

105

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**“DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD Y  
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA POR MEDIO DE  
MICROSATÉLITES DE TONINAS *Tursiops truncatus*,  
EN EL PARQUE DE XCARET, QUINTANA ROO, MÉXICO”.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G A**  
P R E S E N T A :  
**VALENTINA ISLAS VILLANUEVA**

TUTOR DE TESIS:  
DR. BULMARO CISNEROS VEGA

CO-TUTOR:  
DR. ALBERTO DELGADO ESTRELLA



2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Determinación de paternidad y  
caracterización genética por medio de microsateélites de toninas Tursiops  
truncatus, en el parque de Xcaret, Quintana Roo, México"

realizado por Valentina Islas Villanueva

con número de cuenta 9452944-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

*Bulmaro Cisneros Vega*

Propietario

M. en C. Alberto Delgado Estrella

*[Signature]*

Propietario

Dr. Luis Medrano González

Suplente

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

*Blanca Estela Hernández Baños*

Suplente

Dra. Haydeé Rosas Vargas

*[Signature]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de

*[Signature]*

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Ante todo quiero agradecer infinitamente a mi mamá por su apoyo y sacrificios a lo largo de toda mi vida y decirle que es por sus esfuerzos y su cariño que he logrado concluir mi carrera y es por eso que quiero dedicarle este trabajo.

A mi padre y mi hermana por el apoyo económico que me brindaron durante mis estudios, sin su ayuda no habría podido concluir.

Este trabajo no se habría realizado de no ser por la confianza y el apoyo del Dr. Alberto Delgado Estrella, co-director de esta tesis, a quien siempre voy a agradecer por esta oportunidad, por creer en mí sin ninguna referencia, por sus regaños, su ayuda y su experiencia sin las cuales mi formación como bióloga estaría incompleta, por todas esas maravillosas salidas al campo que me dieron la visión real del trabajo de campo y me ayudaron a decidir que quiero continuar en este camino y sobre todo por ser un ejemplo de disciplina, perseverancia e inteligencia.

A Via Delfi y principalmente al Ing. Adán Zurbía igualmente por la confianza al encomendarme este trabajo y sobre todo por la inmensa paciencia y el apoyo total e inmediato tanto económico como logístico que me brindaron a lo largo de toda la tesis a pesar de los inconvenientes y problemas.

Durante los dos años que duró la fase experimental recibí consejos y ayuda de muchísimas personas del CINVESTAV, donde se realizó esta tesis. Principalmente quiero agradecer de manera especial al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por arriesgarse en un campo de trabajo que no es el suyo, los delfines, permitiéndome llevar a cabo este proyecto, poniendo a mi disposición todos los recursos de su laboratorio, sus conocimientos, su tiempo y su personal. A su esposa Ale, por ayudarme con muchísimos experimentos con sus conocimientos, experiencias, tiempo y recursos.

A todos mis compañeros del laboratorio 12: Everardo, Liz, Leonor, Pris. Rossy, Rafita, Luigi, Oscarín y Marco por sus opiniones y consejos en todo momento, por soportar mis explosiones y estar conmigo en los sube y bajas de la experimentación haciéndolo todo mucho más llevadero y agradable. A Pablo, el auxiliar del laboratorio, por enseñarme las bases del trabajo de laboratorio y encargarse de pedidos, reactivos, etc. Igualmente quiero agradecer a Vic por todo su trabajo indispensable para que pudiese realizar mis experimentos.

De otros laboratorios también recibí mucha ayuda de: Adán, Anabel, Lalo, Mario Guapillo, Alberto Marroquí, Enrique Villa, Adriana y Armando Valencia.

A Fabiola Castorena Torres del departamento de Toxicología por la técnica de extracción de DNA a partir de perclorato de sodio que me facilitó muchísimo la vida en una etapa difícil de experimentación.

A Rocío Arroyo por la invaluable ayuda en todo momento con mis trámites, papeles, llamadas, cartas, etc. Gracias Rosy.

De todos mis compañeros del laboratorio quiero agradecer de manera muy especial a mi eterno salvador, Eve, gracias por toda tu paciencia y tranquilidad que me salvaron el pellejo mas de una vez, apareciendo siempre en medio de mis crisis históricas y resolviéndolo todo, sabes que siempre voy a estar en deuda contigo, donde quiera que estés.

Del Centro Médico quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Haydeé Rosas Vargas, por su asesoría experimental, consejos, comentarios y críticas que me ayudaron muchísimo en la realización de mi tesis y sobre todo por su cariño y apoyo como amiga.

Al Dr. Ramón Coral por sus consejos, comentarios, disponibilidad y alegría en todo momento. Al Dr. Diego Arenas por su asesoría en las pruebas de paternidad y a todos mis amigos de ese laboratorio: José Luis, Israel, Adriancito, Paul, Pedro y Javier.

Al Dr. Luis Medrano por todas sus críticas y conocimientos que me ayudaron a mejorar muchísimo este trabajo, por su trayectoria y labor dentro del área de los mamíferos marinos que son una gran fuente de inspiración académica para mí.

To Dr. Andrew Dizon, for all the help you gave me without even knowing me. For solving all my doubts and problems immediately and for all the literature, precious gifts, I got from you, thank you very much.

A mis queridísimos vecinos Anita y Gabriel, quienes me recibieron tantas veces en su casa y me ayudaron a resolver problemas, estuvieron pendientes de mi trabajo y me apoyaron en todo momento, gracias por todo.

Till familjen i Sverige alting jag bodde med er hjälpte mig att skaffa självständighet, kraften, stabilitetet, visdom och självförtroende som jag behövde för att göra klart min utveckling. Jag älskar er så jätte mycket.

A todos mis amigos quienes siempre estuvieron ahí para escuchar mis quejas, para darme ánimos cuando estuve a punto de claudicar, por su paciencia, sus consejos y sobre todo por su cariño: Chofi, Lui, Iric, Liz, Haydeé, Lorena Cabrera, Lorena V, Mauricio Cruz, Mauricio Ruvalcaba, Rodrigo Planter, Octavio, Poncho, Erendira, Siriobska, Abel, Tanya, Pequeña Aida, Gaby, Luciana, Katush, Fabi, Leo, Charly, Chucho, José Jaime, Inti y Víctor Hugo. A Juan Fernando por su amor, atención y amistad y a Rubén por tantas lecciones de vida...

# ÍNDICE GENERAL

	Página	
1.1	Resúmen	3
1.2	Introducción	4
1.3.1	Biología de la especie	4
1.3.2	Marcadores genéticos nucleares: Microsatélites	7
1.3	Antecedentes	9
1.4.1	Estudios moleculares en cetáceos	9
1.4.2	Estudios moleculares en <i>Tursiops truncatus</i>	11
1.4	Justificación	13
1.5	Objetivo General	14
1.6	Material y Método	15
1.7.1	Extracción de DNA	15
1.7.2	PCR	17
1.7.3	Electroforesis vertical	18
1.7	Resultados	20
1.8.1	Extracción de DNA	20
1.8.2	PCR	25
1.8.3	Análisis de los marcadores polimórficos	32
1.8.4	Pruebas de paternidad	36
1.9	Discusión	44
1.10	Conclusiones	49

1.11	Literatura citada	50
1.12	Apéndice A Índice de Tablas y Figuras	56
1.13	Apéndice B Abreviaturas	58
1.14	Apéndice C Soluciones empleadas	60

## 1.2 RESÚMEN

El delfín *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), bufeo o tonina es la especie de odontoceto más conocido y estudiado, esto se debe a sus hábitos costeros y a la adaptación que ha desarrollado al cautiverio en todo el mundo. Estos delfines presentan un sistema de apareamiento poligínico y se describen como una especie promiscua. Las hembras alcanzan la madurez sexual desde los ocho años (promedio 10.6) y los machos entre los 10 y los 15 (Mead y Potter, 1990).

Esta especie se explota de varias maneras; frecuentemente se emplea para espectáculo y exhibición (Ortega-Ortiz, 1996) lo que hace importante su desarrollo y adaptación al cautiverio. El éxito en el establecimiento de estas poblaciones cautivas depende directamente de su manejo genético y demográfico (Foose, 1983). En el presente estudio se emplearon microsatélites para confirmar la paternidad de crías de toninas *Tursiops truncatus*, en condiciones naturales en el parque de XCARET, Quintana Roo, México.

Se obtuvieron muestras de sangre de madres, crías y machos involucrados en los casos de paternidad desconocida. La toma de sangre fue realizada por veterinarios y entrenadores del parque Xcaret y posteriormente enviada al laboratorio en la ciudad de México. Se estandarizaron y compararon en eficiencia dos diferentes técnicas de extracción de DNA a partir de sangre total junto con dos diferentes anticoagulantes. Una vez obtenido el DNA genómico se realizaron reacciones de PCR con iniciadores reportados en la literatura para microsatélites de esta especie. La integridad de los productos de PCR se confirmó corriendo las muestras en geles de agarosa al 2%. Posteriormente los productos se corrieron en geles de poliacrilamida cuya concentración varió del 6% al 12% dependiendo del grado de polimorfismo de cada marcador. Los tamaños de los alelos se determinaron por medio de una curva de calibración a partir de las fotografías. Para las pruebas de determinación de paternidad se corrieron los productos de PCR de los tres machos considerados como posibles padres junto con la o las crías y sus madres. Se probaron cuatro microsatélites, de los cuales, los marcadores, D08 y D22 resultaron ser más polimórficos y por lo tanto útiles en la confirmación de la paternidad de las crías.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se pudieron determinar cuatro casos de paternidad (57%) de manera directa y uno de forma indirecta. Los datos moleculares son congruentes con las observaciones del personal del parque en cuanto a la conducta de estos animales.

## 1.2 INTRODUCCIÓN

### 1.2.1 Biología de la especie

#### A) Clasificación y características morfológicas

El delfín *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), bufeo o tonina es la especie de odontoceto más conocido y estudiado, esto se debe a sus hábitos costeros y la adaptación que ha desarrollado al cautiverio en todo el mundo. Es un animal grande y robusto cuyo rostro sobresale del melón por un pliegue. La aleta dorsal es alta y falcada y se localiza cerca de la mitad del dorso (Jefferson *et al.*, 1993).

En el dorso, el color del cuerpo es uniformemente gris, variando de un gris claro a otro más oscuro o café. Los costados son más claros, el vientre tiende al blanco y en ocasiones es rosáceo (Tinker, 1988). El vientre y los costados algunas veces presentan manchas y hay una franja negra que va del ojo a la aleta dorsal y una tenue capa oscura en el dorso que sólo se aprecia de cerca (Jefferson *et al.*, 1993).

Los adultos miden de 1.9 a 3.8 m siendo los machos más grandes que las hembras. Las crías al nacer miden de 1.0 a 1.3 m. El peso máximo registrado es de 650 kg (Jefferson *et al.*, 1993; Mead y Potter, 1990). Los dientes son grandes, agudos y por lo general miden de 10-13 mm de diámetro y van de 18 a 26 en cada rama. En el cuello, la primera y segunda vértebra están unidas (Tinker, 1988).

#### B) Distribución geográfica

Se localizan principalmente en regiones costeras templadas y tropicales (Shane, 1988). La densidad poblacional parece ser mayor cerca de la costa. Se sabe que también habitan aguas pelágicas. A excepción de su presencia en el Reino Unido y el norte de Europa generalmente no se encuentran más allá de los 45° de latitud en ninguno de los hemisferios (Jefferson *et al.*, 1993).

#### C) Estructura social y comportamiento

Por lo general nadan juntos en agrupaciones de menos de 20 animales, aunque se han observado grandes congregaciones de varios cientos lejos de la costa (Jefferson *et al.*, 1993). Lo más común es observarlos en agrupaciones pequeñas de dos a 15 animales. Una excepción notable se reportó en Sudáfrica donde el grupo iba de tres a 1000 individuos con una media de 140 (Saayman y Tayler, 1973 En: Shane *et al.*, 1986).

La estructura del hábitat y los patrones de actividad aparentemente son los factores primarios de influencia en el tamaño del grupo, el cual en general tiende a aumentar con la profundidad o la amplitud del territorio. Las razones para esto pueden estar relacionadas con el forrajeo y la protección contra depredadores (Shane *et al.*, 1986).

Los lazos madre-cría son muy fuertes, el resto de los individuos pueden ser vistos en diferentes asociaciones. Son animales activos sobre todo cuando se alimentan o están socializando; golpean el agua con la cola y realizan varios comportamientos aéreos. Los picos de observación de crías recién nacidas son en primavera y verano o primavera y otoño en la mayoría de las poblaciones. Son oportunistas en su alimentación y aparentemente comen cualquier tipo de peces disponibles en la época y comúnmente caen en redes de pesca (Jefferson *et al.*, 1993).

Presentan un sistema poligínico y se describe como una especie promiscua. Las hembras alcanzan la madurez sexual desde los ocho años (promedio 10.6) y los machos entre los 10 y los 15 (Mead y Potter, 1990). El periodo de gestación es aproximadamente de un año (Shane *et al.*, 1986 ; Tavolga y Essapian, 1957) y el de lactancia de 12 a 18 meses. Se propone que los partos ocurren en intervalos de dos años y las crías permanecen con sus madres de tres a seis años (Mead y Potter, 1990).

Las poblaciones de *Tursiops truncatus* estudiadas, tienen una estructura social jerárquica. Un macho adulto mayor es el individuo dominante. Shinohara y Takenaka (1995 en Pérez-Cao, 1996) plantean que este no se queda más de la mitad de un año en un grupo donde se reproduzca. Duffield y Wells (1991 en Pérez-Cao, 1996) sugieren que forman asociaciones temporales con grupos matrilocales. No hay relaciones monogámicas por largo tiempo y algunos análisis genéticos han determinado que las crías de una hembra pueden tener diferentes padres (Wells, 1993 en Pérez-Cao, 1996).

Varios estudios sugieren la presencia de dos formás de tonina, *Tursiops truncatus* en las aguas del sureste de USA, una forma grande y oceánica y otra pequeña y costera (Mitchel, 1975, Leatherwood y Reeves, 1982 y Perrin, 1984 en Hersh y Duffield, 1990). Además de las diferencias morfológicas se registran diferencias en los perfiles de hemoglobinas (concentración de Hb, volumen de células empaçadas, conteo de eritrocitos y tipo de Hb). Estos parámetros fueron encontrados también en las poblaciones de delfines al noroeste del océano Atlántico. El ecotipo oceánico mostró valores mayores en estos parámetros comparados con el ecotipo costero. Se sugiere que estas adaptaciones fisiológicas y morfológicas están relacionadas con las diferencias de habitat y alimento (Hersh y Duffield, 1990). Hoelzel *et al.* (1998a) encontraron diferencias entre ambas

formas, costera y oceánica de la costa del este de Norteamérica comparando marcadores genéticos mitocondriales y nucleares.

#### **D) Importancia ecológica y económica**

Esta especie se explota de varias maneras: para espectáculo y exhibición (Ortega-Ortiz, 1996), como carnada para tiburón (Gallo, 1986; Delgado-Estrella, 1991 y López-Hernández, 1997) y en programas interactivos de humanos con delfines para entretenimiento y terapia de patologías como el autismo (Simmonds, 1991 en Pérez-Cao, 1996). En otros países forman parte de programas de ecoturismo como "Whalewatcher" y "Dolphin watch trip" (Hoyt, 1994 en Pérez-Cao, 1996).

#### **E) Cautiverio**

Gracias a su gran adaptación al cautiverio es que esta especie puede ser tan ampliamente estudiada en comparación con el resto de los cetáceos. Tavolga y Essapian (1957) documentaron el comportamiento reproductivo, gestante y de crianza en una colonia cautiva de *Tursiops truncatus* en Marine Studios. Posteriormente, Tavolga (1966) describió los aspectos más relevantes sobre los diversos patrones conductuales y las interacciones sociales en una colonia de 12 animales cautivos.

Ridgway y Benirschke (1977) realizaron un taller para promover las metas del Acta de Protección de mamíferos marinos de 1972, en donde se enfatizó la importancia de los animales en cautiverio para la conservación de las especies.

En nuestro país hasta antes de 1994 se registraron seis nacimientos de toninas en condiciones de cautiverio en delfinarios ubicados en la Cd. de México (parque "Atlantis" y parque "Aragón"); en Acapulco, Guerrero ("Cidi"); en Cuernavaca, Morelos ("Jungla Mágica") y en Guadalajara, Jalisco. Ninguna de estas crías sobrevivió (Gómez-Rubio *et al.*, 1994).

Gómez-Rubio *et al.* (1994) observaron el comportamiento alimentario de una cría de *Tursiops truncatus* en condiciones de semicautiverio en el parque Xcaret, en Quintana Roo, México y registraron lo que hasta el momento es la edad más temprana de inicio del consumo de alimento sólido en condiciones de cautiverio.

Delgado-Estrella *et al.* (1999) informan que en el parque de Xcaret, se ha logrado obtener la tasa de sobrevivencia más elevada para toninas *Tursiops truncatus* nacidas en cautiverio en nuestro país. De las ocho crías nacidas hasta 1998, seis han sobrevivido más de seis meses y de las otras dos, una murió durante el parto y otra poco después de haber nacido.

## 1.2.2 Marcadores genéticos nucleares: Microsatélites.

La técnica molecular de PCR (Reacción en Cadena de la DNA polimerasa) es un proceso que duplica un fragmento específico de DNA de manera exponencial (Mullis, 1990). La PCR explota ciertos aspectos de la replicación del DNA. La DNA polimerasa emplea DNA de una sola banda como molde para la síntesis de una nueva banda complementaria. Estas bandas sencillas de DNA que funcionan como moldes se pueden producir simplemente calentando DNA de doble hélice a temperaturas cercanas a la ebullición. La DNA polimerasa también requiere de una pequeña sección de DNA de doble hélice para iniciar la síntesis. Por eso el punto de inicio de la síntesis de DNA, puede ser especificado agregando un oligonucleótido iniciador que se una a la planilla en ese punto. La síntesis de DNA de una región específica puede ser dirigida por la DNA polimerasa, este es uno de los aspectos más importantes de la PCR, (Watson *et al.*, 1992).

Ambas bandas de DNA pueden servir como moldes para la síntesis mientras se les agregue un iniciador a cada una. Los iniciadores se emplean para flanquear la región de DNA que se quiere amplificar para que las bandas recién sintetizadas de DNA, que comienzan en cada iniciador, se extiendan más allá de la posición del iniciador en la banda opuesta. Por esto los nuevos sitios de unión del iniciador se generan en cada banda recién sintetizada de DNA. La mezcla se calienta una vez para más ciclos de hibridación de bandas y síntesis de DNA. Otro aspecto importante de la técnica es que resulta en la amplificación de una región específica que se determina por la ubicación de los iniciadores en el DNA molde (Watson *et al.*, 1992).

La aplicación de las técnicas de caracterización del DNA en la identificación de individuos proveen gran información en los análisis de material biológico obtenido en casos criminales o de paternidad disputada. Varios aspectos de la PCR la hacen ideal para casos difíciles ya que no se requiere que el DNA esté purificado y de igual modo se puede amplificar DNA degradado que puede contener los pequeños fragmentos de interés intactos (Griffin y Griffin, 1995). La sensibilidad de la técnica permite amplificar a partir de cantidades diminutas de DNA. Higuchi *et al.* (1998) mostraron que es posible amplificar fragmentos de DNA a partir de un solo cabello, por su parte Li *et al.* (1998) amplificaron DNA por PCR a partir de un espermatozoide humano y de células diploides.

La elección del método empleado para PCR se determina con base en el tipo de polimorfismo que se requiere analizar. Los métodos basados en PCR de DNA más utilizados en la identificación de individuos y en las ciencias forenses incluyen el análisis de mini y microsatélites, hibridación de oligonucleótidos alelo-específicos y determinación de la secuencia de los nucleótidos del DNA mitocondrial (mtDNA) (Griffin y Griffin, 1995).

La existencia de elementos repetitivos simples en genomas eucarióticos ha sido documentada desde los 1970's. El nombre designado para estas unidades es VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) que incluye tanto minisatélites como microsatélites (Bruford y Wayne, 1993). Los microsatélites también llamados STR, SSR y SLP (Short Tandem Repeats, Simple Sequence Repeats y Single Strand Length Polymorphisms) (Bruford y Wayne, 1993; Koorey *et al.*, 1992; Tautz y Renz, 1984) son pequeños segmentos de DNA distribuidos ampliamente en genomas eucarióticos (Tautz y Renz, 1984) donde se repiten secuencias de una a seis bases hasta más de 60 veces (Goldstein y Pollock, 1997). En eucariontes se pueden encontrar estas secuencias al menos cada 10 kb de la secuencia de DNA y comprenden aproximadamente el 5% del genoma (Tautz, 1989).

Es posible elegir iniciadores de PCR que específicamente amplifiquen un locus de microsatélite. La longitud de estos productos por lo general es de 50 a 300 nucleótidos, lo que permite observarlos en geles comunes de secuenciación y registrar incluso diferencias de un solo nucleótido (Tautz, 1989). Una de las mayores ventajas de los análisis con microsatélites es que los alelos se registran de acuerdo a su peso molecular o tamaño (Palsbøll *et al.*, 1997).

Los microsatélites son por lo general estables durante varias generaciones, pero por otro lado son hipervariables en longitud cuando se analizan en individuos no relacionados. Aparentemente el deslizamiento de las cadenas de DNA durante la replicación causa estas variaciones, se esperaría encontrar este mecanismo de constante formación y eliminación de secuencias simples en todas las regiones del genoma que no sufran una fuerte presión de selección (Schlötterer y Tautz, 1992).

Los microsatélites son excepcionalmente variables en el número de alelos debido a las variaciones en el número de repetidos por adición o delección de estos (Tautz, 1993 en: Nauta y Weissing, 1996). La tasa de mutación en los loci de microsatélites es muy alta y parece variar entre  $10^{-5}$  y  $10^{-2}$  (Weber y Wong, 1993) esta tasa de mutación junto con su fácil conteo hace que se consideren en la actualidad los mejores marcadores genéticos para la identificación de individuos (Goldstein y Pollock, 1997; Tautz, 1989), las ciencias forenses (Griffin y Griffin, 1995; Hagelberg *et al.*, 1991) y para analizar especímenes de museo (Ellegren, 1991). También han sido empleados exitosamente en estudios de paternidad, y parentesco en humanos y otras especies (Amos *et al.*, 1993 ; Hagelberg *et al.*, 1991). Por su alto grado de polimorfismo se consideran prometedores para el estudio de la estructura genética de las poblaciones naturales (Tautz, 1989; Nauta y Weissing, 1996).

## 1.3 ANTECEDENTES

El empleo de técnicas bioquímicas a lo largo de los últimos 20 años ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de las relaciones entre especies y a veces de su estructura subespecífica (Sharp, 1976). El empleo de marcadores genéticos representa una alternativa viable a los métodos tradicionales de reconocimiento de individuos ya que son permanentes y existen en todos los individuos (Palsbøll *et al.* 1997).

### 1.3.1 Estudios moleculares en cetáceos

En los cetáceos se han realizado diversos estudios moleculares. Amos *et al.* (1993) caracterizaron genéticamente la estructura social de ballenas piloto, *Globicephala melas*, descubriendo que ninguno de los sexos se dispersa de su grupo natal y que no hay dominancia reproductiva entre machos. Para obtener estos resultados se emplearon secuencias de microsatélites y se descartó la paternidad de los machos del grupo así como el hecho de que no se aparean dentro del grupo natal.

Valsecchi y Amos (1996) obtuvieron y caracterizaron microsatélites a partir de una especie de odontoceto *Physeter macrocephalus* y una de misticeto, *Megaptera novaeangliae*. Los 12 microsatélites obtenidos se probaron en 30 especies diferentes de cetáceos representando 10 de las 13 familias vivientes (24 odontocetos y seis misticetos) para casi la mitad de las especies probadas se identificaron cinco o más loci polimórficos. Este trabajo se realizó para identificar microsatélites que fueran útiles en estudios de estructuras poblacionales y sistemas reproductivos en ballenas y delfines.

Para el cachalote *Physeter macrocephalus* Richard *et al.* (1996) examinaron las relaciones de parentesco entre grupos (10-30 individuos) de hembras maduras y juveniles de ambos sexos con microsatélites, secuencias de mtDNA y marcadores ligados al sexo. Se muestrearon tres grupos de las aguas oceánicas de Ecuador. Las relaciones fueron mayores dentro de los grupos que entre grupos. Estos datos son consistentes con el hecho de que en cada grupo hay varias líneas maternas de las cuales los machos se dispersan aproximadamente a la edad de seis años, también hay indicios de relaciones paternas entre individuos del grupo con diferentes haplotipos mitocondriales lo que sugiere largas asociaciones entre diferentes líneas maternas.

Clapham y Palsbøll (1997) publicaron los resultados de análisis moleculares de paternidad para crías de ballena jorobada identificadas individualmente en el Golfo de Maine. Obtuvieron DNA a partir de biopsias de piel de tres hembras adultas y de tres a cinco de sus crías. Con el empleo de microsatélites se obtuvieron al menos tres diferentes alelos parentales en las tres hembras, en tres a cuatro de los seis loci investigados, indicando paternidad múltiple de las crías y por lo tanto la confirmación de un apareamiento promiscuo que ha sido observado en la temporada reproductiva y que es congruente con la ecología social de la especie.

Andersen *et al.* (1997) emplearon isoenzimas y microsatélites para elucidar la estructura genética de tres poblaciones de marsopas *Phocoena phocoena*. Se muestrearon 124 especímenes de marsopas de aguas danesas, del mar del norte y de Groenlandia occidental. Los análisis revelaron que estas tres poblaciones están bien diferenciadas geográfica y genéticamente.

Por otra parte, poblaciones de orcas *Orcinus orca* de las costas desde California hasta Alaska se han estudiado comparando la variación genética en tres marcadores de DNA microsatélite y para las secuencias de 520 pb de la región control del mtDNA. Este estudio distinguió dos tipos de poblaciones, con base en su comportamiento social y de forrajeo (residentes y transitorios), altamente diferenciadas genéticamente. También se encontraron bajos niveles de variación entre poblaciones, consistente con la estructura matrifocal de la población y con un tamaño pequeño de esta (Hoelzel *et al.*, 1998b).

En un estudio genético-histórico con el delfín de Héctor, especie endémica de Nueva Zelanda, Pichler *et al.* (1999) determinaron el impacto de la mortalidad de esta especie comparando muestras desde 1870 hasta 1987 con muestras de 1987-1998. Para este estudio se empleó DNA mitocondrial (mtDNA) y cinco microsatélites que mostraron un decremento en la variabilidad genética de todas las poblaciones.

Un estudio con *Phocoenoides dalli* la marsopa de Dall fue realizado por Escorza-Treviño y Dizon (2000) empleando secuencias de la región de control del mtDNA y microsatélites para estimar los patrones filogeográficos, la estructura de la población intraespecífica y los patrones de dispersión por género.

Escorza-Treviño *et al.* (1999) emplearon tanto marcadores mitocondriales como tres marcadores de microsatélite para confirmar la subdivisión poblacional de los delfines moteados *Stenella attenuata* del Pacífico Oriental Tropical (ETP). Estos autores encontraron diferencias significativas entre individuos costeros y oceánicos y entre poblaciones costeras, mediante el empleo de la región mitocondrial. Sin embargo, con el uso de los microsatélites confirmaron las diferencias entre individuos oceánicos y costeros pero no entre poblaciones.

Garrison *et al.* (1999) realizaron un trabajo similar pero con los delfines giradores o *Stenella longirostris*, trataron de elucidar la estructura genética dentro de las subespecies, empleando tres tipos de marcadores genéticos y comparándolos con rasgos morfológicos y ecológicos. Los marcadores genéticos empleados fueron el DNA mitocondrial y 13 microsátélites. Los autores encontraron variación genética significativa entre poblaciones pelágicas, de aguas someras y de islas así como entre poblaciones de diferentes océanos.

Otro odontoceto muy estudiado genéticamente es la beluga *Delphinapterus leucas*. Buchanan *et al.* (1996) aislaron 15 microsátélites de una librería genómica de beluga y las amplificaron en 100 belugas de dos localidades muy separadas. El estudio reportó 8.6 alelos por locus y una heterocigosidad promedio de 0.65. Gladden *et al.* (1999) obtuvieron resultados con cinco loci de microsátélite. Sus datos indican que hay una homogeneidad entre poblaciones de sitios de veraneo que se cree que pasan el invierno juntas y una diferenciación entre otras poblaciones, principalmente la del mar de Bering con la del Estrecho de Hudson/ BahíaBaffin/ Río San Lorenzo. O'Corry Crowe *et al.* (1999) identificaron 500 individuos de 36 localidades diferentes con ocho loci de microsátélite, para determinar patrones de dispersión. Con esta información se percataron de que poblaciones en riesgo estaban siendo explotadas para la venta de carne de beluga.

### 1.3.2 Estudios moleculares en *Tursiops truncatus*

Duffield y Chamberlin-Lea (1990) analizaron muestras de sangre de 66 toninas *Tursiops truncatus*, en condiciones de cautiverio procedentes del Atlántico Norte, Golfo de México, Pacífico Norte y Golfo de California. Los resultados mostraron que los cariotipos de las toninas del Atlántico y el Pacífico poseían patrones de bandeo similares y un intervalo común de polimorfismos. En este trabajo también se validó el empleo de polimorfismos para cuestiones de paternidad en cuatro casos previamente conocidos.

Shinohara *et al.* (1997) obtuvieron una gran cantidad de microsátélites para poder emplearlos en estudios sociales y de comportamiento de poblaciones silvestres. También probaron la utilidad de la técnica de PCR para la amplificación de regiones de DNA microsátélite en otras cuatro especies de cetáceos (*Grampus griseus*, *Stenella attenuata*, *Globicephala macrorhynchus* y *Megaptera novaeangliae*).

Hoelzel *et al.* (1998a) compararon marcadores nucleares y mitocondriales entre toninas *Tursiops truncatus* costeras y oceánicas y encontraron diferencias genéticas entre ambas formás.

Por su parte Rooney *et al.* (1999) proponen el empleo de microsatélites para examinar el nivel de diversidad genética entre loci y resolver problemas de paternidad. Estos autores encontraron un alto porcentaje de alelos comunes entre los diferentes morfotipos de *Tursiops truncatus* y un bajo nivel de variación genética entre los animales en cautiverio. Ellos sugieren el empleo de esta técnica para el manejo de programas de reproducción de cautiverio.

Möller *et al.* (2001) realizaron un estudio de comportamiento, fotoidentificación y genética en dos poblaciones de toninas costeras, en el sureste de Australia, para investigar su estructura social y genética y probar si las preferencias de asociación están relacionadas con el parentesco. Las relaciones genéticas se establecieron con microsatélites y los linajes maternos a través de SSCP y secuenciando la región control del mtDNA. Asimismo se determinó el sexo de los individuos empleando marcadores ligados al sexo. Los autores encontraron que las asociaciones no son azarosas entre machos y hembras en grupos pequeños y sólo para machos en grupos de talla media. En una de las poblaciones, las asociaciones no fueron azarosas durante la alimentación, mientras que en otras sólo lo eran cuando se encontraban en tránsito. En asociaciones no azarosas las hembras tendían a asociarse con otras hembras cosa que no se observó en los machos.

En el presente trabajo empleamos los iniciadores para el locus Tex Vet 7 caracterizado por Rooney *et al.* (1999) debido a que los autores confirmaron varios casos de paternidad conocida con este marcador y además presentó valores altos de heterocigosidad observada (0.573). En el caso del trabajo de Shinohara *et al.* (1997) los loci más polimórficos fueron D08, D22 y D18 con valores de heterocigosidad de 0.819, 0.756 y 0.769 respectivamente, características por las cuales se eligieron en este trabajo para confirmar la paternidad de las crías.

## 1.4 JUSTIFICACIÓN

Las poblaciones de animales en cautiverio son parte importante de los proyectos de conservación, ya que mantienen varias funciones como:

- \* Proveedores de propágulos para la repoblación de habitats naturales.
- \* Refugio de taxa en peligro de extinción o en situación delicada.
- \* Refuerzo de poblaciones naturales.
- \* Reservorio de células germinales.
- \* Fuente de investigaciones.
- \* Educación ambiental.

El éxito en el establecimiento de estas poblaciones cautivas depende directamente de su manejo genético y demográfico, preservando un cierto grado de diversidad genética (Foose, 1983).

Para este objetivo resulta crucial, seleccionar un grupo de fundadores lo suficientemente diverso genéticamente que estén lo menos relacionados entre sí y manejar con mucho cuidado las subsiguientes cruzas y redistribución periódica de individuos dentro de los grupos (Foose, 1983).

*Tursiops truncatus* es la especie de odontoceto más ampliamente distribuido en el mundo y con una gran capacidad de adaptación al cautiverio por lo que se le explota de manera considerable.

En nuestro país no se ha tenido mucho éxito con la reproducción en cautiverio de esta especie. En estos momentos las crías de *Tursiops truncatus*, nacidas en condiciones de cautiverio en el parque de XCARET, Quintana, Roo; presentan la mayor tasa de sobrevivencia en nuestro país. El manejo reproductivo futuro, de esta población puede representar una perspectiva importante en México para la conservación y la sustentabilidad de esta especie. Por esta razón los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

## **1.5 OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la paternidad de crías de toninas *Tursiops truncatus*, que se encuentran en condiciones naturales en el parque de XCARET, Quintana Roo, México, mediante el uso de microsatélites

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- I. Estandarizar las condiciones para la PCR de los marcadores de microsatélite empleados
- II. Establecer la identidad del producto de PCR, el polimorfismo de los marcadores y su posible empleo en las pruebas de paternidad
- III. Emplear los microsatélites estandarizados para determinar la paternidad de siete crías de *Tursiops truncatus*

## 1.6 MATERIAL Y MÉTODO

### 1.6.1 Extracción de DNA

#### Obtención de Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de delfines adultos y crías, así como muestras de tejido (piel, tejido conjuntivo y músculo) de animales muertos. Estos tejidos se obtuvieron inmediatamente después del deceso del animal, se preservaron en etanol al 70% y se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  por unos meses. Se transportaron congelados a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 48 hrs, una vez en el laboratorio se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de sangre total se obtuvieron por venopunción de la aleta caudal con tubos de vacío vacutainer. Esta operación se llevó al cabo por los entrenadores y médicos veterinarios del parque de Xcaret, quienes entrenan a los animales para que permitan esta maniobra. Las muestras se tomaron en tubos con anticoagulante y se transportaron en termos con bolsas de gel congelado al lugar donde fueron procesadas, el transporte varió de 24 a 72 hrs.

#### A) Extracción de DNA a partir de tejido

La técnica utilizada fue previamente reportada por (Wu *et al.*, 1995). Se maceró un pedazo de tejido (aproximadamente un  $\text{cm}^2$  de piel), que se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (todas las soluciones empleadas en este trabajo se describen en el APÉNDICE A) preparado al instante. El tubo se dejó incubando toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación.

Al día siguiente se agregó EDTA pH 8 hasta quedar a una concentración final de 5 mM y se centrifugó 15 min a 7000 rpm. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a una caja de cultivo P60 o P35, se agregó un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se mezcló rotando la caja.

Se dejó la caja sin mover durante dos horas a  $T^{\circ}\text{A}$  hasta que se observó un precipitado blanco de DNA en el fondo, se decantó el sobrenadante y el DNA se lavó dos veces con un mL de etanol al 70% frío, se dejó secar al aire por 10 min y se disolvió en aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de TE pH 8 a  $37^{\circ}\text{C}$  por dos horas en agitación.

Se analizó la integridad del DNA mediante electroforesis horizontal usando 100 mL de TBE 1X. Se cargaron 3  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra para ácidos nucleicos, junto con 3-10  $\mu\text{L}$  de la muestra de DNA en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que corrieron por 20 min a 90V. La concentración del DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro.

## **B) Extracción de DNA genómico a partir de sangre total**

### **TECNICA I (DTAB-CTAB)**

De acuerdo a Guistincich *et al.* (1991), se colocaron en 2 tubos cónicos de 50 mL, 3 mL de sangre no coagulada a los cuales se les agregaron 6 mL de la solución de lisis. Se mezcló ligeramente y se calentó a 68°C por 10 min. Después de la incubación se agregaron a cada tubo 9 mL de cloroformo, se mezcló por inversión 4-5 veces y se centrifugó a 10 000 rpm 5 min T<sup>o</sup>A.

El sobrenadante se recuperó y se le agregaron 9 mL de agua más 1100 µL de la solución de precipitación, se mezcló por inversión 4-5 veces y se centrifugó a 10 000 rpm 5 min T<sup>o</sup>A. La pastilla se resuspendió en 2 mL de NaCl 1.2 M y se le agregaron 2.5 volúmenes de EtOH 100% se mezcló y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min T<sup>o</sup>A.

El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 300 µL de agua, después se reprecipitó con acetato de amonio 7.5 M (1/2 volumen) y 2 volúmenes de EtOH al 100% frío, se incubó 15 min en hielo y se centrifugó 10 min a 10 000 rpm T<sup>o</sup>A. Por último se lavó la pastilla con EtOH 70% frío y se dejó secar resuspendiendo el DNA en TE o en agua.

### **TÉCNICA II (perclorato de sodio)**

A 5 mL de sangre preservada en EDTA se le adicionaron 20 mL de tampón de lisis I a 4°C. Se mezcló y centrifugo a 4°C por 10 min a 4 200 rpm hasta ver la pastilla. La pastilla se mezcló con: 4.5 mL de tampón de lisis, 125 µL de SDS a 10% (reactivo III) y 1.1 mL de perclorato de sodio (NaClO<sub>4</sub>) 5M (reactivo IV).

Se agitó por 10 min a T<sup>o</sup>A y se le adicionó NaCl 6 M (para precipitar proteína), posteriormente se agitó 15 seg y se centrifugo a 2 520 rpm por 30 min a T<sup>o</sup>A. El sobrenadante se recuperó en un tubo cónico de 50 mL y se le adicionaron 7 mL de isopropanol absoluto a temperatura ambiente. Se lavó con etanol al 70% (2 veces) y se resuspendió en TE para posteriormente mantenerse en agitación a 4°C.

## **C) Purificación de DNA con Fenol-Isoamil-Cloroformo**

Se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo a la solución de DNA, se mezcló vigorosamente 10 seg y se microcentrifugó 15 seg a velocidad máxima y T<sup>o</sup> A, posteriormente se removió cuidadosamente la fase acuosa con el DNA contenido y se transfirió a un nuevo tubo, en donde se adicionaron 1/10 vol de

acetato de sodio 3 M, pH 5.2 a la solución de DNA y se mezclaron con vortex, posteriormente se adicionaron de 2 a 2.5 vol de etanol al 100 % (frío), se mezcló y puso en hielo por cinco min. Después se microcentrifugó por cinco min a 10 000 rpm y se removió el sobrenadante. Por último se adicionó 1mL de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se microcentrifugó para remover el sobrenadante y secar en un rotavapor la pastilla. La pastilla se disolvió en agua o en TE (Ausubel et al., 1998).

### Banco de muestras de DNA genómico

Se extrajo DNA de 44 individuos diferentes, las muestras obtenidas pertenecen a delfines de los parques de Xcaret y Xel-Ha provenientes de Tabasco, Quintana Roo y Cuba (ver Tabla 3 de Resultados).

## 1.6.2 PCR

### A) ESTANDARIZACIÓN

Con la finalidad de establecer las condiciones adecuadas para la reacción de PCR se variaron parámetros como: cantidad de DNA, concentración de oligos, concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), temperatura de alineación de los oligos y ciclos de amplificación. En la Tabla 1 se muestran las condiciones reportadas por los autores, sobre las que se iniciaron las adaptaciones.

LOCUS	TAMAÑO DE REPETIDOS	SECUENCIA DE LOS INICIADORES		TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN (°C)	TAMAÑO REPORTADO DE LOS ALELOS
		5'	3'		
TexVet7 (Rooney <i>et al.</i> , 1999)	(CA) <sub>12</sub>	(1)TGCACTGTACGGGTGTT CAGCAG (2)CTTAATTGGGGGCGATTTCAC		54.5	155-163 pb (6)
D08 (Shinohara <i>et al.</i> , 1997)	(TG) <sub>18</sub>	(1)GATCCATCATATTGTCAAGTT (2)TCCTGGGTGATGAGTCTTC		56	103 pb (8)
D18 (Shinohara <i>et al.</i> , 1997)	(CA) <sub>3</sub> -TA- (CA) <sub>21</sub>	(1)CCCAAACCGACAGACAGAC (2)GATCTGGGGATGCAGG		54	90 pb (6)
D22 (Shinohara <i>et al.</i> , 1997)	(CA) <sub>3</sub> -TA- (CA) <sub>21</sub>	(1)GGAAATGCTCTGAGAAGGTC (2)CCAGAGCACCTATGTGGAC		56	135 pb (7)

**Tabla 1. Condiciones reportadas para los microsatélites empleados en este estudio. El número entre paréntesis se refiere al número de alelos obtenido por los autores en sus estudios.**

Para verificar la amplificación por PCR y el tamaño de los productos obtenidos, se corrieron 5µL de cada muestra junto con 3µL de buffer de solución amortiguadora para ácidos nucleicos en un gel de agarosa al 2%, la corrida se efectuó a 90 V por 20 min.

## **B) Secuenciación directa por PCR**

Las bandas de interés de los productos de PCR para los loci TexVet7, D08 y D22 se purificaron a partir de un gel de agarosa por medio del kit "CONCERT GEL EXTRACTION SYSTEMS". Este sistema emplea membranas de sílica que capturan y purifican el fragmento de DNA. La resina sílica se usa como una suspensión. El gel de agarosa se disuelve con perclorato de Na y el DNA se adsorbe en el soporte de sílica, por la acción de la solución amortiguadora y la temperatura. Las soluciones amortiguadoras de la electroforesis se eliminan con soluciones de lavado que llevan alcohol. El DNA se diluye con TE a altas concentraciones por lo que no requiere precipitación.

El producto se observó de nuevo en un gel de agarosa al 0.8% para revisar la concentración y el resto se empleó en una reacción de secuenciación. El producto de la reacción se purificó por columna por medio del kit CENTRI-SEP. Después de la purificación la muestra se evaporó en un rotavapor y se mandó a secuenciar a la Unidad de ácidos nucleicos del CINVESTAV, IPN.

### **1.6.3 Electroforesis Vertical**

Para analizar los polimorfismos de cada marcador, se corrieron en geles de poliacrilamida, los productos de PCR de todos los individuos involucrados en la paternidad. Los productos se corrieron en cámaras de electroforesis vertical 15\*17cm, con separadores de vinil 0.4mm y peine de teflón con 1 L de TBE 1X a un voltaje de 240V. La concentración de los geles desnaturalizantes de acrilamida varió en 12-15% y los tiempos de corrida en 3-7 hrs, dependiendo de la concentración.

Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/mL y posteriormente se fotografiaron con una cámara digital "Kodak Digital Science DC120 Zoom". En cada gel se cargaron 2 µL de marcador de peso molecular (100pb y 1kb) para poder calcular los tamaños de los alelos con la ayuda de una curva de calibración realizada con el software de análisis de imágenes 1D Kodak Digital Science. Los tamaños se determinaron a partir de la masa del producto y la

distancia recorrida entre las bandas que constituyen la escalera de peso molecular. Se eligieron las fotografías que presentaron mas de cuatro bandas en la escalera, para tratar de tener el mismo porcentaje de error en todos los análisis y poder comparar los diferentes geles. Los tamaños se obtuvieron de la fotografía del gel que presentara la mayor cantidad de individuos con alelos diferentes. Los tres machos I1, I2 y I3 (posibles padres), se corrieron en todos los geles y se tomaron como referencia para obtener los tamaños de los alelos restantes. Los alelos se identificaron con letras del abecedario, comenzando con los de mayor tamaño. Una vez determinados los tamaños se determinó la presencia de cada uno de ellos en los diferentes locus, así como la cantidad de individuos analizados para obtener la frecuencia de aparición de cada alelo en la población analizada.

En las pruebas de paternidad se compararon a los tres machos (I1,I2 y I3) con las parejas de madre y cría. En caso de que estas parejas se hubiesen corrido muy lejos de los tres machos, la fotografía se editó en Powerpoint y se muestra cortada. No todos los individuos se muestrearon con los cuatro alelos esto fue debido a falta de amplificación de alguno de los individuos en las corridas de todos los animales involucrados en la paternidad o a que estos individuos se corrieron en geles en donde no hay marcador de peso molecular suficiente para realizar la curva de calibración por lo que no se pueden determinar los tamaños y por lo tanto las diferencias de tamaños entre individuos.

## 1.7 RESULTADOS

### 1.7.1 Extracción de DNA

#### A) Extracción de DNA a partir de tejido

Una vez descongeladas las muestras de tejido se extrajo el DNA, y se confirmó su integridad corriendo de uno a cinco  $\mu\text{l}$  en un gel de agarosa al 8%, teñido con bromuro de etidio (Fig. 1).

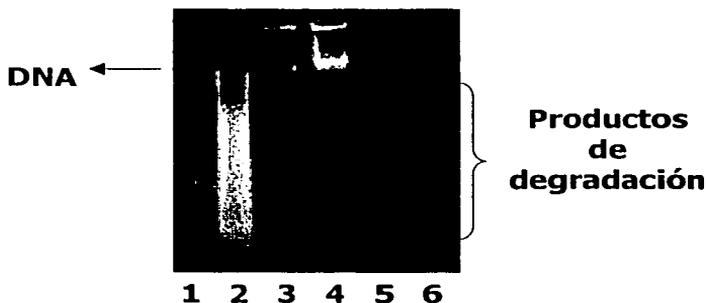
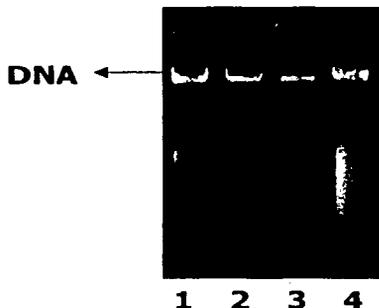


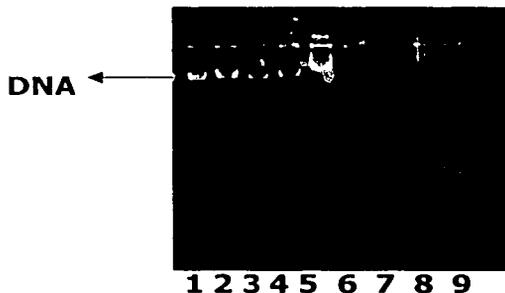
Figura 1. Muestras de DNA obtenidas a partir de tejidos de delfín. Carriles 1,3,5)  $1\mu\text{l}$  de DNA , 2,4,6)  $3\mu\text{l}$  de DNA.

#### B) Extracción de DNA a partir de sangre total

Se probaron dos técnicas para la extracción de DNA y el efecto de dos diferentes anticoagulantes (EDTA y ACD) para la preservación de las muestras sanguíneas. Ambas técnicas se probaron con sangre humana antes de emplearse con muestras de delfín. En la fig. 2 se observa DNA extraído con la Técnica I (DTAB-CTAB) a partir de sangre total de humano con EDTA. Posteriormente se probaron y compararon las dos técnicas (Técnica I (DTAB-CTAB) y Técnica II (Perclorato de Sodio)) con muestras de delfín, el DNA obtenido se muestra en la fig. 3.



**Figura 2.** Muestras de DNA extraído a partir de sangre humana empleando la Técnica I (DTAB-CTAB) y analizadas en un gel de agarosa al 8%. Las muestras sanguíneas se preservaron en EDTA. Carriles 1,3) 3  $\mu$ l de DNA, 3,4) 1  $\mu$ l de DNA.



**Figura 3.** Comparación de las dos técnicas de extracción de DNA empleadas en este estudio. Carriles: 1,2,3,4) DNA de delfin obtenido a partir de la Técnica II (perclorato de sodio), 5) DNA de humano obtenido a partir de la técnica II, 6,7,8,9) DNA de delfin obtenido a partir de la Técnica I (DTAB-CTAB).

Los valores de la concentración, de las muestras de DNA (fig. 3) se muestran en la Tabla 2, al igual que los valores de pureza y absorbancia. La pureza del DNA se determina con base en los valores de absorbancia, obtenidos a partir de la lectura en espectrofotómetro. El DNA de alta pureza tiene valores de  $A_{260}/A_{280}$  con relaciones mayores a 1.8.

INDIVIDUO	ABSORBANCIA	PUREZA	[DNA
	$\lambda 260$	$A_{260}/A_{280}$	ng/ $\mu$ l)]
#28 (II)	0.305	1.752	152.5
#2 (II)	0.176	1.872	88
#1 (II)	0.130	1.969	65
#3 (II)	0.135	1.824	67.5
Humano II	0.498	1.893	249
#3 (I)	0.137	1.851	68.5
#1 (I)	0.146	2.08	73
#28 (I)	0.109	1.912	54.5
#2 (I)	0.485	1.725	242.5

**Tabla 2. Parámetros de las muestras de DNA. Las muestras de DNA fueron obtenidas por dos técnicas diferentes de extracción probadas en este estudio. Las muestras de DNA obtenidas por la técnica de perclorato de sodio se denominan con un II después del número de identificación del individuo de la Tabla 3 y las obtenidas por medio de la técnica DTAB-CTAB con un I.**

A partir de la técnica II se obtuvieron mayores cantidades de DNA. Esta técnica presenta la ventaja adicional de ser más sencilla en su ejecución, sin embargo, el DNA obtenido presentó problemas al ser amplificado por PCR (aún cuando los valores del espectrofotómetro no muestran diferencias de pureza entre ambas técnicas).

Para lograr mayor pureza se agregó un paso de purificación de DNA mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. En esta purificación se pierde algo de DNA pero ya que se obtienen buenas cantidades con la técnica II (perclorato de sodio), esta pérdida no es relevante y el DNA obtenido se amplificó exitosamente. Por lo tanto, la técnica II de perclorato de sodio, con la modificación mencionada, se empleó para las extracciones de DNA subsecuentes.

## 1.7.2 Banco de muestras de DNA genómico

Se procesaron muestras de sangre de delfín de un total de 44 individuos diferentes. En la siguiente tabla 3 se muestran los nombres de todos estos individuos, la localidad de donde provienen (lugar de captura) y el parque en el que se encuentran.

<b>MUESTRA #</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>SEXO</b>	<b>LUGAR DE CAPTURA O NACIMIENTO</b>	<b>SITIO DE RESIDENCIA</b>
1	HOLBOX	M	HOLBOX, Q. ROO	†
2	ALUX	M	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
3	HUJINIC	M	TABASCO	XCARET
4	XUNA	H	XCARET, Q. ROO	XCARET
5	IXCHEL	H	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
6	XCARET	H	XCARET, Q. ROO	XCARET
7	BAXAL	H	XCARET, Q. ROO	XCARET
8	CHIQÜILA	H	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
9	KICHPAM	H	XCARET, Q. ROO	XCARET
10	KIN	H	PARAISO, TAB	XCARET
11	ZAMA	H	XCARET, Q. POO	XCARET
12	POLE	H	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
13	SASTA	H	XCARET, Q. ROO	XCARET
14	MELISSA	H	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
15	NEONATO H	H	XCARET, Q. ROO	†
16	ABRIL	H	HOLBOX, Q. ROO	XCARET
17	KELEM	H	PARAISO, TAB.	XCARET
18	NEONATO M	M	HOLBOX, Q. ROO	†
19	YIKAL	M	CUBA	XCARET
20	DZUL	M	PARAISO, TAB.	XCARET
21	BAILI	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XCARET
22	KANAB	M	PARAISO, TAB.	XCARET
23	KINICH	M	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XCARET
24	TAPISH	H	PARAISO, TAB.	XCARET
25	MAYA	H	HOLBOX, QU. PROO	XCARET
26	FANNY	H	HOLBOX, Q. PROO	XCARET
27	KAYNA	H	PARAISO, TAB.	†
28	PALU	H	PARAISO, TAB.	XCARET
29	IK	H	PARAISO, TAB.	XCARET
30	YOK	M	PARAISO, TAB.	XEL-HA
31	AWILIX	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
32	NICTE-HA	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
33	QUICHE	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
34	DZIC	M	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
35	ITZMAN	M	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
36	CAB	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
37	CH' EN	H	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA
38	PACH	M	BAHIA CAIBARIN, CUBA	XEL-HA

39	KICH	M	PARAISO, TAB.	ESCOLLERA
40	AK'AB	M	PARAISO, TAB.	ESCOLLERA
41	XTUP	M	PARAISO, TAB.	ESCOLLERA
42	NUP	M	SN. PEDRO-SN.PABLO, TAB.	ESCOLLERA
43	CHEL	H	SN. PEDRO-SN.PABLO, TAB.	ESCOLLERA
44	ADULTO	M	TABASCO	†

**Tabla 3. Características de los individuos que conforman el banco de muestras de DNA. Los animales fallecidos se marcan con (†).**

### 1.10.3 PCR

#### A) ESTANDARIZACIÓN

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en presencia de 2.5  $\mu$ l de solución amortiguadora para PCR (APÉNDICE A) (GIBCO), 0.2 $\mu$ l (2.5 unidades) de Taq polimerasa (GIBCO), 200 ng de cada iniciador (BIO SYNTHESIS), 200 ng de DNA templado, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (en concentraciones específicas para cada iniciador) y H<sub>2</sub>O destilada hasta llegar a un volumen total de 25  $\mu$ L.

El locus TexVet 7 se amplificó empleando una concentración de MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y 0.2 mM de dNTPs. Las condiciones de amplificación del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial 96 °C (2min), 35 ciclos de desnaturalización 94°C (30 seg), alineamiento 60°C (30 seg), extensión 72°C (1 min) y extensión final 74°C (10 min). Los tamaños determinados para este locus, por Rooney *et al.* (1999), van de 155 a 163 bases por lo que los productos obtenidos en el gel que se muestra en la fig. 4 parecen ser los esperados ya que tienen un tamaño superior a las 150 pb. Por otra parte se observa que en el gel de poliacrilamida (fig. 5) los productos se separan en dos bandas lo que no se obtuvo en el gel de agarosa.

El locus D08 se amplificó empleando MgCl<sub>2</sub> 2mM y dNTPs 0.4 mM. El programa del termociclador fue: desnaturalización inicial 95°C (5 min), 30 ciclos de desnaturalización 94°C (1 min), alineamiento 56°C (30 seg), extensión 72 °C (30 seg) y extensión final 72°C (7 min). En la fig. 6 se observa que los polimorfismos de este marcador se aprecian en el gel de agarosa. Los productos de PCR se sometieron también a electroforesis en geles de acrilamida (fig 7), y se observó que tienen tamaños alrededor de 100 pb, lo que coincide con lo determinado en el trabajo anterior (Shinohara *et al.*, 1997).

Las condiciones de amplificación para el locus D22 fueron iguales a las de D08, pero se agregó DMSO al 10%. El programa para el termociclador sólo varió en la temperatura de alineamiento que fue de 54°C. Los productos de PCR se muestran en un gel de agarosa (fig. 8) y en un gel de acrilamida (fig. 9) en donde se aprecian bandas cercanas a 135 pb que corresponden con lo informado para este locus (Shinohara *et al.*, 1997).

El locus D18 se amplificó con las mismas condiciones que el marcador D08, pero se le agregó formamida al 3%. Las temperaturas de los ciclos de PCR fueron iguales a las de D22. Los productos se muestran en la fig. 10 en un gel de agarosa y en la fig. 11 en un gel de acrilamida. El marcador D18 no resultó ser

tan polimorfo a simple vista, como se deduce del análisis de los productos de PCR en un gel de agarosa. Por lo que respecta a su comportamiento en un gel de poliacrilamida, se puede apreciar que los productos migran alrededor de las 100 pb lo cual esta de acuerdo a lo informado por Shinohara *et al.* (1997).

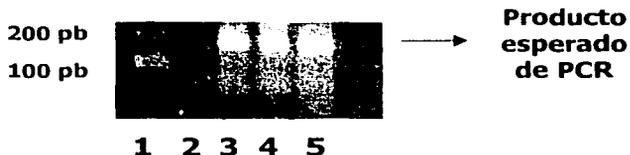


Figura 4. Productos obtenidos con los iniciadores para el locus TexVet7, en un gel de agarosa al 2%. Carriles: 1) Marcador de 100 pb, 2) Control negativo, 3,4,y 5) Productos de PCR de diferentes delfines (5  $\mu$ l).

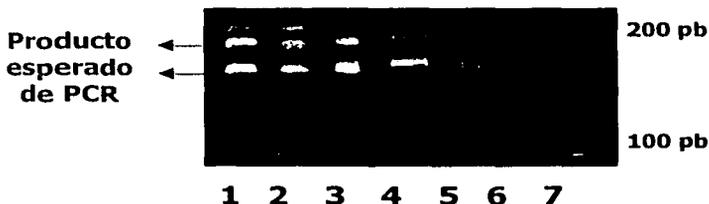


Figura 5. Análisis de los productos de PCR del locus TexVet7 mediante electroforesis en gel de acrilamida al 6%. Carriles 1,2 y 3) Productos de PCR de diferentes delfines (10  $\mu$ l) se muestran con flechas cada uno de los dos alelos, 4)Control Negativo y 5)Marcador de 100 pb.



Figura 6. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores DO8. Carriles 1) Marcador de 100 pb, 2) Control negativo, 3,4,5,6,7,8,9y 10) Productos de PCR de diferentes delfines (5  $\mu$ l).



Figura 7. Análisis de los productos de PCR del locus D08 mediante electroforesis en gel de acrilamida al 8%. Carriles 1) Marcador de 100 pb, 2) Control negativo, 3,4,5,6,7,8) Productos de PCR del marcador D22 de diferentes delfines (10  $\mu$ l) se muestran con flechas dos alelos presentes en cada individuo.

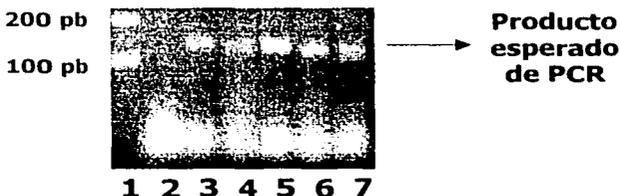


Figura 8. Productos de PCR para el marcador D22. 1) Marcador de 1 Kb, 2) Control negativo, 3,4,5,6,y 7) Productos de PCR de diferentes delfines (5 $\mu$ l).



Figura 9. Análisis de los productos de PCR del locus D22, mediante electroforesis en gel de acrilamida al 8% desnaturalizante. 1) Marcador de 1Kb, 2) Control negativo, 3, 4, 5,6,7,8,9 y 10) Producto de PCR de diferentes delfines (10 $\mu$ l) se muestran con flechas los dos alelos presentes en cada individuo, en los carriles en los que se presentan mas de dos bandas, las de mayor intensidad son las bandas de interés.

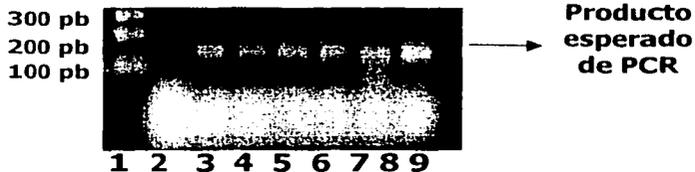


Figura 10. Productos de PCR del marcador D18. 1) Marcador de 1 Kb, 2) Control negativo, 3,4,5,6,7,8 y 9) Productos de PCR de varios delfines (5  $\mu$ l).



Figura 11. Análisis de los productos de PCR del locus D18, mediante electroforesis en gel de acrilamida al 8% desnaturalizante. 1), 2) y 3) Productos de PCR del marcador D18 de diferentes delfines (10  $\mu$ l) se muestran con flechas los dos alelos presentes en cada individuo, 4) Control negativo y 5) Marcador de 1Kb.

## B) SECUENCIACIÓN DIRECTA POR PCR

Para confirmar la identidad de los productos de PCR de los loci empleados en este estudio (TexVet7, D08 y D22), se secuenciaron los productos mediante secuenciación automatizada. En el caso del locus TexVet7 la secuencia obtenida se comparó contra la secuencia descrita en la base de datos GenBank bajo el número de acceso AF004908. A partir de esta comparación se confirmó que tanto la región de repetidos como las secuencias aledañas a los mismos correspondieron a la secuencia esperada. En el caso de las secuencias de los loci D08 y D22, la identidad de los productos de PCR se corroboró por el patrón característico de estos microsatélites, ya que no existe una secuencia descrita en alguna base de datos.

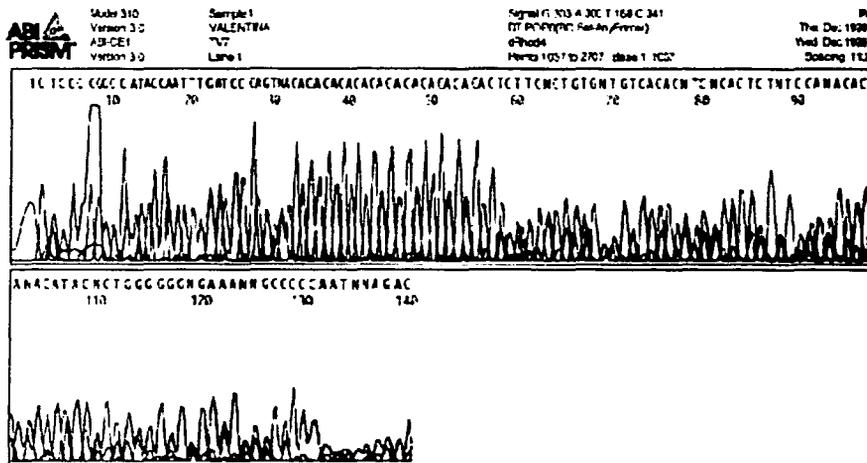


Figura 12. Secuenciación del locus TexVet 7. Para la secuenciación se usó la muestra de DNA del individuo 19. Los repetidos (CA) que conforman el microsatélite se muestran en picos verdes/azules.



Model 310  
Version 3.0  
ABI-CES1  
Version 3.0

Sample1  
VALENTINA  
D08 1  
Lane 1

Signal G:281 A:423 T:148 C:288  
DT (POP:SD Std-AsyPrimer)  
dHead1  
Pairs 884 to 1884 Size 1: 884

Page 1 of 1  
Tue, Jun 2000, 9:47 AM  
Mon, Jun 2000, 8:12 PM  
Spacing: 12.00(12.00)

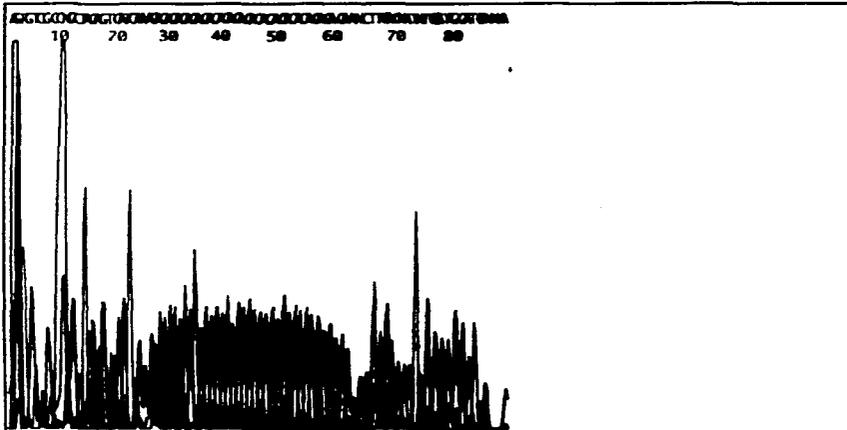


Figura 13. Secuenciación del locus D08. Para la secuenciación se usó la muestra de DNA del individuo 19. Los repetidos (CA) que conforman el microsatélite se muestran en picos verdes/ azules.



### 1.7.3 Análisis de los marcadores polimórficos

Una vez demostrada la presencia de los repetidos (CA) en los productos de PCR, se amplificaron las muestras de DNA de los individuos. Los alelos se etiquetaron por medio de letras en orden alfabético de mayor a menor tamaño como se observa en las figuras 15-21. Los tamaños de los alelos y las frecuencias relativas de cada alelo se muestran en la Tabla 4. En la Tabla 5 se presentan los alelos identificados para cada locus en cada uno de los individuos involucrados en los casos de paternidad. Para el locus TexVet7 el número total de individuos analizados fue de cinco, para el D08 fue de trece, para el D18 fue de catorce y finalmente para el D22 se analizaron diecisiete individuos. Para el locus TexVet7 el alelo de mayor frecuencia fue el E (0.4) y los alelos A, C y D (0.1) comparten la menor frecuencia ya que se identificaron en un solo individuo. En el locus D08 los alelos de mayor frecuencia fueron el E, el F y el G (0.25) y los de menor frecuencia el A, el C y el D (0.0416). En el caso del locus D22 los alelos de mayor frecuencia fueron el D y el F (0.2352) y el de menor frecuencia fue el A (0.0294). Por último el alelo de mayor frecuencia para el locus D18 fue el D (0.4642) y el de menor frecuencia fue el A (0.0357).

En la fig. 15 observamos los polimorfismos obtenidos para el marcador TexVet7, de este análisis se obtuvieron cinco alelos en un intervalo de tamaños que va de 160 a 188 pb. Los polimorfismos del marcador D08 se muestran en las fig. 16, 17 y 18, donde observamos la presencia de siete alelos con tamaños que van de 94 a 122 pb. En las fig. 19 y 20 se muestran los polimorfismos del marcador D22 con un total de siete alelos cuyos tamaños van de 121 a 153 pb. Por último en la fig. 21 se muestran los polimorfismos para el marcador D18 que presenta cuatro alelos con tamaños que van de 75 a 91 pb.

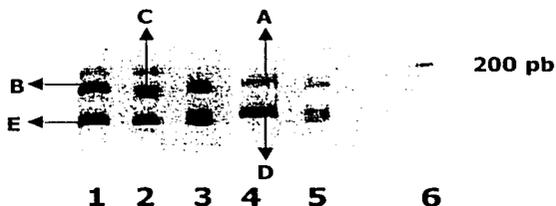


Figura 15. Polimorfismos del marcador TexVet7. Se muestran los cinco alelos del locus etiquetados con las letras A, B, C, D y E. Carriles 1-5) Par de alelos presentes en cada uno de los cinco diferentes individuos analizados y 6) marcador de peso molecular (200 pb).

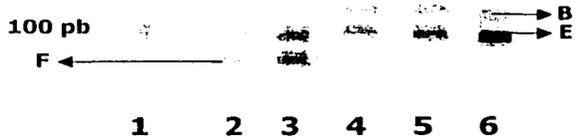


Figura 16. Polimorfismos del marcador D08. Se muestran tres de los dos siete alelos (B,E y F) presentes en el locus D08 cinco individuos. Carriles 1) marcador de peso molecular (100 pb), 2-6) Par de alelos presentes en cada uno de los cinco diferentes individuos analizados.

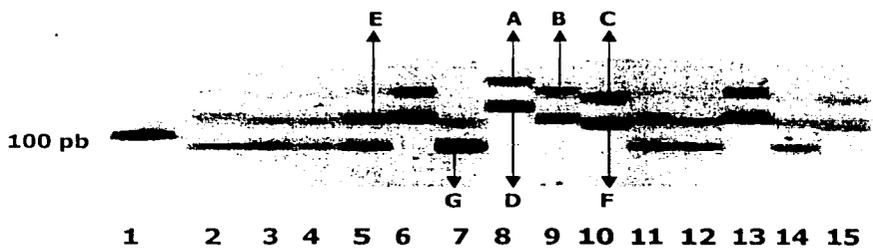


Figura 17. Polimorfismos del marcador D08. Se muestran los siete alelos (A,B,C,D,E,F y G) presentes en el locus D08. Carriles 1) marcador de peso molecular (100 pb), 2 - 15) Par de alelos en cada uno de los catorce diferentes individuos analizados.

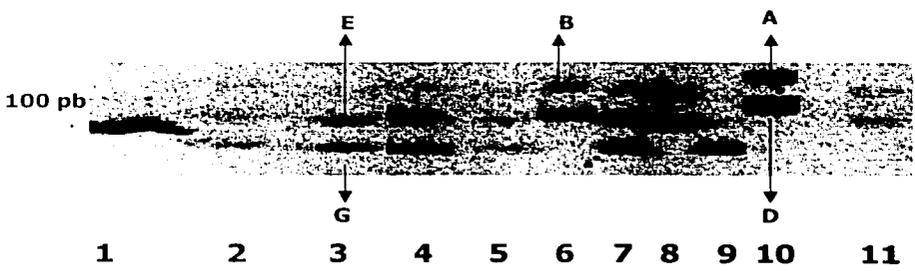


Figura 18. Polimorfismos del marcador D08. Se muestran cinco (A,B,D, E y G) de los siete alelos presentes en el locus D08. Carriles 1) marcador de peso molecular (100 pb), 2-11) Par de alelos en cada uno de los diez diferentes individuos analizados.

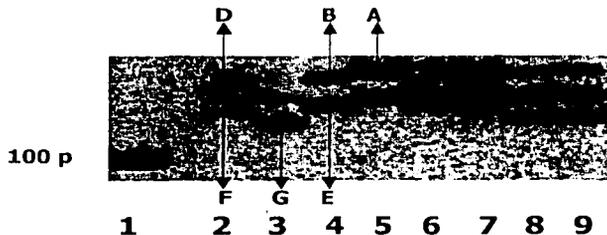


Figura 19. Polimorfismos del marcador D22. Se muestran seis (A, B, D, E, F y G) de los siete alelos presentes en el locus D22. Carriles 1) marcador de peso molecular (1 Kb), 2-9) Par de alelos en cada uno de los seis diferentes individuos analizados.

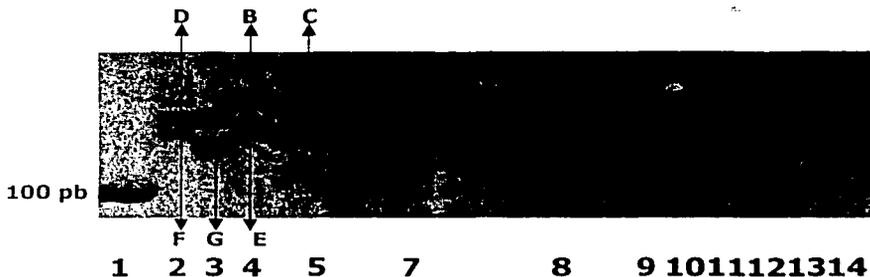


Figura 20. Polimorfismos del marcador D22. Se muestran seis (B, C, D, E, F y G) de los siete alelos presentes en el locus D22. Carriles 1) marcador de peso molecular (1 Kb), 2-14) Par de alelos en cada uno de los 14 diferentes individuos analizados.

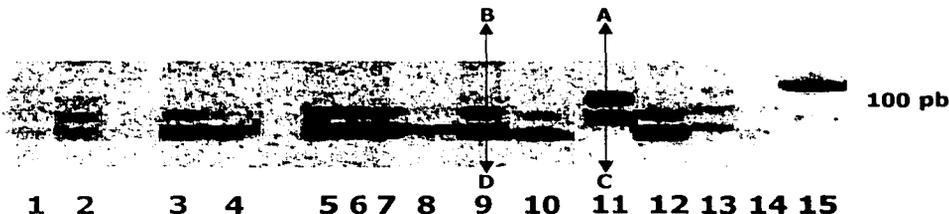


Figura 21. Polimorfismos del marcador D18. Se muestran los cuatro (A, B, C y D) alelos presentes en el locus D18. Carriles 1-13) Par de alelos en cada uno de los 14 diferentes individuos analizados y 14) marcador de peso molecular (1 Kb).

LOCUS	ALELO A	ALELO B	ALELO C	ALELO D	ALELO E	ALELO F	ALELO G	N
TEXVET7	188 (0.1)	179 (0.3)	182 (0.1)	163 (0.1)	160 (0.4)			5
D08	122 (0.0416)	117 (0.125)	114 (0.0416)	110 (0.0416)	105 (0.25)	103 (0.25)	94 (0.25)	12
D22	153 (0.0294)	147 (0.1176)	143 (0.0882)	136 (0.2352)	130 (0.1764)	127 (0.2352)	121 (0.1176)	17
D18	91 (0.0357)	84 (0.4285)	79 (0.0714)	75 (0.4642)				14

Tabla 4. Tamaños y frecuencias relativas de los alelos obtenidas para los cuatro loci analizados. El número de individuos (N) analizados para cada locus se muestra en la última columna. Las frecuencias relativas se muestran entre paréntesis.

INDIVIDUO	NOMBRE	LOCUS TEXVET7	LOCUS D08	LOCUS D22	LOCUS D18
I 1	Holbox	B E	E F	D F	
I 2	Alux	A D	FG	D G	B D
I 3	Huinic	B E	B E	B E	B D
II 4	Xuna	C E	B E	A D	C D
II 5	Xcaret		B E	D E	D
I 6	Ixcel	B E		D E	B D
II 7	Baxal			D F	
I 8	Chiquilá			D F	
II 9	Kichpam		F G	C F	B D
I 10	Kin		C F		B D
II 11	Sasta			B E	B D
II 12	Melissa			B E	B D
II 13	Zama			E G	B D
II 14	Polé			F G	B D
II 15	Kanay		E G		
I 16	Kelem		E G	F C	B D
II 17	Neonato Hembra		F G	F C	B D
I 18	Abril		A D	F B	B D
II 19	Neonato macho		F G	G D	A C

Tabla 5. Individuos muestreados para los cuatro loci analizados. Se presenta el número de identificación del individuo, su nombre completo, los cuatro loci analizados en este estudio y los alelos que presenta cada individuo para los diferentes loci.

## 1.7.4 Pruebas de Paternidad

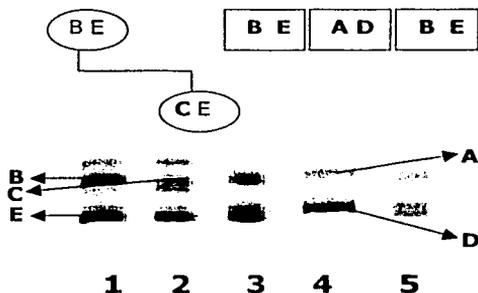
Una vez obtenidos y analizados la estructura de los marcadores polimórficos, se procedió con el análisis de paternidad. Se tomó por separado cada cría y se comparó con su madre y los tres machos en cuestión (I1, I2 e I3). La posible herencia de los alelos de cada microsatélite se muestra en un dendrograma colocado en la parte superior de cada gel y las letras que identifican a cada alelo se muestran a los costados del gel. En la Tabla 6 se muestran los individuos analizados en las pruebas de paternidad, número de identificación, sexo y papel que desempeñan en los casos de paternidad disputada.

El marcador para el locus TexVet7 sólo se empleó en un caso de paternidad desconocida (II4) debido a que en el resto de los casos no mostró ser informativo y la fotografía donde se corrieron el resto de los individuos no presentó la cantidad adecuada de bandas de la escalera de peso molecular. De igual modo el marcador para el locus D18 fue muy poco polimórfico por lo que tampoco se empleó para las pruebas de paternidad.

Número de Identificación	Sexo	Papel
I 1	macho	padre
I 2	macho	padre
I 3	macho	padre
II 4	hembra	cría
II 5	hembra	cría
I 6	hembra	madre
II 7	hembra	cría
I 8	hembra	madre
II 9	hembra	cría
I 10	hembra	madre
II 11	hembra	cría
I 12	hembra	madre
II 13	hembra	cría
I 14	hembra	madre
II 15	hembra	cría
I 16	hembra	madre
II 17	hembra	cría
I 18	hembra	Madre
II 19	macho	cría

Tabla 6. Individuos involucrados en los casos de paternidad desconocida.

En la fig. 22 se observa la prueba para la cría II4 con el marcador TexVet7, se aprecia que todos los individuos fueron heterocigotos para este locus. La cría posee el genotipo B E; heredó el alelo E por vía materna por lo cual, aunque los machos I1 e I3 comparten este alelo, se descarta la posible paternidad de alguno de ellos. El alelo B que debe ser de origen paterno no lo comparte la cría con ninguno de los machos, por lo que se confirma que ninguno de ellos es el padre. Estos resultados son congruentes con la información proveniente del parque acerca de la posibilidad de que la hembra I6 haya llegado recién preñada al parque.



**Figura 22. A) Prueba de paternidad para II 4 con el marcador Tex Vet7. Carriles 1) I 6 (madre), 2) II 4 (cría), 3,4 y 5) (I1, I2, I3) posibles padres. En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II 4 con el marcador Tex Vet 7. Las hembras se designaron con un círculo y los machos con un cuadrado. Los alelos de los machos se designaron con letras más gruesas. Se muestra que la cría (II4) heredó el alelo E de la madre (I6) y que el alelo paterno (C) no corresponde con ninguno de los machos examinados.**

En la fig. 23 se muestra el mismo análisis para la cría II 4 pero con el marcador D08, la cría presenta los mismos alelos que la madre y como no se puede descartar el alelo materno el alelo paterno podría ser de los machos I1 o I3. En la fotografía, el carril de la madre parece estar mas abajo que el de la cría y los alelos parecen no ser los mismos, esto es debido a la corrida y a la mayor concentración del producto de PCR de la hembra, pero debido a que la curva de calibración toma en cuenta la masa y la migración, los valores de peso molecular de sus alelos corresponden a B y E.

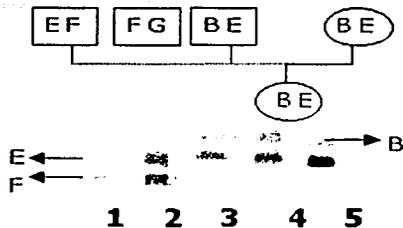


Figura 23. A) Prueba de paternidad para II 4 con el marcador D08. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II 4 (cría) y 5) I6 (madre). En la parte superior se muestra el dendrograma de II 4 con el marcador D08. Se muestra que la cría (II 4) comparte los dos alelos con la madre y con los machos I1 y I3.

La paternidad de II4 con el marcador D22 se muestra en la fig. 24. La cría hereda el alelo D vía materna y no comparte el alelo A con ninguno de los machos lo que descarta la paternidad de alguno de los machos.

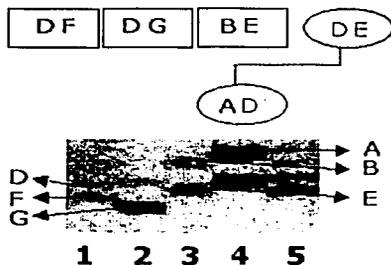


Figura 24. A) Prueba de paternidad para II 4 con el marcador D22. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II 4 (cría) y 5) I6 (madre). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II donde observamos que la cría (II 4) heredó el alelo D de la madre (I 6) y que el alelo A no corresponde con los de ninguno de los alelos de los tres machos.

En la fig. 25 se muestra la prueba para la cría IIS con el marcador D22. En este caso podemos observar que la cría comparte alelos con los tres machos y que tiene el mismo genotipo que la madre por lo que no se puede determinar con certeza la herencia de los alelos.

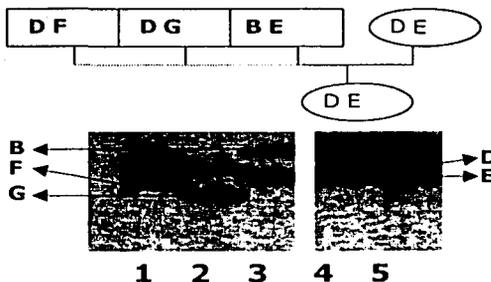


Figura 25. A) Prueba de paternidad para II 5 con el marcador D22. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II5 (cria) y 5) I6 (madre). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II5 donde se aprecia que la cria presenta los mismos alelos que la madre y comparte al menos uno de ellos con los tres machos.

La prueba de paternidad de II7 con el marcador D22 se muestra en la fig. 26. Se observa que la cria y la madre presentan el mismo genotipo y no se puede determinar cual de los dos alelos se heredó vía materna; además comparte los alelos D y F con I1 y el alelo D con I2, por lo que podría ser hija de cualquiera de los dos machos. Bajo los testimonios del personal del parque esta posibilidad se mantiene así que este caso no se pudo confirmar.

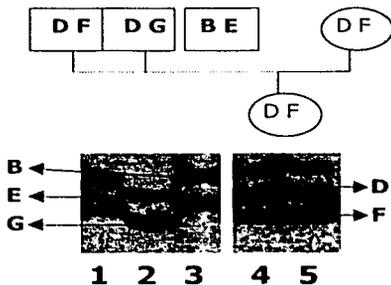


Figura 26. A) Prueba de paternidad para II 7 con el marcador D22. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II7 (cria) y 5) I8 (madre). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II7 con el marcador D22 donde se observa que la madre y la cria presentan el mismo genotipo (alelos D y F) y comparte alelos con los machos I1 e I2.

En la fig. 27 se muestra la prueba de paternidad para II9 con el marcador D08. Se observa que la cría hereda el alelo F vía materna y que el alelo G lo comparte con los machos I1 e I2.

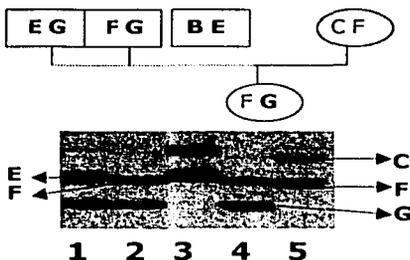


Figura 27. A) Prueba de paternidad para II 9 con el marcador D08. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II9 (cría) y 5) I10 (madre). En la parte superior se muestra el dendrograma de II 9 con el marcador D08. Se observa que la cría presenta el alelo F de la madre y el alelo G de los machos I1 e I2.

En la fig. 28 se muestra una segunda prueba de paternidad para II9 pero con el marcador D22. Para este marcador no se presentan los productos de PCR de la madre, sólo se muestran los tres carriles de los machos y el de la cría. Se observa que la cría comparte el alelo F únicamente con el macho I1 y el C con ninguno por lo que asumimos que ese lo hereda via materna.

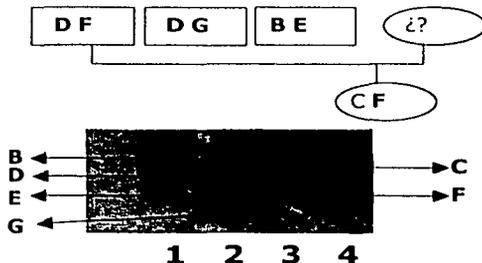


Figura 28. A) Prueba de paternidad para II 9 con el marcador D22. Carriles 1,2) (I1) posible padre, 3) macho I3 y 4) II9 (cría). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II 9 con el marcador D22 donde observamos que la cría presenta los alelos C y F, no sabemos el genotipo de la madre así que no podemos descartar un alelo materno, pero comparte el alelo F únicamente con el macho I1 por lo que suponemos que la cría hereda el alelo C de la madre y el F del macho I1.

La prueba de paternidad para II11 con el marcador D22 se muestra en la fig. 29. En el gel se observa que la cría y la madre comparten ambos alelos (B y E) y no se puede determinar cual hereda vía materna. El único macho que presenta estos alelos es I3 por lo que podemos atribuir la paternidad de II11 al macho I3.

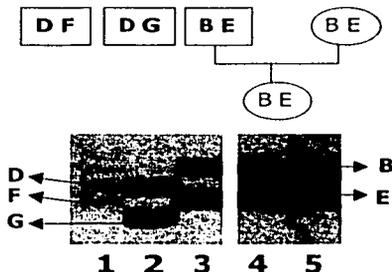


Figura 29. A) Prueba de paternidad para II 11 con el marcador D22. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II 11 (cría) y 5) I12 (madre). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de I11 con el marcador D22, donde se observa que la cría y la madre presentan los alelos B y E al igual que el macho I3 por lo que la cría pudo haber heredado ambos alelos de cualquiera de los dos padres.

En la fig. 30 se muestra la prueba de paternidad para II13 con el marcador D22. Observamos que la cría II 13 hereda el alelo G vía materna y el alelo E vía paterna del macho I 3.

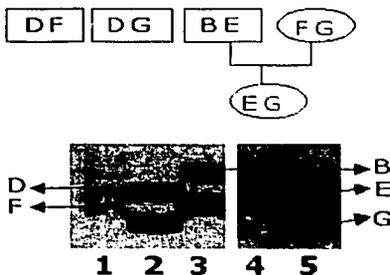


Figura 30. Prueba de paternidad para II 13 con el marcador D22. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II13 (cría) y 5) I14 (madre). En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II 13 con el marcador D22 donde se observa que la cría comparte el alelo G con la madre y el E con el macho I3.

En el caso de II15 sabíamos que el único macho posible era I3, por lo que se descartaron los otros dos del diagnóstico y podemos observar en la fig. 31 que la cría hereda el alelo G vía materna y el E vía paterna.

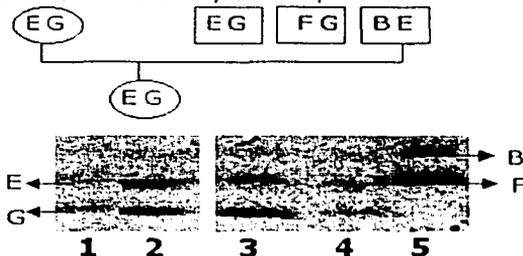


Figura 31. Prueba de paternidad para II 15 con el marcador D08. Carriles 1) II15 (cría) 2) I16 (madre), 3,4 y 5) (I1, I2, I3) posibles padres. En la parte superior del gel se muestra el dendrograma de II5 con el marcador D08 donde se observa que la cría hereda el alelo F de la madre y el E del macho I3.

En la fig. 32 se muestra la prueba de paternidad para la cría II 17 con el marcador D08, observamos que la cría no comparte ninguno de los alelos con la madre (I18). Debido a esta incongruencia y a la incapacidad de confirmar la identidad de las muestras, estos individuos se eliminaron del estudio de confirmación de la paternidad. El mismo caso se presenta en la fig. 33 donde se muestra la prueba de paternidad para la cría II 19 y su madre (I16) , con el marcador D22.

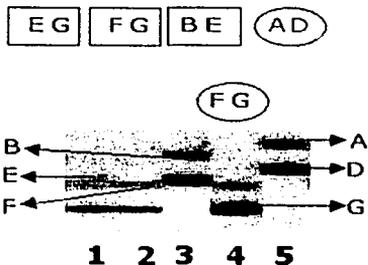


Figura 32. Prueba de paternidad para II 17 con el marcador D08. Carriles 1,2 y 3) (I1, I2, I3) posibles padres, 4) II17 (cría) y 5) I18 (madre). En la parte superior se observa el dendrograma de II17 D08 donde se observa que la cría y la madre no comparten ninguno de los alelos.

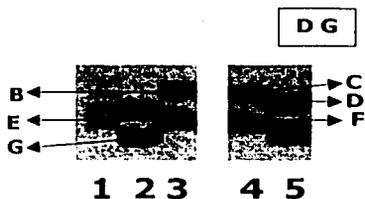


Figura 33. Prueba de paternidad para II19 con el marcador D22. Carriles 1,2y 3) (I1,I2,I3) posibles padres, 4) II19 cría y 5) I 16 (madre). En la parte superior se observa el dendrograma de II19 donde se observa que la cría y la madre no comparten ninguno de los alelos.

Una vez analizados todos los geles y los dendrogramas se obtuvo la Tabla 7, que muestra los marcadores que se ocuparon para cada diagnóstico. Cuando la confirmación de la paternidad se llevó a cabo únicamente con evidencia molecular, ya sea por uno o varios geles, el tipo de diagnóstico se denominó DIRECTO. Cuando la cría compartía alelos con más de un macho pero se podía emplear información conductual acerca de los apareamientos de los animales a través del personal del parque, para confirmar la paternidad, el tipo de diagnóstico se denominó INDIRECTO. Podemos observar que de manera directa se resolvieron cuatro casos (II4, II9, II11, II13), de manera indirecta uno (II5) y dos casos no se pudieron resolver (II5, II7).

CRÍA	TexVet 7	D08	D22	TIPO DE DIAGNÓSTICO
II 4	X	I1, I3	X	Directo X
II 5			I1,I2, I3	No resuelto
II 7			I1,I2	No resuelto
II 9		I1,I2	I1	Directo I1
II 11			I3	Directo I3
II 13			I3	Directo I3
II 15		I1,I2,I3	I3	Indirecto I3

Tabla 7. Diagnósticos de confirmación de paternidad. Se muestran los siete individuos analizados en este estudio, los tres marcadores de microsatélites empleados y el tipo de diagnóstico por el cual se confirmó la paternidad. En cada locus se denomina el o los machos con los que la cría comparte un alelo, la X representa la falta de homología de los alelos de la cría con los alelos de los machos.

## 1.8 DISCUSIÓN

### Extracción de DNA

La extracción de DNA a partir de tejido resulta complicada debido a que cuando las células mueren el DNA comienza a degradarse por la acción de endonucleasas (Williams *et al.*, 1974). Por esta razón, los ciclos de congelamiento-descongelamiento favorecen esta degradación. Para minimizar la acción de las endonucleasas se recomienda aislar y separar en pequeñas alícuotas el tejido y congelarlo rápidamente. (Ausubel *et al.*, 1998). Cuando se va a comenzar con la extracción de DNA es necesario emplear una solución amortiguadora de lisis que al entrar en contacto con el tejido lo proteja contra las nucleasas. Siguiendo estas recomendaciones se obtuvieron cuatro muestras de tejido inmediatamente después del deceso del animal, se preservaron en etanol al 70% y se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de su almacenaje varió entre una semana y tres meses. Una vez que se comenzó con la extracción de DNA el tejido se lavó con la solución de lisis (Proteinasa K/SDS) y se realizaron extracciones con fenol-cloroformo para finalmente precipitar el DNA con etanol. En resumen la técnica de extracción de DNA a partir de tejido resultó exitosa y de fácil empleo.

Por lo que respecta a la extracción de DNA a partir de sangre total, se probaron dos técnicas, cada una con su anticoagulante (ACD o EDTA). La técnica I (DTAB-CTAB) fue exitosamente empleada con anterioridad en el laboratorio para obtener DNA a partir de sangre humana por lo que se empleó como primera opción para extraer DNA de delfín. Decidimos utilizar ACD como anticoagulante para esta técnica ya que Gustafson *et al.* (1987) recomiendan su empleo para muestras de sangre total que van a ser transportadas y almacenadas hasta por un mes, estos autores han reportado buenos resultados incluso después de tres ciclos de congelado-descongelado de la muestra. Esta técnica nos dio buenos con sangre humana pero con sangre de delfín no se obtuvieron los resultados esperados.

La técnica II (perclorato de sodio) que especifica el empleo de EDTA como anticoagulante, se comparó con la técnica I, manejándose las mismas muestras de sangre con ambos procedimientos. Con la técnica II obtuvimos mayores cantidades de DNA, con la ventaja adicional de su mayor sencillez.

En todos los casos observamos menores rendimientos en la extracción de DNA a partir de sangre de delfín comparando con la sangre humana, esta diferencia podría atribuirse a que se ha reportado que los componentes de los eritrocitos degradan el DNA (Tas, 1990 en Escorza y Acosta, 1997) y una de las

particularidades de la sangre de delfín como adaptación al medio acuático son los niveles elevados de hematocrito (Berta y Sumich, 1999).

## PCR

A lo largo del trabajo se probaron cuatro pares de oligos para la amplificación de cuatro microsátélites diferentes. De estos cuatro marcadores se secuenciaron solo tres, estos presentaron la región de los repetidos de CA esperados (TV7, D08 y D22). El marcador D18 no se mandó secuenciar debido a que no mostró ser muy polimórfico, por lo que pensamos que sería de poca utilidad posterior.

El marcador TV7 se amplificó bajo las condiciones reportadas anteriormente. Sin embargo, además del producto esperado se presentaron una gran cantidad de bandas inespecíficas. La presencia de bandas inespecíficas en el PCR se debe a una hibridación no específica de los iniciadores (Hung *et al.*, 1990) o a la errónea hibridación entre el iniciador en su extremo 3' y el templado provocando la inserción o delección de nucleótidos. También puede ser causada por el resbalón de la cadena complementaria (Hauge y Litt, 1993). Para optimizar la PCR es necesario lograr la eficiente desnaturalización del DNA e identificar la temperatura óptima para el alineamiento de los iniciadores (Varadaraj y Skinner, 1994), ya que la presencia de estructuras secundarias estables en el templado pueden interferir con la polimerización del molde (Smith *et al.*, 1990 en Varadaraj y Skinner, 1994). Considerando lo anterior se subió la temperatura de alineamiento de los oligos de 54.5 °C a 60°C y se logró eliminar la mayoría de los productos inespecíficos. A los iniciadores D22 y D18 se les bajó la T° de 56 °C a 54 °C ya que se obtenía un producto poco abundante aún con el uso de solventes.

La amplificación de los marcadores D08, D22 y D18 resultaron ser muy sensibles a la pureza del DNA, por lo que no se pudo amplificar el DNA obtenido por la técnica II (perclorato de sodio). Se agregó un lavado con fenol-cloroformo y esto solucionó la amplificación del locus D08, pero los loci D22 y D18 siguieron presentando problemas para amplificarse. Posteriormente se probó el empleo de solventes sugeridos por Varadaraj y Skinner (1994). Los solventes orgánicos desestabilizan la doble cadena de DNA (Lee *et al.*, 1981 en Varadaraj y Skinner, 1994) lo que permite una mejor desnaturalización del templado y por lo tanto una alineación eficiente de los iniciadores. Bookstein *et al.* 1990 lograron amplificar el gen del retinoblastoma con un 10% de DMSO, ya que se evitó el apareamiento entre cadenas de DNA (Varadaraj y Skinner, 1994). Con base en lo anterior se probó exitosamente el empleo de DMSO al 10% para el locus D22 y formamida al 3% para el D18.

## **Análisis de los marcadores polimórficos**

El marcador D08 presentó siete alelos diferentes en un intervalo de 92 a 121 pb, mientras que Shinohara *et al.* (1997) reportan ocho alelos. Por lo que respecta al locus D22 nosotros encontramos siete alelos en un intervalo de tamaños de 123 a 161 pb. Para este locus un trabajo previo notificó igualmente la presencia de siete diferentes alelos. Los tamaños observados para el locus D18 fueron de 75-91 pb con un total de cuatro alelos y en un estudio anterior obtuvieron seis alelos. En el caso del locus TexVet 7 el intervalo detallado por Rooney *et al.* (1999) es de 155 a 163 pb con seis diferentes alelos; el intervalo observado en este estudio fue de 160 a 188 pb con cinco diferentes alelos.

Las diferencias en el número de alelos encontrado en este estudio con respecto al notificado previamente se pueden deber a que las muestras que analizamos provienen de individuos emparentados y los individuos fundadores (madres y padres) pertenecen a localidades cercanas con probable flujo de individuos (Delgado-Estrella com. pers.) por lo que los valores de heterocigosidad en estas poblaciones deben ser menores a los observados en grupos de individuos no relacionados o de localidades de procedencias muy aisladas como es el caso de los estudios de Shinohara *et al.* (1997) y Rooney *et al.* (1999) además de que las muestras (N) de ambos trabajos son mucho más grandes que la nuestra. Para confirmar los datos de este estudio es recomendable aumentar el tamaño de la muestra y emplear geles de secuenciación con marcadores de peso molecular que permitan una resolución de una o dos bases de diferencia los alelos.

Durante los ensayos de PCR podemos observar que en algunos individuos amplificaron más de dos bandas dentro de los intervalos de tamaños esperados. Esto hace difícil determinar cuál es el alelo producto real de PCR y cuál de estas bandas es una banda inespecífica producto de un erróneo alineamiento de los iniciadores. Se ha reportado (Clemens *et al.*, 1991) que en estos casos las bandas de mayor intensidad son los productos esperados, ya que el híbrido entre los iniciadores y el templado del producto de PCR es más estable y por lo tanto más eficiente en su producción que el híbrido producto de una falla en la hibridación de los iniciadores.

## Pruebas de paternidad

De los cuatro microsatélites estandarizados en este estudio únicamente tres pudieron emplearse para confirmar la paternidad de las crías de delfín. Lo anterior debido a que el locus D18 no fue informativo en el análisis mencionado anteriormente. En estudios anteriores sobre la confirmación de paternidad con microsatélites (Hagelberg *et al.*, 1991; Amos *et al.*, 1993; Richard *et al.*, 1996; Clapham y Palsbøll, 1997; Hoelzel *et al.*, 1998b; Rooney *et al.*, 1999; y Möller *et al.*, 2001) se han empleado de cuatro a 12 loci polimórficos de microsatélites por lo que es necesario ampliar la batería de marcadores para resolver los casos de paternidad presentados en nuestra muestra poblacional.

Resulta difícil descartar aún con el uso de varios marcadores de microsatélites la paternidad de especies poligínicas. Se ha visto que machos de toninas en vida libre se relacionan temporalmente con grupos de hembras y copulan con varias de ellas sin presentar exclusividad en el apareamiento (Duffield y Wells, 1991). En el presente estudio nos apoyamos de los testimonios de entrenadores y veterinarios del parque en lo referente a la conducta y las fechas de concepción de las crías estudiadas, para confirmar la paternidad en un caso, en donde la evidencia molecular presentada no fue suficiente.

Dentro de los análisis de los polimorfismos se incluyeron dos hembras con sus respectivas crías que presentaron algunos alelos que no se observaron en el resto de los individuos analizados. Estas hembras no compartieron ninguno de los dos alelos con sus crías, esta incongruencia de datos entre madres y crías podría deberse a errores en el muestreo o a mutaciones en los alelos de los individuos derivando en un tamaño diferente por efecto del "resbalón" de la cadena complementaria. Lo anterior podría confirmarse con el empleo de un mayor número de marcadores, ya que el evento de mutación es azaroso y tiene pocas probabilidades de repetirse en dos diferentes regiones del genoma en el mismo individuo. Ambas crías murieron al nacer por lo que sólo se contó con una muestra de tejido para la extracción de DNA, y no se pudo comparar ni corroborar la identidad de dichas muestras.

Dos casos de paternidades disputadas por los machos I1 e I2 no se esclarecieron completamente (II5 y II7), esto fue debido al parecido molecular entre los machos, con los marcadores (D08 y D22).

Los marcadores más informativos para la resolución de los casos de paternidad fueron D08 y D22, aunque su resolución no fue suficiente. De los siete casos analizados en este estudio, se resolvieron cinco casos (71%), de los cuales únicamente uno se apoyó en información sobre los animales, los cuatro restantes

se concluyeron de manera molecular pero sólo uno de ellos por más de un microsatélite.

El presente trabajo es una base importante en el estudio de la biología molecular de las toninas *Tursiops truncatus* del parque de Xcaret que proveerá de valiosa información para el conocimiento y la conservación de dichos animales así como de las poblaciones silvestres de donde provienen. Los marcadores moleculares empleados en este estudio se pueden utilizar en un futuro para continuar monitoreando a las poblaciones de toninas tanto en condiciones naturales como en cautiverio así como para realizar diversos estudios de genética de poblaciones y filogeografía que apoyen las políticas de conservación de la especie y su hábitat.

## 1.9 CONCLUSIONES:

- La técnica de perclorato de sodio y EDTA se eligió por encima de la técnica DTAB-CTAB y el ACD por mejor rendimiento y fácil empleo.
- Tres marcadores polimórficos (TexVet7, D08 y D22) no fueron suficientes para confirmar todos los casos de paternidad desconocida.
- En los loci TexVet7, D08 y D18 se observó un menor número de alelos comparado con los reportados en la literatura. Estas diferencias pueden deberse al número de muestras (N), al parentesco entre individuos y al posible flujo entre la poblaciones de donde provienen los fundadores.
- De los siete casos analizados en este estudio, se resolvieron (tanto directa como indirectamente) cinco o el 71%.
- El presente trabajo es una base importante en el estudio de la biología molecular de las toninas *Tursiops truncatus* del parque de Xcaret que proveerá de valiosa información para el conocimiento y la conservación de dichos animales.

## 1.10 LITERATURA CITADA:

- Andersen, L.W, L.E. Holm, H.R. Siegismund, F. Clausen, C.C. Kinze and V. Loeschke. 1997. A combined DNA-microsatellite and isozyme analysis of the population structure of the harbour porpoise in Danish waters and west Greenland. *Heredity* 78(Pt3):270-276.
- Amos, B., C. Schlöterer and D. Tautz. 1993. Social Structure of Pilot Whales Revealed by Analytical DNA Profiling. *Science* 260 April.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Volumen 1. John Wiley and Sons Inc. 2.1.1-2.1.5,2.2.3.
- Berta, A. and J.L. Sumich. 1999. *Marine Mammals: Evolutionary Biology*. Academic Press USA. 494 pp.
- Bookstein, R., C. C. Lai, H. To and W.H. Lee. 1990. PCR-based detection of a polymorphic *BamHI* site in intron A of the human retinoblastoma (RT) gene. *Nucleic Acids Research*.(18):166-6
- Bruford, M.W. and R.K. Wayne.1993. Microsatellites and their application to population genetic studies.*Current Opinion in Genetics and Development* (3):939-943.
- Buchanan F.C., M.K. Friesen, R.P. Littlejohn and J.W. Clayton. 1996. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology* 5(4):571-575.
- Clapham, P.J. and P.J. Palsøll.1997. Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaeangliae*, Borowski). *Proceedings of the Royal Society London B*. (264):95-98.
- Clemens, P.R., R.G. Fenwick, J.S. Chamberlain, R.A. Gibbs, M. De Andrade, R. Chakraborty and C.T. Caskey.1991. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. (49):951-960.
- Delgado-Estrella, A. 1991. Algunos aspectos de la ecología de poblaciones de las toninas *Tursiops truncatus*, Montagu 1821, en la laguna de Términos y sonda de Campeche, México. Tesis de Licenciatura, Biología. ENEP Iztacala, UNAM. 149 pp.
- Delgado-Estrella, A.; Sánchez, O.R.;Vázquez M., L.E.; Ibarra, L. y Cruz M.O. 1999. Nacimiento, desarrollo y sobrevivencia de crías de toninas, (*Tursiops truncatus*), en

condiciones de cautiverio en el parque Xcaret, Quintana Roo, México. XXIV Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos. Memorias 18-22 abril 1999. Mazatlán, Sinaloa. Pag. 21.

-Duffield, D.A. and J. Chamberlin-Lea. 1990. Use of Chromosome Heteromorphisms and Hemoglobins in Studies of Bottlenose Dolphin Populations and Paternities Pp. 609-619. En: S. Leatherwood y R. Reeves (Eds.) The bottlenose dolphin. Academic Press. San Diego, USA. 653 pp.

-Ellegren, H. 1991. DNA typing of museum birds. *Nature*. 354(6349):113.

-Escorza S., C.A. Lux and A.S. Costa. 1997. Methods of DNA extraction: from initial tissue preservation to purified DNA storage. En: *Molecular Genetics of Marine Mammals*. A. E. Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin, eds. Special Publication 3:87-106.

-Escorza Treviño, S., K. Abella and A.E. Dizon. 1999. Stock structure analyses of spotted dolphins in the eastern tropical Pacific Ocean reveal a high degree of female philopatry. Resúmenes de la XIII Conferencia bienal de Biología de Mamíferos Marinos. Wailea, Maui, Hawaii.

-Escorza-Treviño, S. and A.E. Dizon. 2000. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 9(8):1049-1060.

-Foote TJ. 1983. The relevance of captive populations to the conservation of biotic diversity Pp. 1-14. En: Schoenwald-Cox CM. Chambers SM, MacBryde B, and Thomás L. (Eds.) *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings.

-Gallo-Reynoso, J.P. 1986. Sobre mamíferos marinos mexicanos. *Rev. Tec. Pesq.* 19(219):10-16.

-Garrison, L.M., W.F. Perrin, C. Vitulli and A.E. Dizon. 1999. 3 types of genetic markers used to compare worldwide genetic variation with morphology and ecology in spinner dolphins. Resúmenes de la XIII Conferencia bienal de Biología de Mamíferos Marinos. Wailea, Maui, Hawaii.

-Gladden J.G., M.M. Ferguson, M.K. Friesen and J.W. Clayton. 1999. Population structure of North American beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 8(3):347-363.

-Goldstein, D.B and Pollock, D.D. 1997. Launching microsattelites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* (88):335-342.

-Gómez-Rubio, A., A. Delgado-Estrella y J.G. Ortega-Ortiz. 1994. Comportamiento alimentario de una cría de *Tursiops truncatus* en condiciones de semicautiverio. Resúmenes de la XIX Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S.

-Griffin, H.G. and A.M. Griffin .1995. PCR Technology : Current Innovations. CRC Press. Inc.383pp.

-Guistincich, S., G. Manfietti, G. Del Sal, C. Schneider and P. Carninci. 1991. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* (11):298-300,302.

-Gustafson, S., J.A. Proper, E.J. W. Bowie and S.S. Sommer. 1987. Parameters affecting the yield of DNA from Human Blood. *Analytical Biochemistry* (165):294-299.

-Hagelberg E, Gray IC and Jeffreys AJ 1991. Identification of the Skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* (352):427-429.

-Hauge X.Y and M. Litt. 1993. A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Human Molecular Genetics* 2(4):411-415.

-Hersh, S.L. and D. A. Duffield. 1990. Distinction between Northwest Atlantic Offshore and Coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. Pp.129-139 . En: S. Leatherwood y R. Reeves (Eds.) *The bottlenose Dolphin*. Academic Press. San Diego.

-Higuchi, R., D.H. Von Beroldigen, G.F. Sensabaugh and H.A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 332(6164):543-6.

-Hoelzel, A.R.,C.W. Potter and P.B. Best. 1998a. Genetic differentiation between parapatric nearshore and offshore populations of the bottlenose dolphin. *Proceedings of the Royal Society London B*. Jul 7;265(1402):1177.

-Hoelzel, A.R., M.Dalheim and J. Stern. 1998b. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern north Pacific and genetic differentiation between foraging specialists.*Journal of Heredity*(89):121-128.

-Hung, T, K. Mak, and K. Fong. 1990. A specificity enhancer for polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Research* 18: 4953

-Jefferson, T.A., S. Leatherwood and M.A. Weber. 1993. FAO species identification guide. Marine mammals of the world. FAO. Roma. 320p.

-Koorey, D.J., G.W. McCaughan, R.J. Trent and N.D. Gallagher. 1992. Dinucleotide repeat polymorphism at the D5S134 locus linked to the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Human Molecular Genetics*. 1(8):655-659.

-Li, H., U.B. Gyllensten, X. Cui, R.K. Saiki, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1988. Amplification an analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells, *Nature*, 335(6189):414-417.

-López-Hernández, I. 1997. Ecología poblacional de las toninas *Tursiops truncatus* en la costa de Tabasco, México. Tesis Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 77pp.

-Mead, J.G. and C.W. Potter. 1990. Natural history of the bottlenose dolphins along the central Atlantic coast of the United States Pp195-195. En: S. Leatherwood y R. Reeves (Eds.) *The bottlenose dolphin*. Academic Press. San Diego.

-Möller, L.M., L.B. Beheregaray, R.G. Harcourt and M. Krützen. 2001. Alliance membership and kinship in wild male bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia. *Proceedings of the Royal Society London B*. 268(1479):1941-1947.

-Mullis, K.B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. 262(4):56-61, 64-65

-Nauta, M.J. and F.J. Weissing. 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: implicaciones for genetic differentiation. *Genetics*. 143(2):1021-1032.

-O'Corry-Crowe, G.M., R.S. Suydam, A. Rosenberg, K.J. Frost and A.E. Dizon. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* (6):955-970.

-Ortega-Ortíz, J.G. 1996. Distribución y abundancia de las toninas *Tursiops truncatus*, en la Bahía de la Ascensión, Q. Roo, México. Tesis Maestría, ICMYL, UACYP-CCH, UNAM. 82 pp.

-Palsbøll, P.J., J. Allen, M. Bérube, P.J. Clapham, T.P. Feddersen, P.S. Hammond, R.R. Hudson, H. Jørgensen, S. Katona, A.H. Larsen, F. Larsen, J. Lien, D.K. Mattila, J. Sigurjónsson, R. Sears, T. Smith, R. Sponer, P. Stevick and N. Øien. 1997. Genetic tagging of humpback whales. *Nature* (388):767-769.

-Pérez-Cao, H. 1996. Genética-Bioquímica Poblacional del delfín tonina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) de Cuba. Trabajo de Diploma, Universidad de la Habana, Facultad de Biología.64 pp.

-Pichler F.B. d C.S. Baker.2000. Genetic Impact of bycatch on endemic Hector 's dolphin: Change in diversity over one hundred years. Proceedings of the Royal Society London B.267(1438):97-102.

-Richard, K.R., M.C. Dillon, H. Whitehead and J.M. Wright.1996. Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. Proceedings of the National Academy of Science USA (93):8792-8795.

-Ridgway, S.H. and K. Bernischke.1977. Breeding dolphins: Present Status, suggestions for the future. S.H. Ridgway y K. Bernischke, eds. U.S. Marine Mammal Comminssion Report MMC-76/77, Washington, D.C.

-Rooney, A.P., D.B., Merrit and J.N. Der.. 1999. Microstellite Diversity in Captive Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Journal of Heredity. Jan-Feb;90(1) 228-231.

-Schlötterer C and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research 20(2):211-215.

-Shane, S.H.1988. The bottlenose dolphin in the wild. Published in the United States by Susan H. Shane. 49 pp.

-Shane, S.H., R. S. Wells and B. Würsig. 1986. Ecology, behavior and social organization of the bottlenose dolphin: A review. Marine Mammal Science 2(1):34-63.

-Sharp, G.D. 1976. Biochemical Genetic Studies, their value and limitations in stock identification and discrimination. Scientific Consultation on Marine Mammals. Bergen, Norway, 31 August-9 September. Food and agriculture organization of the United Nations.

-Shinohara, M., X. Domingo-Roura and O. Takenaka. 1997. Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. Molecular Ecology 6(7):695-696.

-Tautz, D.1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research. Vol 17(16):6463-6471.

- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. Vol 12(10):4127-4138.
- Tavolga, M.C. 1966. Behavior of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Social interactions in a captive colony. En: K.S. Norris (Ed) "Whales, dolphins and porpoises" Pp.718-730. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Tavolga, M.C. and F.S. Essapian. 1957. The behavior of the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*): Mating, pregnancy, parturition and mother-infant behavior. *Zoologica* 42(1):11-31.
- Tinker, S.P. 1988. *Whales of the World*. Bess Press, Inc., Honolulu, Hawaii. 310pp.
- Valsecchi E. and W. Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* (5):151-156.
- Varadaraj K. and D.M. Skinner. 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* (140):1-5.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. Scientific American Books. New York. 79-95 pag.
- Weber, J.L. and C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2(8):1123-1128.
- Williams J.R., Little J.B. and Shipley WU. 1974. Association of mammalian cell death with specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* (252): 754-755.
- Wu, Q., M. Chen, M. Buchwald and R.A. Phillips. 1995. A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 5087-5088.

## APÉNDICE A

### ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tablas</b>	<b>Páginas</b>
1. Condiciones reportadas para los microsatélites empleados en este estudio	17
2. Parámetros de las muestras de DNA	22
3. Características de los individuos que conforman el banco genómico	23-24
4. Tamaños y frecuencias relativas de los alelos obtenidos para los cuatro loci analizados	34
5. Individuos muestreados para los cuatro loci analizados	35
6. Individuos involucrados en los casos de paternidad desconocida	36
7. Diagnósticos de confirmación de paternidad	43

### Figuras

1. Muestras de DNA obtenidas a partir de tejidos de delfín	19
2. Muestras de DNA extraído a partir de sangre humana empleando la Técnica I (DTAB-CTAB)	21
3. Comparación de las dos técnicas de extracción de DNA empleadas en este estudio	21
4. Productos obtenidos con los iniciadores para el locus TexVet7	26
5. Análisis de los productos de PCR del locus TexVet7 mediante electroforesis en gel de acrilamida	26
6. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores D08	26
7. Análisis de los productos de PCR del locus D08 mediante electroforesis en gel de acrilamida	27
8. Productos de PCR para el marcador D22	27
9. Análisis de los productos de PCR del locus D22 mediante electroforesis en gel de acrilamida	27
10. Productos de PCR del marcador D18	28
11. Análisis de los productos de PCR del locus D18 mediante electroforesis en gel de acrilamida	28
12. Secuenciación del locus TexVet 7	29
13. Secuenciación del locus D08	30
14. Secuenciación del locus D22	31
15. Polimorfismos del marcador TexVet7	32
16. Polimorfismos del marcador D08	33

17. Polimorfismos del marcador D08	33
18. Polimorfismos del marcador D08	33
19. Polimorfismos del marcador D22	34
20. Polimorfismos del marcador D22	34
21. Polimorfismos del marcador D18	34
22. Prueba de paternidad para II 4 con el marcador Tex Vet7	37
23. Prueba de paternidad para II 4 con el marcador D08	38
24. Prueba de paternidad para II 4 con el marcador D22	38
25. Prueba de paternidad para II 5 con el marcador D22.	39
26. Prueba de paternidad para II 8 con el marcador D22	39
27. Prueba de paternidad para II 9 con el marcador D08	40
28. Prueba de paternidad para II 9 con el marcador D22	40
29. Prueba de paternidad para II 11 con el marcador D22	41
30. Prueba de paternidad para II 13 con el marcador D22	41
31. Prueba de paternidad para II 15 con el marcador D08	42
32. Prueba de paternidad para II 17 con el marcador D08	42
33. Prueba de paternidad para II 19 con el marcador D22	43

## APÉNDICE B

### ABREVIATURAS

A:	Absorbancia
DNA:	ácido desoxiribonucleico
cm <sup>2</sup> :	centímetros cuadrados
DMSO:	dimetilsulfoxido
dNTPs:	desoxiribonucleótidos trifosfato
ETP:	población tropical oriental (Eastern Tropical Population)
EtOH:	alcohol etílico
Hb:	hemoglobina
kb:	kilobase
L:	litro
M:	molaridad mol/litro
MgCl <sub>2</sub> :	cloruro de magnesio
mM:	milimolar
mL:	mililitro
mtDNA:	ácido desoxiribonucleico mitocondrial
NaCl:	cloruro de sodio
NaClO <sub>4</sub> :	perclorato de sodio
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pH:	potencial de hidrógenos

rpm:	revoluciones por minuto
STR:	short tandem repeats (repetidos cortos en tandem)
SSLP:	single strand length polymorphisms (polimorfismos de longitud de cadena sencilla)
SSR:	short sequence repeats (secuencias repetidas cortas)
SSCP:	single strand conformation polymorphisms (polimorfismos conformacionales de cadena sencilla)
T <sup>o</sup> A:	temperatura ambiente
V:	volts
VNTRs:	variable number tandem repeats (repetidos en tandem de número variable)
vol:	volúmen
μL:	microlitro
°C:	grados centígrados
*	multiplicación
λ:	longitud de onda

## **APÉNDICE C SOLUCIONES EMPLEADAS**

### **TÉCNICA I**

\*Solución de lisis:

DTAB 8%

NaCl 1.5 M

Tris-HCl 100mM

EDTA pH 8.6 50mM

\*Solución de NaCl

NaCl 1.2M

\*Solución de precipitación

CTAB 5%

NaCl 0.4 M

\*Anticoagulante EDTA 0.5% pH 7.6 (1mL/5mL de sangre).

### **TÉCNICA II**

\*Buffer de lisis I (filtrar con membrana 0.2 $\mu$ )

Sacarosa 0.3M

Tris-HCl (pH 7.5) 10mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

Tritón X-100 1%

Conservar a 4°C y cubrir con aluminio

\*Buffer de lisis II

NaCl 0.075 M

Na-EDTA 0.024M

Ajustar pH8 y conservar a T° ambiente

### **EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE TEJIDO**

\*Buffer de lisis

Na Cl 400mM

Tris-HCl (pH 8.5) 100mM

SDS 0.2%

Rnasa A 40 ( g/mL

Proteinasa K 500 (g/mL

## **PURIFICACION DE DNA**

### **\*FENOL-ISOAMIL-CLOROFORMO**

Fenol 25 volúmenes

Cloroformo 24 volúmenes

Alcohol isoamílico 1 volúmen

## **SOLUCIONES GENERALES**

### **\*SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA PCR**

200 mM Tris-HCl (pH 8.4)

500 mM KCl

### **\*TE**

Tris-HCl pH7.5

Na-EDTA 1mM pH8

### **\*TBE 10X**

TRIZMA base 107.77g

EDTA 9.3g

Ácido bórico 55.02

Disolver en 800mL y ajustar pH a 8.3, aforar a un litro y esterilizar por autoclave.

### **\*AGAROSA 8%**

Agarosa 0.8g

TBE 1X 100mL

Bromuro de etidio 10mg/mL 3µl

### **\*AGAROSA 2%**

Agarosa 2 g

TBE 1X 100mL

Bromuro de etidio 10mg/mL 3µl

### **\*BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL)**

Bromuro de Etidio 1g

100 mL de agua

Mantener en aluminio y a T° ambiente

### **\*SOLUCIÓN PARA TEÑIR GELES DE ACRILAMIDA**

Bromuro de etidio (10mg/mL) 5µl

TBE 1X 100mL

### **\*SOLUCIÓN FIJADOR DE GELES DE ACRILAMIDA**

Metanol 10%  
Ácido acético 10%  
Agua 80%

\*SDS 10%  
lauril sulfato de sodio 100 g  
Disolver en 900mL de agua. Calentar a 68°C  
Ajustar pH a 7.2 y aforar a un litro de agua

\*APS 10%  
Persulfato de amonio 1g  
Agua 10mL (preparar en el momento)

\*SOLUCIÓN ACRILAMIDA 40% (Saamrock et al)  
Acrilamida 380g  
N,N' metilenbisacrilamida 20g  
Agua 1 litro (caliente a 37°C para disolver)  
Filtrar y almacenar en botellas oscuras a 4°C

\*SOLUCIÓN ACRILAMIDA 30%  
Acrilamida 29 g  
N,N' bmetilenbisacrilamida  
Agua 100 mL  
(mismás recomendaciones que al 40%)

\*BUFFER DE MUESTRA PARA ÁCIDOS NUCLÉICOS  
Azul de bromofenol 0.25%  
Xilen cianol FF 0.25%  
Glicerol en agua 30%

\*BUFFER DE MUESTRA CON FORMAMIDA  
Azul de bromofenol 0.09%  
Xilen cianol FF 0.09%  
Formamida 95%  
Almacenar a 4°C hasta tres meses

\*FENOL SATURADO (100mL)  
Fenol 50mL  
Tris-HCl 50mL  
8-hidroxiquinoleína 1pst  
Mezclar hasta que se separen las dos fases