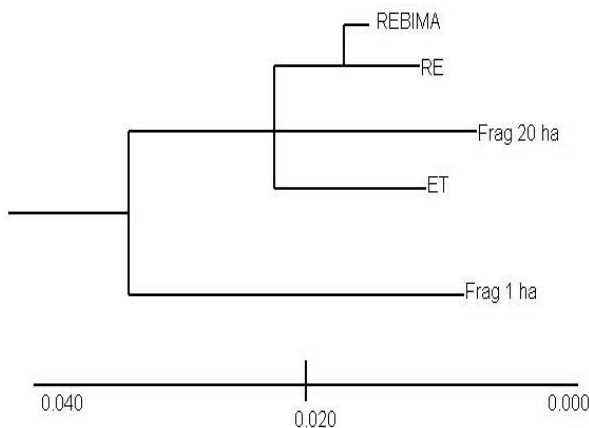
**Tabla 3.** Estimaciones del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Valores negativos indican ausencia de endogamia o deriva genética (d.e.=desviación estándar).

**Table 3.** Estimates of inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). Negative values indicate a lack of inbreeding or genetic drift (d.e.=standard deviation).

Tropas	REBIMA	Reserva Ejidal	El Tormento	Fragmento 1 ha	Fragmento 20 ha
$F_{IS}$					
1	-0.200	-0.333	0.000	-0.660	-0.333
2	-1.000	0.000	-0.500		
3	0.000	-1.000	-0.333		
4	-0.330	-0.330	-0.333		
5	-0.330				
Media	-0.372	-0.416	-0.292		-0.497
+ d.e.	-0.376	-0.420	-0.210		-0.231

genética estrecha (valor más bajo de 0.0022), lo que podría resultar del poco tiempo de separación (< 25 años) entre estas poblaciones. En contraste, las poblaciones de los fragmentos de 1 y 20 ha fueron las más distantes genéticamente con respecto a la REBIMA y la RE (Figura 1). Es posible que la alta variabilidad genética detectada para las poblaciones en los fragmentos refleje efectos pasados de consanguinidad o deriva

genética, como resultado del aislamiento excesivo, que han aumentado la separación entre éstas y las poblaciones de la REBIMA y RE. Aun así, el pequeño tamaño de las poblaciones en los fragmentos de selva (un grupo en cada caso) está muy por abajo del mínimo estándar que se requeriría para asegurar su persistencia, siendo estas poblaciones más sensibles a procesos estocásticos que conducen a una rápida pérdida de la variabilidad genética y a la depresión reproductiva (Goncalves, EC, Ferrari SF, Silva A, Countinho, PEG, Menezes EV, Schneider,



**Figura 1.** Dendrograma basado en distancias genéticas de Nei (1978) y matriz de distancia genética de Nei (1978) de acuerdo al loci AP40 en cinco poblaciones de monos aulladores de la Selva Lacandona, Chiapas, México. REBIMA=Reserva de la Biosfera Montes Azules (331,200 ha), RE=Reserva ejidal (1,700 ha localizadas a 2 km de la REBIMA), Frag 20 ha y Frag 1 ha=fragmentos aislados de selva a 1 y 1.5 km de la REBIMA y de la RE, ET=reserva forestal El Tornado (1,400 ha ubicadas a 500 km al norte de los sitios mencionados arriba). Las poblaciones en los fragmentos de 1 y 20 ha mostraron las mayores distancias con respecto a la REBIMA y a la RE, sugiriendo una diferenciación genética de las poblaciones como resultado del aislamiento durante varias décadas (ca 30 años).

**Figure 1.** Dendrogramme based on Nei's (1978) genetic distances and genetic distance matrix (Nei 1978) according to the AP40 loci in five populations of howler monkeys of the Lacandon jungle, Chiapas, Mexico. REBIMA=Montes Azules Biosphere Reserve (331,200 ha), RE=community reserve (1,700 ha 2 km from the REBIMA), Frag 20 ha and Frag 1 ha=isolated jungle fragments about 1 and 1.5 km from the REBIMA and the RE, ET=El Tornado Forest Reserve (1,400 ha 500 km north of the other sites). Populations in the 1 and 20 ha fragments had the greatest estimated distances with respect to the REBIMA and the RE, suggesting a genetic differentiation of the populations as a result of isolation during several decades (ca 30 years).

MPC 2003. Effects of habitat fragmentation on the

genetic variability of silvery marmosets, *Mico argentatus* En: Marsh, L (ed) Primates in Fragments Ecology and Conservation. New York, Kluwer Press).

En conclusión y tomando en cuenta el uso de un sólo marcador molecular (AP40), como una limitante para este estudio, las poblaciones de *A. pigra* distribuidas en la REBIMA y en la RE no fueron diferenciadas genéticamente, lo cual probablemente se debió al corto tiempo de aislamiento de la segunda. La población geográficamente separada de ET no exhibió, como es el caso de la RE, una variabilidad genética diferente a aquella detectada para la población de la misma especie en la REBIMA. Esto sugiere que tanto en la RE como en ET, las poblaciones probablemente son suficientemente grandes como para sostener niveles de variabilidad genética tan altos como las poblaciones en el hábitat continuo de la REBIMA. Finalmente, estudios futuros deberán incorporar más marcadores microsatélites, así como un mayor número de muestras de poblaciones en paisajes fragmentados.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT por la beca otorgada para la realización de este trabajo. Al personal de los laboratorios de Genética y de Análisis de Información Geográfica y Estadística de El Colegio de la Frontera Sur en San Cristóbal de Las Casas. Se agradece también el apoyo económico del Scott Neotropic Fund of Cleveland Metropark Zoo y de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Laboratorio de Primatología de la Estación de Biología Los Tuxtlas. En el campo se contó con la incansable asistencia del señor Celedonio Chan Salas, nuestro guía y habitante del ejido Reforma Agraria. Agradecemos la ayuda en el campo de Joseph Hawes, Petra Wilbrink, Sarie Van Belle, Marisela García Bautista, Jorge Bolaños, y Manuel Oñorbe. Se agradece el apoyo logístico a Carla Gasca y Blanca Luz Coello.