

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL  
JAGUAR (*Panthera onca*) EN CAUTIVERIO”**

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A  
Rocío del Pilar Rueda Zozaya

Comité tutorial:

Cotutores: Dr. Germán D. Mendoza Martínez  
Dr. Octavio Monroy Vilchis  
Asesor: Dr. José G. Herrera Haro

Diciembre de 2015

**El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud** de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de **Posgrados de Excelencia** del **CONACyT** y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó **Rocío del Pilar Rueda Zozaya**, el día 8 de diciembre del 2015.

Jurado:

Cotutor: **Dr. Germán David Mendoza Martínez**



Cotutor: **Dr. Octavio Monroy Vilchis**

Asesor: **Dr. José Guadalupe Herrera Haro**



Sinodal: **Dr. Daniel Martínez Gómez**



Sinodal: **Dr. José Cuauhtémoc Chávez Tovar**



Este proyecto del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud fue realizado en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco, en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Laboratorio de Biología Molecular. Además se hizo otra fase experimental en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular de la Estación Biológica de Doñana en Sevilla, España, que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco por su cobijo y apoyo incondicional desde hace más de 15 años, así como a todo su personal administrativo y académico, quienes siempre tienen la mejor disposición para la formación de los alumnos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT porque dan la oportunidad de que las personas se formen académicamente con un gran apoyo en la manutención, además agradezco que me hayan concedido la extensión de beca de 2013 a 2014. Número de becario: 212653.

A la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, en especial a la Dra. Susi (María Jesús) Ferrara, porque más que ser coordinadora ha sido como una mamá académica que apoya, instruye, critica constructivamente y siempre ve la forma de que salgamos adelante. Al Dr. Humberto González Márquez, quien recientemente se incorporó como coordinador, agradezco su apoyo para que se culminara este trabajo de la mejor manera posible.

A mi Comité Tutorial, gracias por su apoyo y paciencia durante estos cinco años, en especial a los Dres. Germán Mendoza y Daniel Martínez, sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo y por ser siempre los mejores consejeros!

A Daniel Martínez y Estela Méndez, porque nuevamente estuve bajo su cobijo. Todos estos años solo he recibido cosas buenas por parte de ustedes, la mejor forma para retribuirles será que sigamos trabajando y produciendo.

Al Dr. Octavio Monroy Vilchis, al Dr. José G. Herrera Haro, quienes me apoyaron cabalmente desde que se estaba cocinando este proyecto, y con la ilusión de seguir colaborando con ustedes.

Al Dr. Cuauhtémoc Chávez Tovar, porque sin su consejo y apoyo no hubiera podido ingresar al Doctorado, gracias por toda la ayuda brindada y por siempre estar ahí, de igual manera siempre contarás conmigo.

Al Dr. José Antonio Godoy de la Estación Biológica de Doñana del CSIC en Sevilla, por la maravillosa estancia, apoyo y orientación para la realización del trabajo. A María Lucena, María Méndez, Begoña Adrados, Elena Marmesat, Charles Szychta, Francisco Palomares y Ana Piriz por toda su ayuda y amistad que me brindaron en la estancia.

A la Lic. Laura Nava de COPLADA porque en todos los momentos que le solicitamos su apoyo siempre recibimos una respuesta favorable, mucha disposición y ayuda. Trabajadora impecable. A Margarita González y Laura Ruiz de Convenios Patrocinados, porque gracias a toda su amabilidad y disposición me pude ir a la estancia a Sevilla con los gastos cubiertos.

A mis compañeros de laboratorio porque se vuelven como una segunda familia: Mariana, Angie, Mauricio, Liz, Tania, Johnathan, Gaby, Mónica, Olivia, Ismael, Andrés, Ale, Libertad, Lobo, Itzel, Roberto, Chabelita, Dafne, Pamela, Paty. Agradezco mucho a Armando Sunny por toda la ayuda para la realización e interpretación de los análisis.

A mis papás, a Rituleshka y a Genaro, les prometo que ya es lo último que haré como estudiante, en las buenas, en las malas y en las peores, como siempre, ahí estaremos juntos.

A mis tíos: Neto, Marisela, Violeta, Pedro, Rita†, Oralia†, Licha, Raquel; a mis “primates” los Armandos, Pancho, Elena, Sofía, Violeta, Carlos, Víctor, Pedro, Verónica, Maribel y Mariana. Este año fue devastador, pero por ellas debemos seguir haciendo las cosas, porque no podemos defraudarlas.

A todo el personal de los zoológicos que tuvieron la disposición para participar con nosotros abriéndonos sus puertas y confiando sus preciosos jaguares para que este proyecto se llevara a cabo. Los nombres han sido omitidos para mantener la confidencialidad de algunos particulares, sin embargo, no podemos dejar de agradecer el apoyo a la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre.

A los jaguares, porque tenemos la esperanza de seguir contando con su presencia durante muchos años más, que contribuyamos en algo para mejorar las condiciones de nuestro ambiente y los recursos naturales.

**Para Rita H. y Oralia Zozaya†**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Jaguar</b>	2
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	
<b>La problemática de los grandes felinos</b>	4
<b>Jaguar</b>	5
<b>Variabilidad genética</b>	7
<b>Variación genética en jaguar</b>	10
<b>Endogamia</b>	12
<b>Genealogía</b>	14
<b>Pregunta de investigación, Hipótesis, Objetivo general, Objetivos particulares</b>	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>Muestreo</b>	17
<b>Métodos de procesamiento de muestras</b>	18
<b>Análisis genéticos iniciales</b>	21
<b>Estimación de la estructura genética</b>	21
<b>Variabilidad genética</b>	24
<b>Tamaño efectivo de la población, cuellos de botella genéticos y parentesco</b>	25
<b>IV. RESULTADOS</b>	
<b>Muestreo poblacional y detección de errores en las salidas</b>	26
<b>Estructura genética</b>	26
<b>Variabilidad genética</b>	31
<b>Tamaño efectivo de la población, cuellos de botella genéticos, endogamia y parentesco</b>	37

## V. DISCUSIÓN

Estructura y variabilidad genética	43
Tamaño efectivo poblacional	47
Cuello de botella	47
Parentesco	49

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
------------------------------------	----

VII. BIBLIOGRAFÍA	53
-------------------	----

ANEXO I	66
---------	----

ANEXO II	68
----------	----

© *Propuesta para establecer los lineamientos del programa de cruzamiento de jaguar en cautiverio*

## CUADROS

**Cuadro 1. Niveles de variación genética evaluados con muestras de jaguares de vida libre y con muestras de museos.....11**

**Cuadro 2. Lista de zoológicos que participaron en la entrega de muestras de sangre de jaguar.....17**

**Cuadro 3. Loci evaluados en *Panthera onca* a través de 11 iniciadores marcados con fluorocromos.....20**

**Cuadro 4. Número de individuos que en Structure fueron asignados a un grupo genético con una probabilidad de <40 a 95%.....28**

**Cuadro 5. Número de genotipos por locus, por grupo genético y por el total.....32**

**Cuadro 6. Medidas de diversidad analizadas mediante 11 microsatélites en tres grupos genéticos de 56 jaguares cautivos.....33**

**Cuadro 7. Análisis de varianza molecular basada en los valores de Fst.....35**

**Cuadro 8. Estimación del tamaño efectivo poblacional basado en el método LD...37**

<b>Cuadro 9. Análisis de cuello de botella genético evaluado bajo tres modelos.....</b>	<b>38</b>
<b>Cuadro 10. Coeficientes de endogamia de Weir &amp; Cockerham (W&amp;C) y de Hardy-Weinberg estimados para cada grupo genético y en total.....</b>	<b>40</b>
<b>Cuadro 11. Relaciones de parentesco asignadas con la máxima probabilidad, de acuerdo a los datos genéticos a nivel de significancia de 0.05 .....</b>	<b>41</b>

## **FIGURAS**

<b>Figura 1. Distribución actual e histórica del jaguar en México.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Sitios de muestreo en la Península de Yucatán.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3. Sitios de muestreo en Brasil.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4. Detección del número de <math>K</math> grupos óptimos.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 5. Estimación de los grupos genéticos de 56 jaguares en cautiverio utilizando 11 microsatélites.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 6. Detección del número de <math>K</math> grupos genéticos óptimos.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 7. Estimación de los grupos genéticos de 158 jaguares.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 8. Distribución de los tres grupos genéticos asignados en Structure en cada zoológico.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 9. Análisis factorial de correspondencias de jaguares cautivos.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 10. Análisis factorial de correspondencias en el que están considerados los genotipos de los jaguares de cautiverio y de vida libre.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 11. Árbol filogenético sin raíz construido con el método NJ.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 12. Dendograma de los grupos genéticos de vida libre y de cautiverio.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13. Proporción de machos y hembras en 56 jaguares cautivos.....</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

*Los registros genealógicos de animales (studbooks) son creados para evitar la reproducción entre individuos emparentados cercanamente, de lo contrario, se podría generar endogamia, particularmente con las especies que están en peligro de extinción, como Panthera onca (Linnaeus, 1758). Además, no existe un censo actual de los jaguares que se encuentran en cautiverio en México, en los zoológicos mexicanos no se sigue un protocolo estandarizado en los programas de reproducción con base en estudios genéticos. Debido a la falta del programa orientado a mantener la variación genética, se requiere conocer el nivel actual de la variación genética de los jaguares cautivos para poder proveer y proporcionar la información para la creación del studbook basado en análisis genéticos. Por esta inquietud se propuso en este trabajo genotipar por medio de 11 microsátélites 56 jaguares de zoológicos de México, la mayoría de ellos con origen desconocido. En primer lugar, se obtuvieron tres grupos genéticos, cuyo nivel de heterocigosidad a nivel general fue de moderado a ligeramente alto ( $H = 0.53$  a  $0.72$ ), también se encontraron signos de endogamia con un nivel de ligero a moderado en los tres grupos ( $-0.49$  a  $0.35$ ). Los resultados del análisis de parentesco, a nivel general, mostraron que la mayoría de los individuos no están relacionados (67.86 a 84.98%).*

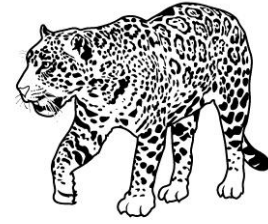
*Se hace hincapié en la importancia de mantener el nivel de variación genética para la gestión de las poblaciones cautivas de jaguar, las cuales podrían utilizarse como un potencial reservorio genético para futuros programas de conservación ex situ.*

## SUMMARY

*Genealogy records of animals (studbooks) are created to avoid reproduction between closely related individuals, which could cause inbreeding, particularly for such endangered species as the Panthera onca (Linnaeus, 1758). There is no current census of captive jaguars in Mexico, and Mexican zoos do not follow a standardized protocol in breeding programs based on genetic studies. Because of the lack of a breeding program that has the purpose of maintaining genetic variation, it is of concern to know the current level of genetic variation of captive jaguars and provide a basis for the formation of the studbook based on this results. We genotyped 56 captive jaguars with unknown origin from Mexican zoos through 11 microsatellites, firstly we obtained three genetic grupo genéticos, the levels of heterozygosity were moderate to high ( $H = 0.53-0.72$ ), also we found few to moderate signs of inbreeding in all three grupo genéticos ( $-0.49$  to  $0.35$ ), relatedness analysis showed that most of the individuals are unrelated (67.86 to 84.98%)*

*We emphasise the importance of keep level of genetic variation for managing captive populations of jaguar as a potential genetic reservoir for future ex situ conservation programs.*

# ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL JAGUAR (*Panthera onca*) EN CAUTIVERIO



## I. Introducción

### I. Jaguar

La fragmentación y degradación de hábitat ha provocado que varias especies de felinos se encuentren en vulnerabilidad o peligro de extinción, como el tigre (*Panthera tigris*), el león (*Panthera leo*), el guepardo (*Acynonix jubatus*), el jaguar (*Panthera onca*), y otros de menor tamaño como el leopardo de las nieves (*Panthera uncia*), el tigrillo (*Leopardus tigrinus*) y la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) (Oli *et al.*, 1994; Polisar *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2004; Bhagavatula y Singh, 2005; Kitchener *et al.*, 2006; Grisolia *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2007; Marker *et al.*, 2008; Ruiz-García, 2013).

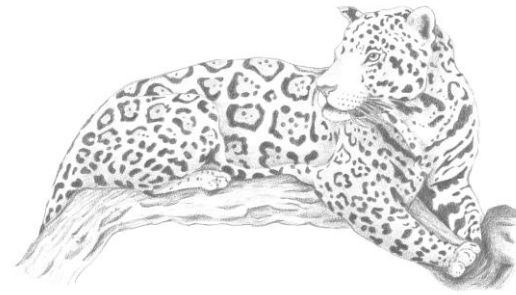
El jaguar es el felino americano de mayor talla, además tiene una gran trascendencia histórico-cultural (Campos, 2002). En México y a lo largo de Centro y Sudamérica hay una incesante disminución de las poblaciones a pesar de que está prohibida su cacería y comercio de ejemplares y/o sus derivados desde inicios de la década de los setentas. Las principales amenazas de las poblaciones de jaguar están dadas por el ser humano y sus actividades: fragmentación y degradación del hábitat, cacería furtiva, urbanización y conflictos directos por depredación de ganado (Núñez, 2000; Ruiz-García *et al.*, 2006; Eizirik *et al.*, 2008; Haag *et al.*, 2010; Rabinowitz y Zeller, 2010; Roques *et al.*, 2011). Como se ha reducido aproximadamente 60% la distribución original del jaguar, se ha situado en riesgo de extinción de acuerdo a la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2014), en el Apéndice I de la CITES (2015) y en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Si hay una reducción considerable en las poblaciones a niveles críticos, es probable que esto conlleve a una pérdida de diversidad genética al disminuir el tamaño efectivo de la población (organismos que se reproducen y están representados genéticamente en la población). En zoológicos y criaderos se puede presentar con mayor frecuencia esta situación por las limitaciones de espacio y el número reducido de individuos que se pueden albergar en sus recintos (Kitchener, 1997). Con pocas opciones para cruzamientos, el nivel de parentesco puede llegar a ser alto y se incrementan las posibilidades de que la deriva génica, endogamia y eventos estocásticos-demográficos afecten el *fitness* poblacional (Hedrick, 2001). Este término se refiere a la capacidad de los organismos para adaptarse, reproducirse y dejar descendencia que a su vez aportará genes a la población. Al disminuirse el *fitness*, el riesgo de extinción se hace cada vez mayor al cabo de unas generaciones, tanto en vida libre como en cautiverio.

No existe un programa integral de conservación para jaguar, aunque se han implementado algunas estrategias para los de vida libre, como el establecimiento de Reservas de la Biosfera y numerosos corredores biológicos que permitan la perpetuación de la especie (Ceballos *et al.*, 2011). Se calcula que existen alrededor de 300 jaguares en UMAS y criaderos particulares, para esta población no existe un registro genealógico estandarizado (studbook) o pedigrí, y las consecuencias de la reproducción no orientada al mantenimiento de la variación genética pueden abarcar desde malformaciones congénitas hasta la pérdida de genotipos únicos y valiosos que hayan desaparecido también en vida libre, es por ello que el objetivo de este trabajo es determinar la variación genética existente en 56 jaguares de cautiverio para sustentar la formación del studbook en México con una caracterización genética del jaguar.

## II. Marco teórico

### La problemática de los grandes felinos



Las alteraciones en el ambiente han provocado la disminución de las poblaciones de los grandes carnívoros terrestres, los cuales son muy susceptibles a la fragmentación y perturbación de su hábitat, los principales factores que influyen en ello están directa o indirectamente relacionados con las actividades humanas (Eizirik *et al.*, 2001; Rosas-Rosas *et al.*, 2008; Roques *et al.*, 2011). Los felinos mayores como el león (*Panthera leo*), el tigre (*Panthera tigris*), el leopardo (*Panthera pardus*), el jaguar (*Panthera onca*), el puma (*Puma concolor*) entre otras especies, se encuentran cada vez más amenazados y se presentan con mayor frecuencia los conflictos directos con el ser humano por la invasión de asentamientos urbanos en zonas de su hábitat, lo que ha repercutido en escasez de presas y cacería ilegal de estas especies (Rabinowitz, 1986; Núñez *et al.*, 2000; Scognamillo *et al.*, 2003; Roma-Moreno *et al.*, 2006; Ruiz-García *et al.*, 2006; Sanderson *et al.*, 2002; Monroy-Vilchis *et al.*, 2008; Chávez y Zarza 2009). Por ejemplo, el lince ibérico (*Lynx pardinus*) en 1998 tenía una población estimada de 880 a 1150 individuos agrupados en nueve poblaciones genéticamente aisladas, la principal causa de su disminución fue la excesiva cacería entre 1950-1960, además de la disminución de su presa más importante: el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*), actualmente su principal amenaza es la destrucción y la falta de conectividad de su hábitat en España y Portugal (Garrote *et al.*, 2011).

Las poblaciones de león (*Panthera leo*) africano disminuyeron de un rango que iba de 30000-100000 y ahora va de 12500 a 3000 ejemplares (Bauer y Van Der Merwe, 2004), y así, entre los grandes felinos se calcula que existen en vida libre menos de

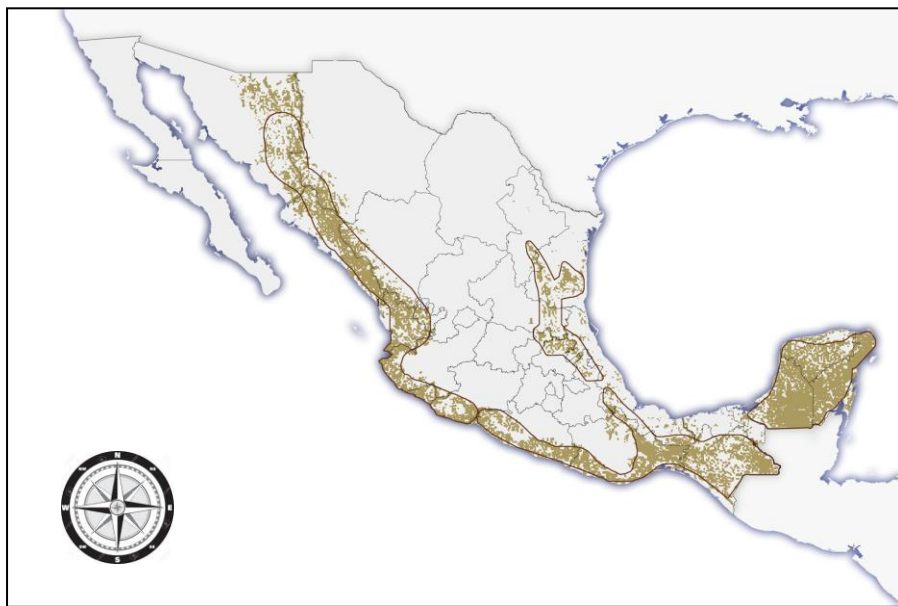
15000 tigres, chitas y leopardos de las nieves; 23000 leones y 50000 pumas, y un número aproximado equivale también al de los jaguares en todo el continente americano.

Cuando las poblaciones se reducen de manera considerable, tanto en vida libre como en cautiverio, tienen una alta probabilidad de perder variabilidad genética (Laikre, 1999) por ejemplo, las poblaciones de chita se redujeron considerablemente a unos cientos de individuos, situación causada por varios eventos geológico-ecológico-demográficos: un severo cuello de botella histórico datado a finales del Pleistoceno (10000 años atrás aproximadamente), seguido por una alta endogamia y por lo menos dos recientes cuellos de botella subsiguientes (Menotti-Raymond y O'Brien, 1993).

### **Jaguar**

Desde 1973 el jaguar se encuentra enlistado en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna (CITES), también se encuentra en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y en la NOM-059-SEMARNAT-2010, por lo que está totalmente prohibida su cacería, así como la venta de ejemplares y sus derivados (Caso *et al.*, 2008). No es sorprendente esta situación si el hábitat del jaguar en todo el continente americano ha disminuido aproximadamente 65% desde su distribución original (Rodríguez-Soto *et al.*, 2011), y de manera similar en México (Figura 1). Un aspecto importante de los programas de conservación enfatizaría la necesidad de mantener el hábitat en condiciones favorables para la supervivencia de las poblaciones que ahí alberga (Eizirik *et al.*, 1998), además se requiere conocer la historia evolutiva para elucidar cómo ha ido divergiendo genéticamente y los eventos demográficos que han ido modelando el número de individuos las poblaciones, así como determinar si ha ido

perdiendo diversidad genética, las causas y sus probables consecuencias (Eizirik *et al.*, 2008). La diversidad genética es requerida para que las poblaciones puedan evolucionar en respuesta a los cambios ambientales (Ruiz López *et al.*, 2012). La podríamos definir llanamente como el resultado de todas las diferencias entre las diversas formas <alelos> de los genes de los individuos que componen una población determinada, entonces, mientras más diversidad genética exista, mayor será su potencial evolutivo, es decir, tendrá más posibilidades para sobrevivir a las presiones de selección, podrá adaptarse y seguir transmitiendo sus genes a la población (Frankham, 1995). Cabe mencionar que no se tiene registro de caracterizaciones genéticas con jaguares de vida libre, sería de mucha utilidad que se conociera el nivel de variación genética de al menos unas decenas de ejemplares para tener una mínima noción de la situación de los jaguares en el territorio nacional.



**Figura 1. Distribución actual e histórica del jaguar en México (datos basados en muestreos realizados anualmente desde el 2008, modificado de Ceballos *et al.*, 2006).**

## Variabilidad genética

Existen varias formas para determinar la variación genética, por ejemplo, con el uso de marcadores genéticos. Los marcadores genéticos básicamente son secuencias de ADN cuyas diferencias pueden ser identificadas por medio de técnicas como hibridación *southern* o algunos métodos basados en la PCR (Grisolia *et al.*, 2007). Uno de los marcadores moleculares más aceptado por su gran capacidad para detectar polimorfismos, su codominancia durante la recombinación genética, su amplia distribución en el genoma, su herencia por vía biparental y su costo relativamente accesible es el microsatélite (Eguiarte *et al.*, 2007). Los microsatélites son pequeños fragmentos de ADN (de 2 a 10 pb) que se emplean para hacer identificaciones hasta a nivel individual, por ejemplo, se les usa en medicina forense o para pruebas de paternidad (Nascimento *et al.*, 2006). Son una buena herramienta para estudios genéticos, ya que se heredan en gran proporción a la siguiente generación y tienen suficientes polimorfismos (variaciones alélicas) para diferenciar entre genotipos muy cercanos. También se han empleado para clasificar individuos según el grado de parentesco dentro de poblaciones y así proceder a su reproducción controlada; como un método para determinar la existencia de cuellos de botella poblacionales, para estimar el grado de pérdida de variabilidad genética si se compara con el ADN recuperado de pieles de museos y colecciones científicas (Ruiz-García *et al.*, 2013). Los microsatélites se obtienen a través de la PCR, la cual requiere de la presencia de un iniciador o *primer*, que es un oligonucleótido con  $\pm 20$  pares de bases, estos oligos van a flanquear los fragmentos deseados y son necesarios para que la ADN polimerasa comience a añadir nucleótidos por el extremo 3'-OH al reconocer por apareamiento complementario secuencias blanco en el ADN molde o plantilla, que es generalmente de origen

genómico (Karp, 1998). Los microsatélites han sido muy útiles para estudios en ecología de poblaciones, por ejemplo Dalén (2004) empleó esta técnica para distinguir muestras de heces de zorra del ártico (*Alopex lagopus*) y zorra roja (*Vulpes vulpes*), que son indistinguibles al colectarlas en campo. Farrell *et al.*, (2000) extrajeron ADN de excrementos para discriminar cuatro especies de carnívoros que cohabitan simpátricamente en Venezuela, dos de esas especies eran jaguar y puma.

Los marcadores moleculares han sido útiles para estudios genéticos en otros mamíferos, por ejemplo, Pérez-Sweeney *et al.* (2005) emplearon microsatélites para ver diversidad genética en una población de tamarino o tití león negro (*Leontopithecus chrysopygus*), de la cual identificaron nueve loci polimórficos y mediante su análisis determinaron si se encontraba en Equilibrio de Hardy-Weinberg; los resultados mostraron que a pesar de ser una población en vías de extinción, los alelos tuvieron una heterocigosidad adecuada para el tamaño efectivo poblacional, considerando que el tamarino negro ha padecido constantes reducciones poblacionales, y cuellos de botella genéticos (Leberg, 1992).

Uno de los parámetros para medir la variación genética es conocer la heterocigosidad o la proporción de heterocigotos en una población, es decir el número de individuos con diferentes alelos en un locus (Allendorf y Luikart, 2007). Existen dos mediciones de la heterocigosidad, la esperada ( $H_e$ ) y la observada ( $H_o$ ), la primera está vinculada al Equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual postula que las frecuencias alélicas y genotípicas alcanzarán un equilibrio, definido por la distribución binomial en una generación y permanecerá constante en poblaciones con panmixia que no experimenten migración, selección, mutación o apareamiento selectivo (Allendorf y Luikart, 2007).

Fórmula:  $H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  o más conocido de la siguiente manera:

EHW:  $p^2+2pq+q^2 = 1$ , donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias de los alelos.

Si el valor de la heterocigosidad observada se desvía considerablemente del valor de la esperada, entonces la población tendría exceso o déficit de heterocigotos, lo cual podría tener varias implicaciones para su adecuación darwiniana. Generalmente se asocia un bajo nivel de heterocigosis a poblaciones con un tamaño efectivo pequeño ( $N_e$ ), debido a que en cada generación con proporción mendeliana se perdería 25% de los heterocigotos; si el  $N_e$  fuera muy grande, habría más número de posibles combinaciones durante el intercambio genético para que se formen más heterocigotos. Un ejemplo donde se puede observar el efecto conjunto de varias situaciones críticas:  $N_e$  reducido + cuellos de botella + deriva génica + endogamia = el chita, que en la actualidad tiene un nivel de monomorfismo alto y menos de 1% de heterocigosidad ( $H_o=0.0004$ ), por lo que el pronóstico de supervivencia de esta especie es muy bajo (O'Brien *et al.*, 1983; Merola, 1994; Kelly y Durant, 2000). Se ha reportado que un nivel de heterocigosidad bajo está correlacionado significativamente con el incremento en la tasa de extinción de poblaciones vulnerables (Hedrick y Kallinowski, 2001). A decir, Saccheri *et al.*, (1998) proveyeron la primer evidencia de que los niveles de heterocigosidad pueden influir tanto en una población como para llevarla a la extinción, para ello evaluaron la heterocigosidad de 42 poblaciones de mariposa (*Melitaea cinxia*) a través de siete enzimas polimórficas y un microsatélite, con un modelo de regresión logística obtuvieron niveles de endogamia más altos en las poblaciones más pequeñas y aisladas; asimismo, siete de las 42 poblaciones se extinguieron, y lograron correlacionar significativamente las diferencias en la heterocigosidad entre las poblaciones (a menor nivel de  $H$ , mayor endogamia y probabilidad de extinción). Otro parámetro que puede ser útil para estimar la variación genética es la cuantificación del número total de alelos

por locus. Esta medida se complementa bien con la heterocigosidad debido a que es más sensible a la pérdida de variación aún si el tamaño muestral es pequeño. Además el empleo de la proporción de loci polimórficos ayuda a comparar la variación entre poblaciones, para ello se considera primero un locus polimórfico si la frecuencia del alelo más común es igual o mayor a 0.95 (Allendorf y Luikart, 2007).

### **Variación genética en jaguar**

Por la evidencia que existe sobre la reducción y fragmentación en su área de distribución, así como la disminución de la conectividad entre los parches de hábitat, es posible que las poblaciones de jaguares estén perdiendo diversidad genética y su potencial evolutivo pueda ser afectado como una consecuencia de ello, como se ha reportado que ha sucedido con las poblaciones de chita, león, tigre asiático, leopardo y panda, por lo que recientemente se le ha puesto atención a las poblaciones en cautiverio como reservorio recurso genético alternativo. En un estudio se pudo determinar que unos ejemplares de tigres de la India conservaban unos genotipos pertenecientes a una localidad donde ya estaban extintos en vida libre e iniciaron unos programas de recuperación mediante la reproducción de estos individuos (Luo *et al.*, 2008).

Es notable que a pesar de las evidencias de pérdida de variación genética con otras especies del género *Panthera*, además de los avances en técnicas de biología y genética molecular, la información sobre aspectos genéticos de poblaciones de jaguar sea escasa (Eizirik *et al.*, 2002; Roques *et al.*, 2011). Las investigaciones se podrían apoyar en protocolos estandarizados de muestras de jaguares en los que se emplea material biológico de forma no invasiva, con lo que se puede obtener información valiosa, como el estatus de conservación ecológica y genética de una población, caracterizaciones hormonales, presencia de patógenos, entre otros. Eizirik *et al.*, (2001)

fueron los pioneros en investigar la diversidad genética, la estructura poblacional e historia demográfica de 40 jaguares en Sudamérica; lo que más destacaron de sus resultados fue que los jaguares analizados, que provenían de cuatro regiones separadas por barreras geográficas y artificiales, mostraron niveles moderados a altos de heterocigosidad que evaluaron a través de microsatélites, sin embargo, en la estimación de variación genética con secuencias mitocondriales obtuvieron un número de haplotipos y diversidad nucleotídica con niveles bajos a moderados. Por estos resultados sugirieron que es probable que las poblaciones hayan pasado por un proceso de expansión demográfica, antecedido por un cuello de botella genético.

Sería muy recomendable que se emplee un conjunto o *set* estandarizado y sistematizado de marcadores moleculares para el desarrollo de análisis comparativos de jaguares en diferentes sitios de estudio y ecosistemas, como lo propusieron Eizirik *et al.* (2008) al evaluar el estatus actual del jaguar con 13 microsatélites que seleccionaron al observar su utilidad para obtener genotipos con un nivel de polimorfismo alto (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Niveles de variación genética evaluados con muestras de jaguares de vida libre y con muestras de museos.**

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Sitio</b>	<b>Núm. de muestras</b>	<b>Parámetro</b>
<b>Eizirik <i>et al.</i></b>	2001	América	44	H = 0.622-0.724
<b>Roma-Moreno <i>et al.</i></b>	2006	Zoológicos brasileños	39	PIC = 0.69
<b>Ruiz-García <i>et al.</i></b>	2006	Colombia	62	H = 0.846
<b>Haag <i>et al.</i></b>	2010	Brasil	59	H = ~0.73
<b>Roques <i>et al.</i></b>	2014	Brasil	90	H = 0.74
<b>Roques <i>et al.</i></b>	2015	Brasil y México	102	H = 0.6 (México), 0.73-0.84 (Brasil)

PIC = contenido de información polimórfica y H = heterocigosidad.

Haag *et al.* (2010) investigaron sobre los efectos de la fragmentación en poblaciones de jaguar en Brasil y obtuvieron que han perdido diversidad alélica a causa

de la deriva génica y como consecuencia se están estructurando porque el flujo génico está disminuido por efecto de las barreras geográficas, que limitan la migración de individuos. En general las poblaciones de jaguar a lo largo de su área de distribución han mostrado un nivel de variabilidad genética moderado a alto (Eizirik *et al.*, 2001; Ruiz-García *et al.*, 2006; Roma-Moreno *et al.*, 2006; Eizirik *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que al cabo de unas 10 generaciones el nivel de endogamia puede aumentar tanto en poblaciones de vida libre como en cautiverio, por lo que el objetivo principal de los programas de conservación de especies en peligro de extinción se debería centrar también en mantener la variación genética y evitar lo más posible la endogamia (Willoughby *et al.*, 2015).

### **Endogamia**

La endogamia se refiere generalmente al apareamiento entre individuos con un alto grado de parentesco, lo que provocaría que aumente la probabilidad de encontrar dos individuos que compartan alelos IBD (*identity by descent*), esto quiere decir que aumente la posibilidad de que se compartan alelos idénticos que vienen de generaciones anteriores y se van haciendo cada vez más frecuentes (Allendorf y Luikart, 2007), esto podría observarse cuando hay cruzamiento no aleatorio en generaciones sucesivas en una población inicial que tenga pocos individuos y estén muy emparentados entre ellos, si no se introducen “genes nuevos” en esta población se enfrentarían a dos escenarios: pérdida de diversidad alélica y fijación de alelos con desventajas adaptativas por la deriva al azar, es decir, las mutaciones deletéreas tenderían a acumularse porque la selección es menos eficaz (puesto que habría pocos individuos heterocigotos) en poblaciones pequeñas y esto podría conducir a un severo cuello de botella genético que ponga en peligro de extinción a la especie (Keller y Waller, 2002). Ambos procesos

tienden a ser graduales y no son rápidamente perceptibles, sin embargo, la endogamia puede actuar con rapidez en poblaciones pequeñas por la fijación de una fracción grande de la carga genética causada por la deriva génica, de tal manera que aumenta la frecuencia de individuos que son homocigotos para alelos IBD, lo cual resulta en la reducción del *fitness*, que a veces se refiere como depresión por endogamia (Hedrick y Kallinowski, 2000; Keller y Waller, 2002).

Para probar los efectos de la endogamia en poblaciones de vida libre, Jiménez *et al.* (1994) realizaron un estudio con el ratón *Peromyscus leucopus noveboracensis*, formando una población endogámica y una no endogámica, observaron que tuvo un ligero efecto al aumentar los niveles de alelos letales (0.45), aunque en otros roedores u otros mamíferos se presentan niveles más altos en condiciones similares. Otro ejemplo muy conocido es el del chita, cuyo nivel de heterocigosidad es de solo 0.0004-0.014, este fenómeno fue producido por varios cuellos de botella genéticos seguidos de extensos periodos de endogamia, por lo que sus niveles de homocigosidad son muy altos (O' Brien *et al.*, 1983; 1987; Merola, 1994;). Hedrick y Kallinowski (2000) evaluaron la influencia de la endogamia y la deriva génica en el *fitness* de una población de *Drosophila sp.*, la mitad de la población heredó alelos recesivos letales y la mitad perjudiciales, al cabo del tiempo disminuyó el *fitness* y el tamaño poblacional en ambas y nos llevaría a hacernos la siguiente pregunta: ¿Esto se podría generalizar a especies amenazadas? La respuesta podría ser que sí debido a que en las poblaciones pequeñas la deriva génica tendría mayor influencia que la selección natural, puesto que recrudece la probabilidad de aparición de alelos recesivos, por ejemplo, la pantera de Florida (*Puma concolor coryi*) tuvo una disminución drástica de su población hasta quedar en unos 50 individuos que reunieron con los pocos que sobrevivieron en vida libre y algunos de

cautiverio (Hedrick y Kalinowski, 2010). Han realizado muchos esfuerzos por conservar esta subespecie de puma, sin embargo, sus niveles de heterocigosidad son tan bajos como los del chita.

### **Genealogía**

Con los análisis de ADN se puede inferir las relaciones de parentesco entre los individuos en poblaciones de vida libre y cautiverio, con ello se ha tratado de elucubrar su origen y desarrollo evolutivo (Godoy, 2009). Si no se tiene un registro de genealogía (*studbook*), involuntariamente se podrían estar reproduciendo entre consanguíneos, cuyas consecuencias ya fueron señaladas anteriormente (pérdida de variabilidad genética, endogamia). Se puede hacer la asignación de individuos de origen desconocido a una población basándose en la correlación de distancias y similitudes genéticas entre ellos y unas poblaciones de referencia. Los métodos para hacerlo están basados en la probabilidad de encontrar genotipos multilocus (Charlesworth y Willis, 2009) que hagan *match* en la distribución de los genotipos asignados a individuos con una población originaria ya conocida (Cornuet y Luikart, 1996).

Con el conocimiento del genotipo y genealogía de los jaguares en cautiverio se podrían formar las bases para un programa de cruzamiento, existen algunas especies cuyos programas de cruzamiento han resultado favorecedores, como el del panda (*Ailuropoda melanoleuca*), lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), ocelote (*Leopardus pardalis*) y margay (*Leopardus wiedii*). En México la DGVS (Dirección General de Vida Silvestre) de la SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) es la dependencia mexicana que debería contar con el censo actualizado y pedigrí de los jaguares que hay en cada UMA, como no existe, y mucho menos hay una caracterización genética de cada uno, en este trabajo evaluamos la

variabilidad genética de 56 jaguares, cuyo resultado será el punto de partida para proponer las estrategias a seguir para la formación del registro genealógico estandarizado de jaguares cautivos en México.

### **Pregunta de investigación**

¿Existe variabilidad genética suficiente en los jaguares que están en cautiverio para poder ser la base de futuros programas de conservación de su diversidad genética?

### **Hipótesis**

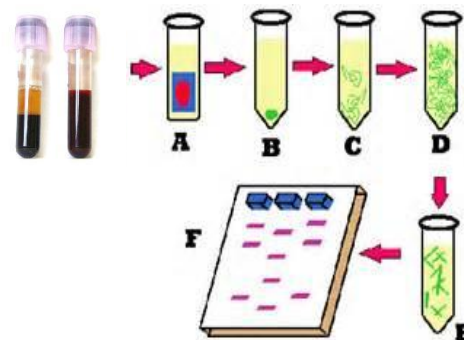
Existe una variabilidad genética en la población de jaguares en cautiverio en parques zoológicos en México suficiente para plantear programas de conservación de la diversidad genética en esta especie.

### **Objetivo general**

Evaluar a través de polimorfismos en microsatélites y secuencias mitocondriales la diversidad genética de la población de jaguares en cautiverio en México, con el fin de proponer programas de conservación de esta diversidad genética.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar la variabilidad genética en una población de jaguares en cautiverio a través del uso de secuencias microsatélites.
2. Evaluar la variabilidad genética en una población de jaguares en cautiverio a través del análisis de secuencias mitocondriales.
3. Analizar la variabilidad genética de la población de jaguares tomando base los datos de los polimorfismos y secuencias.
4. Realizar una propuesta de programa de cruzamiento con base en los resultados de los ejemplares evaluados.



### III. Materiales y métodos

#### Muestreo

Se realizó una fase piloto con sangre de gato doméstico, con la finalidad de estandarizar las condiciones de PCR sin malgastar muestras de jaguar.

Se colectaron 56 muestras de sangre completa de jaguar desde mayo de 2011 hasta octubre de 2013, provenientes de 14 zoológicos mexicanos:

**Cuadro 2. Lista de zoológicos que participaron en la entrega de muestras de sangre de jaguar**

Zoológico	Entidad Federativa
1	Distrito Federal
2	Distrito Federal
3	Hidalgo
4	Puebla
5	Morelos
6	Guerrero
7	Quintana Roo
8	Yucatán
9	Guanajuato
10	Puebla
11	Guanajuato
12	Estado de México
13	Sinaloa
14	Oaxaca

El volumen de sangre se procuró que fuera de por lo menos 2 ml, se colectó en vacutainers con EDTA y se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento. Para la contención química de los individuos se siguieron los protocolos establecidos en cada UMA, los cuales están basados en la NOM-126-ECOL-2000. Debido a que es una especie en peligro de extinción está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010, por lo que se contó con la mención en el permiso de colecta: Oficio Núm.

SGPA/DGVVS/01685/11, a nombre del Dr. Gerardo Ceballos González del Instituto de Ecología de la UNAM.

### **Métodos de procesamiento de muestras**

En el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-Xochimilco se hizo la extracción de ADN genómico (basado en el protocolo de Sambrook y Russell, 2001):

- a) Se homogeneizó el contenido del tubo, se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{l}$  y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante cuidando de no tocar el paquete celular blanco (leucocitos). Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de buffer SRL, se mezcló por inversión y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente.
- b) Con una micropunta de 100  $\mu\text{l}$  se retiró el sobrenadante y se dejó solo la pastilla, a la cual se le añadieron 2 ml de SRL y se homogeneizó. Se pasó a otro tubo nuevo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se decantó el tubo y se conservó la pastilla, a ésta se le añadieron 900  $\mu\text{l}$  de TE, 15  $\mu\text{l}$  de proteinasa K, 60  $\mu\text{l}$  de EDTA y 60  $\mu\text{l}$  de SDS. Se mezcló por inversión y se incubó a 56 °C durante 2 horas con agitación suave.
- d) Posteriormente se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de NaCl y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 13300 rpm durante 20 minutos, se conservó el sobrenadante (400  $\mu\text{l}$ ) y se transfirió a tubos nuevos de 1.5 ml.
- e) Se añadió a cada tubo 1 ml de etanol absoluto frío y se mezcló muy despacio por inversión. Se le añadieron 5  $\mu\text{l}$  de poliacrilamida, se centrifugaron a 13300 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se conservó el sobrenadante en congelación y se

pusieron a secar los tubos con la pastilla de ADN. Posteriormente se rehidrató con 15 µl de TE y se rotuló el tubo con la identificación de cada jaguar.

El ADN extraído se visualizó a través de la electroforesis, para ello se preparó un gel de agarosa 0.8% y se introdujo en una cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder, con unas cargas a 80 Volts y 100 mA durante 45 minutos. Después se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 2%. Posteriormente se midió la concentración del ADN en un espectrofotómetro y se diluyó a una concentración final de 100 ng/ml.

Se utilizó un conjunto de 11 microsatélites marcados con fluorocromo, desarrollado por Menotti-Raymond *et al.* (1999) y optimizado por Roques *et al.* (2014). Los primeros autores desarrollaron un mapa de ligamiento entre cromosomas usando más de 500 microsatélites para gato doméstico (*Felis catus*), los segundos seleccionaron 11 que tuvieran un nivel de polimorfismo alto, además organizaron los microsatélites en dos grupos de tal forma que con su marcaje no se sobrelaparan los rangos del tamaño de los fragmentos, con el fin de hacer una lectura multiplex (Cuadro 3).

En el Laboratorio de Ecología Molecular de la Estación Biológica de Doñana (Sevilla) se hicieron las amplificaciones de los fragmentos utilizando ese mismo set de microsatélites, bajo la supervisión del Dr. José Antonio Godoy y patrocinado por el proyecto de Genética de la Conservación del Lince Ibérico. Las condiciones de la PCR fueron: una primera etapa de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C, con una duración 30 segundos, hibridación a 57 °C, con una duración 90 segundos y extensión a 72 °C, con una duración de 30 segundos, y una etapa final de extensión de 30 minutos a 72 °C.

**Cuadro 3. Loci evaluados en *Panthera onca* a través de 11 iniciadores marcados con fluorocromos (Chirhart *et al.*, 2000). El tamaño de los alelos y la temperatura de alineamiento están indicados también en el texto. 6-FAM, NED, PET, VIC: acrónimos de los fluorocromos.**

Nombre del microsatélite	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Color	Tamaño del alelo (en bp)	Temperatura de alineamiento (en °C)	Unidad de repetición
<b>FCA115</b>	F:CTCACACAAGTAACTCTTTG R:CCTTCCAGATTAAGATGAG	6-FAM	185-225	57	Tetranucleótido
<b>FCA90</b>	F:ATCAAAAGTCTTGAAGAGCATGG TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTCC	6-FAM	100-120	62	Dinucleótidos
<b>FCA26</b>	F:GGAGCCCTTAGAGTCATGCA TGTACACGCACCAAAAACAA	6-FAM	126-160	60	
<b>FCA82</b>	F:TCACCGCTTAAGAAGAGGCTA R:GTGAAGCTTCCGAAATGAGG	VIC	190-210	57	
<b>FCA176</b>	F:GGAAACTTGGAAAGCAAAACC R:TCCACAGTTGGAGTTCTTAAGG	PET	213-233	57	
<b>FCA547</b>	F:GGTGACAAAACAAAACAAAGCA R:GGAGCCTGCATAGGATTCAC	VIC	215-235	60	
<b>FCA77</b>	F:GGCACCTATAACTACCAGTGTGA R:ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG	NED	110-154	57	
<b>FCA43</b>	F:GAGCCACCTAGCACATATAACC R:AGACGGGATTGCATGAAAAG	NED	hd	60	
<b>FCA566</b>	F:TGCTCAAACAGATAAGGCTGAA R:CCCCTCATGCTGTCTCTCA	NED	155-175	57	
<b>FCA24</b>	F:CCCAGCTTTGTCTCTTACTGTG R:CATCCTCCCCTAATGCC	PET	210-235	60	
<b>FCA126</b>	F:GCCCCTGATACCCTGAATG R:CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	PET	150-170	57	

Las reacciones de PCR de cada uno de los dos multiplex consistieron en un volumen final de 20 µl: 3 µl de ADN (15 ng/µl) Multiplex PCR Master Mix 1X (QIAGEN®), BSA 0.01%, H<sub>2</sub>O, 0.2 M de cada iniciador, *forward* y *reverse* (Sigma-Aldrich®). El microsatélite que se amplificó por separado (FCA115) se procesó con diferentes condiciones en la PCR: una primera etapa de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 92 °C, hibridación a 57 °C, y la extensión a 72 °C, cada paso con duración de 30 segundos, y una etapa de extensión final de 5 minutos a 72 °C. Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 20 µl que contenían 3 µl de extracto de ADN (15 ng/ µl) Tris-HCl mM pH 8, mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 0.25 mM, 0.01% de BSA, 0.4 M de cada iniciador y 0.4 U de Taq polimerasa (Bioline®). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio al 2%. Se obtuvieron los alelos (fragmentos) por medio del secuenciador SG-600 LIZ (Life Technologies Inc.). Se calculó el tamaño de los fragmentos mediante el software v4.0 GeneMapper (Applied Biosystems®) y se rectificaron manualmente aquellos alelos que tuvieran patrones anormales o dudosos.

### **Análisis genéticos iniciales**

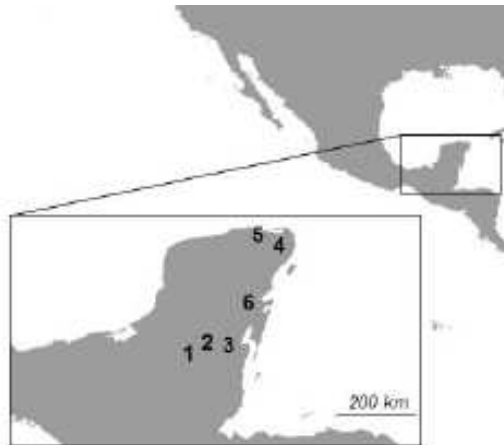
Con la rectificación manual y revisión de los alelos de todos los loci se asignaron los genotipos consenso, se comprobaron errores de genotipado con el software MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), con un intervalo de confianza del 95% y 1000 repeticiones. Este software puede ayudar a identificar los alelos nulos, por los cuales se deben ajustar las frecuencias genotípicas sesgadas, por ejemplo, los loci FCA115, FCA547 y FCA566 mostraron alelos nulos y mediante el software FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007) se evaluó si su presencia era suficiente para afectar significativamente los cálculos de las frecuencias de los genotipos. FreeNA además permite dar varios tratamientos estadísticos a un conjunto de datos de microsatélites que tenga alelos nulos con base en la corrección de INA, y permite evaluar si hay diferencias significativas entre los valores de  $F_{ST}$  con dicha corrección (Chapuis y Estoup, 2007). La frecuencia de alelos por cada locus se encuentra en el Anexo I.

### **Estimación de la estructura genética**

Para la asignación de individuos a poblaciones con origen conocido, se pidió autorización a Séverine Roques *et al.*, quienes otorgaron permiso para usar los

genotipos que han obtenido a lo largo de varios años de colectas de muestras no invasivas en la península de Yucatán (Figura 2):

Ejido Caoba (3), Calakmul (1), Petcacab (6), El Zapotal (5), El Edén (4). El número 2 corresponde a un sitio del cual no se incluye ninguna muestra para este estudio.



**Figura 2. Sitios de muestreo en la Península de Yucatán (Imagen de C. Chávez).**

Y varias zonas de Brasil: Amazonas, Caatinga, Cerrado (zona centro) y



**Figura 3. Sitios de muestreo en Brasil**

Con el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003; Hubisz *et al.*, 2009) se infirió la probabilidad de asignar distintas poblaciones mediante

análisis bayesiano, el procedimiento se basa en el método de cadena de Markov-Monte Carlo (MCMC), y a su vez se basa en la máxima probabilidad de que los datos se ajusten al número potencial de agrupaciones o grupo genéticos  $K$  asignados; cada ejecución se realizó con 1 000000 períodos y 1 000000 iteraciones MCMC, con la opción de que las frecuencias de alelos estuvieran correlacionadas y con un modelo de reproducción con admixia (cuando hay reproducción entre individuos que provienen de poblaciones que estaban contiguas, pero quedaron separadas en algún momento). Se introdujo en el modelo la opción POPFLAG, en la que se establece que se tiene información sobre el origen de algunos individuos (en la matriz de datos, se asigna un valor de 1 en una columna adyacente a los genotipos) que en este caso fueron todos los genotipos de los jaguares de vida libre de Brasil y México, de Roques *et al.* que se utilizaron como referencia, para los 56 jaguares cautivos se asignó un valor de 0, es decir, que no hay información previa sobre el origen de la población. Se determinó el valor máximo de  $\Delta K$  con HARVESTER STRUCTURE 0.6.92 (Earl y von Holdt, 2012), mediante el método de Evanno y posteriormente se calculó la distribución de la variación genética entre y dentro de los grupos genéticos de individuos.

Para determinar la agrupación de los individuos con base a la correspondencia de sus frecuencias alélicas se hizo un análisis factorial de correspondencias (FCA) en Génétix 4.05 (Belkhir *et al.* 2005) primero usando solo el conjunto de genotipos de jaguares de zoológicos y en otro modelo utilizando simultáneamente el conjunto de los genotipos de vida libre y de cautiverio.

Se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) basado en  $F_{ST}$  con GenAlEx 6.5.2. (Peakall y Smouse 2006). Además, un árbol filogenético fue construido a partir de las distancias genéticas de conformidad con el modelo *Stepwise Mutation*

*Model* o modelo de mutación gradual (SMM), y fue tomado como base para analizar si esta población pasó por un cuello de botella genético recientemente. Se calculó la distancia genética de Nei (Nei, 1972) de todos los individuos utilizando POPULATIONS 1.2.30 (Langella, 2002). A su vez, estas distancias se utilizaron para construir el árbol NJ (*Neighbour-joining*) que agrupa individuos por similitud genética con otro software: FIGTREE 1.4.2. (Rambaut y Drummond 2010), por último con GENETIC STUDIO (Dyer 2009) se estimaron las distancias genéticas de Nei (DNei) entre los grupos genéticos obtenidos.

### **Variabilidad genética**

Para calcular algunos parámetros genéticos se utilizaron las frecuencias alélicas, incluyendo el número medio de alelos por locus ( $A$ ), el número medio de alelos efectivos por locus ( $A_e$ ), heterocigosis observada y esperada ( $H_o$ ,  $H_e$ ), el índice de fijación de alelos ( $F_{st}$ ) mediante el software Genalex 6.5. Se efectuaron algunas pruebas globales y específicas con los genotipos poblacionales para detectar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010), y GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995) mediante 100000 iteraciones de la cadena de Markov y 100000 *dememorisation steps*. Se infirió que hubo niveles de desequilibrio de ligamiento (LD) o desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) significativos y fueron corregidos con una aproximación de comparaciones múltiples mediante False Discovery Rate (FDR), de acuerdo a Benjamini y Hochberg (1995), que utiliza el software QVALUE (Storey, 2002) para R (versión 3.0.1; Desarrollo R Equipo Central, 2013).

### **Tamaño efectivo de la población, cuellos de botella genéticos y parentesco**

El tamaño efectivo de la población se midió con el software LDNE (Waples, 2006; Waples y Do, 2008), basado en el método de desequilibrio de ligamiento (Hill, 1981). Se utilizó para calcular cuántos jaguares están siendo reproducidos (y dejando sus genes en el pool genético) en los zoológicos muestreados. También se utilizó el software BOTTLENECK 5.1.26 (Cornuet y Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999) para detectar indicios sobre posibles cuellos de botella genéticos dentro de la población, que hayan ocurrido recientemente. Se estimó la heterocigosidad observada y esperada bajo el modelo de alelos infinitos (IAM), el modelo de mutación gradual (SMM) y el modelo de dos fases (TPM), con ajustes de 90% SMM, el 10% en IAM, y el 10% de la varianza; y los valores por defecto utilizados (70% SMM, 30% de IAM, y 10% de la varianza). Ambos ajustes se realizaron con 10000 repeticiones y el exceso de heterocigosidad fue examinado con la prueba de Wilcoxon. Se evaluó la relación entre los individuos con el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006), en donde se considera la presencia de alelos nulos y se basa en las pruebas de máxima verosimilitud.

## IV. RESULTADOS

### Muestreo poblacional y detección de errores en las salidas

Se evaluaron los genotipos obtenidos de 56 jaguares provenientes de 14 zoológicos mexicanos a través de 11 microsatélites, se detectaron tres de ellos con presencia de alelos nulos: FC115, FC547 y FC566. Este análisis se hizo con el software MICRO-CHECKER (Oosterhout y Hutchinson, 2004), posteriormente se evaluó con la *t*-student si las diferencias fueron significativas ( $t = 0.015$ ,  $P = 0.99$ , G.L. = 20) de acuerdo con el análisis FreeNA ( $F_{st-INA} = 0.096$ ,  $F_{st} = 0.095$ ) y con GRAPHPAD RAPID CALCS (Chapuis y Estoup, 2007). Como no hubo diferencias significativas se determinó que la presencia de los alelos nulos no afectaría las salidas de los demás análisis.

### Estructura genética

Considerando los jaguares de los zoológicos como una población base, se obtuvieron tres grupos genéticos con el software STRUCTURE 2.3.4 ( $\text{LnPr}(K = 3) = -1716.35$ , ver Figura 4 y 5), de acuerdo con el método Evanno (basado en la probabilidad máxima de grupos  $K$  (Pritchard *et al.*, 2000), y como se puede apreciar en la gráfica que se encuentra posteriormente, el máximo valor de  $\Delta K$  está dado en  $K = 3$ .

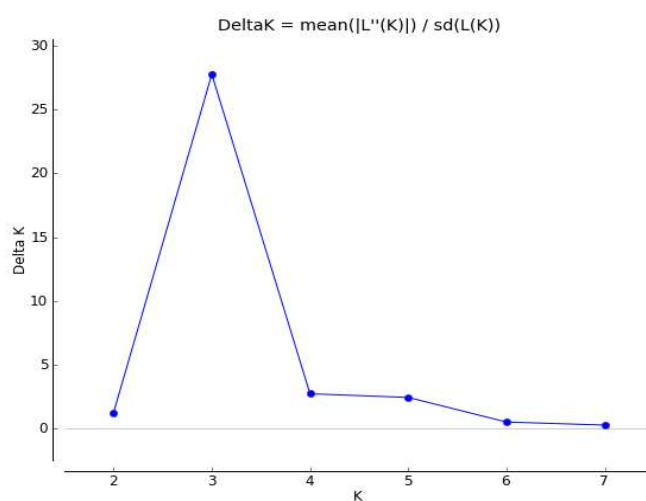
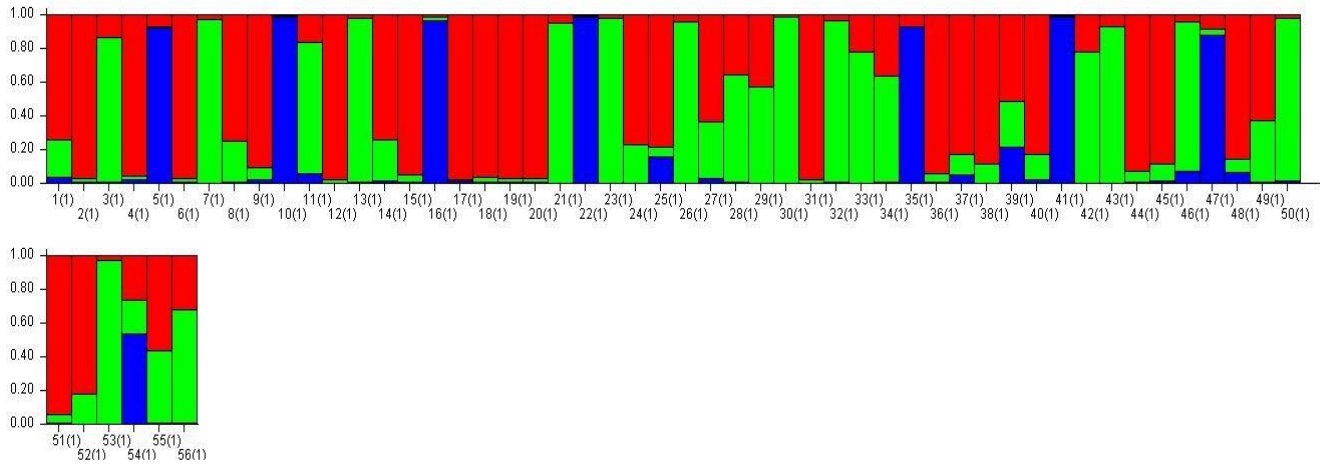
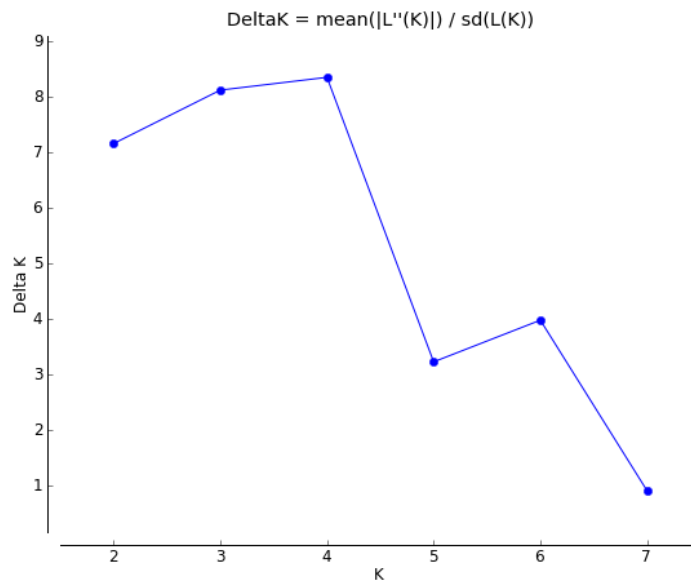


Figura 4. Detección del número de  $K$  grupos óptimos usando los genotipos de jaguares cautivos. Basado en el método de Evanno *et al.* (2005).

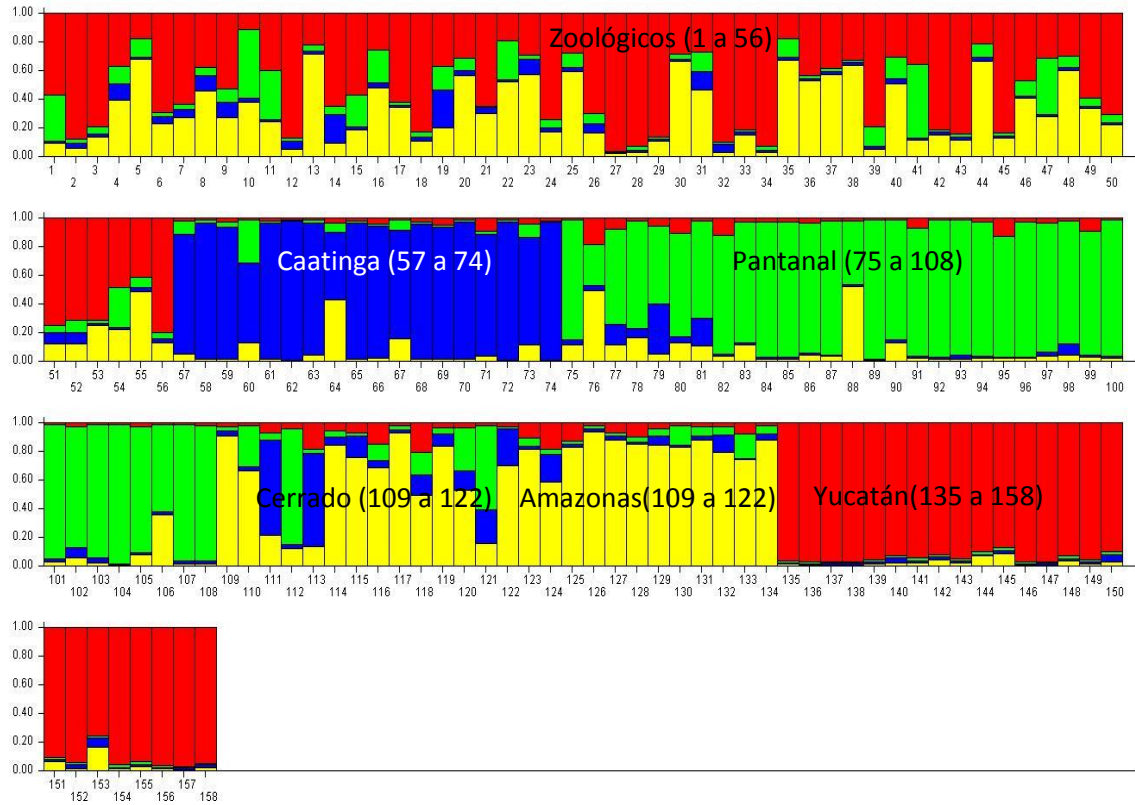


**Figura 5.** Estimación de los grupos genéticos de 56 jaguares en cautiverio utilizando 11 microsatélites. El número resultante fue asignado al número óptimo de grupo genéticos ( $K$ ) utilizando STRUCTURE 2.3. El color en cada línea vertical representa la proporción de cada  $K$  grupo inferido por cada individuo. El número en la parte inferior de cada barra corresponde a la identificación individual, el número entre paréntesis corresponde a la población con la que se introduce el conjunto de datos al inicio de las simulaciones.

Paralelamente se realizó el análisis conjunto con los genotipos de vida libre provenientes de Brasil y México, se obtuvieron 4 grupos genéticos (Figuras 6 y 7):



**Figura 6.** Detección del número de  $K$  grupos genéticos óptimos usando los genotipos de jaguares de vida libre que provienen de la península de Yucatán y varias zonas de Brasil. Basado en el método de Evanno *et al.* (2005).



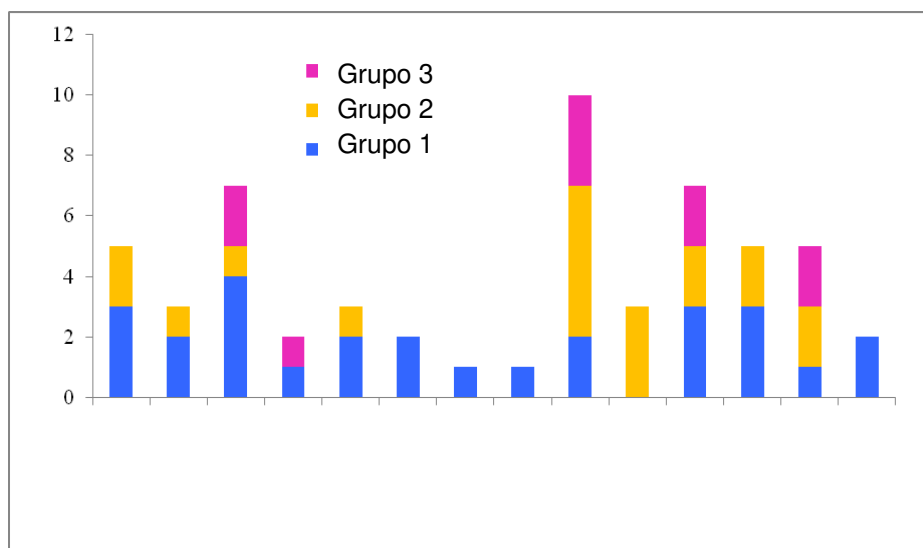
**Figura 7.** Estimación de los grupos genéticos de 158 jaguares (56 provienen de cautiverio y 102 de vida libre: 23 de la península de Yucatán; 17 de Caatinga, 33 del Pantanal, 13 del centro de Cerrado y 11 del Amazonas en Brasil) utilizando 11 microsatélites. El número resultante fue asignado al número óptimo de grupos ( $K$ ) utilizando STRUCTURE 2.3.4. El color en cada línea vertical representa la proporción de cada  $K$  grupo inferido por cada individuo. El número en la parte inferior de cada barra corresponde a la identificación individual.

Para comprobar que la asignación de individuos a cada grupo genético fuera la adecuada, se verificó que la probabilidad de asignación fuera de mínimo 60% para considerarla aceptable (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Número de individuos que en Structure fueron asignados a un grupo genético con una probabilidad de <40 a 95%.

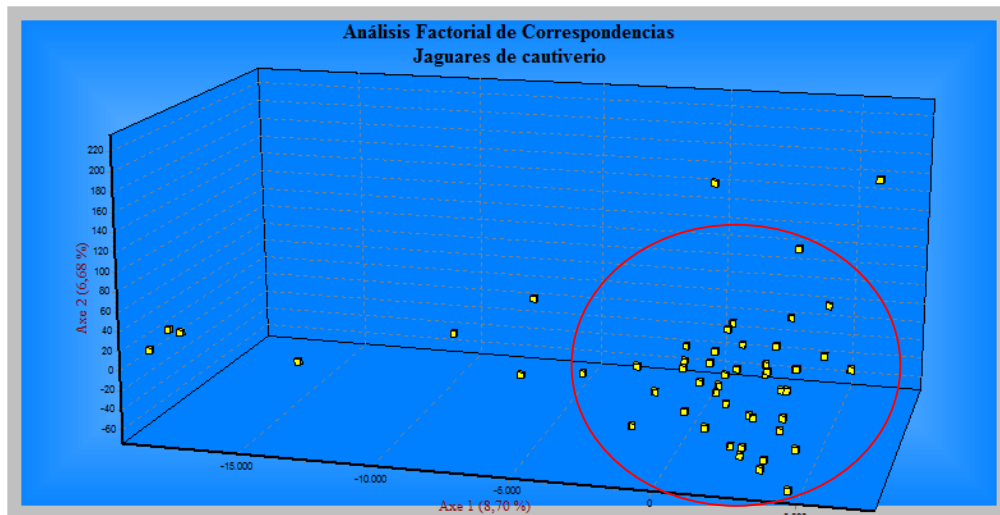
<i>P</i>	Número de jaguares asignados	(%)
>90 %	30	53.57
>80 %	9	17.86
>70 %	8	14.29
>60 %	2	3.57
45-60 %	7	12.50
Total	56	100

Más de las tres cuartas partes de la población total fue asignada con una probabilidad mayor a 60%. Para visualizar la distribución final asignada de los tres grupos genéticos en los jaguares de cada zoológico se realizó un gráfico de barras (Figura 8). Cada barra representa el o los individuos que fueron muestreados por zoológico y la proporción del color de cada grupo genético que está representado en ese zoológico.



**Figura 8. Distribución de los tres grupos genéticos asignados en Structure en cada zoológico.**

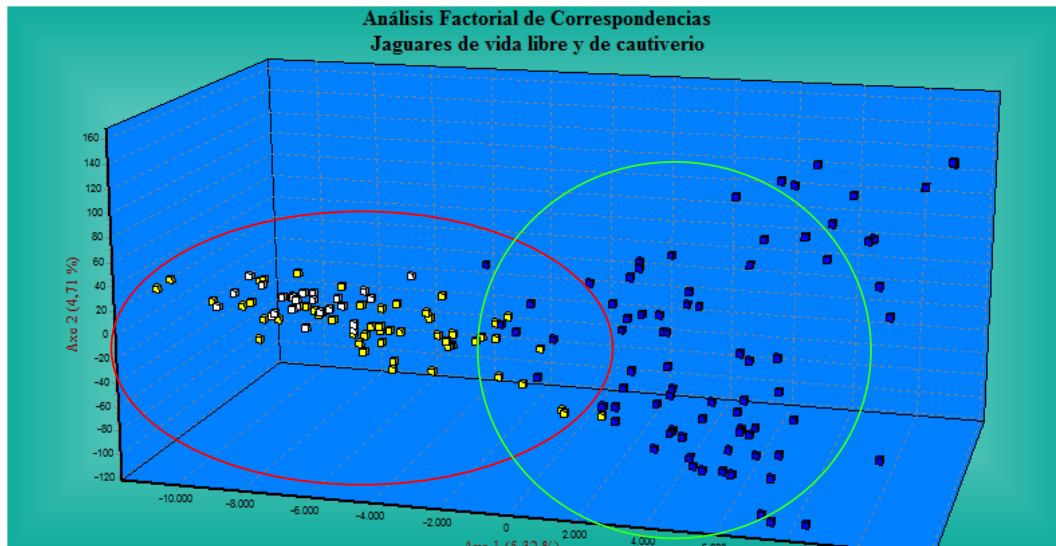
Para tener otra perspectiva de la estructuración de la población se obtuvo con Génétix un análisis factorial de correspondencias (Figura 9), en el primer caso se usaron solamente los genotipos de jaguares de cautiverio, y quedaron asignados de la siguiente manera:



**Figura 9. Análisis factorial de correspondencias de genotipos de jaguares cautivos. Cada cubo representa un individuo, los ejes representan la parte porcentual que es explicada por la similitud en la correlación de las frecuencias alélicas.**

La mayoría de los individuos están agrupados cercanamente en la nube de puntos de dispersión, los que están fuera del círculo rojo trata de jaguares que se encuentran con una mayor distancia genética. En concreto, los objetos analizados (en esta versión del programa se refiere a todos los individuos) son vistos como una nube de puntos en un hiperespacio que tiene varias dimensiones y modalidades (alelos) en todas las variables (alelos en diferentes loci), por convención, el primer eje es la que tiene la mayor contribución a la inercia total. En este análisis de correspondencia se observaron 10 jaguares que no estuvieron agrupados cercanamente, es decir, que tuvieron mayor distancia genética respecto de los demás; al revisar los grupos genéticos formados en Structure se observó que hubo algunas coincidencias en que esos 10 jaguares pertenecieran al mismo grupo genético, asimismo hubo algunas coincidencias en los individuos asignados en un mismo grupo genético y los individuos que estaban agrupados de manera muy cercana en el FCA (Figura 10).

En el segundo análisis factorial de correspondencias, en el que se utilizaron de manera conjunta los genotipos de jaguares de vida libre y de cautiverio, se obtuvo la siguiente figura:



**Figura 10.** Análisis factorial de correspondencias en el que están considerados los genotipos de los jaguares de cautiverio y de vida libre. Cada cubo representa un individuo, los ejes representan la parte porcentual que es explicada por la similitud en la correlación de las frecuencias alélicas. Los cubos amarillos representan los de cautiverio, los azules los de origen brasileño y los de blanco los de origen mexicano.

Esta asociación canónica se ajusta a lo que presumiblemente ocurre en algunos zoológicos mexicanos: que la mayoría de los individuos contengan más genotipos que sean afines a jaguares con origen mexicano, no obstante, hay varios casos en los que se observa que hay individuos que son agrupados hacia la nube de datos correspondiente a jaguares de origen brasileño. Se observa también una diferenciación amplia entre los individuos de Brasil y México.

### **Variabilidad genética**

Se encontraron 176 genotipos para la población de jaguares cautivos (Cuadro 5), con un rango de 6-40 ( $\bar{x} = 16$ ) genotipos por locus. El menor número de genotipos por locus

fue de seis en FCA43, y el más alto fue 40 en el FCA115. Este microsatélite presentó el mayor número de genotipos heterocigóticos (33), mientras que el más bajo fue FCA43 con 3. El loci que tenía el número más bajo de los genotipos homocigotos fue FCA26 con 1 y el más alto FCA115 con 7 (Anexo I).

**Cuadro 5. Número de genotipos por locus, por cada grupo genético y por el total.**

Locus	Total de grupo genéticos	Homocigotos	Heterocigotos	Grupo genético 1	Grupo genético 2	Grupo genético 3
FCA24	12	3	9	10	6	5
FCA26	10	1	9	10	4	3
FCA43	6	3	3	6	6	2
FCA77	17	4	13	13	7	3
FCA82	12	4	8	9	3	5
FCA90	14	5	9	9	6	5
FCA115	40	7	33	25	12	4
FCA126	10	2	8	8	7	3
FCA176	13	4	9	12	6	3
FCA547	23	5	18	16	10	4
FCA566	19	4	15	16	6	6
<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>42</b>	<b>134</b>	<b>134</b>	<b>73</b>	<b>43</b>
<b>Promedio</b>	<b>16</b>	<b>3.82</b>	<b>12.18</b>	<b>12.18</b>	<b>6.64</b>	<b>3.91</b>

Se midió la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), el número total de alelos ( $A$ ), el número de alelos efectivos ( $A_e$ ), el índice de información de Shannon ( $I$ ) y los valores  $F_{st}$  por locus (Cuadro 6). En el grupo genético 1 el número de alelos tuvo un rango de 3 a 17 ( $\bar{x} = 7$ ), el  $A_e$  de 2.62 a 12 ( $\bar{x} = 4.37$ ). La mínima  $H_o$  fue de 0.57 en el locus FC24, la máxima fue de 0.85 en el locus FC115, el valor promedio para todos los loci de  $H_o$  y  $H_e$  fue iguales (0.7), el índice de fijación  $F_{st}$  tuvo un rango de -0.14 a 0.12. En el grupo genético 2 el número resultante de alelos tuvo un rango de 3 a 9 ( $\bar{x} = 4.45$ ). El  $A_e$  tuvo un rango de 1.2 a 7.1 ( $\bar{x} = 3.13$ ), la  $H_o$  mínima fue de 0.19 en el locus FC82, la máxima fue de 0.72 en el locus FC24 ( $\bar{x} = 0.53$ ), en dos loci se encontraron diferencias significativas entre  $H_o$ - $H_e$ : FC115 (0.62- 0.86;  $p < 0.002$ ), FC566 (de 0.5 a 0.7,  $P < 0.0007$ ), y hubo una diferencia global significativa ( $t = -0.169$ ,  $-0.017$   $p < 0.021$ ). En el grupo genético 3 los valores de  $F_{st}$  tuvieron un rango de -0.15 a 0.32, el número

de alelos osciló de 2 a 6 ( $\bar{x} = 3.6$ ), el Ae tuvo un rango de 1.44 a 4.67 ( $\bar{x} = 2.76$ ), la mínima Ho fue de 0.37 en el locus FCA43, la máxima fue de 0.98 en el loci FC115 y en el FC176 ( $\bar{x} = 0.71$ ), entre cada pareja de valores de Ho y He en cada loci no se encontraron diferencias significativas, pero sí hubo diferencia significativa entre los valores promedio de las Ho y He (0.71-0.59,  $t = 0.026, 0.207, P < 0.016$ ), la Fst tuvo un rango de valores de -0.54 a 0.19.

**Cuadro 6. Medidas de diversidad analizadas mediante 11 microsatélites en tres grupos genéticos de 56 jaguares cautivos. A = número de alelos, Ae = número efectivo de alelos, I = índice de información de Shannon, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, Fst = índice de fijación.**

Nombre	Locus	A	Ae	I	Ho	He	Fst
<b>Grupo genético 1</b>	<b>FCA24</b>	5	2.62	1.18	0.57	0.62	0.08
	<b>FCA26</b>	6	2.99	1.41	0.72	0.67	-0.09
	<b>FCA43</b>	3	2.62	1.02	0.61	0.62	0.02
	<b>FCA77</b>	7	4.03	1.60	0.83	0.75	-0.11
	<b>FCA82</b>	6	3.07	1.35	0.77	0.67	-0.14
	<b>FCA90</b>	5	3.38	1.31	0.74	0.70	-0.05
	<b>FCA115</b>	17	12.05	2.65	0.85	0.92	0.07
	<b>FCA126</b>	6	2.50	1.20	0.62	0.60	-0.04
	<b>FCA176</b>	6	4.10	1.53	0.73	0.76	0.04
	<b>FCA547</b>	8	5.26	1.83	0.79	0.81	0.03
<b>FCA566</b>	8	5.41	1.81	0.71	0.81	0.12	
<b>Total</b>		<b>7</b>	<b>4.37</b>	<b>1.54</b>	<b>0.72</b>	<b>0.72</b>	<b>-0.01</b>
<b>Grupo genético 2</b>	<b>FCA24</b>	4	2.99	1.19	0.72	0.66	-0.09
	<b>FCA26</b>	3	2.21	0.92	0.63	0.55	-0.15
	<b>FCA43</b>	3	2.52	0.99	0.53	0.60	0.13
	<b>FCA77</b>	5	2.50	1.17	0.50	0.60	0.17
	<b>FCA82</b>	3	1.21	0.37	0.19	0.17	-0.08
	<b>FCA90</b>	4	2.96	1.16	0.61	0.66	0.08
	<b>FCA115</b>	9	7.11	2.08	0.62	0.86	0.27
	<b>FCA126</b>	5	2.91	1.23	0.50	0.66	0.24
	<b>FCA176</b>	3	2.97	1.09	0.53	0.66	0.21
	<b>FCA547</b>	5	3.79	1.42	0.50	0.74	0.32
<b>FCA566</b>	5	3.34	1.4	0.50	0.70	0.29	
<b>Total</b>		<b>4.455</b>	<b>3.136</b>	<b>1.185</b>	<b>0.530</b>	<b>0.624</b>	<b>0.125</b>
<b>Grupo genético 3</b>	<b>FCA24</b>	4	2.61	1.16	0.50	0.62	0.19
	<b>FCA26</b>	3	2.33	0.95	0.87	0.57	-0.53

	<b>FCA43</b>	2	1.44	0.48	0.37	0.30	-0.23
	<b>FCA77</b>	3	1.85	0.78	0.62	0.46	-0.36
	<b>FCA82</b>	5	3.92	1.47	0.86	0.74	-0.15
	<b>FCA90</b>	3	2.67	1.04	0.62	0.62	0.00
	<b>FCA115</b>	5	4.08	1.49	0.98	0.75	-0.32
	<b>FCA126</b>	2	2	0.69	0.50	0.50	0.00
	<b>FCA176</b>	3	2.84	1.07	0.98	0.65	-0.54
	<b>FCA547</b>	4	1.97	0.95	0.62	0.49	-0.27
	<b>FCA566</b>	6	4.67	1.67	0.86	0.79	-0.09
<b>Total</b>		<b>3.636</b>	<b>2.762</b>	<b>1.068</b>	<b>0.713</b>	<b>0.591</b>	<b>-0.210</b>
<b>Promedio</b>		<b>5.03</b>	<b>3.42</b>	<b>1.26</b>	<b>0.65</b>	<b>0.65</b>	<b>-0.03</b>

No se detectaron desviaciones significativas en el análisis de desequilibrio por ligamiento en ninguno de los grupos genéticos, dado que consideramos los 11 loci como marcadores independientes; sin embargo se hallaron signos de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg debido a la deficiencia de heterocigotos en cuatro loci del análisis de la población total: FCA82 (Fis W & C = 0.08, P = 0), FCA115 (Fis W & C = 0.14, P = 0), FCA547 (Fis W & C = 0.21, P = 0) y FCA566 (Fis W & C = 0.20, P = 0) y en el grupo genético 2, dos loci: FCA547 (Fis W & C = 0.35, P = 0) y FCA566 (Fis W & C = 0.31, P = 0).

En resumen, los niveles de diversidad genética fueron de moderados a altos (de 0.53 a 0.72) con un promedio global de 0.65 (cuadro 6). La  $H_o$  fue mayor en el grupo genético 1 (0.72), pero teniendo en cuenta que el grupo genético 3 contenía sólo ocho individuos, su valor de  $H_o$  (0.71), sugiere un ligero nivel de exogamia, mientras que el grupo genético 2 mostró una heterocigosidad moderada (0.53).

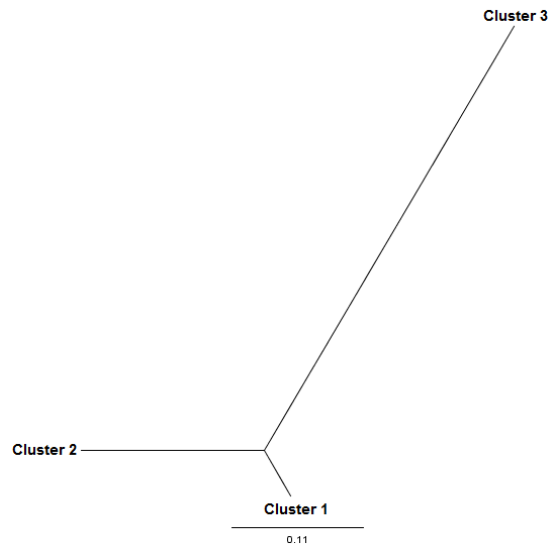
Los resultados de AMOVA mostraron que la variación genética reside intraindividualmente (76%  $P = 0.001$ ), después a nivel interindividual (16%  $P = 0.001$ ) y por último entre grupos (8%  $P = 0.001$ ), ver Cuadro 7. Los valores de  $F_{st}$  y de la distancia de Nei mostraron que el nivel de estructuración genética fue bajo entre los

grupos genéticos; bajo entre el grupo genético 1 y el grupo genético 2 ( $F_{st} = 0.051$ ,  $N_{ei} = 0.2142$ ) moderado entre el grupo genético 1 y el grupo genético 3 ( $F_{st} = 0.113$ ,  $N_{ei} = 0.4857$ ), y también moderado entre el grupo genético 2 y el grupo genético 3 ( $F_{st} = 0.151$ ,  $N_{ei} = 0.5425$ ).

**Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) basada en los valores de  $F_{st}$ .**

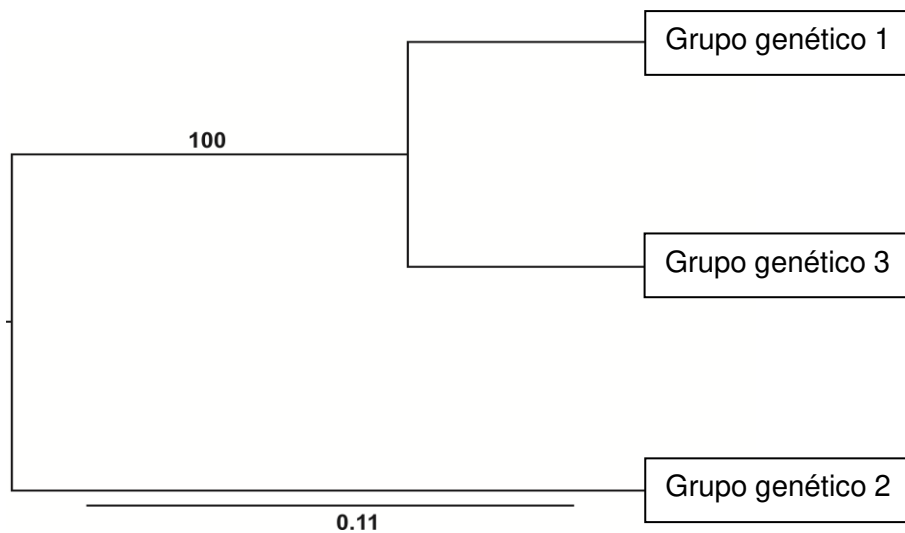
Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación
<b>Entre grupo genéticos</b>	1	33.778	0.365 $V_a$	<b>8 %</b>
<b>Entre Individuos</b>	53	248.981	0.702 $V_a$	<b>16 %</b>
<b>En Individuos</b>	56	184.5	3.295 $V_b$	<b>76 %</b>
<b>TOTAL</b>	111	629.141	4.361	
<b>Índice de fijación <math>F_{st}</math>: 0.084 <math>P = 0.001</math></b>				

Se construyó un árbol filogenético basado en el método de relación entre individuos más cercanos (*Neighbour-joining* NJ) en el cual se mostró que los jaguares de los grupos genéticos 1 y 2 tuvieron más similitud por las distancias genéticas de  $N_{ei}$ , y al comparar la ramificación con la del grupo genético 3, éste aparece más lejana alas de 1 y 2 (Figura 11); este árbol solo contiene los genotipos de los jaguares cautivos. El grupo genético 1 corresponde al color rojo, el grupo genético 2 corresponde al color verde y el grupo genético 3 corresponde al color azul de la salida de Structure (Figura 5).



**Figura 11.** Árbol filogenético sin raíz construido con el método NJ (*Neighbour-Joining*) basado en las estimaciones de distancias genéticas estandarizadas de Nei (Nei 1972) entre las poblaciones.

También se construyó un dendograma analizando conjuntamente los genotipos de los jaguares de vida libre y los de cautiverio. En este caso se consideraron tres grupos genéticos: el 1 se refiere al de jaguares cautivos, el 2 se refiere al de jaguares brasileños de vida libre y el 3 se refiere al de jaguares de vida libre de la península de Yucatán (Figura 12).



**Figura 12.** Dendograma de los grupos genéticos considerando poblaciones de vida libre y de cautiverio.

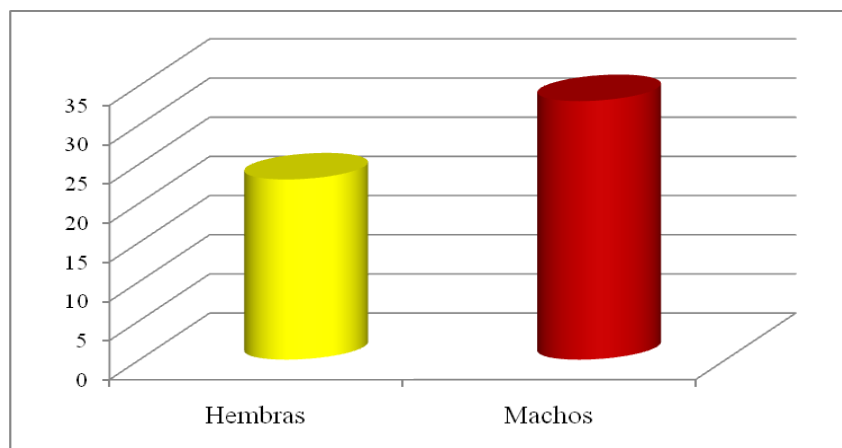
## Tamaño efectivo de la población, cuellos de botella genéticos, endogamia y parentesco

La estimación del tamaño efectivo de la población fue de 17.3 con el método de LD, un tamaño de muestra media armónica de 51.9 para todos los individuos (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Estimación del tamaño efectivo poblacional basado en el método LD.**

LDNe			
	Tamaño de la media armónica de la muestra	Ne	Intervalo de confianza (95 %)
<b>56 jaguares en cautiverio</b>	51.9	17.3	13.4 - 22.7

En la siguiente figura (Figura 13) se muestra la proporción de machos y hembras que hay en los 56 jaguares que fueron muestreados.



**Figura 13. Proporción de machos y hembras en 56 jaguares cautivos.**

Con BOTTLENECK se detectó un cuello de botella genético reciente asociado a un exceso de heterocigotos para la población total, con una variación de 30% y una probabilidad de 70%, respecto a los modelos de IAM y TPM ( $P = 0$ ), con una varianza de 10% y una probabilidad de 90%, bajo el modelo de IAM ( $P = 0$ ). Cuando se analizó de forma independiente cada grupo genético, los tres mostraron signos de cuellos de

botella recientes de acuerdo al resultado de los tres modelos, con las variaciones y probabilidad específica (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Análisis de cuello de botella genético evaluado bajo tres modelos: IAM, TPM y SMM, con varianza = 10% y 90% de probabilidad, varianza = 30% y probabilidad de 70%**

		Varianza = 10 Probabilidad = 90 %				Varianza = 30 Probabilidad = 70 %			
			IAM	TPM	SMM		IAM	TPM	SMM
<b>Locus</b>		<b>He</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>He</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>
<b>Grupo genético</b>	FCA24	0.685	0.502	0.635	0.669	0.685	0.502	0.585	0.669
	FCA26	0.641	0.558	0.703	0.722	0.641	0.571	0.656	0.724
	FCA43	0.595	0.318	0.428	0.461	0.595	0.315	0.382	0.450
	FCA77	0.781	0.671	0.776	0.798	0.781	0.668	0.745	0.802
	FCA82	0.630	0.637	0.747	0.772	0.630	0.637	0.710	0.771
	FCA90	0.738	0.514	0.642	0.674	0.738	0.521	0.591	0.673
	FCA115	0.930	0.868	0.914	0.921	0.930	0.866	0.901	0.920
	FCA126	0.635	0.576	0.699	0.724	0.635	0.573	0.651	0.722
	FCA176	0.772	0.571	0.699	0.727	0.772	0.572	0.655	0.725
	FCA547	0.846	0.664	0.775	0.799	0.846	0.660	0.736	0.802
FCA566	0.823	0.728	0.826	0.844	0.823	0.727	0.793	0.843	
Wilcoxon (prueba de una cola para comprobar exceso de heterocigosidad)			$P = 0$	$P = 0.18$	$P = 0.61$		$P = 0$	$P = 0$	$P = 0.58$

		Varianza = 10 Probabilidad = 90 %				Varianza = 30 Probabilidad = 70 %			
			IAM	TPM	SMM		IAM	TPM	SMM
<b>Locus</b>		<b>He</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>He</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>	<b>Heq</b>
<b>Grupo genético 1</b>	FCA24	0.63	0.561	0.665	0.685	0.63	0.555	0.624	0.685
	FCA26	0.678	0.613	0.719	0.744	0.678	0.619	0.683	0.740
	FCA43	0.629	0.361	0.463	0.482	0.629	0.359	0.413	0.468
	FCA77	0.768	0.688	0.771	0.787	0.768	0.693	0.745	0.788
	FCA82	0.69	0.647	0.729	0.75	0.69	0.645	0.701	0.753
	FCA90	0.72	0.578	0.675	0.692	0.72	0.579	0.639	0.694
	FCA115	0.934	0.895	0.924	0.929	0.934	0.897	0.917	0.928
	FCA126	0.613	0.644	0.726	0.749	0.613	0.636	0.693	0.745
	FCA176	0.774	0.643	0.732	0.745	0.774	0.650	0.698	0.751
	FCA547	0.825	0.713	0.798	0.814	0.825	0.723	0.773	0.813
FCA566	0.83	0.719	0.795	0.814	0.83	0.712	0.769	0.815	
Wilcoxon (prueba de una cola para comprobar exceso de heterocigosidad)			$P = 0$	$P = 0.23$	$P = 0.68$		$P = 0$	$P = 0.04$	$P = 0.76$

		Varianza = 10 Probabilidad = 90 %				Varianza = 30 Probabilidad = 70 %			
			IAM	TPM	SMM		IAM	TPM	SMM
Locus		He	Heq	Heq	Heq	He	Heq	Heq	Heq
Grupo genético 2	FCA24	0.684	0.510	0.604	0.632	0.684	0.521	0.572	0.618
	FCA26	0.562	0.389	0.477	0.494	0.562	0.402	0.451	0.495
	FCA43	0.619	0.393	0.481	0.499	0.619	0.399	0.440	0.494
	FCA77	0.617	0.592	0.688	0.707	0.617	0.599	0.654	0.705
	FCA82	0.179	0.412	0.487	0.491	0.179	0.396	0.459	0.503
	FCA90	0.681	0.513	0.603	0.624	0.681	0.516	0.572	0.622
	FCA115	0.887	0.806	0.853	0.859	0.887	0.810	0.836	0.860
	FCA126	0.675	0.604	0.685	0.707	0.675	0.605	0.657	0.702
	FCA176	0.681	0.390	0.475	0.503	0.681	0.397	0.450	0.501
	FCA547	0.757	0.608	0.690	0.705	0.757	0.604	0.660	0.705
	FCA566	0.721	0.595	0.688	0.707	0.721	0.605	0.653	0.706
	Wilcoxon (prueba de una cola para comprobar exceso de heterocigosidad)		$P = 0.01$	$P = 0.1$	$P = 0.18$		$P = 0.01$	$P = 0.04$	$P = 0.36$

		Varianza = 10 Probabilidad = 90 %				Varianza = 30 Probabilidad = 70 %			
			IAM	TPM	SMM		IAM	TPM	SMM
Locus		He	Heq	Heq	Heq	He	Heq	Heq	Heq
Grupo genético 3	FCA24	0.658	0.618	0.667	0.675	0.658	0.607	0.648	0.681
	FCA26	0.608	0.487	0.540	0.555	0.608	0.480	0.511	0.558
	FCA43	0.325	0.294	0.326	0.336	0.325	0.295	0.310	0.329
	FCA77	0.492	0.483	0.536	0.550	0.492	0.479	0.519	0.556
	FCA82	0.802	0.728	0.766	0.770	0.802	0.728	0.757	0.774
	FCA90	0.667	0.478	0.540	0.549	0.667	0.490	0.524	0.554
	FCA115	0.813	0.726	0.767	0.776	0.813	0.727	0.752	0.774
	FCA126	0.533	0.298	0.326	0.340	0.533	0.294	0.307	0.330
	FCA176	0.692	0.481	0.538	0.552	0.692	0.481	0.517	0.554
	FCA547	0.525	0.615	0.669	0.680	0.525	0.614	0.648	0.681
	FCA566	0.846	0.797	0.823	0.828	0.846	0.798	0.815	0.829
	Wilcoxon (prueba de una cola para comprobar exceso de heterocigosidad)		$P = 0$	$P = 0.08$	$P = 0.12$		$P = 0$	$P = 0.03$	$P = 0.13$

Además, los valores del coeficiente de consanguinidad fueron de bajos a moderados: en la población total (Fis; -0,12 a 0,21), en el grupo genético 1 (Fis; -0,12 a 0,14), moderados en el grupo genético 2 (Fis, desde -0,13 a 0,35) y en el grupo genético 3 (Fis; -0,49 a 0,25; Cuadro 10).

**Cuadro 10. Coeficientes de endogamia de Weir & Cockerham (W&C) y de Hardy-Weinberg estimados para cada grupo genético y en total. Los valores en negritas fueron significativos en deficiencia de heterocigosidad ( $P \leq 0.01$ ) con la corrección de FDR.**

Locus	Grupo genético		Grupo genético 1		Grupo genético 2		Grupo genético 3	
	Fis W&C	<i>P</i>	Fis W&C	<i>P</i>	Fis W&C	<i>P</i>	Fis W&C	<i>P</i>
<b>FCA24</b>	0.11	0.27	0.09	0.33	-0.06	0.66	0.25	0.08
<b>FCA26</b>	-0.12	0.98	-0.07	0.88	-0.13	0.89	-0.48	1
<b>FCA43</b>	0.08	0.14	0.04	0.38	0.15	0.13	-0.17	1
<b>FCA77</b>	0.13	0.05	-0.09	0.85	0.19	0.14	-0.30	1
<b>FCA82</b>	0.08	<b>0</b>	-0.12	0.07	-0.05	1	-0.07	0.54
<b>FCA90</b>	0.09	0.1	-0.03	0.50	0.11	0.34	0.07	0.48
<b>FCA115</b>	0.14	<b>0</b>	0.09	0.09	0.30	0.01	-0.25	1
<b>FCA126</b>	0.12	0.32	-0.02	0.62	0.26	0.16	0.07	0.7
<b>FCA176</b>	0.10	0.10	0.06	0.35	0.23	0.08	-0.49	1
<b>FCA547</b>	0.21	<b>0</b>	0.05	0.06	0.35	<b>0</b>	-0.21	1
<b>FCA566</b>	0.20	<b>0</b>	0.14	0.17	0.31	<b>0</b>	-0.01	0.27
<b>Promedio</b>	0.10		0.01		0.15		-0.14	

Respecto al análisis de parentesco, se obtuvo que en su mayoría los individuos no están cercanamente emparentados = 83.38 %, hubo un porcentaje bajo de medios hermanos = 11.82%, y unos porcentajes aún más bajos de hermanos completos = 2.60% y padres/crías = 2.21% en toda la población de cautiverio. Al analizar cada grupo genético por separado, se obtuvo que en el 1 la mayoría de los individuos probablemente no están relacionados = 84.98%, el porcentaje de medios hermanos fue de 10.59%, de padres/crías de 2.71% y de hermanos completos fue de 1.72%. En el grupo 2 la mayoría de los individuos no estaban emparentados (80.70%) el porcentaje de medios hermanos fue bajo, de 11.11% y más bajo para hermanos completos y padres/crías = 4.09%. Finalmente, en el grupo genético 3 la mayoría de los individuos no estuvieron emparentados (67.86%), pero no fue tan alto como el de los otros dos grupos. De medios hermanos fue de 14.29%, hermanos completos 10.71% y de padres/crías fue de 7.14%, por lo que en este grupo genético fue donde se encuentra la

mayor probabilidad de encontrar algún grado de parentescos entre los 8 individuos que la conforman.

El análisis de parentesco basado en el estimador de la máxima verosimilitud (ML), de acuerdo a la cantidad de alelos compartidos, reveló que en el grupo genético 1 se detectaron 8 hermanos completos (FS), 44 medios hermanos (HS) y 9 padres/crías (PO); también se evaluaron las diferencias logarítmicas entre las probabilidades dadas (LnL) para las otras categorías de parentescos (Cuadro 11). Hubo diferencias significativas entre las comparaciones de hermanos completos y padres/crías, sin embargo, en la categoría de medios hermanos no hubo diferencias al compararlos con los no emparentados ( $P= 0.9$ ) y hermanos completos con medios hermanos ( $P= 0.2$ ). En el grupo genético 2 se estimaron 7 hermanos completos, 22 medios hermanos y 7 padres/crías; hubo diferencias significativas entre todas las categorías de parentesco, excepto al comparar hermanos completos con padres/crías ( $P= 0.07$ ). En el grupo genético 3 se detectaron 6 hermanos completos, 17 medios hermanos y 5 padres/crías; en este grupo todas las comparaciones con otras categorías de relaciones tuvieron diferencias significativas ( $P>0.01$ ).

**Cuadro 11. Relaciones de parentesco asignadas con la máxima probabilidad, de acuerdo a los datos genéticos a nivel de significancia de 0.05.**

Grupo genético 1						
Número de parejas	R <sup>I</sup>	LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
8	FS	-51.82-(-46.44)	-54.49-(-48.31)	-52.88-47.11	-	-10050.82-(-10045.44)
			<b>0.032*</b>	<b>0.03*</b>		<b>0.003*</b>
44	HS	-57.98-(-49.96)	-58.2-(-50.77)	-	-61.8-(-51.36)	-10056.98-(-10048.96)
			<b>0.9</b>		<b>0.2</b>	<b>0.0001*</b>
9	PO	-14.08-(-15.9)	-15.13-(-16.28)	-14.54-(-15.98)	-14.73-(-16.38)	-
			<b>0.005*</b>	<b>0.008*</b>	<b>0.001*</b>	
Grupo genético 2						
	R <sup>I</sup>	LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
7	FS	-26.15-(-23.48)	-27.09-(-28.42)	-26.85-(-25.53)	-	-10025.15-(-23.51)
			<b>0.017*</b>	<b>0.027*</b>		<b>0.078*</b>
22	HS	-39.31-(-41.37)	-39.65-(-41.73)	-	-40.65-(-43.56)	-10038.31-(-10040.37)
			<b>0.0001*</b>		<b>0.0001*</b>	<b>0.0001*</b>
7	PO	-39.95-(-41.61)	-40.5-(-43.26)	-40.03-(-41.65)	-42.25-(-41.95)	-
			<b>0.002*</b>	<b>0.014*</b>	<b>0.007*</b>	
Grupo genético 3						
	R <sup>I</sup>	LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
6	FS	-72.18-(-69.44)	-96.77-(-76.96)	-80.52-(-69.5)	-	-75.47-(-10068.44)

			<b>0.001*</b>	<b>0.007*</b>		<b>0.0001*</b>
17	HS	-84.21-(-57.14)	-92.41-(-60.95)	-	-87.3-(-57.51)	-10083.21-(-10056.14)
			<b>0.0001*</b>		<b>0.0001*</b>	<b>0.0001*</b>
5	PO	-78.15-(-52.94)	-98.24-(-68)	-82.55-(-55.87)	-80.48-(-56.32)	-
			<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.019*</b>	

R = parentesco, LnL = Ln de la verosimilitud, U = no emparentados, HS = medios hermanos, FS = hermanos completos, PO = padre/cría.

<sup>1</sup> Probable relación asignada por el método de máxima verosimilitud en ML Relate (Kalinowski et al. 2006).

\* Diferencia significativa.

En el Anexo II se adjuntó una propuesta para realizar los lineamientos basales de un programa de reproducción para los jaguares analizados en este estudio, con base en los resultados obtenidos, de manera que se evite el cruzamiento entre individuos emparentados, es decir, en cada pareja asignada no se detectó ningún parentesco ( $P > 90\%$ ).

## V. DISCUSIÓN

### **Estructura y variabilidad genética**

Debido a que los jaguares que provienen de los zoológicos no forman una población natural, se consideró analizar de manera conjunta a todos los individuos (como una sola población), y a los tres grupos genéticos que fueron asignados en Structure. Se utilizó la base de datos de jaguares de vida libre como referencia para que los de cautiverio fueran agrupados por probabilidad con las similitudes que se generaran en las simulaciones del programa. Como se obtuvieron tres grupos genéticos basados en el  $\Delta K$  por STRUCTURE (Figura 4), debido a que este software infiere la formación de poblaciones distinta y asigna individuos a las poblaciones bajo un modelo con admixia). En el grupo genético 1 (rojo) se asignaron 29 individuos, en el grupo genético 2 (verde) se asignaron 19 individuos y en el grupo genético 3 (azul) ocho individuos. Es probable que en algunos zoológicos se ha reproducido accidentalmente jaguares con origen geográfico conocido y los de origen geográfico desconocido formando individuos que contienen parcialmente genotipos de uno, dos o incluso los tres grupos genéticos (Luo *et al.*, 2008). Con este resultado no se puede establecer que en cada grupo genético haya de manera absoluta individuos con genotipo mexicano o sudamericano, sin embargo, se pueden tener elementos para que en los programas de cruzamiento se consideren a los individuos con una alta probabilidad de pertenecer a alguno de los tres “clusters” para favorecer la presencia de los genotipos que se hayan visto con mayor frecuencia en jaguares mexicanos de vida libre. Para complementar estos resultados el pedigrí o el registro de cada zoológico podría corroborar la validez de estas asignaciones (Witzenberger y Hochkirch 2011).

Además, fueron utilizados los genotipos de vida libre en el programa Génétix para ver la estructura espacial de los individuos en el análisis factorial de correspondencias, debido a que al hacer las simulaciones solo con los genotipos de los cautivos no se aprecia la inercia de la nube de datos que se detecta con mayor claridad en el análisis conjunto de ambas condiciones (Figuras 9 y 10). De acuerdo a los resultados del factorial cautivos + vida libre, los individuos de cautiverio mantienen mayor cercanía hacia los genotipos de jaguares mexicanos (Figura 9), esto concuerda con lo esperado, es decir, se tenía la suposición de que prevalecen animales que provienen de ejemplares decomisados, donados de vida libre de origen mexicano o son descendientes de ellos, de acuerdo a lo que han reportado los veterinarios encargados de los zoológicos que fueron incluidos en el muestreo.

En todos los zoológicos se ha reportado que el jaguar se reproduce de manera exitosa, en algunos casos se sabe sobre su origen hasta dos o tres generaciones hacia atrás y de manera intuitiva han tratado de evitar reproducir animales que tengan algún grado de parentesco conocido, esto probablemente ha ayudado a que el nivel de heterocigosidad se esté manteniendo en un nivel moderado a alto. Además, en el AFC de la Figura 9, se puede observar que los jaguares mexicanos presentan una menor diversidad, si bien el tamaño de la muestra es menor, no debería ser sorprendente puesto que la extensión de hábitat disponible para jaguares en Brasil y su estado de conservación es mucho mayor que el que existe para la península de Yucatán. Sería recomendable genotipar individuos de vida libre a lo largo del territorio mexicano para evaluar la estructura y estatus genéticos en distintas condiciones ambientales.

En el AMOVA (Cuadro 7) se observó que la mayor proporción de la variación genética residía en los individuos (76 %,  $p = 0.001$ ), seguido por la variación entre

individuos (16 %,  $p = 0.001$ ) y por último al comparar entre grupo genéticos (8 %,  $p = 0.001$ ). De acuerdo a estos resultados, se puede vislumbrar que hubo una diferenciación genética moderada entre los tres grupos formados, con base en la variación de las frecuencias alélicas analizadas; puede ser que esto se atribuya a que los individuos fundadores han sido muy diferentes entre sí (presumiblemente de poblaciones diferenciadas), a su vez, esta diferencia es, probablemente, un resultado de la diversa procedencia geográfica de los jaguares y los efectos de diferentes reproducciones selectivas. Además estos resultados de la variación dentro de los individuos (76%) son concordantes con el árbol NJ: los grupos genéticos 1 y 2 fueron más similares y más lejanos con el grupo 3 (Figuras 11 y 12). Esta asignación probablemente se haya originado en parte por la crianza selectiva, por ejemplo, la reproducción de jaguares melánicos con jaguares de origen mexicano, siendo que en México no hay evidencia de jaguares negros en vida silvestre (Meyer 1994; Cartín-Núñez y Carrillo 2009; Eizirik et al., 2003). Tanto el análisis  $F_{st}$  y AMOVA mostró diferenciación genética significativa entre los grupos, aunque el valor  $F_{st}$  entre el grupo genético 1 y 2 fue muy bajo, tuvo valor significativo (0.051). Los valores de las distancias de Nei también fueron significativos al considerar los tres grupos con un grado de diferenciación.

A pesar de las limitaciones en el espacio y el número de los individuos, en esta investigación hemos encontrado niveles de moderados a altos de heterocigosidad (desde 0.53 hasta 0.72; Cuadro 6). Debido a que esta población cautiva está formada por individuos de diversas procedencias, el nivel de heterocigosidad podría deberse a la reproducción entre algunos individuos que provienen de poblaciones muy diferenciadas, es decir, que tiene indicios de estructuración genética (Luo *et al.* 2008). En algunos zoológicos los veterinarios han comentado que tienen la sospecha de que los jaguares

que procedían de decomisos son de origen sudamericano, debido a que su morfología es diferente a la del mexicano: tienen mayor tamaño por la disponibilidad y el tipo de presas que consumen en las selvas de Sudamérica (Nowell y Jackson, 1996) y como en el caso de los melánicos, este tamaño más grande y robusto les confiere más atractivo para los visitantes de los parques zoológicos. Es probable entonces que en los jaguares cautivos de los zoológicos mexicanos se tengan heterocigosidades derivadas de poblaciones de jaguares brasileños, las cuales se ha reportado que son altas en distintas zonas, con valores que van del 0.6 al 0.8 (Haag *et al.*, 2010; Roques *et al.*, 2015) y son los que mantienen niveles de conservación más elevados, tanto de calidad del hábitat como del estatus de sus poblaciones (Eizirik *et al.*, 2008). Casi la totalidad de investigaciones sobre la diversidad genética de jaguar se ha enfocado en los de vida libre, Haag *et al.* (2010) reportaron que ha disminuido la heterocigosidad promedio ( $H_o = 0.73$ ) en poblaciones de jaguar que habitan la zona del Pantanal, esta pérdida de riqueza alélica se está dando por la reducción y aislamiento de las poblaciones. Por esta fragmentación, cada vez se dificulta más la migración y flujo génico entre parches de hábitat, lo cual a su vez favorece los efectos de la deriva génica. Por otra parte, en Colombia se reportó un nivel de heterocigosidad alto ( $H = 0.84$ ) en una población de jaguares (Ruiz-García *et al.*, 2006), los autores explicaron que puede deberse a que todavía existe una buena calidad del hábitat sumado al efecto transitorio de una ligera subdivisión de la población (Boecklen, 1986; Swindell y Bouzat, 2006).

En otros grandes felinos se ha reportado pérdida de diversidad, como en el guepardo (*Acinonyx jubatus*), que en algunas poblaciones mantiene una heterocigosidad que no supera 0.3 en siete regiones geográficas de Namibia, la tendencia es que continúe esta disminución por ser una especie monomórfica, por haber sufrido varios

cuellos de botella genéticos sucesivamente y en conjunto con eventos de endogamia (Marker *et al.*, 2008; Frankham, 2015). También en el Occidente y Centro de África las poblaciones de leones (*Panthera leo*) han mostrado niveles bajos de diversidad genética mediante análisis de secuencias de citocromo b y de la región control (Bertola *et al.*, 2011). En unas subespecies de tigre (*P. tigris*) la heterocigosidad media observada varió de  $H_o$  mínima = 0.40 (*P. t. Altaica*) a  $H_o$  máxima = 0.66 (*P. t. Corbetti*), en el análisis se consideraron seis subespecies (Luo *et al.* . 2004).

### **Tamaño efectivo poblacional, cuellos de botella genéticos y parentesco**

En estudios realizados en vida silvestre, se han reportado tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) de alrededor de 1000 individuos en la zona del Pantanal Brasileño, de 4.6 a 514 en otras zonas de Brasil con una fragmentación de hábitat muy alta. En México y otros países americanos no se han realizado estudios en vida libre en los que se mida este parámetro en poblaciones de jaguar. El tamaño efectivo poblacional de los 56 jaguares analizados fue de 17, lo cual es de poner atención puesto que se trata de animales que están en condiciones controladas y daría evidencia de que no se está siguiendo un programa de reproducción donde al menos estén contemplando incluir la mayor cantidad de individuos. Se observó que en dos zoológicos existe la reproducción más frecuente de tres ejemplares melánicos (datos no mostrados), lo cual se hizo evidente en el resultado del análisis de parentesco, que se discutirá más adelante.

### **Cuello de botella**

Los grandes felinos pasaron por un cuello de botella genético que data de finales del Pleistoceno hace unos 10000 años, en particular el jaguar tuvo posteriormente un evento de expansión demográfica en América (Menotti-Raymond y O'Brien 1993; Eizirik *et al.*, 2001). Al parecer todos los felinos han tenido disminución en su diversidad genética

(O'Brien *et al.*, 1987; 1994; Eizirik *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2013), por ejemplo, se encontró que el tigre de Amur (*P. t. altaica*) en la década de 1940 a 1950 sufrió una disminución en su diversidad haplotípica al comparar una población de vida libre con unos ejemplares cautivos, en estos últimos se conservaba mayor número de haplotipos, incluso algunos que ya se habían perdido en vida libre, presumiblemente porque fueron capturados antes de que el cuello de botella eliminara esos haplotipos poco frecuentes en la población, de ahí la importancia de que los programas de manejo en cautiverio tengan una gestión totalmente apoyada en datos genéticos, ya que el objetivo principal debería ser mantener la variación genética (Russello *et al.*, 2004). El leopardo de Amur (*P. p. orientalis*) tuvo una reducción muy crítica de su población, quedando solo 25-40 individuos en el Oriente Ruso, los niveles de heterocigosidad que ahora tienen son tan bajos como los de la pantera de Florida ( $H_o < 0.34$ ), lo cual lo convierte en una de las subespecies de felino más amenazadas en el mundo (Uphyrkina *et al.*, 2002; Hedrick y Fredrickson, 2010). En este estudio también se observaron indicios de un cuello de botella genético, de acuerdo a los resultados del análisis basado en la detección de exceso de heterocigosidad bajo los modelos de IAM y TPM (Cuadro 9), presumiblemente como resultado del cuello de botella ancestral y por un tamaño efectivo poblacional pequeño respecto al total de individuos que hay en cautiverio (Cuadro 8). Esto nos hace suponer que el número de jaguares que se están reproduciendo es bajo y podría ser mayor si se planteara el objetivo de ampliar el  $N_e$ , siendo que hay más animales disponibles para reproducción.

Particularmente, en las poblaciones de jaguar en cautiverio no hay una actualización sistematizada del censo, los datos más recientes son de 2003 y están publicados en el taller “El papel de los Zoológicos de Mesoamérica y el Caribe en la Conservación de los Jaguares” desarrollado por el Grupo de Especialistas en

Conservación y Reproducción (CBSG). En el apartado correspondiente a México se estimaron 135 jaguares (62 machos, 67 hembras y 7 que no se conocía su sexo), esta información debería actualizarse constantemente mediante una institución que funja como directriz del programa que vigile la reproducción controlada de los jaguares.

### **Parentesco**

No todo el personal de los zoológicos está capacitado para seguir algún criterio para reproducción con fines de mantenimiento de la variación genética, como emparejar individuos no relacionados, asimismo, para corroborar y realizar de manera eficaz los protocolos de reproducción se debería contar con el pedigrí a nivel nacional, para evitar aparear jaguares con cierto grado de consanguinidad, cuyos efectos negativos ya han sido mencionados (Witzenberger y Hochkirch, 2011).

Aunque tuvimos un número moderado de loci, el análisis de parentesco fue en su mayoría concordante con los demás resultados. El grupo genético 1 mostró el mayor número de posibles relaciones (Total = 61), de los cuales 2 eran conocidas (1 de padre/cría y 1 de hermanos completos), lo cual correspondería a que tuvo el mayor número de individuos que la conforman, lo que aumentaría la posibilidad de encontrar posibles parentescos. En el grupo 3 se encontró sólo una relación de padre/cría, sin embargo, esos dos jaguares melánicos fueron asignados correctamente en ML Relate, puesto que se trató de uno de los parentescos confirmados por el personal del zoológico. La relación con las mayores posibilidades en los tres grupos fue medios hermanos HS (Cuadro 11), que tiene ambigüedad, debido al desafío para el cálculo y asignación de individuos que comparten sólo el 25% del material genético, y en realidad puede clasificarse en otras categorías, tales como primos, tíos/sobrinos, abuelos/nietos. Existe una cuarta relación -confirmada por personal del zoológico- de padre/cría, cuyo resultado no fue tan evidente como en las otras relaciones, en este particular existe la

posibilidad de que los padres y los hijos fueran asignados en diferentes grupos, la causa más probable que consideramos más plausible se debe a que estos padres tienen diferentes orígenes, por lo cual hayan sido asignados a un grupo genético diferente, mientras que la descendencia se asigna a la proporción heredada de cada parental. En general, es probable que nuestros resultados hayan mostrado un nivel de ligero a moderado de parentesco entre los individuos; lo que sugiere que las camadas se han distribuido en los zoológicos que han mantenido un intercambio limitado. Por lo tanto, hacemos hincapié en la necesidad de un análisis de parentesco robusto, basado en información genética y donde se utilice preferentemente un alto número de marcadores moleculares para mejorar la precisión de las estimaciones.

Recientemente Willoughby *et al.* (2015) obtuvieron evidencias a favor de la reproducción basada en el *mean kinship* (MK), que consiste en la medición del grado de parentesco de una población, cada individuo cuenta con un índice MK que después se puede cotejar en unas tablas de contingencia con las propuestas para apareamiento, si se quiere verificar el MK resultante de una pareja de posibles progenitores y da un valor alto, entonces se busca otra pareja con la que se produzca el valor MK más bajo. Para conservar la diversidad genética y retardar los efectos de la endogamia se ha sugerido que se formen parejas lo más lejanamente emparentadas para que produzcan valores MK lo más bajo posibles. Si se implementa el protocolo de reproducción adecuado, como el MK, podría ser una opción para mantener la variabilidad genética actual dentro de la población de jaguares cautivos y permitiendo que más individuos contribuyan al pool genético, es decir, que el  $N_e$  sea más alto.

## VI. Conclusiones y recomendaciones

El manejo de poblaciones en cautiverio se ha convertido en una herramienta importante en la conservación animal, sobre todo en las especies en peligro de extinción, ya que pueden ser consideradas como un recurso valioso para los programas de conservación *ex situ*. No obstante, la falta de un programa de reproducción bien ejecutado que esté basado en datos genéticos y orientados al propósito de mantener la diversidad genética, es probable que repercuta en que la población cautiva eventualmente se enfrente a los efectos de la endogamia y la deriva génica.

Aunque en los resultados obtenidos se asignó la mayoría de los individuos a grupos genéticos donde prevalecieron genotipos mexicanos, existe también un conjunto de individuos que son el producto de cruzamiento con jaguares de orígenes muy distintos. Por estos resultados y de acuerdo con lo que se ha reportado en estudios similares, recomendamos acompañar los programas de reproducción en cautiverio con un registro genealógico, pedigrí o studbook para evitar la consanguinidad y mantener la diversidad genética, tal como lo llevan a cabo en los programas de reproducción que emplean el *mean kinship*, el cual se basa en emparejar individuos con el grado de parentesco más bajo. Si una parte de los objetivos de los programas de conservación de jaguares cautivos en México es el de mantener la variación genética de esta especie, entonces se deben realizar distintas estrategias para mantener la diversidad genética de los jaguares con genotipo mexicano lo más conservado posible y paralelamente mantener la variación genética de los que han resultado de la reproducción con jaguares de orígenes distintos.

Las universidades mexicanas y otras instituciones de investigación pueden servir como centros de apoyo para realizar la caracterización genética de los individuos. Con los genotipos se puede construir una base de datos que puede ser empleada en diversos programas de cómputo para hacer las simulaciones de diversos escenarios mediante el uso de modelos pertinentes.

Este proceso se debería realizar bajo la responsabilidad y supervisión de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de México (AZCARM), para garantizar que todas las UMAS tengan acceso a la información, además de que ésta debe estar constantemente actualizada y estar disponible para que la gente pueda acceder y siga las recomendaciones de reproducciones de jaguar. Si hay un plan de manejo adecuado, los jaguares en cautiverio podrán mantenerse viables, de lo contrario se corre el riesgo de que eventos estocásticos, ambientales y demográficos los hagan perder variación genética y sean menos aptos para subsistir a largo plazo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Allendorf W, Luikart G. (2007). Conservation and the genetics of populations. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Bhagavatula J, y Singh L. (2006). Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: a pilot study. BMC genetics 7(1):48.

Bauer H, y Van Der Merwe S. (2004). Inventory of free-ranging lions *Panthera leo* in Africa. Oryx 38(01):26-31.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N y Bonhomme F. (2005) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Roy Stat Soc B Met 57(1):289-300.

Bertola LD, Van Hooft WF, Vrieling K, Uit de Weerd DR, York DS, Bauer H, Prins HHT, Funston PJ, Udo de Haes HA, Leirs H, van Haeringen WA, Sogbohossou E, Tumenta PN, De Iongh HH (2011) Genetic diversity, evolutionary history and implications for conservation of the lion (*Panthera leo*) in West and Central Africa. Journal of Biogeogr 38(7):1356-1367. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02500.x

Boecklen WJ (1986) Optimal design of nature reserves: consequences of genetic drift. Biol Conserv 38(4), 323-338. doi: 10.1016/0006-3207(86)90058-3

Campos Fernández-Fígares MM (2002) El caballo y el jaguar: sobre la historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Comares Editores, España.

Cartín-Núñez M, Carrillo E (2009) New record of black jaguar, *Panthera onca* (Carnivora: Felidae) in Costa Rica. *Brenesia* 71-72:67-68.

Caso A, Lopez-Gonzalez C, Payan E, Eizirik E, de Oliveira T, Leite-Pitman R, Kelly M, Valderrama C (2008) *Panthera onca*-The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 29 April 2015.

Ceballos G, Chávez C, Zarza H (2011): El Jaguar en México. Alianza WWF/Telcel CONANP, UNAM. Servicios Ecológicos y Científicos. México, Distrito Federal.

Ceballos G, Chávez C, List R, Zarza H, Medellín RA (2011) Jaguar Conservation and Management in Mexico: Case studies and perspectives, Alianza WWF/Telcel CONANP, UNAM. Servicios Ecológicos y Científicos. México, Distrito Federal.

CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Appendix I. 2015.

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4):2001-2014.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evo* 24(3):621-631. doi: 10.1093/molbev/msl191

Charlesworth D, Willis JH (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genetics* 10:783-796. doi: 10.1038/nrg2664

Chávez C, Zarza H (2009) Distribución potencial del hábitat del jaguar y áreas de conflicto humano-jaguar en la península de Yucatán. *Rev Mex Mastozool* 13:46-62.

Dalén L, Götherström A, y Angerbjörn A (2004) Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics* 5(1):109-111.

Dyer RJ (2009) Genetic studio: a suit of programs from spatial analysis of genetic-marker data. *Mol Ecol Resour* 9:110-113

Dutta T, Sharma S, Maldonado JE, Wood TC, Panwar HS, Seidensticker J (2013) Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India. *Divers Distrib* 19(7):760-771. doi: 10.1111/ddi.12024

Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Eguiarte L. (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología.

Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE, Crawshaw Jr PG, Vié JC, Brousset DM, O'Brien SJ, Salzano FM (1998) Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution* 47(5):613-624.

Eizirik E, Heup KJ, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ, Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Mol Ecol* 10:65-79. doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.01144.x

Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O'Brien SJ (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13:448-453. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00128-3

Eizirik E, Haag T, Santos AS, Salzano FM, Silveira L, Azevedo FCC Furtado MM (2008) Jaguar Conservation Genetics. CAT News 4:31-34.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of grupo genéticos of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Excoffier L, Lischer HEL (2010) ARLEQUIN suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10:564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

Falush D, Stephens M, Pritchard J (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164(4):1567-1587.

Farrell LE, Roman J, y Sunquist, ME (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. Molecular Ecology 9(10):1583-1590.

Frankham R (1995) Conservation Genetics. Annu Rev Genet 29:305-27. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.001513

Frankham R (2015) Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. Mol Ecol. Early view. Doi: 10.1111/mec.13139

Garrote G, De Ayala RP, Pereira P, Robles F, Guzman N, García FJ, y Barroso JL (2011) Estimation of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) population in the Doñana area, SW Spain, using capture–recapture analysis of camera-trapping data. European Journal of Wildlife Research 57(2):355-362.

Gialluisi A, Pippucci T, Anikster Y, Ozbek U, Medlej-Hashim M, Mégarbané A, Romeo G (2012) Estimating the allele frequency of autosomal recessive disorders through mutational records and consanguinity: the homozygosity index (HI). *Annals of human genetics* 76(2):159-167.

Godoy JA (2009) La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Revista Ecosistemas*:18(1).

Grisolia AB, Moreno F, Campagnari VR, Milazzotto MP, Garcia JF, Adania CH, Y Souza EB (2007) Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. *Genetics and Molecular Research*:382-389.

Haag T, Santos AS, Sana DA, Morato RG, Cullen L Jr, Crawshaw PG, De Angelo C, Di Bitetti MS, Salzano FM, Eizirik E (2010) The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Mol Ecol* 19:4906-4921. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04856.x

Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics* 31:139-162.

Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends Ecol Evol* 16:629-636. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02282-0

Hedrick PW, Fredrickson R (2010) Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conserv Genet* 11:615-626. doi: 10.1007/s10592-009-9999-5

Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet Res*, 38(03):209-216. doi: 10.1017/S0016672300020553

Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resources* 9(5):1322-1332. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x

Jiménez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266(5183):271-273. Doi: 10.1126/science.7939661

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6(2):576-579. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

Karp G (1998) *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana. México. 746 pp.

Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* 17(5): 230-241. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02489-8

Kelly MJ, y Durant SM (2000) Viability of the Serengeti cheetah population. *Conserv Biol* 14(3):786-797.

Kitchener AC (1997) The role of museums and zoos in conservation biology. *Int Zoo Yb* 35:325-336. doi: 10.1111/j.1748-1090.1997.tb01228.x

Lacy RC (1995) Clarification of genetic terms and their use in the management of captive populations. *Zoo Biology*, 14(6):565-577.

Laikre L (1999) Hereditary defects and conservation genetic management of captive populations. *Zoo Biol* 18:81-99. doi: 10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:2<81::AID-ZOO1>3.0.CO;2-2

Langella O (2002) Populations 1.2.30 Copyright (C) 1999 Olivier Langella CNRS-UPR9034. Available at <http://bioinformaticsorg/tryphon/populations/>

Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46(2):477-494.

Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, van der Walt J, Martenson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB, Tilson R, Brady G, Martelli P, Subramaniam V, McDougal C, Hean S, Huang SQ, Pan W, Karanth UK, Sunquist M, Smith JLD, O'Brien SJ (2004) Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biology* 2(12):2275-2293. doi: 10.1371/journal.pbio.0020442

Luo SJ, Johnson WE, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, Traylor-Holzer K, Smith JLD, O'Brien SJ (2008) Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase conservation value of captive populations. *Current Biology* 18(8):592-596. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.053

Marker LL, Wilkerson AJP, Sarno RJ, Martenson J, Breitenmoser-Würsten C, O'Brien SJ, Johnson WE (2008) Molecular genetic insights on cheetah (*Acinonyx jubatus*) ecology and conservation in Namibia. *Journal of Heredity* 99(1):2-13. doi: 10.1093/jhered/esm081

Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1993) Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *P Natl Acad Sci USA* 90(8):3172-3176. doi: 10.1073/pnas.90.8.3172

Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schäffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien S J (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57(1):9-23. Doi: 10.1006/geno.1999.5743

Merola M (1994) A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. *Conserv Biol* 8(4):961-971.

Meyer JR (1994) Black jaguars in Belize? A survey of melanism in the jaguar, *Panthera onca*. [http://biological-diversity.info/Black\\_Jaguar.htm](http://biological-diversity.info/Black_Jaguar.htm)

Monroy-Vilchis O, Sánchez Ó, Aguilera-Reyes U, Suárez P, y Urios V (2008) Jaguar (*Panthera onca*) in the State of Mexico. *The Southwestern Naturalist* 53(4):533-537.

Nascimento T, Telles M, Resende L, Silveira L, Jácomo A, Morato R, Diniz-Filho JE, Eizirik E, Brondani R, y Brondani C (2006) Paternity testing and behavioral ecology: A case study of jaguars (*Panthera onca*) in Emas National Park, Central Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 29(4):735-740

Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283-292.

Nowell K, y Jackson P (Eds.) (1996) *Wild cats: status survey and conservation action plan* Gland: IUCN 1-382 pp.

O'Brien SJ, Wildt DE, Bush M, Caro TM, FitzGibbon C, Aggundey I, Leakey RE (1987) East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? *Proc Natl Acad Sci USA* 84(2):508-511.

Núñez R, Miller B, y Lindzey F (2000) Food habits of jaguars and pumas in Jalisco, Mexico. *Journal of Zoology* 252:373-379.

O'Brien SJ (1994) Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu Rev Genet* 28(1):467-489. doi: 10.1146/annurev.ge.28.120194.002343

O'Brien SJ, Johnson WE (2005) Big Cat Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:407-429. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162151

Oli MK, Taylor IR, y Rogers ME (1994) Snow leopard *Panthera uncia* predation of livestock: an assessment of local perceptions in the Annapurna Conservation Area, Nepal. *Biol Conserv* 68(1):63-68.

Patterson BD (2007) On the nature and significance of variability in lions (*Panthera leo*). *Evol Biol* 34(1-2):55-60.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Pérez-Sweeney BM, Valladares-Padua C, Burrell AS, Di Fiore A, Satkoski J, Van Coeverden de Groot PJ, Boag PT, y Melnick D (2005) Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). *Mol Ecol* 5(2):198-201.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502–503.

Polisar J, Maxit I, Scognamillo D, Farrell L, Sunquist ME, Eisenberg JF (2003) Jaguars, pumas, their prey base, and cattle ranching: ecological interpretations of a management problem. *Biol Conserv* 109(2):297–310. doi:10.1016/s0006-3207(02)00157-x

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

Rabinowitz A (1986) Jaguar predation on domestic livestock in Belize. *Wildlife Society Bulletin* 14: 170-174.

Rabinowitz A, y Zeller KA (2010) A range-wide model of landscape connectivity and conservation for the jaguar, *Panthera onca*. *Biological Conservation* 143(4):939-945.

Rambaut A, Drummond A (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed 2013 Apr 25

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP v 12: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.

Rodríguez-Soto C, Monroy-Vilchis O, Maiorano L, Boitani L, Faller JC, Briones MA, Núñez R, Rosas-Rosas O, Ceballos G, Falcucci A (2011) Predicting potential distribution of the jaguar (*Panthera onca*) in Mexico: Identification of priority areas for conservation. *Divers Distrib* 17:350-361. doi: 10.1111/j.1472-4642.2010.00740.x

Roma-Moreno V, Grisolia AB, Campagnari F, Milazzotto M, Adania CH, Garcia JF, Souza EBD (2006) Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genet Mol Biol* 29(2):290-293. doi: 10.1590/S1415-47572006000200017

Roques S, Adrados B, Chavez C, Keller C, Magnusson WE, Palomares F, y Godoy JA (2011) Identification of Neotropical felid faeces using RCP-PCR. *Molecular Ecology Resources* 11(1):171-175.

Roques S, Furtado M, Jácomo AT, Silveira L, Sollmann R, Tôrres NM, Godoy JA, Palomares F. (2014) Monitoring jaguar populations *Panthera onca* with non-invasive genetics: a pilot study in Brazilian ecosystems. *Oryx* 48(03):361-369. doi: 10.1017/S0030605312001640

Roques, S., Sollman, R., Jácomo, A., Tôrres, N., Silveira, L., Chávez, C., Keller, C., Mello do Prado, D., Carignano Torres, P., Jorge dos Santos, C., Bernardes Garcia da Luz, X., Magnusson, W. E., Godoy, J. A., Ceballos, G., and Palomares, F. Effects of habitat deterioration on the population genetics and conservation of the jaguar. *Conservation Genetics*, 1-15.

Rosas-Rosas O, Bender LC, y Valdez R (2008) Jaguar and puma predation on cattle calves in Northeastern Sonora, Mexico. *Rangeland Ecology and Management* 61:554-560.

Ruiz-García M, Payán E, Murillo A, Álvarez D (2006) DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes Genet Syst* 81:115-127. doi: 10.1266/ggs.81.115

Ruiz-García M (2013) Jaguar, genes y conservación: La historia poblacional del gran felido americano revelada por el ADN. *Investigación y ciencia* 441:24-31.

Ruiz-López MJ, Ganan N, Godoy JA, Del Olmo A, Garde J, Espeso G, y Gomendio M (2012) Heterozygosity-Fitness Correlations and Inbreeding Depression in Two Critically Endangered Mammals. *Conservation Biology* 26(6):1121-1129.

Russello MA, Gladyshev E, Miquelle D, Caccone A (2004) Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian far east. *Conserv Genet* 5(5):707-713. doi: 10.1007/s10592-004-1860-2

Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, y Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392(6675):491-494.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 2001.

Sanderson EW, Redford KH, Chetkiewicz CLB, Medellín RA, Rabinowitz A, Robinson JG y Taber AB (2002) Planning to save a species: the jaguar as a model. *Conserv Biol* 16:58-72.

SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio en la lista de especies en riesgo. *Diario Oficial* 2002:1-56.

Silver SC, Ostro LET, Marsh LK, Maffei L, Noss AJ, Kelly MJ, Wallace RB, Gómez H, Ayala G (2004) The use of camera traps for estimating jaguar *Panthera onca* abundance and density using capture/recapture analysis. *Oryx* 38(02):148-154. doi: 10.1017/S0030605304000286.

Storey J D (2002) A direct approach to false discovery rates. *J Roy Stat Soc B* 64(3):479-498. doi: 10.1111/1467-9868.00346

Swindell WR, Bouzat JL (2006) Selection and inbreeding depression: effects of inbreeding rate and inbreeding environment. *Evolution* 60(5):1014-1022. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01179.x

Uphyrkina O, Miquelle D, Quigley H, Driscoll C, O'Brien SJ (2002) Conservation genetics of the Far Eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *J Hered* (5):303-311. doi: 10.1093/jhered/93.5.303

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Waples RS (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv Genet* 7:167–184. Doi: 10.1007/s10592-005-9100-y

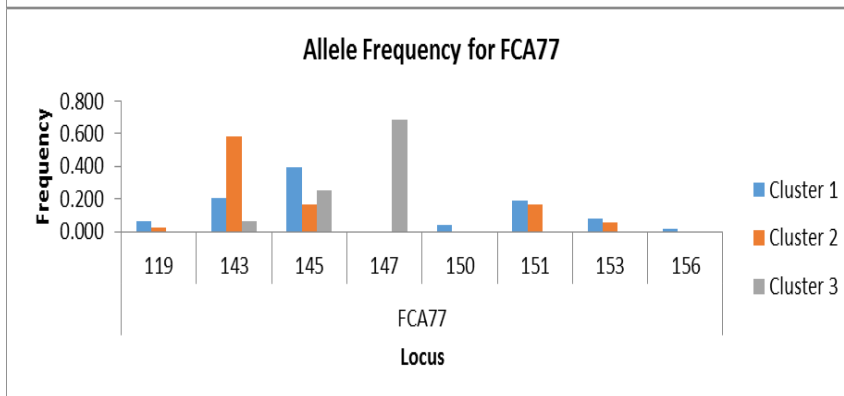
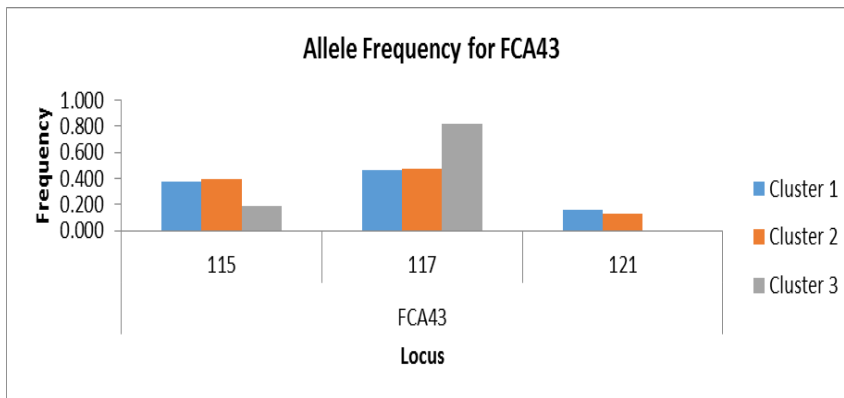
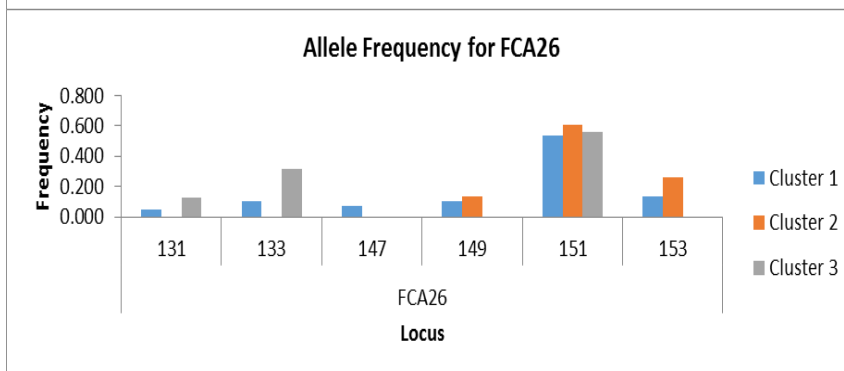
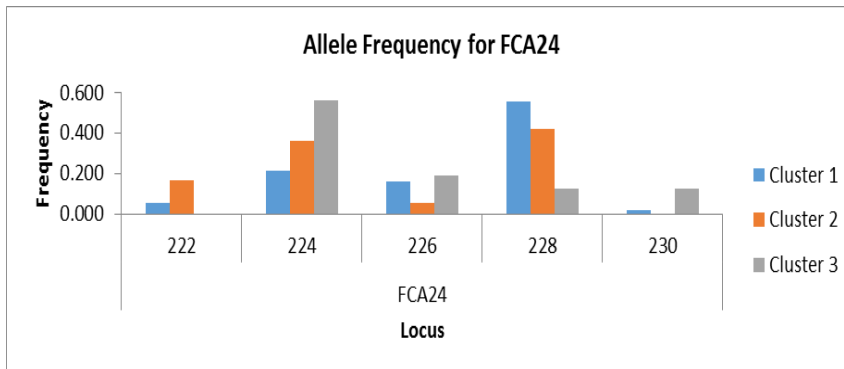
Waples RS, Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8(4):753-756. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x

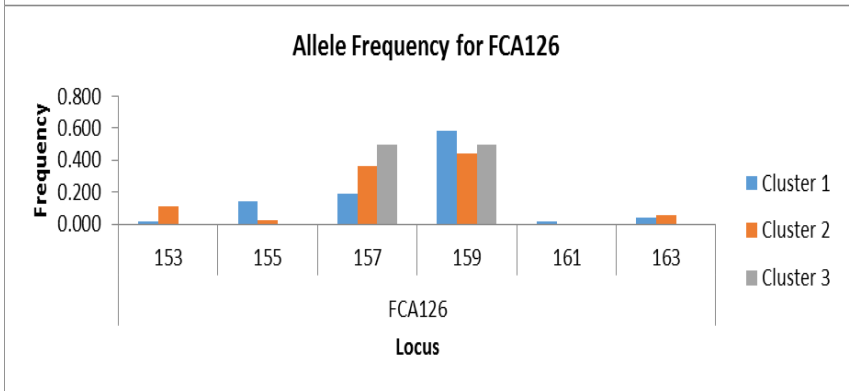
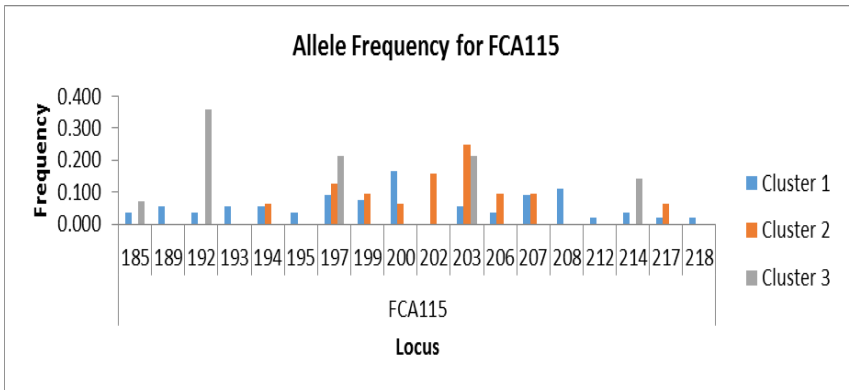
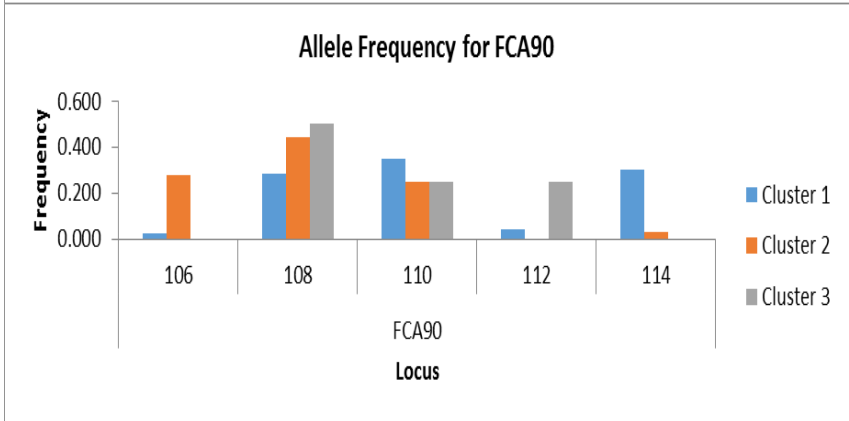
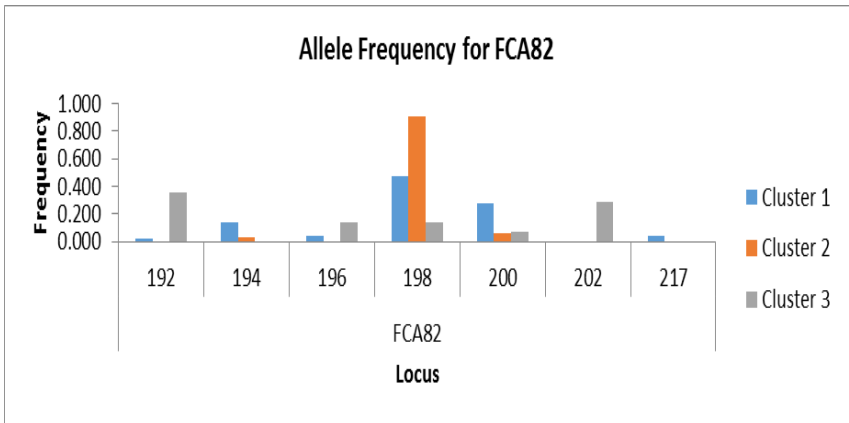
Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, Ivy JA, Lacy RC, DeWoody JA (2015) The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Mol Ecol* 24(1):98-110. doi: 10.1111/mec.13020

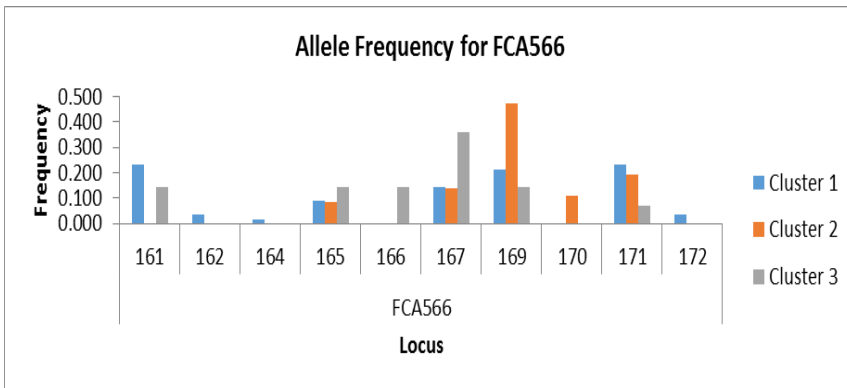
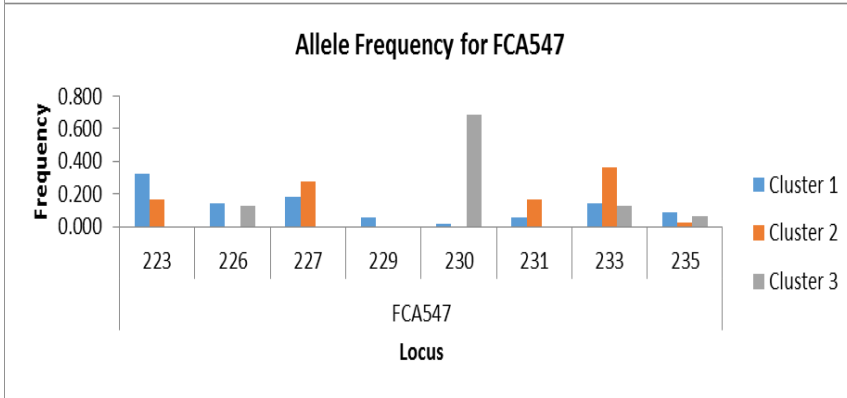
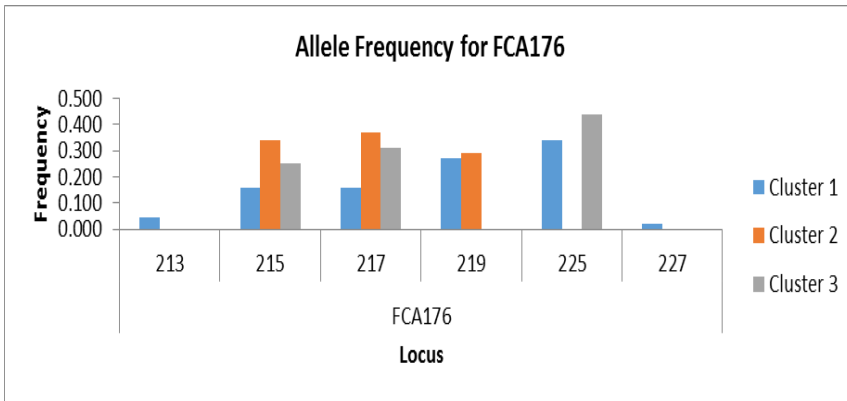
Witzenberger KA, Hochkirch A (2011) Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodivers Conserv* 20(9):1843-1861. doi: 10.1007/s10531-011-0074-4

ANEXO I

Proporciones de frecuencias alélicas por locus







## ANEXO II.

### Propuesta para establecer los lineamientos del programa de cruzamiento de jaguar en cautiverio

De acuerdo a los resultados de las caracterizaciones genéticas de 56 jaguares en cautiverio, se establece esta pequeño mapa de probables cruzamientos para los tres grupos genéticos que fueron detectados con base a los genotipos multilocus en Structure (Chapuis y Estoup, 2007).

En los programas de reproducción que tienen como objetivo mantener la variación genética, se ha observado que el modelo que mejor se ajusta a estas necesidades, es el *mean kinship* (Willoughby *et al.*, 2015). A grandes rasgos, en este protocolo de reproducción se calcula el valor de parentesco (*kinship value*), el cual es un estimador útil para resumir el valor genético de un animal en un programa de crianza (Lacy, 1995). Para obtener el valor kinship se puede usar cualquier estimador de consanguinidad. Podría ser útil también el uso de un índice de homocigosidad, que se puede calcular a partir de las tablas de genotipos de los animales muestreados (Gialluisi *et al.*, 2011).

Para el grupo genético 1, que tiene una probabilidad de 95% de asignación a genotipos de origen mexicano, particularmente de la zona de la península de Yucatán:

Individuo 1	Individuo 2
Hda	1PA
Bagee	Hda
Bculia	Hda
Bic	Cculia
Bic	Epsil
Bic	Fri
Big	Hda
Cculia	Bagee
Cculia	Bculia
Cculia	Big
Delta	Cculia
Epsil	1PA
Epsil	Bagee
Epsil	Bculia
Epsil	Delta
Er	Hda
Er	Cculia
Er	Epsil
Fri	1PA
Fri	Bagee
Fri	Bculia
Fri	Big
Hec	Cculia
Hec	Epsil

Ik	Hda
Ik	Epsil
Ik	Fri
Iv	Hda
Iv	Cculia
Iv	Epsil
Iv	Fri
Kia	Hda
Kia	Epsil
Kia	Fri
Mat	Cculia
Mat	Epsil
Nen	1PA
Nen	Bagee
Nen	Delta
Nen	Er
Nen	Hec
Nen	Iv
Nen	Bic
Nen	Kia
Nen	Mat
OM8	1PA
OM8	Bculia
OM8	Big
OM8	Delta
OM8	Er
OM8	Hec
OM8	Ik
OM8	Iv
OM8	Bic
OM8	Kia
OM8	Mat
OM9	Hda
OM9	Cculia
OM9	Epsil
OM9	Fri
OM9	Nen
Omega	1PA
Omega	Bagee
Omega	Big
Omega	Delta
Omega	Er
Omega	Hec
Omega	Ik
Omega	Iv
Omega	Bic
Omega	Kia
Omega	OM9
Onz	Hda
Onz	Cculia
Onz	Epsil
Onz	Fri
Onz	Nen
Onz	OM8
Onz	Omega
Pak	Hda
Pak	Fri

Pak	Nen
Pak	OM8
Pak	Omega
Say	1PA
Say	Bagee
Say	Bculia
Say	Big
Say	Delta
Say	Er
Say	Hec
Say	Iv
Say	Bic
Say	Kia
Say	OM9
Say	Onz
Say	Pak
Slim	Hda
Slim	Cculia
Slim	Epsil
Slim	Fri
Slim	Nen
Slim	Omega
Slim	Say
Som	Bagee
Som	Bculia
Som	Big
Som	Delta
Som	Er
Som	Hec
Som	Ik
Som	Iv
Som	Bic
Som	Mat
Som	OM9
Som	Pak
Tas	1PA
Tas	Bagee
Tas	Big
Tas	Delta
Tas	Er
Tas	Hec
Tas	Iv
Tas	Bic
Tas	Kia
Tas	Mat
Tas	OM9
Tas	Onz
Tas	Pak
Tas	Slim
Teg	Hda
Teg	Cculia
Teg	Epsil
Teg	Fri
Teg	Nen
Teg	OM8
Teg	Omega
Teg	Say

Teg	Som
Z	Hda
Z	Cculia
Z	Epsil
Z	Fri
Z	Nen
Z	Omega
Z	Say
Z	Som
Z	Tas

Para el grupo genético 2, que tiene una probabilidad de 95% de asignación a genotipos de origen mexicano, particularmente de la zona del sur, sureste (cercanas al Istmo de Tehuantepec):

Individuo 1	Individuo 2
Alfa	Z
Beta	Z
Cir	Z
Mira	Emi
Mira	Ig
Mira	DieC
Mira	Kin
Mune	Z
Mune	Emi
Mune	Ig
Mune	DieC
Mune	Kin
Neg	Z
Neg	Ig
Neg	DieC
Neg	Kin
OM2	Emi
OM2	Ig
OM2	DieC
OM2	Kin
OM2	Oaxaca
OM2	OM1
Sian	Z
Sian	Ig
Sian	DieC
Sian	Kin
Sian	Oaxaca
Sian	OM1
Sian	Poc
Sian	Pobe
Tlax	Z
Tlax	Emi
Tlax	Ig
Tlax	DieC
Tlax	Oaxaca
Tlax	OM1
Tlax	Poc
Tlax	Pobe
Tlax	Suy

Zur	Emi
Zur	Ig
Zur	DieC
Zur	Oaxaca
Zur	OM1
Zur	Poc
Zur	Pobe
Zur	Suy
Igor	Beta
Igor	Cir
Diego	Alfa
Diego	Cir
Kinam	Alfa
Kinam	Cir
Oaxaca	Alfa
Oaxaca	Beta
Oaxaca	Cir
Oaxaca	Mira
Oaxaca	Mune
Oaxaca	Neg
OM1	Alfa
OM1	Beta
OM1	Cir
OM1	Mira
OM1	Mune
OM1	Neg
Poc	Alfa
Poc	Beta
Poc	Cir
Poc	Mira
Poc	Mune
Poc	Neg
Poc	OM2
Pobe	Alfa
Pobe	Beta
Pobe	Cir
Pobe	Mira
Pobe	Mune
Pobe	OM2
Suy	Beta
Suy	Mira
Suy	Mune
Suy	OM2

Para el grupo genético 3, que tiene una probabilidad de 95% de asignación a genotipos de origen sudamericano, o con admixia de sudamericano y mexicano, siendo la mayor proporción la primera:

Individuo 1	Individuo 2
BalT	Yum

## **Genetic variability and structure of jaguar (*Panthera onca*) in Mexican zoos**

Pilar Rueda Zozaya<sup>a</sup>, Germán D. Mendoza-Martínez<sup>a</sup>, Daniel Martínez-Gómez<sup>b\*</sup>, Octavio Monroy-Vilchis<sup>c</sup>, José Antonio Godoy<sup>d</sup>, Armando Sunny<sup>c</sup>, Francisco Palomares<sup>d</sup>, Cuauhtémoc Chávez<sup>e</sup>, José Herrera-Haro<sup>f</sup>,

<sup>a</sup> Laboratorio de Ensayos Metabólicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 3100, Distrito Federal, 04960, México.

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 3100, Distrito Federal, 04960, México.

<sup>c</sup> Centro de Investigación en Ciencias Biológicas Aplicadas, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario 100, Colonia Centro, Toluca, Estado de México, 50000, México.

<sup>d</sup> Estación Biológica de Doñana, CSIC. c/ Américo Vespucio s/n, 41092 Isla de la Cartuja, Sevilla, España.

<sup>e</sup> Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Lerma, Hidalgo Pte. 46, Col. La Estación, Lerma, Estado de México, 52006, México.

<sup>f</sup> Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, México.

Corresponding author: Daniel Martínez Gómez, Tel.: +521 54837000 ext. 3060; e-mail address: dmartin@correo.xoc.uam.mx

**Running title: population genetics of jaguar in Mexican zoos.**

## Abstract

Genealogical records of animals (studbook) are created to avoid reproduction between closely related individuals, which could cause inbreeding, particularly for such endangered species as the *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). Jaguar is the largest felid in the Americas and is considered an important ecological key species. In Mexico, wild jaguar populations have been significantly reduced in recent decades, and population decline typically accompany decreases in genetic variation. There is no current census of captive jaguars in Mexico, and zoos do not follow a standardized protocol in breeding programs based on genetic studies. Here, we emphasise the importance of maintaining an adequate level of genetic variation and propose the implementation of standardised studbooks for jaguars in Mexico, mainly to avoid inbreeding. In addition, achieving the aims of studbook registration would provide a population genetic characterisation that could serve as a basis for *ex situ* conservation programmes.

Key words: *Panthera onca*, studbook, genetic variability, microsatellite, population genetics.

## Introduction

The jaguar (*Panthera onca*), the largest felid in the Americas, is considered an important and emblematic species for many pre-Columbian cultures (Campos 2002). As most large carnivores, this felid is currently cited in the Red List (IUCN 2013) as Near Threatened (Caso et al. 2008), in CITES Appendix I (2015) and as Endangered in Mexican laws (SEMARNAT 2010). It is estimated that there are approximately 4000 jaguars in the wild throughout the country (Fig. 1), approximately 70 % less than in the 1960s (Chávez et al. 2009; Ceballos et al. 2011). The decline in jaguar population is mainly due to habitat loss and fragmentation, and fur trade is still a threat to wild populations (Quigley and Crawshaw 1992; Eizirik et al. 2001; Silver et al. 2004; O' Brien and Johnson 2005; Ruiz-García et al. 2006; Eizirik et al. 2008; Ruiz-García 2013; Roques et al. 2014); it is estimated that only 16 % of the current territory in Mexico is suitable for the increasingly diminished and isolated jaguar populations (Rodríguez-Soto et al. 2011).

Genetic diversity is progressively lost by the action of drift in small populations, and this effect is further intensified by the reduction of gene flow when these populations become effectively isolated. (Frankham 1995; Hedrick and Kalinowski 2000; Keller and Waller 2002; Martínez-Cruz et al. 2004), and this can seriously compromise the survival of a species already at risk of extinction (Hedrick 2001). Previous characterization of genetic variation in jaguar populations revealed moderate to

high global genetic diversity in the wild, with some variation among populations and studies (Table 1). Most recent studies have reported a reduced genetic diversity at the periphery of the species range as a consequence of isolation by distance and recent isolation due to fragmentation (Haag et al. 2010; Roques et al. 2014). Mexican jaguar populations in particular show a reduced genetic diversity and a high differentiation to those in Brazil (Roques et al. 2015).

The role of zoos in recent decades as conservation centers has been key to the successful development of conservation programmes for several endangered species: Speke's gazelle (*Gazella spekei*), California condor (*Gymnogyps californianus*), bighorn sheep (*Ovis Canadensis*), Florida panther (*Puma concolor coryi*), European bison (*Bison bonasus*), Mexican grey wolf (*Canis lupus baileyi*) are noticeable examples (Willis and Wiese 1997; Templeton and Read 1998; Meretsky et al. 2000; Whittaker et al. 2004; Hedrick 1994; Olech and Perzanowski 2002; Fredrickson and Hedrick 2002; Fredrickson et al. 2007). Captive populations of endangered species can be used as a genetic reservoir and as a source of individuals for reintroductions and for the demographic and genetic reinforcement of extant populations (Frankham 2015). However, captive populations often begins with a small number of individuals distributed in several breeding centers, partly due to spatial constraints (Laikre 1999; Boakes et al. 2007), and if left unmanaged genetic drift and non-random matings results in a rapid loss of genetic diversity and accumulation of inbreeding (Jiménez et al. 1994; Laikre 1999; Keller and Waller 2002; Charlesworth and Willis 2009), with likely reduction of fitness and adaptive potential that can seriously limit their conservation value (Frankham 2015). The erosion of genetic diversity in captive population can however be minimized with the implementation of proper genetic management program that establish the breeding priority and the optimal breeding schemes within and among centers. Such a program is often based on the minimization of average kinship and thus requires exhaustive and reliable genealogical records and/or molecular marker data for kinship estimation.

The genetic status of captive jaguars is mostly unknown. Moreno et al. (2006) assessed genetic variability of jaguars in Brazilian zoos and reported moderate to high levels of polymorphism (suited genetic variability in this species), but genetic data on Mexican captive jaguars is currently lacking. Some Mexican zoos do not exhaustively record births, deaths, or translocations and do not carry a standardized studbook, this difficult an appropriate genetic management in these populations (Ralls et al. 1988; Laikre 1999). Considering these circumstances, we carried out a research in order to: 1) To evaluate some parameters of genetic variation on 56 captive jaguars, 2) To assign individuals to

genetic clusters approximating the breeding processes carried out in zoos, and 3) To establish a baseline information useful to implement measures that unify and standardize a prospective studbook in Mexico based on genetic and genealogical information of jaguars.

## Materials and methods

### Sampling

Fourteen Mexican zoos provided fresh blood samples of 56 jaguars with unknown origin and practically no information on their pedigree. The handling of all individuals was carried out according to the protocols established in each zoo, based on NOM-126-SEMARNAT-2000 and collecting permit No. SGPA/DGVS/01685/11. Blood was collected in tubes with EDTA and stored at 4 °C until processing.

### Molecular methods

Total genomic DNA was extracted from blood samples according to the protocol of Sambrook and Russell (2001). DNA samples were visualized by agarose gel electrophoresis. A set of 11 labeled microsatellite markers developed by Menotti-Raymond et al. 1999 and optimized by Roques et al. (2014) was used for individual genotyping (Table 2). PCR conditions were: a first denaturation step at 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C, lasting 30 seconds, annealing at 57-60 °C, lasting 90 seconds and extension at 72 °C, lasting 30 seconds, and a final extension step of 30 minutes at 72 °C. PCR reactions consisted of 3 µl of DNA extract (15 ng/µl) in a final volume of 20 µl containing Type-it Multiplex PCR Master Mix 1X (QIAGEN®), BSA 0.01 %, and 0.2 µM of each primer (Sigma-Aldrich®) and 0.4 U of Taq polymerase (Bioline®). Allele sizes were determined using the ABI 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems), based on the size standard GS-600 LIZ (Life Technologies Inc.) using GENEMAPPER software v4.0 (Applied Biosystems®) and manually checked to assure reproducibility and correct misreading.

### Genotyping

After assigning consensus genotypes to jaguar individuals we tested for genotyping errors with the software MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004), with a 95 % confidence interval and 1,000 repetitions; this program can help identify null alleles and accordingly adjust genotype frequencies. FCA115, FCA547 and FCA566 showed a heterozygote deficit consistent with the presence of null alleles. Genotypes were also evaluated with the software FREENA (Chapuis and Estoup 2007), a computer program that allows several statistical treatments on microsatellite datasets with null alleles. Based on INA-corrected

allele frequencies we checked whether there are significant differences between values of  $F_{st}$  due to the presence of null alleles (Chapuis and Estoup 2007), using a t-test implemented in GRAPHPAD QUICK CALCS to assess the statistical significance of differences.

### Genetic structure

With STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; Hubisz et al. 2009) we assessed a Bayesian cluster analysis for inferring the probability of individual assignment to a varying number of distinct populations. The procedure uses a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach to estimate the data fit to each range of potential  $K$  clusters. The simulations was performed using 1,000,000 burn in periods and 1,000,000 MCMC iterations, with correlated allele frequencies and an admixture model without prior information on population origin. We selected the most likely number of clusters based on the maximum value of  $\Delta K$ , following the Evanno method as implemented in STRUCTURE HARVESTER 0.6.92 (Earl and von Holdt 2012). We calculated the distribution of the genetic variance between and within clusters and individuals using an analysis of molecular variance (AMOVA) based on  $F_{st}$  as implemented by GENALEX 6.5. (Peakall and Smouse 2006). A phylogenetic tree was constructed from the genetic distances in accordance with the stepwise mutation model (SMM): Nei's genetic distance (Nei 1972) with all individuals using POPULATIONS 1.2.30 (Langella 2002). These distances were used to construct a NJ tree to cluster individuals by genetic similarity with FIGTREE 1.4.2. (Rambaut and Drummond 2010). Finally in GENETIC STUDIO (Dyer 2009) we estimated Nei's genetic distance ( $D_{Nei}$ ) between clusters.

### Genetic variability

Allelic frequencies were used to calculate some genetic parameters including the mean number of alleles per locus ( $A$ ), the mean number of effective alleles per locus ( $A_e$ ), observed and expected heterozygosities ( $H_o$ ,  $H_e$ ), and the allelic fixation index ( $F_{st}$ ), using GENALEX 6.5. The data set were evaluated to detect deviations from the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in the global captive population and in each specific population with ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010) and GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) using 100,000 Markov chain steps and 100,000 dememorisation steps. The significant values inferred to LD or HWE deviations were corrected for multiple comparisons with a False Discovery Rate (FDR) approach according to Benjamini and Hochberg (1995) as implemented by the QVALUE software (Storey 2002) for R (version 3.0.1; R Development Core Team, 2013).

Effective population size, genetic bottlenecks, and relatedness

Effective population size was estimated with the software LDNE (Waples 2006; Waples and Do 2008), based on the linkage disequilibrium method (Hill 1981). We used the software BOTTLENECK 5.1.26 (Cornuet and Luikart 1996; Piry et al. 1999) to test for a trace of genetic bottlenecks events. We estimated the observed and expected heterozygosity under the infinite allele model (IAM), SMM and the two-phase model (TPM), with settings at 90 % SMM, 10 % IAM, and 10 % variance and default values (70 % SMM, 30 % IAM, and 10 % variance). Both settings were calculated with 10,000 replicates and excess of heterozygosity was tested with Wilcoxon test. We evaluated relatedness among individuals with the program ML-RELATE (Kalinowski et al. 2006), which takes into account null alleles and is based on maximum likelihood tests. Also we presented a summary of the of relationships assigned with the highest likelihood, consistent with the genetic data at the 0.05 level of significance; a graphical comparison of the number of pairs of individuals probably related (ML RELATE) and the number of pairs of individuals having a relationship according to the information provided by the veterinarians of each zoo.

## Results

### Population sampling and potential scoring errors

Genotypes from fifty-six blood samples from Mexican zoos were obtained by microsatellite analysis with 11 loci (Roques et al. 2014). The analysis of genotypes with MICRO-CHECKER showed three loci with potential null alleles: FC115, FC547 and FC566. However, since the adjusted  $F_{st}$  values did not significantly differ from the unadjusted values ( $F_{st-INA} = 0.096$ ,  $F_{st} = 0.095$ ;  $t = 0.015$ ,  $P = 0.99$ ,  $gl = 20$ ) we kept all loci for further analyses.

### Genetic structure

Three genetic clusters were obtained with STRUCTURE software ( $\text{LnPr}(k = 3) = -1716.35$  Fig. 2), according to the Evanno method (based on the maximum likelihood of  $k$  clusters; Fig. A1). At least 85 % of jaguars were assigned with a probability of 95 % to the clusters obtained (Table 3), several individuals were assigned partially to one, two or all three clusters (Figure 2). Results of AMOVA showed that most of the genetic variation resided within individuals (76 %;  $P = 0.001$ ), then between individuals within clusters (16 %;  $P = 0.001$ ) and finally between clusters (8 %;  $P = 0.001$ , Table 4). The  $F_{st}$  and Nei's genetic distances were slightly moderate among Clusters, moderate between Cluster 1 to Cluster 2 ( $F_{st} = 0.051$  Nei's = 0.2142), moderate between Cluster 1 to Cluster 3 ( $F_{st} = 0.113$  Nei's = 0.4857), and high between Cluster 2 to Cluster 3 ( $F_{st} = 0.151$  Nei's = 0.5425). In agreement with AMOVA, the NJ tree showed the Clusters 1 and 2 are more similar between them,

instead the Cluster 3 is the most different from all (Fig. A2). Also the results of the NJ tree and STRUCTURE showed signs of admixture (Fig. A2 and Fig. 2).

### Genetic variability

After FDR correction, no significant overall linkage disequilibrium was detected in any Cluster, so we considered the eleven loci as independent markers. We measured  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $A$ ,  $A_e$ , Shannon's Information Index ( $I$ ) and  $F_{st}$  values per locus for each of the three inferred clusters and for the overall captive jaguar population (CJP), see Table 4. In the genetic Cluster 1, the following values were obtained:  $A$  ( $\square = 7$ ),  $A_e$  ( $\square = 4.4$ ),  $H_o$  and  $H_e$  were the same ( $\square = 0.72$ ) and,  $F_{st}$  ( $\square = -0.01$ ); Cluster 2:  $A$  ( $\square = 4.4$ ),  $A_e$  ( $\square = 3.13$ ),  $H_o$  ( $\square = 0.53$ )  $H_e$  ( $\square = 0.62$ ) and,  $F_{st}$  ( $\square = 0.12$ ) and Cluster 3:  $A$  ( $\square = 3.63$ ),  $A_e$  ( $\square = 2.8$ ),  $H_o$  ( $\square = 0.7$ )  $H_e$  ( $\square = 0.59$ ) and,  $F_{st}$  ( $\square = -0.2$ ).

In summary, levels of genetic diversity were moderate to high (0.53-0.72) with an overall mean of 0.65 (Table 4).  $H_o$  was higher in genetic Cluster 1 (0.72), but considering that genetic Cluster 3 contained only eight individuals, it would be proportionately higher (0.71), while the Cluster 2 has a moderate heterozygosity (0.53). In addition, the values of the inbreeding coefficient were low to moderate: in the captive jaguar population CJP ( $F_{is}$ ; from -0.12 to 0.21), the Cluster 1 ( $F_{is}$ ; from -0.12 to 0.14), the Cluster 2 ( $F_{is}$ ; from -0.13 to 0.35), and Cluster 3 ( $F_{is}$ ; from -0.49 to 0.25; Table A2).

### Effective population size, genetic bottlenecks, and relatedness

The effective population size was estimated in 17.3 (95% CI: 13.4-22.7), with a harmonic mean sample size of 51.9 (Table 5). Evidence of a recent genetic bottleneck associated with a heterozygote excess (BOTTLENECK results) was observed for all captive jaguar population CJP with a variance of 30 % and a probability of 70 %, under the IAM and TPM models ( $P = 0$ ), also with a variance of 10 % and a probability of 90 %, under the IAM model ( $P = 0$ ). When analyzed independently each cluster the same phenomenon was observed, all Clusters showed possible bottlenecks under the two models used for this analysis (Table A3).

The relatedness analysis based on the maximum likelihood (ML) estimator, according to the amount of shared alleles, in Cluster 1 revealed 8 full siblings (FS), 44 half siblings (HS) and 9 parent/offspring (PO) relationships; we also evaluated the differences between the Ln Likelihood (LnL) for the other relationships categories (Table 7). There were significant differences between FS and PO comparisons, however in HS relationships there were no

differences compared with unrelated (U) and FS. In Cluster 2 revealed 7 FS, 22 HS and 7 PO relationships; there were significant differences between all the relationships categories compared but in FS with PO. In Cluster 3 revealed 6 FS, 17 HS and 5 PO relationships assigned by ML; in this cluster all comparisons with other categories of relationships categories had significant differences (Table 7).

## Discussion

### Genetic structure and genetic variability

Although captive jaguars are not a natural population, genetic analysis could be useful for conservation on this endangered species. The analysis of fifty-six blood samples from captive animals showed three genetic clusters based on the  $\Delta k$  estimated by STRUCTURE (Fig. 2). Cluster 1 (red) with 29 individuals, Cluster 2 (green) with 19 individuals and Cluster 3 (blue) only 8 individuals. This software infers population structure, assigning individuals to the closest population, identifying migrants and admixed individuals. We start from the premise that captive jaguar population have some degree of structure because many animals from highly differentiated populations have been reproduced each other (Brazilian, Venezuelans with individuals from Mexican origin), as mentioned by zookeepers. More than 85% of the jaguars were assigned to one of three clusters ( $P = 95\%$ ), in several cases it was observed that some individuals were partially assigned to more than one cluster (Table 3), probably these characteristics of variable proportions of membership to the clusters within individuals was due to the mate of jaguars from very different populations, a common situation in the sampled animals.

AMOVA results revealed that there was moderate genetic differentiation between the three clusters formed according to allelic frequencies; it may result from different founder individuals (presumably from differentiated populations), in turn this difference is probably to be a result of the diverse geographical origin of jaguars and the effects of different selective breeding. We attribute these results to the variation within individuals (76%) and are concordant with the NJ tree: Clusters 1 and 2 were more similar instead cluster 3 was the most distant. This assignment probably was originated from the selective breeding, chiefly South American individuals mated with Mexicans, for example reproduction of melanistic jaguars have been increased because they are very attractive to the visitors (pers. obs); in Mexico there is no evidence of black jaguars in wild, the northernmost record being from Costa Rica (Meyer 1994; Eizirik et al. 2003; Cartín-Núñez and Carrillo 2009), and few sightings are reported in Belize without further solid evidence. Both  $F_{st}$  analysis and AMOVA showed significant genetic differentiation among clusters, although the  $F_{st}$  value between Cluster 1

and 2 was small, it is statistically significant (0.051). The values of Nei's distances were also significant to consider the clusters with a degree of differentiation.

Despite limitations in space and number of individuals, in this research we found moderate to high levels of heterozygosity (0.53 to 0.72; Table 5). Because this captive population is probably formed by individuals of several origins, levels of heterozygosity could be raised as a result of the mixture of individuals from populations with some degree of differentiation (Luo et al. 2008). The highest record of heterozygosity in jaguars reported by Ruiz-García et al. 2006 for Colombian jaguars ( $H = 0.84$ ), is perhaps derived from the population subdivision that they assessed (Boecklen 1986; Swindell and Bouzat 2006). Other research about genetic diversity in jaguar was developed by Haag et al. 2010, the average  $H_o = 0.73$  was high, nonetheless they reported allelic loss, differentiation between populations isolated and low effective sizes, this processes possibly caused by recent genetic drift. In other large felids genetic diversity has been reported low levels, cheetah (*Acinonyx jubatus*)  $H_e = 0.64$  to 0.70 in Namibia (Marker et al. 2008); Luo et al. (2004) obtained a mean observed heterozygosity in several samples of tiger subspecies (*P. tigris*) ranged from 0.40 ( $H_o$  minimum in *P. t. altaica*) to 0.66 ( $H_o$  maximum in *P. t. corbetti*). In contrast, Indian leopard (*P. pardus*) showed high levels of  $H_o = 0.74$  (Dutta et al. 2013).

### Effective population size, genetic bottleneck and relatedness

There is no a regular update of the census of jaguars in Mexican zoos, the most recent data is from 2003, published in the workshop "*El papel de los zoológicos de Mesoamérica y el Caribe en la conservación de los jaguares*" (The role of zoos in Mesoamerica and the Caribbean in the conservation of jaguars) developed by the Conservation Breeding Specialist Group (CBSG). They estimated 135 jaguars (62 males, 67 females and 7 unknown), however, it has not been updated a census to verify whether this number has increased or decreased. In several zoos where we collected blood samples, veterinarians mentioned that they try to avoid the breeding between close-related individuals, however, in the absence of an updated and standardized jaguar studbook, consanguineous matings cannot be completely avoided and an effective genetic management cannot be implemented, what will adversely affect genetic variation (Witzenberger and Hochkirch 2011). On the contrary, breeding programs that are genetically managed based on mean kinship, retained genetic diversity and delayed the effects of inbreeding, even when there is scarce information about the pedigree of individuals, these programs can still be implemented by using molecular marker data to

estimate kinship among individuals. The data generated by this study provides thus a starting point for the implementation of genetic management program of captive jaguars in Mexico, since in more than half of the relationships assigned, it was verified that there was a high probability of consistency with the information provided by zoo keepers. Also, it could be detected that some families are formed due to the limited interchange that has occurred in four zoos having proximity (data not shown). Accordingly, this may also be reflected in the small effective population size obtained ( $N_e = 17$ ) considering there have been no reproductions guided in a program to maintain genetic variation, for example, random mating that includes the greatest number of jaguars (Table 6). In the three clusters a recent genetic bottleneck was detected (Table A3), it is possible that this result indicated a restricted reproduction between few individuals (founder members) and furthermore, the captive jaguar population has recently been formed (it is estimated that in the 1980's). To avoid the loss of genetic diversity caused by of the lack of accurate planning in the genetic management of captive jaguar populations, this research would contribute to be the starting point for further establishment of appropriate genetic management for Mexican zoos.

Although we had a moderate number of loci, the relatedness analysis was mostly consistent with the other results. Cluster 1 showed the largest number of possible relationships (Total = 61), of which 2 were known (1 parent/offspring and 1 full siblings). In Cluster 3 it was found only one parent/offspring relationship, however this two melanistic jaguars formed one of the confirmed relationships. The relationship with the largest possibilities in the three clusters was HS (Table 7), it is expected to be ambiguous because of the challenge of calculating and assigning individuals that share only 25 % of the genetic material and may actually be categorized in other relationships such as cousins, uncles/nephews, grandparents/grandchildren. Hence, we emphasize the necessity for further analysis of parentage based on genetic information, preferably using a high number of molecular markers to improve the precision of the estimates. In three of the four known relationships we observed consistency on the assignment of the individuals into the same cluster, one of full siblings (Figure 2, see bars 14 and 38) and two of parent/offspring (Figure 2, see bars 15 and 17; 16 and 22). The fourth relationship of parent/offspring was not very clear (bars 56 and 39 of the Figure 2), there is the possibility that parents and offspring were assigned in different clusters, the most likely cause that we consider is because these parents have different origins, and each parent could be assigned to a different cluster meanwhile offspring are assigned to the proportion inherited from each parent. In general, it is likely that our results show a

medium level of relatedness among individuals; which suggests that litters have been distributed in zoos that have maintained a limited exchange of individuals. Following the protocol of reproduction based on the mean kinship (MK) as suggested by Willoughby et al. (2015) is strongly recommended to avoid the loss of genetic variation, if there is the purpose to establish a studbook for captive jaguars, it is important to have an intensive relatedness analysis prior to start a breeding program.

## Conclusions

Captive breeding has become an important tool in animal conservation, but the lack of a well-executed management program aimed at minimizing the impact of drift and inbreeding can reduce their usefulness for species conservation. Wild Mexican jaguars have declined and show signs of genetic erosion, a situation that could eventually demand supplementation from a healthy captive genetic stock, there was no information about genetic status of captive jaguars, and our research is the first to provide basic information on genetic variation of captive jaguars in Mexico. They need to be genetically managed based on genealogical and molecular information to guarantee the appropriate management to retain genetic diversity for jaguar conservation programmes. This paper is the first in genetically evaluate captive populations of jaguars in Mexico and provides the basis to designing breeding programs that conserve the genetic diversity of these populations.

## Acknowledgments

The first author acknowledges CONACYT (No. 212653) for the scholarship, and all the support obtained as a Ph.D student in the programme of Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. One phase of the project was done at Estación Biológica de Doñana in Seville, Spain. The authors would like to thank Begoña Agrados, María Méndez and María Lucena for the invaluable help in analysis and laboratory procedures. Also they would like to thank to all the zoos that provided blood samples, with a special mention to Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre in Mexico City.

## References

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B Met* 57(1):289-300.
- Bertola LD, Van Hooft WF, Vrieling K, Uit de Weerd DR, York DS, Bauer H, Prins HHT, Funston PJ, Udo de Haes HA, Leirs H, van Haeringen WA, Sogbohossou E, Tumenta PN, De Iongh HH (2011) Genetic diversity, evolutionary history and implications for conservation of the lion (*Panthera leo*) in West and Central Africa. *Journal of*

- Biogeogr 38(7):1356-1367. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02500.x
- Bishop JM, Leslie AJ, Bourquin SL, O’Ryan C (2009) Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). Biol Conserv 142(10):2335-2341. doi: 10.1016/j.biocon.2009.05.016
- Boecklen WJ (1986) Optimal design of nature reserves: consequences of genetic drift. Biol Conserv 38(4), 323-338. doi: 10.1016/0006-3207(86)90058-3
- Boakes EH, Wang J, Amos W (2007) An investigation of inbreeding depression and purging in captive pedigreed populations. Heredity 98:172-182. doi: 10.1038/sj.hdy.6800923
- Briscoe DA, Malpica JM, Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks RG, Barker JSF (1992) Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. Conserv Biol 6(3):416-425. doi: 10.1046/j.1523-1739.1992.06030416.x
- Campos Fernández-Fígares MM (2002) El caballo y el jaguar: sobre la historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Comares Editores, España.
- Cartín-Núñez M, Carrillo E (2009) New record of black jaguar, *Panthera onca* (Carnivora: Felidae) in Costa Rica. Brenesia 71-72:67-68.
- Caso A, Lopez-Gonzalez C, Payan E, Eizirik E, de Oliveira T, Leite-Pitman R, Kelly M, Valderrama C (2008) *Panthera onca*-The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 29 April 2015.
- Ceballos G, Chávez C, Zarza H (2011): El Jaguar en México. Alianza WWF/Telcel CONANP, UNAM. Servicios Ecológicos y Científicos. México, Distrito Federal.
- Ceballos G, Chávez C, List R, Zarza H, Medellín RA (2011) Jaguar Conservation and Management in Mexico: Case studies and perspectives, Alianza WWF/Telcel CONANP, UNAM. Servicios Ecológicos y Científicos. México, Distrito Federal.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Appendix I. 2015.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144(4):2001-2014.
- Chirhart SE, Honeycutt RL, Greenbaum IF (2000) Microsatellite markers for the deer mouse *P. maniculatus*. Mol Ecol 9:1669-1672.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Mol Biol Evo 24(3):621-631. doi: 10.1093/molbev/msl191
- Charlesworth D, Willis JH (2009) The genetics of inbreeding depression. Nat Rev Genetics 10:783-796. doi: 10.1038/nrg2664
- Chávez C, Zarza H (2009) Distribución potencial del hábitat del jaguar y áreas de conflicto humano-jaguar en la península de Yucatán. Rev Mex Mastozool 13:46-62.
- Dyer RJ (2009) Genetic studio: a suit of programs from spatial analysis of genetic-marker data. Mol Ecol Resour 9:110-113
- Dutta T, Sharma S, Maldonado JE, Wood TC, Panwar HS, Seidensticker J (2013) Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India. Divers Distrib 19(7):760-771. doi: 10.1111/ddi.12024
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4:359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Eizirik E, Heup KJ, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O’Brien SJ, Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). Mol Ecol 10:65-79. doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.01144.x
- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O’Brien SJ (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. Curr Biol 13:448-453. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00128-3
- Eizirik E, Haag T, Santos AS, Salzano FM, Silveira L, Azevedo FCC Furtado MM (2008) Jaguar Conservation Genetics. CAT News 4:31-34.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) ARLEQUIN suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10:564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Falush D, Stephens M, Pritchard J (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164(4):1567-1587.
- Frankham R (1995) Conservation Genetics. Annu Rev Genet 29:305-27. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.001513
- Frankham R (2015) Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and

- consistent benefits of gene flow. *Mol Ecol Early view*. doi: 10.1111/mec.13139
- Fredrickson R, Hedrick P (2002) Body sizes in endangered Mexican wolves: effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Anim Conserv* 5:39-43. doi: 10.1017/S1367943002001051
- Fredrickson RJ, Siminski P, Woolf M, Hedrick, PW (2007) Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *P Roy Soc Lond B Bio* 274:2365-2371. doi: 10.1098/rspb.2007.0785
- Haag T, Santos AS, Sana DA, Morato RG, Cullen L Jr, Crawshaw PG, De Angelo C, Di Bitetti MS, Salzano FM, Eizirik E (2010) The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Mol Ecol* 19:4906-4921. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04856.x
- Hedrick PW (1994) Purging inbreeding depression and the probability of extinction: full-sib mating. *Heredity* 73:363-372. doi: 10.1038/hdy.1994.183
- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of ecology and systematics* 31:139-162.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends Ecol Evol* 16:629-636. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02282-0
- Hedrick PW, Fredrickson R (2008) Captive breeding and the reintroduction of Mexican and red wolves. *Mol Ecol* 17:344-350. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03400.x
- Hedrick PW, Fredrickson R (2010) Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conserv Genet* 11:615-626. doi: 10.1007/s10592-009-9999-5
- Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet Res*, 38(03):209-216. doi: 10.1017/S0016672300020553
- Hu Y, Qi D, Wang H, Wei F (2010) Genetic evidence of recent population contraction in the southernmost population of giant pandas. *Genetica* 138(11-12):1297-1306. doi: 10.1007/s10709-010-9532-2
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resources* 9(5):1322-1332. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Jaramillo-Jaimes MT, Sifuentes-Rincón AM, Sánchez Torres-Esqueda MT, Mendoza-Martínez GD, Clemente-Sánchez F, Olivera-López JI, Molina Hernández M, Martínez-Tripp SC (2007) Genetic variability in six Mexican gray wolf (*Canis lupus baileyi*) populations determined by microsatellite markers. *J Appl Anim Res* 31(2):131-136. doi: 10.1080/09712119.2007.9706647
- Jiménez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266(5183):271-273. doi: 10.1126/science.7939661
- Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6(2):576-579. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* 17(5): 230-241. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02489-8
- Kitchener AC (1997) The role of museums and zoos in conservation biology. *Int Zoo Yb* 35:325-336. doi: 10.1111/j.1748-1090.1997.tb01228.x
- Laikre L (1999) Hereditary defects and conservation genetic management of captive populations. *Zoo Biol* 18:81-99. doi: 10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:2<81::AID-ZOO1>3.0.CO;2-2
- Langella O (2002) Populations 1230 Copyright (C) 1999 Olivier Langella CNRS-UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/tryphon/populations/>
- Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, van der Walt J, Martenson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB, Tilson R, Brady G, Martelli P, Subramaniam V, McDougal C, Hean S, Huang SQ, Pan W, Karanth UK, Sunquist M, Smith JLD, O'Brien SJ (2004) Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biology* 2(12):2275-2293. doi: 10.1371/journal.pbio.0020442
- Luo SJ, Johnson WE, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, Traylor-Holzer K, Smith JLD, O'Brien SJ (2008) Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase conservation value of captive populations. *Current Biology* 18(8):592-596. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.053
- Marker LL, Wilkerson AJP, Sarno RJ, Martenson J, Breitenmoser-Würsten C, O'Brien SJ, Johnson WE (2008) Molecular genetic insights on cheetah (*Acinonyx jubatus*) ecology and conservation in Namibia. *Journal of Heredity* 99(1):2-13. doi: 10.1093/jhered/esm081
- Martínez-Cruz B, Godoy JA, Negro JJ (2004) Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Mol Ecol* 13(8):2243-2255. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02220.x
- Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1993) Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *P Natl Acad Sci USA* 90(8):3172-3176. doi: 10.1073/pnas.90.8.3172
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schäffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien S J (1999) A genetic linkage map of microsatellites in

- the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57(1):9-23. doi: 10.1006/geno.1999.5743
- Meretsky VJ, Snyder NF, Beissinger SR, Clendenen DA, Wiley JW (2000) Demography of the California Condor: implications for reestablishment. *Conserv Biol* 14:957-967. doi: 10.1046/j.1523-1739.2000.99113.x
- Meyer JR (1994) Black jaguars in Belize? A survey of melanism in the jaguar, *Panthera onca*. [http://biological-diversity.info/Black\\_Jaguar.htm](http://biological-diversity.info/Black_Jaguar.htm)
- Moreno VR, Grisolia AB, Campagnari F, Milazzotto M, Adania CH, Garcia JF, Souza EBD (2006) Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genet Mol Biol* 29(2):290-293. doi: 10.1590/S1415-47572006000200017
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283-292.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Bush M, Caro TM, FitzGibbon C, Aggundey I, Leakey RE (1987) East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? *Proc Natl Acad Sci USA* 84(2):508-511.
- O'Brien SJ (1994) Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu Rev Genet* 28(1):467-489. doi: 10.1146/annurev.ge.28.120194.002343
- O'Brien SJ, Johnson WE (2005) Big Cat Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:407-429. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162151
- Olech W, Perzanowski K (2002) A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. *Biol Conserv* 108:221-228. doi: 10.1016/S0006-3207(02)00108-8
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502-503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ralls K, Ballou JD, Templeton A (1988) Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conserv Biol* 2(2):185-193. doi: 10.1111/j.1523-1739.1988.tb00169.x
- Rambaut A, Drummond A (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed 2013 Apr 25
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP v 12: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249.
- Rodríguez-Soto C, Monroy-Vilchis O, Maiorano L, Boitani L, Faller JC, Briones MA, Núñez R, Rosas-Rosas O, Ceballos G, Falcucci A (2011) Predicting potential distribution of the jaguar (*Panthera onca*) in Mexico: Identification of priority areas for conservation. *Divers Distrib* 17:350-361. doi: 10.1111/j.1472-4642.2010.00740.x
- Roques S, Furtado M, Jácomo AT, Silveira L, Sollmann R, Tôrres NM, Godoy JA, Palomares F. (2014) Monitoring jaguar populations *Panthera onca* with non-invasive genetics: a pilot study in Brazilian ecosystems. *Oryx* 48(03):361-369. doi: 10.1017/S0030605312001640
- Roques S, Sollman R, Jácomo A, Tôrres N, Silveira L, Chávez C, Keller C, Mello do Prado D, Carignano Torres P, Jorge dos Santos C, Bernardes Garcia da Luz X, Magnusson WE, Godoy JA, Ceballos G, Palomares F (2015) Effects of habitat deterioration on the population genetics and conservation of the jaguar. *Conserv Genet* 1-15. doi: 10.1007/s10592-015-0766-5) c
- Ruiz-García M, Payán E, Murillo A, Álvarez D (2006) DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes Genet Syst* 81:115-127. doi: 10.1266/ggs.81.115
- Ruiz-García M (2013) Jaguar, genes y conservación: La historia poblacional del gran felido americano revelada por el ADN. *Investigación y ciencia* 441:24-31.
- Russello MA, Gladyshev E, Miquelle D, Caccone A (2004) Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian far east. *Conserv Genet* 5(5):707-713. doi: 10.1007/s10592-004-1860-2
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio en la lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 2002:1-56.
- Silver SC, Ostro LET, Marsh LK, Maffei L, Noss AJ, Kelly MJ, Wallace RB, Gómez H, Ayala G (2004) The use of camera traps for estimating jaguar *Panthera onca* abundance and density using capture/recapture analysis. *Oryx* 38(02):148-154. doi: 10.1017/S0030605304000286.
- Storey J D (2002) A direct approach to false discovery rates. *J Roy Stat Soc B* 64(3):479-498. doi: 10.1111/1467-9868.00346

Swindell WR, Bouzat JL (2006) Selection and inbreeding depression: effects of inbreeding rate and inbreeding environment. *Evolution* 60(5):1014-1022. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01179.x

Templeton AR, Read B (1998) Elimination of inbreeding depression from a captive population of Speke's gazelle: validity of the original statistical analysis and confirmation by permutation testing. *Zoo Biol* 17:77-94. doi: 10.1002/(SICI)1098-2361(1998)17:2<77::AID-ZOO4>3.0.CO;2-6

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Waples RS (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv Genet* 7:167-184. doi: 10.1007/s10592-005-9100-y

Waples RS, Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8(4):753-756. doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x

Whittaker DG, Ostermann SD, Boyce WM (2004) Genetic variability of reintroduced California bighorn sheep in Oregon. *J Wildlife Manage* 68:850-859. doi: 10.2193/0022-541X(2004)068[0850:GVORCB]2.0.CO;2

Willis K, Wiese RJ (1997) Elimination of inbreeding depression from captive populations: Speke's gazelle revisited. *Zoo Bio.* 16:9-16. doi: 10.1002/(SICI)1098-2361(1997)16:1<9::AID-ZOO3>3.0.CO;2-E

Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, Ivy JA, Lacy RC, DeWoody JA (2015) The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Mol Ecol* 24(1):98-110. doi: 10.1111/mec.13020

Witzenberger KA, Hochkirch A (2011) Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodivers Conserv* 20(9):1843-1861. doi: 10.1007/s10531-011-0074-4

Woodworth LM, Montgomery ME, Briscoe DA, Frankham R (2002) Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. *Conservation Genetics* 3(3):277-288. doi: 10.1023/A:1019954801089

**Table 1** Levels of genetic variability with samples from free-living, captivity and museums jaguars. PIC = polymorphism information content and H = Heterozygosity

Author(s)	Year	Site	Number of samples	Parameter
Eizirik et al.	2001	Americas	44	H = 0.622-0.724
Moreno et al.	2006	Brazilian zoos	39	PIC = 0.69
Ruiz-García et al.	2006	Colombia	62	H = 0.846
Haag et al.	2010	Brazil	59	H = ~0.73
Roques et al.	2014	Brazil	90	H = 0.67-0.7
Roques et al.	2015	Mexico and Brazil	102	H = 0.6 (Mexico), 0.73-0.84 (Brazil)

**Table 2** Microsatellite loci evaluated in *Panthera onca* by 11 fluorescent primers (Chirhart et al. 2000). Allele size and annealing temperatures conditions are indicated. 6-FAM, NED, PET, VIC: fluorophore acronyms.

Literature markers name	Markers name in this study	Primers Sequences (5'-3')	Dye	Allele size (in bp)	Annealing to (in °C)	Repeat unit
F115	FCA115	F:CTCACACAAGTAACTCTTTG R:CCTTCCAGATTAAGATGAG	6-FAM	185-225	57	Tetranucleotide
F90a	FCA90	F:ATCAAAAGTCTTGAAGAGCATGG TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTCC	6-FAM	100-120	62	Dinucleotide
FCA26	FCA26	F:GGAGCCCTTAGAGTCATGCA TGTACACGCACCAAAAACAA	6-FAM	126-160	60	Dinucleotide
N82b	FCA82	F:TCACCGCTTAAGAAGAGGCTA R:GTGAAGCTTCCGAAATGAGG	VIC	190-210	57	Dinucleotide
F176	FCA176	F:GGAAACTTGGAAAGCAAAACC R:TCCACAGTTGGAGTCTTAAGG	PET	213-233	57	Dinucleotide
V547b	FCA547	F:GGTGACAAAACAAAACAAAGCA R:GGAGCCTGCATAGGATTCAC	VIC	215-235	60	Dinucleotide
FCA77	FCA77	F:GGCACCTATAACTACCAGTGTGA R:ATCTCTGGGGAAATAAATTTGG	NED	110-154	57	Dinucleotide
N43a	FCA43	F:GAGCCACCCTAGCACATATAACC R:AGACGGGATTGCATGAAAAG	NED	100-130	60	Dinucleotide
N566b	FCA566	F:TGCTCAAACAGATAAGGCTGAA R:CCCCTCATGCTGTCTCTCA	NED	155-175	57	Dinucleotide
FCA24	FCA24	F:CCCAGCTTGTCTCTTACTGTG R:CATCCTCCCTAATGCC	PET	210-235	60	Dinucleotide
FCA126	FCA126	F:GCCCCTGATACCCTGAATG R:CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	PET	150-170	57	Dinucleotide

**Table 3** Number of individuals that were assigned to a cluster at a 95% probability in Structure.

P	Number of assigned jaguars	(%)
>90 %	30	53.57
>80 %	9	17.86
>70 %	8	14.29
>60 %	2	3.57
45-60 %	7	12.50
Total	56	100

**Table 4** Analysis of molecular variance (AMOVA) based on Fst values.

Source of Variation	D.F.	Sum of Squares	Variance components	Percentage of variation
BETWEEN clusters	1	33.778	0.365 Va	<b>8 %</b>
BETWEEN individuals	53	248.981	0.702 Va	<b>16 %</b>
WITHIN individuals	56	184.5	3.295 Vb	<b>76 %</b>
TOTAL	111	629.141	4.361	
<b>Fixation index Fst: 0.084 P = 0.001</b>				

**Table 5** Measures of diversity at 11 microsatellites in the three jaguar clusters obtained from 56 captive individuals. A = Number of different alleles, Ae = Number of effective alleles, I = Shannon's Information Index, Ho = Observed Heterozygosity, He = Expected Heterozygosity, Fst = Fixation Index.

Genetic cluster	Locus	A	Ae	I	Ho	He	Fst
<b>Cluster 1</b>	<b>FCA24</b>	5	2.62	1.18	0.57	0.62	0.08
	<b>FCA26</b>	6	2.99	1.41	0.72	0.67	-0.09
	<b>FCA43</b>	3	2.62	1.02	0.61	0.62	0.02
	<b>FCA77</b>	7	4.03	1.60	0.83	0.75	-0.11
	<b>FCA82</b>	6	3.07	1.35	0.77	0.67	-0.14
	<b>FCA90</b>	5	3.38	1.31	0.74	0.70	-0.05
	<b>FCA115</b>	17	12.05	2.65	0.85	0.92	0.07
	<b>FCA126</b>	6	2.50	1.20	0.62	0.60	-0.04
	<b>FCA176</b>	6	4.10	1.53	0.73	0.76	0.04
	<b>FCA547</b>	8	5.26	1.83	0.79	0.81	0.03
	<b>FCA566</b>	8	5.41	1.81	0.71	0.81	0.12
<b>Mean</b>		<b>7</b>	<b>4.37</b>	<b>1.54</b>	<b>0.72</b>	<b>0.72</b>	<b>-0.01</b>
<b>Cluster 2</b>	<b>FCA24</b>	4	2.99	1.19	0.72	0.66	-0.09
	<b>FCA26</b>	3	2.21	0.92	0.63	0.55	-0.15
	<b>FCA43</b>	3	2.52	0.99	0.53	0.60	0.13
	<b>FCA77</b>	5	2.50	1.17	0.50	0.60	0.17
	<b>FCA82</b>	3	1.21	0.37	0.19	0.17	-0.08
	<b>FCA90</b>	4	2.96	1.16	0.61	0.66	0.08
	<b>FCA115</b>	9	7.11	2.08	0.62	0.86	0.27
	<b>FCA126</b>	5	2.91	1.23	0.50	0.66	0.24
	<b>FCA176</b>	3	2.97	1.09	0.53	0.66	0.21
	<b>FCA547</b>	5	3.79	1.42	0.50	0.74	0.32
	<b>FCA566</b>	5	3.34	1.4	0.50	0.70	0.29
<b>Mean</b>		<b>4.455</b>	<b>3.136</b>	<b>1.185</b>	<b>0.530</b>	<b>0.624</b>	<b>0.125</b>
<b>Cluster 3</b>	<b>FCA24</b>	4	2.61	1.16	0.50	0.62	0.19
	<b>FCA26</b>	3	2.33	0.95	0.87	0.57	-0.53
	<b>FCA43</b>	2	1.44	0.48	0.37	0.30	-0.23
	<b>FCA77</b>	3	1.85	0.78	0.62	0.46	-0.36
	<b>FCA82</b>	5	3.92	1.47	0.86	0.74	-0.15
	<b>FCA90</b>	3	2.67	1.04	0.62	0.62	0.00
	<b>FCA115</b>	5	4.08	1.49	0.98	0.75	-0.32
	<b>FCA126</b>	2	2	0.69	0.50	0.50	0.00

	<b>FCA176</b>	3	2.84	1.07	0.98	0.65	-0.54
	<b>FCA547</b>	4	1.97	0.95	0.62	0.49	-0.27
	<b>FCA566</b>	6	4.67	1.67	0.86	0.79	-0.09
	<b>Mean</b>	<b>3.636</b>	<b>2.762</b>	<b>1.068</b>	<b>0.713</b>	<b>0.591</b>	<b>-0.210</b>
	<b>Overall mean</b>	5.03	3.42	1.26	0.65	0.65	-0.03

**Table 6** Estimating of effective population size based on LD method.  
LDNe

	Harmonic mean sample size	Ne	Confidence interval (95 %)
Captive jaguars	51.9	17.3	13.4-22.7

**Table 7** Relationships assigned with the maximum likelihood according to genetic data at the 0.05 level of significance.

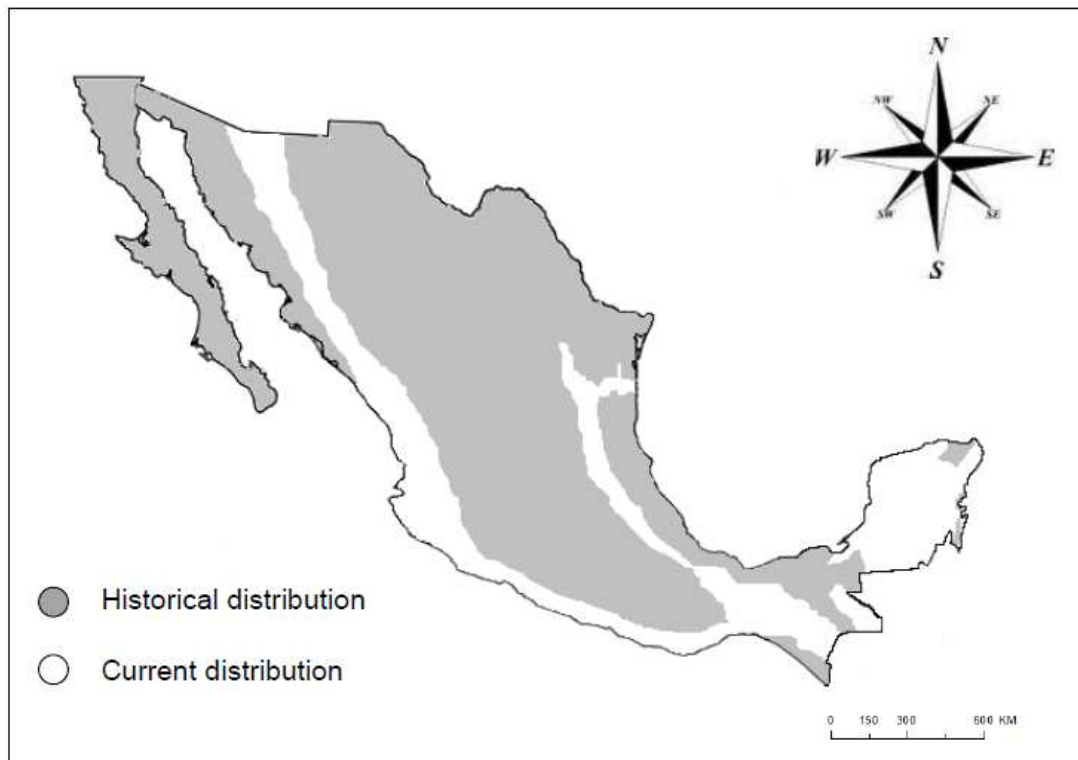
Number of pairs	R <sup>1</sup>	Cluster 1				
		LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
8	FS	-51.82-(-46.44)	-54.49-(-48.31)	-52.88-47.11	-	-10050.82-(-10045.44)
			<b>0.032*</b>	<b>0.03*</b>		<b>0.003*</b>
44	HS	-57.98-(-49.96)	-58.2-(-50.77)	-	-61.8-(-51.36)	-10056.98-(-10048.96)
			<b>0.9</b>		<b>0.2</b>	<b>0.0001*</b>
9	PO	-14.08-(-15.9)	-15.13-(-16.28)	-14.54-(-15.98)	-14.73-(-16.38)	-
			<b>0.005*</b>	<b>0.008*</b>	<b>0.001*</b>	
Cluster 2						
	R <sup>1</sup>	LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
7	FS	-26.15-(-23.48)	-27.09-(-28.42)	-26.85-(-25.53)	-	-10025.15-(-23.51)
			<b>0.017*</b>	<b>0.027*</b>		<b>0.078*</b>
22	HS	-39.31-(-41.37)	-39.65-(-41.73)	-	-40.65-(-43.56)	-10038.31-(-10040.37)
			<b>0.0001*</b>		<b>0.0001*</b>	<b>0.0001*</b>
7	PO	-39.95-(-41.61)	-40.5-(-43.26)	-40.03-(-41.65)	-42.25-(-41.95)	-
			<b>0.002*</b>	<b>0.014*</b>	<b>0.007*</b>	
Cluster 3						
	R <sup>1</sup>	LnL(R)	LnL(U)	LnL(HS)	LnL(FS)	LnL(PO)
6	FS	-72.18-(-69.44)	-96.77-(-76.96)	-80.52-(-69.5)	-	-75.47-(-10068.44)
			<b>0.001*</b>	<b>0.007*</b>		<b>0.0001*</b>
17	HS	-84.21-(-57.14)	-92.41-(-60.95)	-	-87.3-(-57.51)	-10083.21-(-10056.14)
			<b>0.0001*</b>		<b>0.0001*</b>	<b>0.0001*</b>
5	PO	-78.15-(-52.94)	-98.24-(-68)	-82.55-(-55.87)	-80.48-(-56.32)	-
			<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.019*</b>	

R = relatedness, LnL = Ln of the Likelihood, U = unrelated, HS = half siblings, FS = full siblings, PO = parent/offspring.

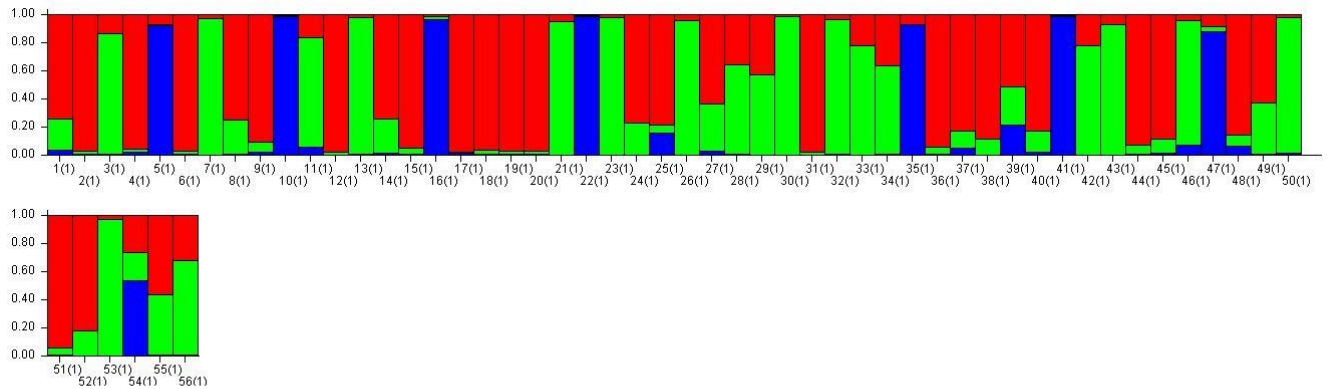
<sup>1</sup> Probable relationship assigned by Maximum Likelihood in ML Relate (Kalinowski et al. 2006).

\* Significant difference.

Figures.

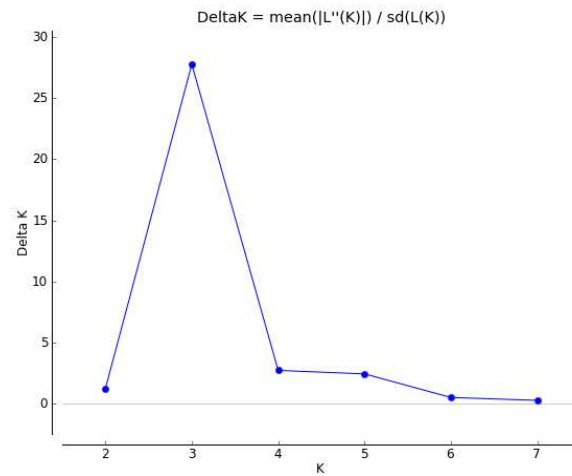


**Fig. 1** Historical and current distribution of the jaguar in México (data based on surveys carried out annually since 2008, modified from Ceballos et al. 2011).

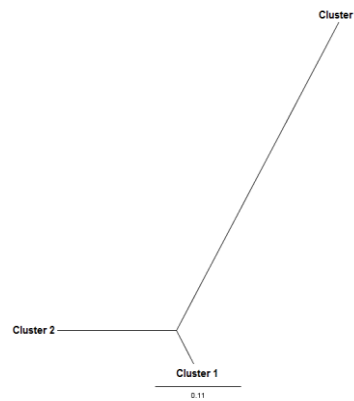


**Fig. 2** Estimation of genetic ancestry in each of the three inferred clusters for the 56 captive jaguars using STRUCTURE 2.3.4. Each individual is represented by a single vertical line divided into k-coloured ensemble. Colour length in vertical lines represents the proportion of ancestry from each of the three inferred clusters in each individual. Each number corresponds to an individual and the number inside the brackets represents the captive population.

## Supporting information



**Figure A1.** Evanno et al. (2005) plot detecting the number of  $K$  groups that best fit the data.



**Fig. A2** Unrooted tree constructed by the NJ method using the estimated Nei's standardized genetic distances (Nei 1972) among clusters.

**Table A1** Hardy-Weinberg and inbreeding coefficients of Weir and Cockerham (W&C) for the Captive Jaguar Population (CJP) and for each Cluster, values in bold were significant deficiency of heterozygosity ( $P \leq 0.01$ ) with the correction of FDR.

Locus	CJP		Cluster 1		Cluster 2		Cluster 3	
	Fis W&C	$P$	Fis W&C	$P$	Fis W&C	$P$	Fis W&C	$P$
FCA24	0.11	0.27	0.09	0.33	-0.06	0.66	0.25	0.08
FCA26	-0.12	0.98	-0.07	0.88	-0.13	0.89	-0.48	1
FCA43	0.08	0.14	0.04	0.38	0.15	0.13	-0.17	1
FCA77	0.13	0.05	-0.09	0.85	0.19	0.14	-0.30	1
FCA82	0.08	<b>0</b>	-0.12	0.07	-0.05	1	-0.07	0.54
FCA90	0.09	0.1	-0.03	0.50	0.11	0.34	0.07	0.48
FCA115	0.14	<b>0</b>	0.09	0.09	0.30	0.01	-0.25	1
FCA126	0.12	0.32	-0.02	0.62	0.26	0.16	0.07	0.7
FCA176	0.10	0.10	0.06	0.35	0.23	0.08	-0.49	1
FCA547	0.21	<b>0</b>	0.05	0.06	0.35	<b>0</b>	-0.21	1
FCA566	0.20	<b>0</b>	0.14	0.17	0.31	<b>0</b>	-0.01	0.27

Mean	0.10	0.01	0.15	-0.14
------	------	------	------	-------

**Table A2** Number of genotypes per locus, for the Captive Jaguar Population (CJP) and for each of the clusters analyzed.

Locus	CJP	Homozygote	Heterozygote	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
FCA24	12	3	9	10	6	5
FCA26	10	1	9	10	4	3
FCA43	6	3	3	6	6	2
FCA77	17	4	13	13	7	3
FCA82	12	4	8	9	3	5
FCA90	14	5	9	9	6	5
FCA115	40	7	33	25	12	4
FCA126	10	2	8	8	7	3
FCA176	13	4	9	12	6	3
FCA547	23	5	18	16	10	4
FCA566	19	4	15	16	6	6
Total	176	42	134	134	73	43
Mean	16	3.82	12.18	12.18	6.64	3.91

**Table A3** Bottleneck analysis under three models: IAM, TPM and SMM, with variance = 10 and = 90 % probability and variance = 30 and probability = 70 %, for the Captive Jaguar Population (CJP) and Clusters of *Panthera onca*.

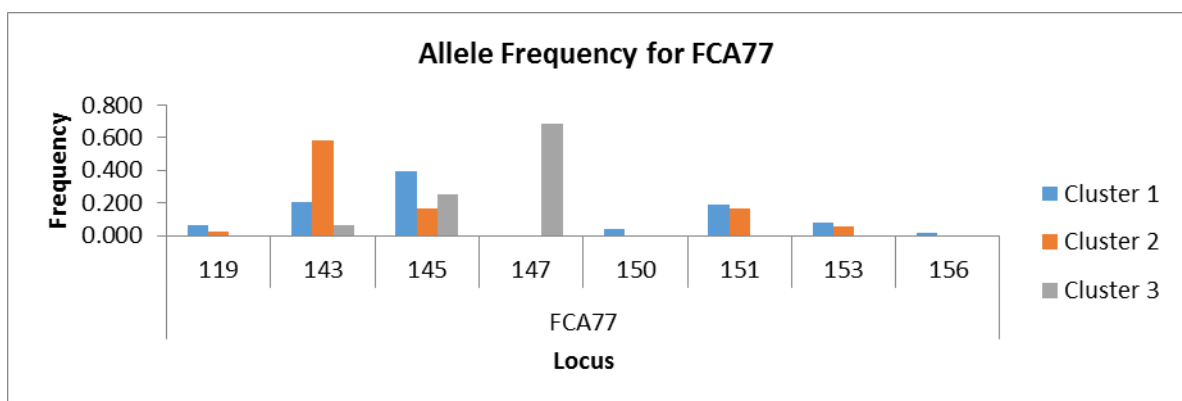
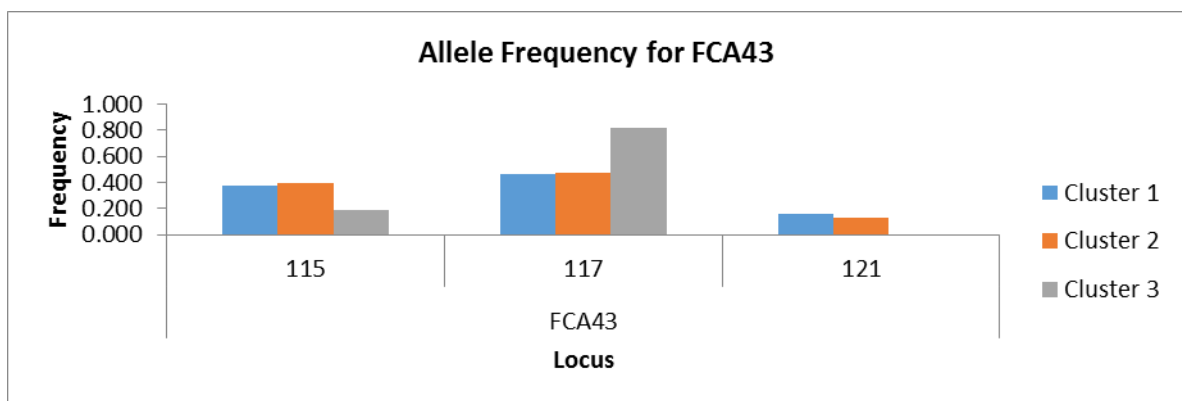
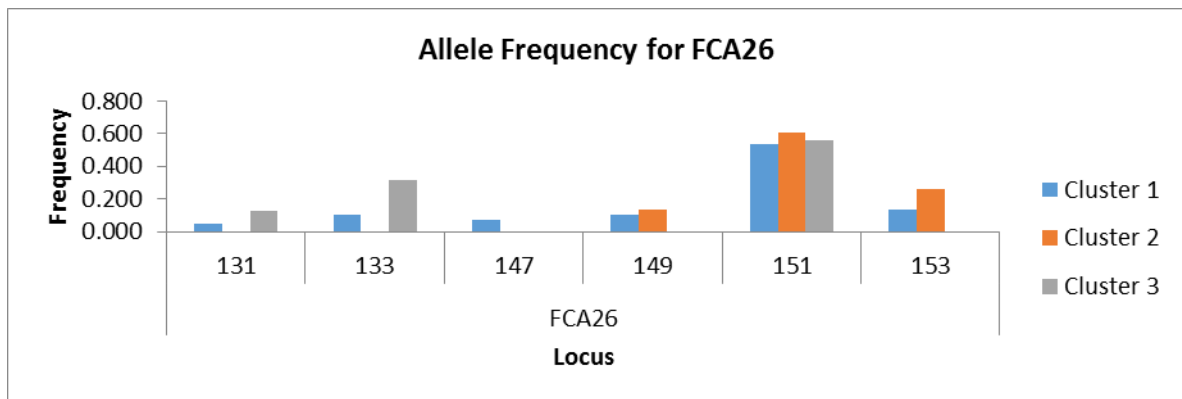
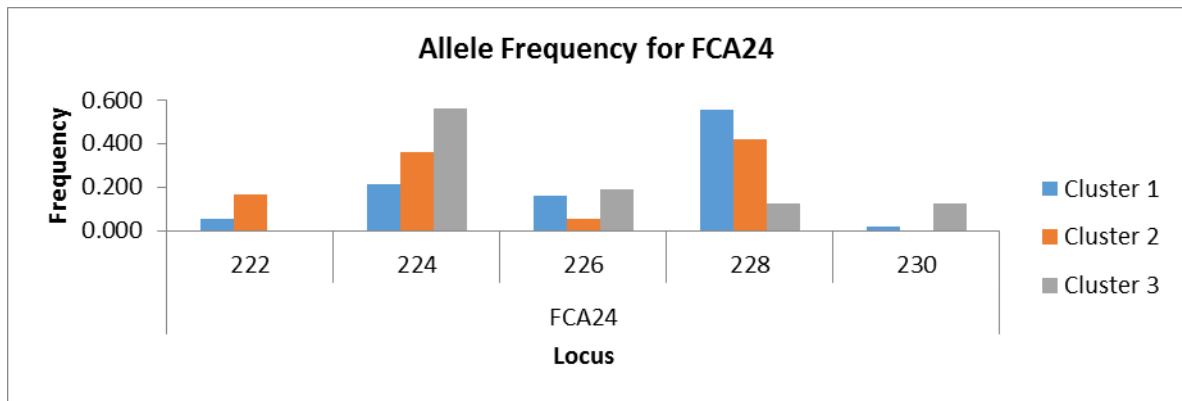
Locus	Variance = 10 Probability = 90 %				Variance = 30 Probability = 70 %			
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM		
	He	Heq	Heq	He	Heq	Heq	Heq	
FCA24	0.685	0.502	0.635	0.669	0.685	0.502	0.585	0.669
FCA26	0.641	0.558	0.703	0.722	0.641	0.571	0.656	0.724
FCA43	0.595	0.318	0.428	0.461	0.595	0.315	0.382	0.450
FCA77	0.781	0.671	0.776	0.798	0.781	0.668	0.745	0.802
FCA82	0.630	0.637	0.747	0.772	0.630	0.637	0.710	0.771
FCA90	0.738	0.514	0.642	0.674	0.738	0.521	0.591	0.673
FCA115	0.930	0.868	0.914	0.921	0.930	0.866	0.901	0.920
FCA126	0.635	0.576	0.699	0.724	0.635	0.573	0.651	0.722
FCA176	0.772	0.571	0.699	0.727	0.772	0.572	0.655	0.725
FCA547	0.846	0.664	0.775	0.799	0.846	0.660	0.736	0.802
FCA566	0.823	0.728	0.826	0.844	0.823	0.727	0.793	0.843
Wilcoxon (one-tailed for heterozygosity excess)		$P = 0$	$P = 0.18$	$P = 0.61$		$P = 0$	$P = 0$	$P = 0.58$

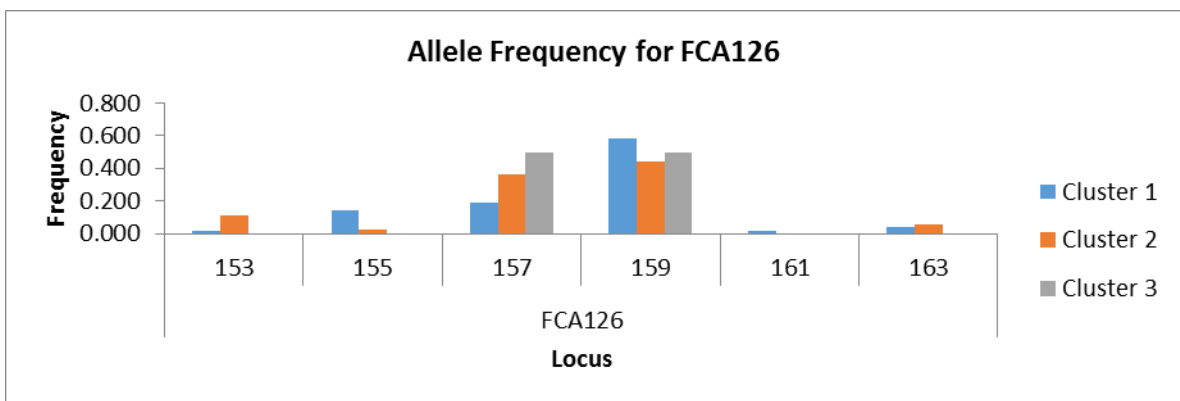
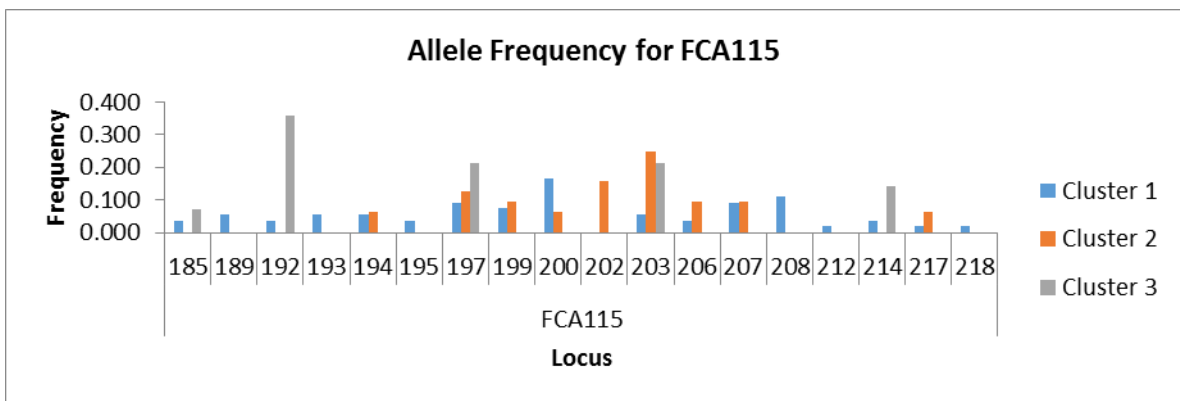
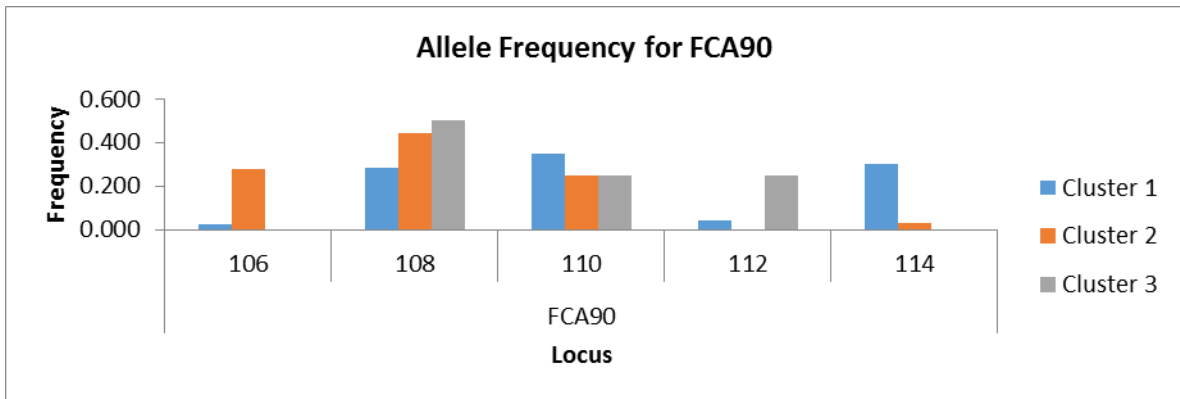
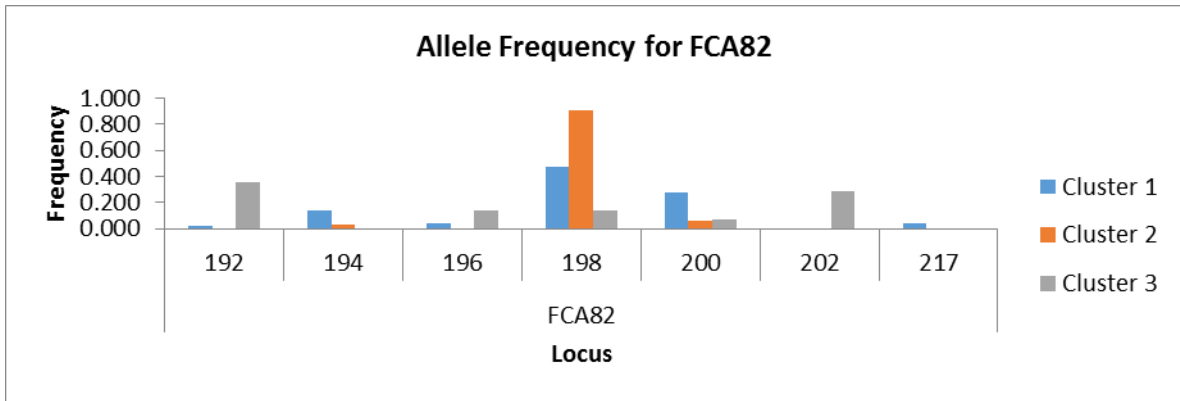
Locus	Variance = 10 Probability = 90 %				Variance = 30 Probability = 70 %			
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM		
	Heq	Heq	Heq	Heq	Heq	Heq	Heq	
FCA24	0.63	0.561	0.665	0.685	0.63	0.555	0.624	0.685
FCA26	0.678	0.613	0.719	0.744	0.678	0.619	0.683	0.740
FCA43	0.629	0.361	0.463	0.482	0.629	0.359	0.413	0.468
FCA77	0.768	0.688	0.771	0.787	0.768	0.693	0.745	0.788
FCA82	0.69	0.647	0.729	0.75	0.69	0.645	0.701	0.753
FCA90	0.72	0.578	0.675	0.692	0.72	0.579	0.639	0.694

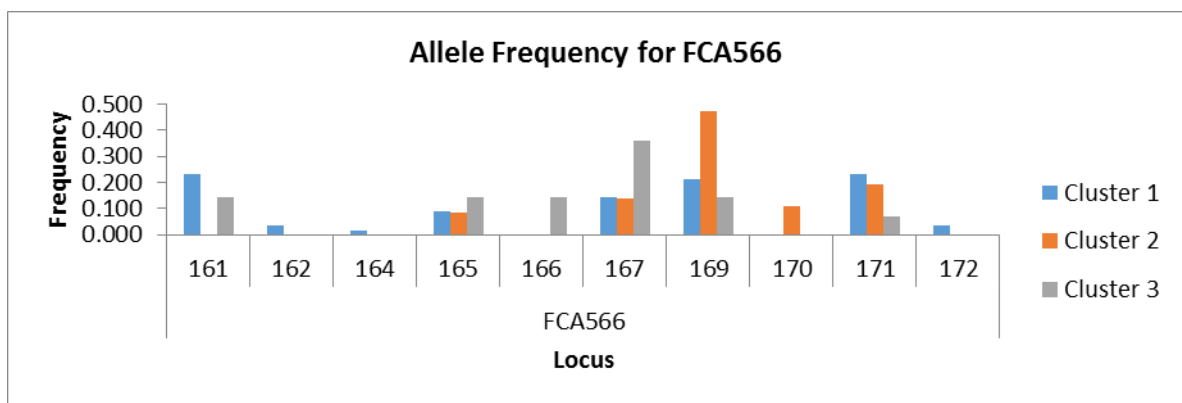
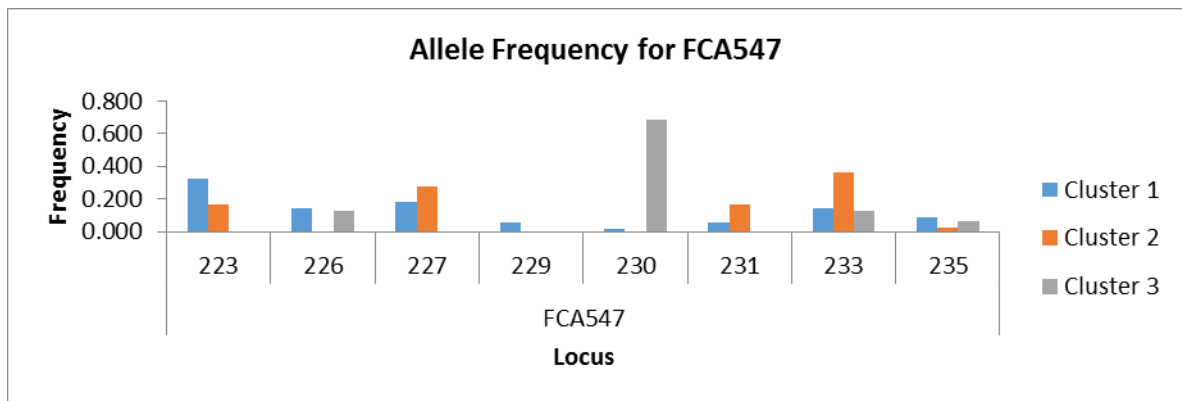
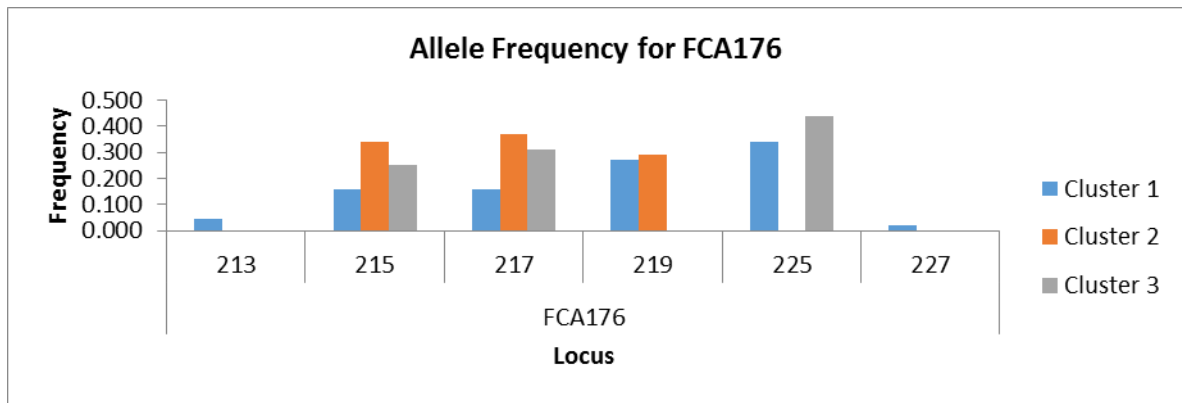
FCA115	0.934	0.895	0.924	0.929	0.934	0.897	0.917	0.928
FCA126	0.613	0.644	0.726	0.749	0.613	0.636	0.693	0.745
FCA176	0.774	0.643	0.732	0.745	0.774	0.650	0.698	0.751
FCA547	0.825	0.713	0.798	0.814	0.825	0.723	0.773	0.813
FCA566	0.83	0.719	0.795	0.814	0.83	0.712	0.769	0.815
Wilcoxon (one-tailed for heterozygosity excess)	$P = 0$	$P = 0.23$	$P = 0.68$		$P = 0$	$P = 0.04$	$P = 0.76$	

Cluster 2	Locus	Variance = 10 Probability = 90 %				Variance = 30 Probability = 70 %			
		He	IAM Heq	TPM Heq	SMM Heq	He	IAM Heq	TPM Heq	SMM Heq
		FCA24	0.684	0.510	0.604	0.632	0.684	0.521	0.572
FCA26	0.562	0.389	0.477	0.494	0.562	0.402	0.451	0.495	
FCA43	0.619	0.393	0.481	0.499	0.619	0.399	0.440	0.494	
FCA77	0.617	0.592	0.688	0.707	0.617	0.599	0.654	0.705	
FCA82	0.179	0.412	0.487	0.491	0.179	0.396	0.459	0.503	
FCA90	0.681	0.513	0.603	0.624	0.681	0.516	0.572	0.622	
FCA115	0.887	0.806	0.853	0.859	0.887	0.810	0.836	0.860	
FCA126	0.675	0.604	0.685	0.707	0.675	0.605	0.657	0.702	
FCA176	0.681	0.390	0.475	0.503	0.681	0.397	0.450	0.501	
FCA547	0.757	0.608	0.690	0.705	0.757	0.604	0.660	0.705	
FCA566	0.721	0.595	0.688	0.707	0.721	0.605	0.653	0.706	
Wilcoxon (one-tailed for heterozygosity excess)	$P = 0.01$	$P = 0.1$	$P = 0.18$		$P = 0.01$	$P = 0.04$	$P = 0.36$		

Cluster 3	Locus	Variance = 10 Probability = 90 %				Variance = 30 Probability = 70 %			
		He	IAM Heq	TPM Heq	SMM Heq	He	IAM Heq	TPM Heq	SMM Heq
		FCA24	0.658	0.618	0.667	0.675	0.658	0.607	0.648
FCA26	0.608	0.487	0.540	0.555	0.608	0.480	0.511	0.558	
FCA43	0.325	0.294	0.326	0.336	0.325	0.295	0.310	0.329	
FCA77	0.492	0.483	0.536	0.550	0.492	0.479	0.519	0.556	
FCA82	0.802	0.728	0.766	0.770	0.802	0.728	0.757	0.774	
FCA90	0.667	0.478	0.540	0.549	0.667	0.490	0.524	0.554	
FCA115	0.813	0.726	0.767	0.776	0.813	0.727	0.752	0.774	
FCA126	0.533	0.298	0.326	0.340	0.533	0.294	0.307	0.330	
FCA176	0.692	0.481	0.538	0.552	0.692	0.481	0.517	0.554	
FCA547	0.525	0.615	0.669	0.680	0.525	0.614	0.648	0.681	
FCA566	0.846	0.797	0.823	0.828	0.846	0.798	0.815	0.829	
Wilcoxon (one-tailed for heterozygosity excess)	$P = 0$	$P = 0.08$	$P = 0.12$		$P = 0$	$P = 0.03$	$P = 0.13$		







**Fig. A3** Allelic frequencies for each locus and clusters for *Panthera onca*.