

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio genético de la liebre de
Tehuantepec (*Lepus flavigularis*) utilizando
microsatélites de ADN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE :**

B I Ó L O G A

P R E N T A A:

ERNESTINA CÁNDIDA CAAMAÑO CASALES

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. FERNANDO
ALFREDO CERVANTES REZA**

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
» <i>Lepus flavigularis</i>	2
» Fragmentación del hábitat	3
» Marcadores Moleculares	7
» Perdida de la variabilidad genética	8
Objetivo	9
Material y Métodos	9
» Recolección de la muestra	
9	
» Extracción del ADN	14
» Amplificación del ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	15
» Captura y análisis de los datos	23
Resultados	23
» Variación alélica	27
» Variación genotípica	30
» Endogamia	33
Discusión	34
Conclusiones	37
Sugerencias para la conservación de <i>Lepus flavigularis</i>	38
Literatura Citada	48

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Número y localidad de la toma de muestra de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	11
Cuadro 2. Características de los microsatélites que se utilizaron para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Fuente Mougel et al. 1197	15
Cuadro 3. Concentración 1: ADN (ng/μl) encontrado para cada muestra utilizada. Concentración 2: μl necesarios para cada uno de los individuos, a una concentración final de 100 ng/μl de ADN para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	17
Cuadro 4. Volúmenes y concentraciones de los reactivos que se utilizaron en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	18
Cuadro 5. Programa del termociclador par la amplificación de los microsatélites Sat 2, 3, 5 y 16 que se utilizaron para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	19
Cuadro 6. Voltaje y tiempo de corrimiento para los geles de archilamida-bis-acrilamida, para cada uno de los microsatélites amplificados, en la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	21
Cuadro 7. Matriz de genotipos resultantes de la lectura de las bandas de ADN, para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. * Individuos Heterocigotos. 01, 02, 03, 04, 05 y 06 son los diferentes alelos encontrados.	22
Cuadro 8. Probabilidad de ligamiento por el método de Markov, para cada par de loci en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	25
Cuadro 9. Tamaño de los alelos en pares de bases (pb), para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca	26

Cuadro 10. Comparación del tamaño de los loci reportados, en pares de bases (pb), con el tamaño encontrando en la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. * Mougel et al (1997)	27
Cuadro 11. Número de heterocigotos esperados (He) y observados (Ho), de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México	32
Cuadro 12. Nivel de endogamia Fis, en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> de Tehuantepec, Oaxaca. México.	33
Figura 1. Liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Foto: Verónica Farias.	3
Figura 2. La flecha indica el área de distribución de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.	5
Figura 3. Sitio de muestreo (*) para el estudio genético de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.	10
Figura 4. Toma de muestra de tejido de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, para la extracción de ADN. Foto: Verónica Farias.	12
Figura 5. Laboratorio de Biología Molecular anexo a la Colección Nacional de Mamíferos, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.	13
Figura 6. Gel de azarosa, mostrando el ADN extraído de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Cada carril indica un individuo.	14
Figura 7. En el extremo superior se muestran las bandas de amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa de ADN para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, en el gel de agarosa. Cada carril indica un individuo.	19

Figura 8. Cámara vertical de electroforesis para geles de acrilamida, en la que se realizó el corrimiento del producto del PCR, para las muestras de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.	20
Figura 9. Bandas de ADN producto de la amplificación por PCR de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, en gel de acrilamida. Cada carril indica un individuo. El marcador es en pares de bases (pb). Foto A Individuos homocigotos. Foto B individuos heterocigotos.	22
Figura 10. Número de alelos por locus en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.	28
Figura 11. Frecuencias alélicas para cada uno de los locus en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. ...	29
Figura 12. Porcentaje de Individuos homocigotos por locus en la población de la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. ...	30
Figura 13. Comparación de heterocigotos esperados (H_e) y observados (H_o), para la liebre <i>Lepus flavigularis</i> del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca.México. En todos los casos es mayor H_e	32

APÉNDICES

Apéndice 1	39
Apéndice 2	41
Apéndice 3	43
Apéndice 4	45
Apéndice 5	47

RESUMEN

La liebre tropical (*Lepus flavigularis*), es una especie monotípica, endémica de México y se encuentra en peligro de extinción. Su hábitat se restringe a la faja costera del sureste de Oaxaca, desde Tehuantepec hasta el límite con Chiapas, y se encuentra fragmentado. Para contribuir a su conservación, se requiere efectuar evaluaciones de su variabilidad genética por lo que en este estudio se examinaron cuatro microsatélites de su ADN. El área de muestreo comprendió solo una población, donde se tomaron muestras de tejido de oreja de 20 individuos capturados. De estas muestras, se extrajo el ADN con la técnica de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico y los microsatélites fueron amplificados por medio de PCR. Los resultados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 10%, se identificaron individuos homocigotos y heterocigotos, se realizó una matriz de datos y se analizaron con Gene Pop. Se encontró que el número de alelos en la población de *Lepus flavigularis* fue bajo, siendo el Sat 3 el más alto (6 alelos). El número de individuos heterocigotos más alto correspondió al Sat 16 con 8. Se encontró que el número de individuos homocigotos más alto fue el Sat 2 con 20. También se registraron frecuencias alélicas de 0.5, dando como consecuencia que en el equilibrio de Hardy-Weinberg detectara una deficiencia significativa de heterocigotos ($P < 0.000$). Fis fue de 0.94 lo cual indica endogamia en la población. Se concluyó que la variabilidad en esta población es baja, comparada con *L. americanus*, *L. timidus* y *L. europeus*, probablemente por las condiciones de aislamiento y fragmentación en el que se encuentra el hábitat. Por lo que es necesario saber cómo se encuentran genéticamente las otras poblaciones, para poder favorecer el flujo genético entre estas y proponer su conservación.

INTRODUCCIÓN

Los lagomorfos se encuentran representados en casi todo el mundo, su característica distintiva es la presencia de un segundo par de dientes atrás de los incisivos superiores, presentan un cráneo fenestrado e hileras de dientes no coincidentes superiores e inferiores y cola corta (Cervantes, 1993). Estos mamíferos se dividen en dos familias: Ochotonidae (picas) y Leporidae (liebres y conejos). En México existen solamente lepóridos (Romero, 2004) y están representados por tres géneros con 15 especies: cinco son liebres (Género *Lepus*), nueve son conejos (Género *Silvilagus*) y el género *Romerolagus* con una sola especie (Aranda, 2000; Cervantes, 1993). Entre las liebres encontramos a *Lepus flavigularis*, la cual tiene la distribución más sureña de todas las especies del género y es considerada como un taxón en peligro de extinción (NOM-059 – Ecol-2002).

Lepus flavigularis

Lepus flavigularis Nelson 1909 (Cervantes, 1993; Fig. 1) es una liebre grande, de patas largas por lo que es de movimientos rápidos, además presenta grandes orejas, el color general es pardo grisáceo en el dorso y blanco grisáceo en el vientre; la cola es pequeña y de color blanco; un ejemplar adulto pesa de dos a cinco kilos. (Aranda y March, 1987). Es un animal solitario, activo tanto en el día como en la noche (Aranda y March, 1987, Villa y Cervantes, 2003). Las liebres nacen con pelo y con los ojos abiertos llamados lebratos, en pequeños depresiones o camas en forma de cuna, formadas por hojas secas, generalmente cerca de algún arbusto y su alimentación consiste en tallos, brotes tiernos, semillas, corteza de hierbas y diversos arbustos (Villa y Cervantes, 2003). El apareamiento puede ocurrir en cualquier época del año, el período de gestación es alrededor de 45 días y consiste de dos a cuatro lebratos, los cuales nacen desarrollados (Aranda y March, 1987).



Figura 1. Liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Foto: Verónica Farias.

La liebre de Tehuantepec es una especie monotípica y endémica de México, solamente se le ha encontrado en la faja costera del sureste de Oaxaca, desde Tehuantepec hasta los límites con Chiapas (Villa y Cervantes, 2003; Romero, 2004; Fig.2). En el hábitat de esta liebre dominan asociaciones vegetales derivadas de bosque tropical caducifolio o matorral subtropical, que puede ser vegetación secundaria derivada del impacto negativo sobre la vegetación original (Vargas, 2000). Es una zona con suelos arenosos, abierta y con pocos arbustos, donde se pueden encontrar pastizales, matorrales, manchones de mangle botoncillo (*Conocarpus erecta*) y abundantes nopales (*Opuntia tehuantepeca* y *O. decumbens*; Vargas, 2000; Rzedowski, 1991). Este hábitat al igual que otros, ha sido altamente perturbado por la acción del hombre (Sántiz, 2002) por la tala de árboles, incendios, y el intenso pastoreo (Vargas, 2000; Sántiz, 2002), ocasionando la fragmentación de su paisaje y de las poblaciones de la liebre.

Fragmentación del hábitat

La distribución espacial de muchas especies, se encuentra fragmentado, en forma de "parches" (Amos y Harwood, 1998), ocasionando la reducción de las poblaciones en su ambiente, lo que ocurre a una tasa acelerada (Ashley, 1999). Asimismo, cuando el hábitat es fragmentado por grandes distancias geográficas, barreras físicas o antropogénicas se dice que, el equilibrio se encuentra en peligro (Amos y Harwood, 1998), dando origen a poblaciones aisladas de fauna y flora pequeñas y a su vez, también en peligro de extinción local (Portales, 1996; Amos y Harwood, 1998; Mossman y Waser, 2001).

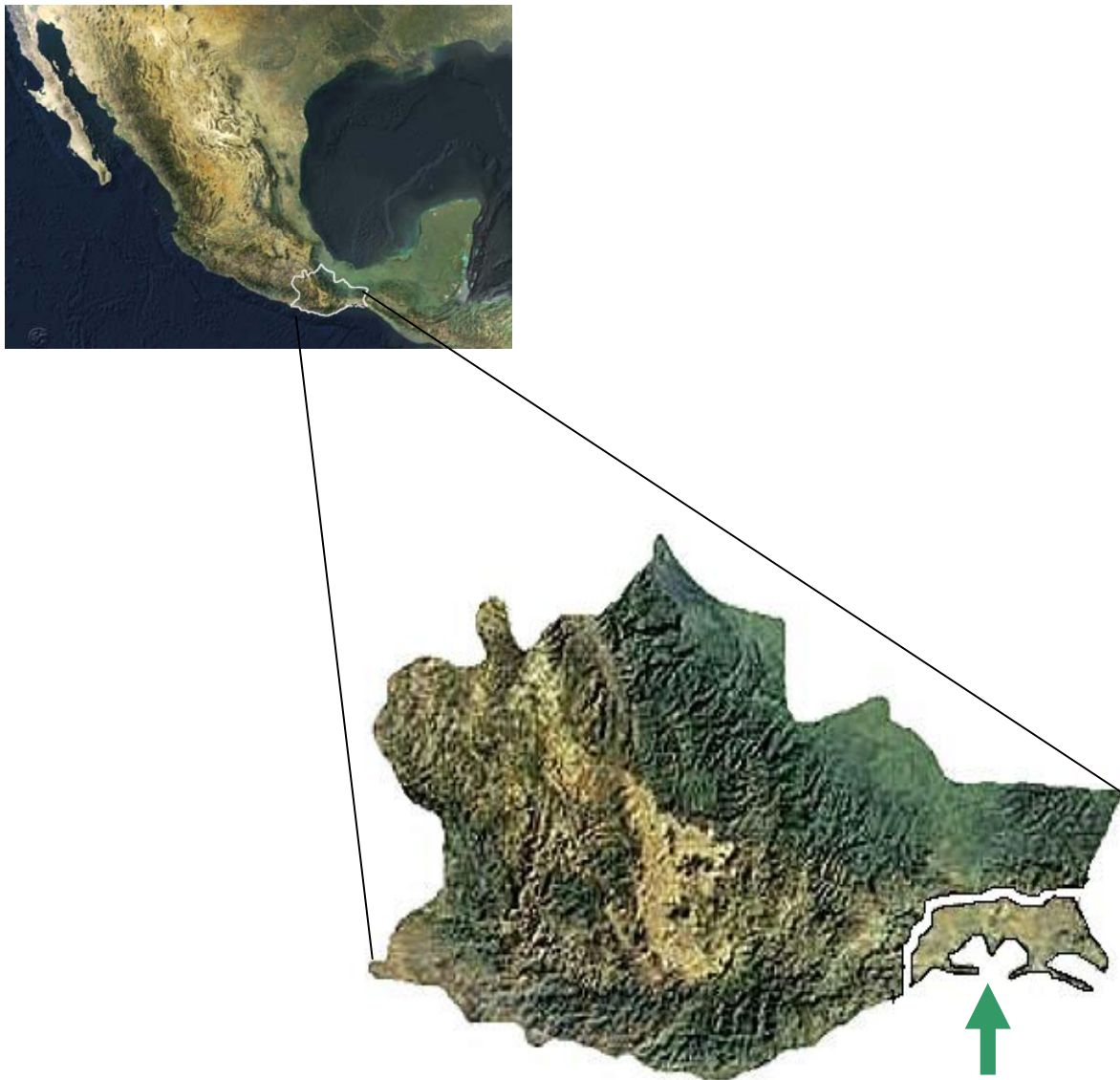


Figura 2. La flecha indica el área de distribución de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

Igualmente, dichos procesos influyen en la estructura genética, impidiendo el flujo genético entre las poblaciones (Friar et al. 2001; Mossman y Waser, 2001), debido a que esta relación es inversa, ya que si hay una comunicación entre las poblaciones, mayor será la variabilidad genética entre éstas (Goldstein y Schlötterer, 2000; SurrIDGE et al. 1998). De la misma manera, la reducción del tamaño de la población aislada, se refleja en el aumento de su endogamia, repercutiendo en la disminución de la variabilidad genética (Amos y Harwood, 1998; SurrIDGE et al. 1998). Esto se sabe que ocurre con *L. flavigularis*, de la que se conocen actualmente tres poblaciones, separadas en forma triangular por la Laguna Inferior, y asentamientos humanos dentro de un promedio aproximado de 24.17 km entre cada una de ellas (Villa y Cervantes, 2003). Sin duda esta fragmentación del hábitat ha impactado el componente genético de la liebre. Por ejemplo, en un estudio aloenzimático de la variación genética de *L. flavigularis* se encontró un número bajo de alelos por locus de 1.3 (Cervantes et al. 2002). Es probable que esto se deba a la alta fragmentación de su hábitat y a su aislamiento geográfico (Cervantes et al. 2002), pero no se ha comprobado.

Por lo que esto es un aspecto relevante para el tema de la conservación genética de esta especie (Dallas et al. 2002), pues la pérdida del material genético y del potencial evolutivo que esto puede representar, la pone en peligro volviéndola incapaz de ser adaptable a los cambios ambientales (SurrIDGE et al. 1998; Goldstein y Schlötterer, 2000).

Por lo tanto, si se conocen los problemas que ocasiona la fragmentación del hábitat en la estructura genética, de la población de *L. flavigularis* y que además se quiere promover la conservación de esta especie, como se ha hecho para otros

taxa (Hochachka y Mommsen, 1993), es necesario conocer la estructura y la variación genética dentro de su especie, pues el perfil de la diversidad genética natural es la llave para la evolución, la adaptación y la especiación (Amos y Harwood, 1998; SurrIDGE et al. 1998). Este conocimiento debe apoyarse en métodos más precisos para el análisis de la variación genética intrapoblacional, como es el uso de los marcadores moleculares.

Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas que han auxiliado a entender procesos genéticos en estudios ecológicos y de conservación con especies en peligro de extinción (Dalla y Piertney, 1998; Hajeer et al. 2000; Clark y Russell, 2000). Entre los marcadores moleculares más utilizados se encuentran los microsatélites (Walker y Rapley, 2000), que son repeticiones de ADN de un tamaño de alrededor de 100 a 300 pares de bases (pb; Ferraris y Palumbi, 1996; Prado et al. 1997; Clark y Russell, 2000), su tipo de herencia es codominante y presentan un alto polimorfismo (Ashley y Dow, 1994; Andersson et al. 1999; Hajeer et al. 2000). Estas cualidades permiten distinguir fácilmente variaciones genéticas intraespecíficas (SurrIDGE et al. 1999; Goldstein et al. 1999; Goldstein y Schlötterer, 2000). Proporcionan una extraordinaria resolución de discriminación genética (Goldstein et al. 1999; Saunders y Parkes, 1999; SurrIDGE et al. 1999; García et al. 2001), lo que resulta de mucha utilidad para conocer la estructura genética de las poblaciones (Andersson et al. 1999; SurrIDGE et al. 1999; Goldstein et al. 1999). La información que estos generan, permite inferir (Jörg y Thomas, 1999; Baker, 2000; Goldstein y Schlötterer, 2000) eventos que puedan presentar las poblaciones, como el nivel de endogamia y la reducción de la variación

genética (Bruford y Wayne 1993; Amos y Harwood, 1998), como producto de un “cuello de botella” (Ashley y Dow, 1994; Amos y Harwood, 1998; Andersson et al. 1999; Queney et al. 2000).

Pérdida de la variabilidad genética

Los niveles de variación genética en una población silvestre pueden ser evaluados por cambios en la heterocigosidad (Goldstein y Schlötterer, 2000; Saunders y Parkes, 1999), lo cual se ha observado exitosamente con el estudio de los microsatélites de ADN (Mougle et al. 1997; SurrIDGE et al. 1998; Queney et al. 2000; Burton, 2002), en el estudio para la conservación de especies en peligro de extinción, como los lagomorfos (Mougle et al. 1997; SurrIDGE et al. 1998; Queney et al. 2000; Burton et al. 2002). Por ejemplo, se ha reportado que en una población silvestre del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), la dinámica de la migración de individuos es la estabilidad en la población, en donde si ésta es afectada, altera gravemente a la estructura genética (SurrIDGE et al. 1999; Mossman y Wasser, 2001). Esto se pudo concluir realizando el análisis genético con microsatélites, ya que estos permiten trabajar a una escala fina dentro de la población (Saunders y Parkes, 1999; SurrIDGE et al. 1999), permitiendo documentar la pérdida de la variación genética en la población silvestre (Taylor y Cooper, 1999; Saunders y Parkes, 1999).

Por lo tanto, si se conocen las consecuencias que ocasiona la fragmentación del hábitat en la estructura genética y que además, se sabe que el área de distribución actual de *L. flavigularis* está fragmentada, es necesario conocer la estructura genética de la población. Por lo que si el aislamiento de una población silvestre de *L. flavigularis*, ocasiona una reducción en su variabilidad

genética, entonces la población en estudio presentará una variabilidad genética baja, en comparación con otros lagomorfos en los que su hábitat está relativamente mejor conservado, y por consiguiente también su contenido genético.

OBJETIVO

- Estimar la variación genética intrapoblacional de la liebre de Tehuantepec *Lepus flavigularis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de las muestras

Se colectaron muestras de 20 ejemplares del poblado de Santa Cruz (Montecillo, Figura 3), municipio de San Francisco del Mar, localizado en el estado de Oaxaca, México a 10 metros sobre el nivel del mar (16° 13' 55" N, 94° 37' 56" W). Las colectas se realizaron del 27 de Abril al 30 de Agosto del 2001 (Cuadro 1). Cada muestra de tejido (Figura 4) consistió en piel, procedente de perforaciones de la oreja de aproximadamente 3 mm de diámetro. Este tejido se colocó en microtubos para centrifuga de 1.5 µl con alcohol al 95 % y se guardaron en el refrigerador convencional para su posterior análisis en el Laboratorio de Biología Molecular, anexo a la Colección Nacional de Mamíferos, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal (Figura 5).



Figura 3. Sitio de muestreo (*) para el estudio genético de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

N° de ejemplar	Localidad	Coordenadas
1	Llano el Cacal, 5.71 km. NNW Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 24' 4.7" 94° 37' 33.4"
2	4.6 km. WNW San Francisco del Mar Viejo, Mpio. San Francisco del Mar.	16° 14' 49.9" 94° 40' 16.3"
3	2.8 km. WNW San Francisco deL Mar Viejo. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 15' 3.7" 94° 38' 54.9"
4	5.9 km. WNW San Francisco deL Mar Viejo. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 14' 41.1" 94° 40' 46.4"
5	Llano Contreras, 4.9 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 32 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 9.7" 94° 37' 55.4"
6	Llano Contreras, 4.8 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 23 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 2.2" 94° 37' 54.4"
7	Llano Contreras, 4.3 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 20 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 59.1" 94° 37' 36.32"
8	Llano Contreras, 4.4 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 17 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 11.8" 94° 37' 35.2"
9	Llano Contreras, 4.4 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 27 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 4.3" 94 37° 37'.2"
10	Llano Contreras, 4.3 km. WNW Santa Cruz (Montecillo). 21 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 48.9" 94° 37' 37.1"
11	Llano Contreras, 4.8 km WNW Santa Cruz (Montecillo). 18 m. Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 22.5" 94° 38' 9.5"
12	Llano Contreras 4 km. NW Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 00.7" 94° 37' 22.9"
13	Llano Contreras 3.88 km NW Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 06.1" 94° 37' 15.2"
14	Llano Contreras 4.38 km. W Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 07.0" 94° 37' 41.1"
15	Llano Contreras 3.37 km. W Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 36.9" 94° 37' 15.6"
16	Llano Contreras, Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 23' 04.6" 94° 36' 58.5"
17	Llano Contreras, Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 53.0" 94° 37' 29.4"
18	Llano Contreras, Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 58.7" 94° 37' 49.3"
19	Llano Contreras, Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 47.2" 94° 37' 39.7"
20	Llano Contreras, Santa Cruz (Montecillo). Mpio. San Francisco del Mar.	16° 22' 56.9" 94° 37' 51.0"

Cuadro1. Número de la muestra y localidad de procedencia de la liebre

***Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.**



Figura 4. Toma de muestras de tejido de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, para las extracciones de ADN.

Foto: Verónica Farias.



Figura 5. Laboratorio de Biología Molecular anexo a la Colección Nacional de Mamíferos, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.

Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó por medio del procedimiento convencional de fenol cloroformo-alcohol-isoamílico (Saunders y Parkes, 1999; Darbre, 2001), con modificaciones (Apéndice 1). Para confirmar la presencia del ADN extraído se realizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa durante 30 min a 110 v 57 mamp (Apéndice 2) y posteriormente se tomaron fotos de las bandas resultantes de ADN, utilizando una cámara Polaroid instantánea con luz ultra violeta (Sambrook et al. 1989; Jörg y Lubjuhn, 1999; Figura 6).

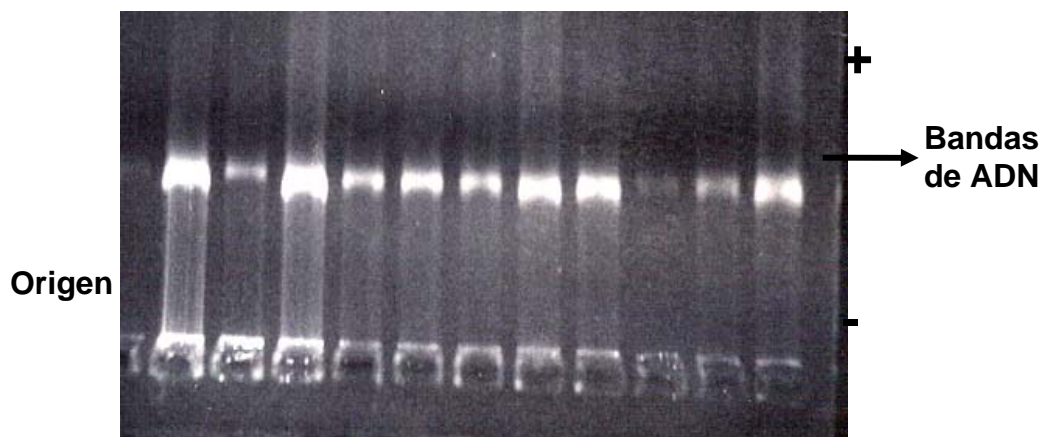


Figura 6. Gel de agarosa, mostrando el ADN extraído de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Cada carril indica un individuo.

Amplificación del ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los marcadores específicos para el PCR (Innis et al. 1990; Barrera et al. 1993; Clark y Russell, 2000) fueron cuatro microsatélites, diseñados originalmente para el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*: Sat 2, Sat 3, Sat 5 y Sat 16 (Mougel et al. 1997; Cuadro 2). La concentración del ADN extraído, se cuantificó con un espectrofotómetro marca Biomate (Cuadro 3), cuyas unidades fueron nanogramos por microlitro (ng/μl); con este valor se calculo el equivalente a los 100 ng/μl necesarios para la reacción de PCR de cada tubo de reacción.

Locus	Marcadores	Repetición	Tamaño
Sat 2	5' GCTCTCCTTTGGCATACTCC 3' 5' GCTTTGGATAGGCCAGATC 3'	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀	241-253 bp
Sat 3	5' GGAGAGTGAATCAGTGGGTG 3' 5' GAGGGAAAGAGAGAGACAGG 3'	(TC) ₂₂	146-162 pb
Sat 5	5' GCTTCTGGCTTCAACCTGAC 3' 5' CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG 3'	(TC) ₂₃ TTT (CT) ₅	206-234 pb
Sat 16	5' AATCAGCCTCTATGGAATTCCC 3' 5' AATGCTACATGGTAACCAGGC 3'	(TG) ₁₅	109-115 pb

Cuadro 2 Características de los microsatélites que se utilizaron para la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. Fuente Mougel et al. 1997.

Número de liebre	Concentración 1 (ng/μl)	Concentración 2 (ng/μl)
1	81.68	1.22
2	65.99	1.52
3	42.04	2.38
4	93.43	1.07
5	49.40	2.01
6	49.90	2.00
7	35.85	2.79
8	53.38	1.87
9	53.95	1.85
10	21.37	4.68
11	64.26	1.56
12	45.43	2.20
13	35.85	2.79
14	61.96	1.04
15	33.61	2.98
16	54.52	1.83
17	31.37	3.19
18	63.11	1.58
19	137.48	0.73
20	78.67	1.28

Cuadro 3. Concentración 1: ADN (ng/μl) encontrado para cada muestra analizada. Concentración 2: μl necesarios para cada uno de los individuos, a una concentración final de 100 ng/μl de ADN para la liebre *Lepus favigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

Para el amplificado de PCR se sabe de la importancia de la combinación y concentración de componentes químicos (Agua, Buffer, los marcadores, MgCl₂, dNTPs, ADN, y Taq-polimeras; Saunders y Parkes, 1999; Clark y Russell, 2000), la manipulación adecuada del tiempo y de las temperaturas (desnaturalización, alineación y extensión; Baker, 2000; De Salle et al. 2001). Por lo que la reacción para el PCR se realizó con un programa (Mougel et al. 1997), en un termociclador marca ThermoHybaid, estos se basaron en las características para cada uno de los microsatélites (Cuadro 4 y 5).

Reactivo	Concentración original	Volumen tomado	Volumen final en la reacción
H ₂ O	Lo necesario para completar un volumen total de 25µl		
Buffer 10 X	10 X	0.65µl	1 X
Dntp's	100 mM	0.2 µl	0.8 µl
MgCl ₂	60 mM	0.65 µl	1.56 µl
Primer F	20 µM	0.5 µl	0.4 µl
Primer R	20 µM	0.5 µl	0.4µl
ADN	Lo necesario para agregar 100 ng en 25µl de reacción.		
Taq polimerasa	5 U / µl	0.2 µl	1 U / µl

Cuadro 4. Volúmenes y concentraciones de los reactivos que se utilizaron en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

Temperatura.	Tiempo.	N° de Ciclos.
94°	5'	1 Ciclo
94°	30''	} 30 Ciclos
X°	30''	
72°	30''	
72°	10'	1 Ciclo
4°		

Sat 2, 16	X = 55°
Sat 3, 5	X = 60°

Cuadro 5. Programa del termociclador para la amplificación de los microsatélites Sat 2, 3, 5 y 16 que se utilizaron para la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

Los resultados del amplificado fueron visualizados en geles de agarosa utilizando 5 μ l de producto (De Salle et al. 2001; Figura 7) según recomendaciones convencionales (Apéndice 2). Posteriormente, para un análisis más detallado de las bandas del ADN amplificado se realizó electroforesis con geles de bis-acrilamida al 10%, en cámaras verticales según Sambrook et al. 1989, con modificaciones (Figura 8, apéndice 3). Los geles de acrilamida fueron preparados con 1 μ l amortiguador de carga al 10 %, 3 μ l de la muestra producto del PCR y 0.75 μ l del marcador (escalera) marca Bio-Rad.

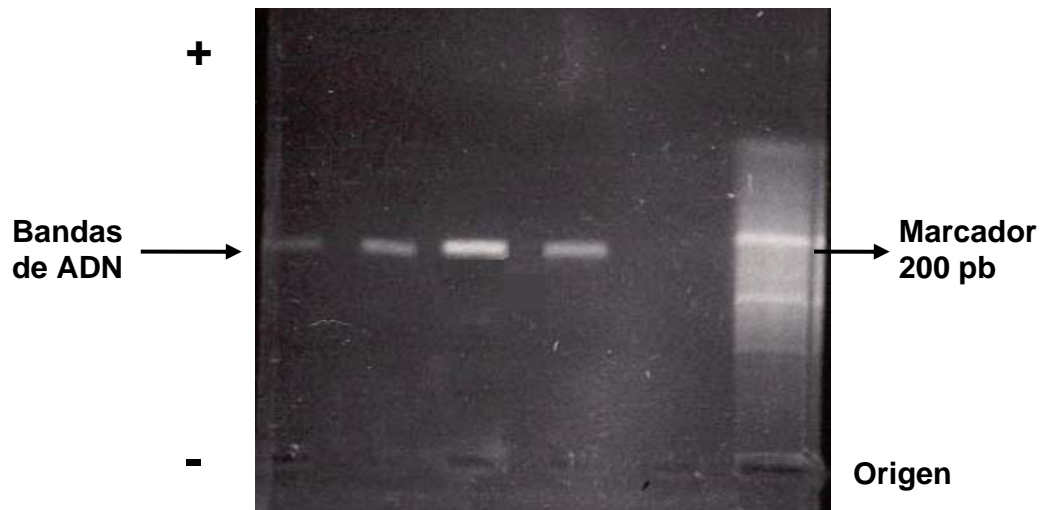


Figura 7. En el extremo superior se muestran las bandas de amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa de ADN para la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, en gel de agarosa.

Cada carril indica un individuo.

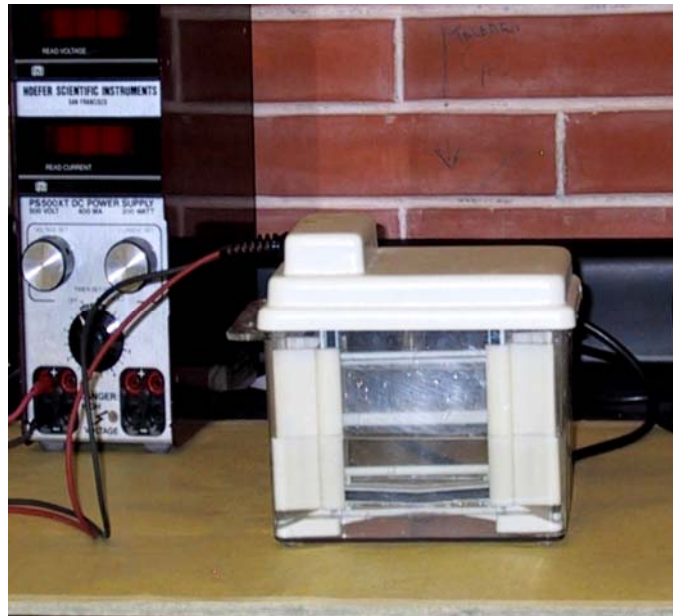


Figura 8. Cámara vertical de electroforesis para geles de acrilamida, en la que se realizó el corrimiento del producto de PCR, para las muestras de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

La técnica se estandarizó para cada uno de los microsatélites, lo mismo que el voltaje y tiempo en que se corrieron los geles de acrilamida. Posteriormente, se tiñeron con la técnica de tinción de plata, con Silver Satin plus kit de la marca Bio-Rad y se examinaron para su interpretación (Cuadro 6, Figura 9).

Microsatélites	Voltios	Miliamperes	Tiempo de corrimiento
Sat 2	47	10	7 Hrs.
Sat 3	60	25	2 Hrs.
Sat 5	60	25	3 Hrs.
Sat 16	60	25	2 Hrs.

Cuadro 6. Voltaje y tiempo de corrimiento para los geles de acrilamida-bis-acrilamida, para cada uno de los microsatélites amplificados, en la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

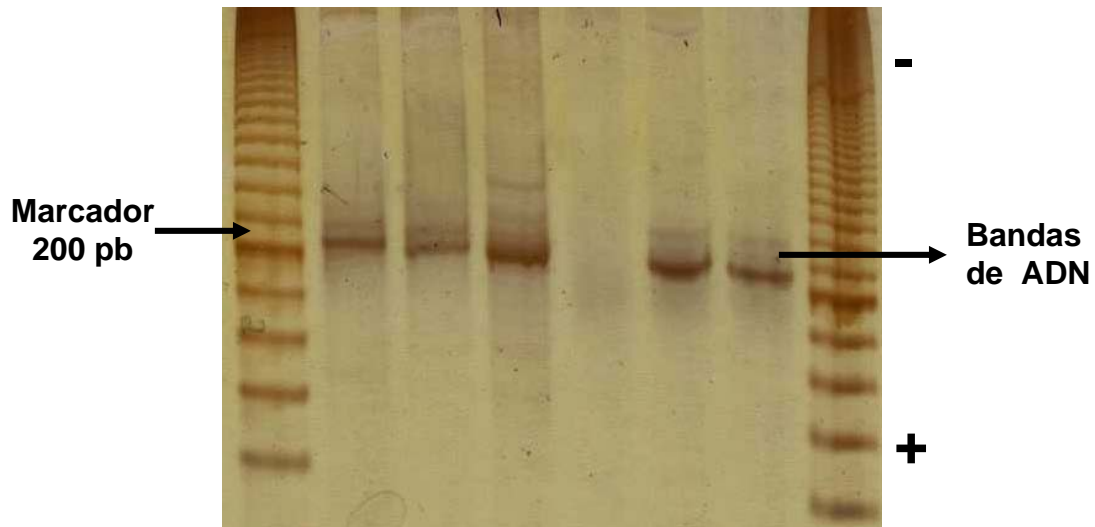


Foto A

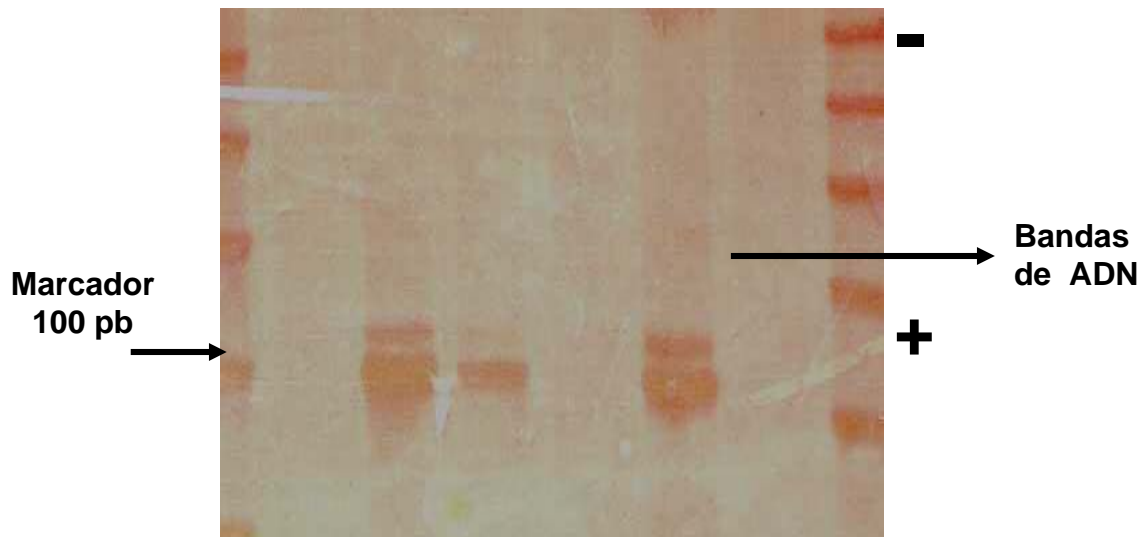


Foto B

Figura 9. Bandas de ADN producto de la amplificación por PCR de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México, en gel de acrilamida. Cada carril indica un individuo. El marcador se indica como referencia (pb). Foto A individuos homocigotos. Foto B individuos heterocigotos.

Captura y análisis de los datos

La lectura de los resultados se llevó a cabo de manera directa sobre las bandas de ADN amplificado (Apéndice 4), en los geles de acrilamida, registrando los alelos encontrados para cada uno de los microsatélites, distinguiéndose por su peso molecular. Se descartaron las bandas tenues o confusas. Posteriormente se realizó una matriz de datos, en la cual se registran cada uno de los individuos con los genotipos encontrados por microsatélite.

Estos datos, fueron analizados con el software GENEPOP Versión 3.3 (Raymond y Rousset, 2001). Los parámetros calculados fueron: el número de alelos para cada microsatélite, tamaño en pares de bases (pb) de los alelos, frecuencia alélica, heterocigocidad observada (H_o), y heterocigocidad esperada (H_e) por locus e intrapoblacional a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Asimismo, se estimó el nivel de endogamia con el estadístico F_{is} (Hartl y Clark 1989) calculados de acuerdo con Weir y Cockerham (1984) y la probabilidad de ligamiento por pares de microsatélite.

RESULTADOS

La investigación se realizó con un total de 20 individuos de la liebre del Istmo de Tehuantepec *Lepus flavigularis*. Para cada uno se evaluaron cuatro microsatélites; Sat 2, Sat 3, Sat 5 y Sat 16 (Cuadro 7). Los resultados indican individuos homocigotos y heterocigotos.

Nº de liebre	Microsatélites			
	Sat 2	Sat 3	Sat 5	Sat 16
Número de alelos				
1	0202	0202	0202	0404
2	0202	0202	0202	0202
3	0101	0303	0202	0303
4	0202	0101	0303	0101
5	0202	0202	0303	0303
6	0202	0204 *	0303	0304 *
7	0202	0303	0303	0203 *
8	0202	0606	0203 *	0304 *
9	0202	0303	0204 *	0304 *
10	0303	0303	0204 *	0202
11	0202	0101	0203 *	0405 *
12	0202	0606	0303	0304 *
13	0202	0101	0101	0103 *
14	0202	0202	0101	0303
15	0202	0505	0202	0303
16	0202	0303	0202	0202
17	0202	0101	0303	0202
18	0202	0303	0303	0303
19	0202	0404	0202	0103 *
20	0202	0202	0101	0303

Cuadro 7. Matriz de genotipos resultantes de la lectura de las bandas de ADN, para la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. * Individuos Heterocigotos. 01, 02, 03, 04, 05 y 06 son los diferentes alelos encontrados.

Para evaluar la probabilidad de ligamientos entre pares de microsatélites, se utilizó el método de Markov, en donde una probabilidad cercana a 0 indica que los microsatélites se encuentren ligados. Ninguno de nuestros resultados indicaron ligamiento por lo tanto se decidió seguir trabajando con los microsatélites (Cuadro 8).

Par de loci		Valor de Chi ²	Grados de libertad	Probabilidad
Locus 1	Locus 2			
Sat 2	Sat 3	0.000	2	1
Sat 2	Sat 5	2.793	2	0.25
Sat 3	Sat 5	0.749	2	0.69
Sat 2	Sat 16	0.147	2	0.93
Sat 3	Sat 16	1.161	2	0.56
Sat 5	Sat 16	0.933	2	0.63

Cuadro 8. Probabilidad de ligamiento por el método de Markov, para cada par de loci en la población de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

En lo que se refiere al tamaño de los microsatélites, las diferencias encontradas entre el conejo europeo *Oryctolagus cunicularius* (Mougel et al. 1997) y la liebre del Istmo *L. flavigularis*, se observan en el cuadro 9. El Sat 2 presenta una diferencia de 41 a 47 pb siendo la más grande, mientras que el Sat 16 presentó 29 pb menos que el reportado, siendo éste el que tuvo menos diferencia de los cuatro loci.

Locus	Intervalo en pb		Diferencia encontrada en pb
	* <i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Lepus flavigularis</i>	
Sat 2	241 – 253	200 – 206	41 – 47
Sat 3	146 – 162	110 – 150	36 – 12
Sat 5	206 – 234	190 – 220	16 – 14
Sat 16	109 – 115	80 – 115	29 – 0

Cuadro 9. Comparación del tamaño de los loci reportados, en pares de bases (pb), con el tamaño encontrando en la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México. * Mougel et al. (1997).

Variación alélica

Ejecutando el análisis, con respecto al tamaño para cada uno de los locus, expresado en número de pares de bases (pb), se encontró que: el Sat 2 fue el que tuvo el menor número de alelos (3 alelos), con un tamaño de 200 a 206 pb, mientras que, Sat 3 presento 6 alelos siendo este el mas grande, con un tamaño de 110 a 160 pb (Cuadro 10).

Locus	Alelos					
	1	2	3	4	5	6
Sat 2	200	204	206			
Sat 3	110	115	120	130	140	160
Sat 5	190	200	210	220		
Sat 16	80	90	100	110	115	

Cuadro 10. Tamaño de los alelos en pares de bases, encontrados para cada uno de los locus en la población de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

Con respecto al número de alelos, el Sat 2 fue el microsatélite que presentó el menor número de alelos con solo tres. Mientras que Sat 3 presentó 6 alelos, siendo el valor más alto. En promedio, se registraron 4.5 alelos por locus en la población (Figura 10).

Referente a las frecuencias alélicas en toda la población, la más alta fue para el Sat 2 en el alelo 2 con una frecuencia de 0.9 y la más baja fue para el Sat 16 en el alelo 5 con una frecuencia de 0.025 (Figura 11).

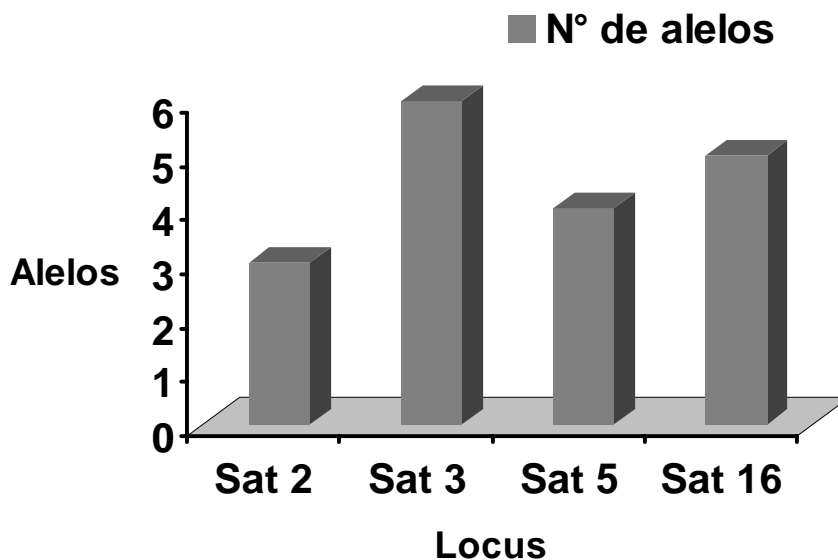


Figura 10. Número de alelos por locus en la población de la liebre *Lepus flavigularis* del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca México.

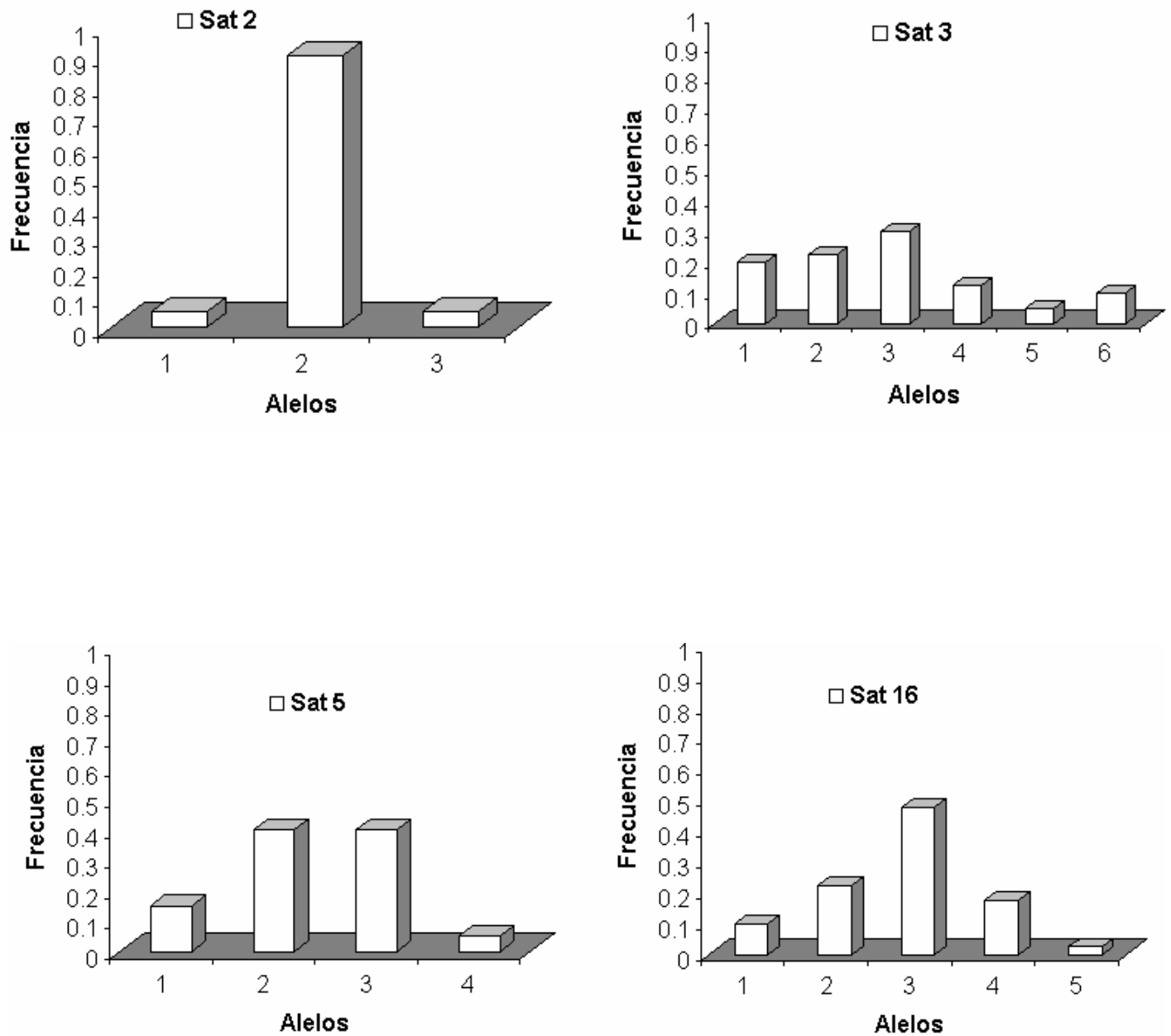


Figura 11. Frecuencias alélicas para cada uno de los locus en la población de la liebre *Lepus flavigularis* de Tehuantepec Oaxaca México.

Variación Genotípica

De los 4 loci analizados, el Sat 2 presentó 20 individuos homocigotos, siendo este el más alto, mientras que Sat 16, con 12 individuos homocigotos, fue el más bajo. Esto equivale en el porcentaje poblacional, al 45% heterocigotos (9 individuos), fue nuevamente bajo y el 55 % homocigotos (11 individuos), fue el más alto (Figura 12).

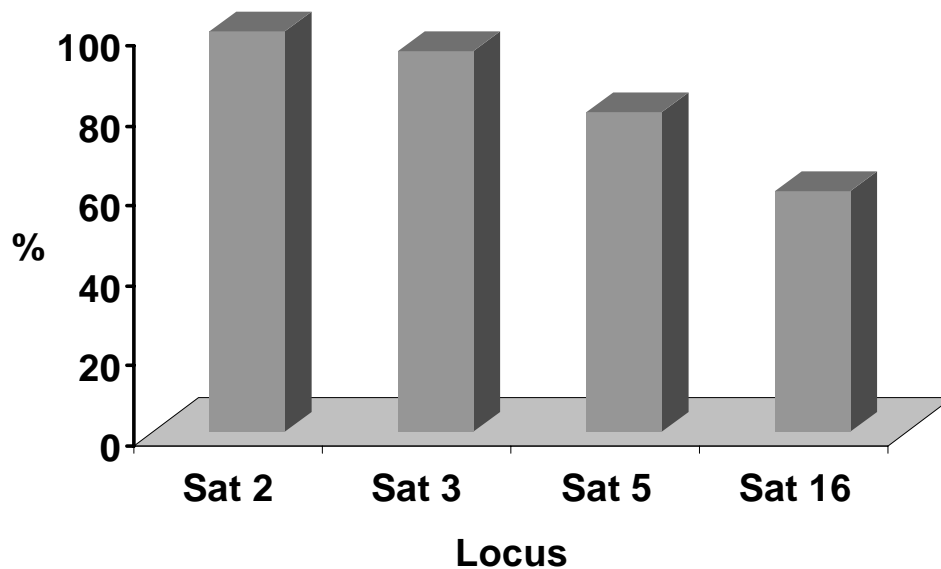


Figura 12. Porcentaje de individuos homocigotos por locus en la población de la liebre *Lepus flavigularis* de Tehuantepec, Oaxaca México.

Tocante al número de heterocigotos esperados (H_e) y el número de heterocigotos observados (H_o) se encontró una diferencia significativa, lo que sugiere un déficit de heterocigotos, según la prueba de Hardy-Weinberg (H-W, Cuadro 11 y Figura 13), que asume que en una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación o migración, las frecuencias genéticas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación (Goudet, 1995). En nuestros resultados, H_e fue siempre mayor que H_o ; así para Sat 2 con una H_e de 3.8 es el más baja y el más alto fue Sat 3 con 16.2, presentándose un promedio poblacional de 11.85. Por otro lado, para H_o la más baja fue también para Sat 2 con 0 y la más alta fue para Sat 16 con 8, teniendo un promedio poblacional de 3.25.

Locus	N° de			Probabilidad
	individuos	H_e	H_o	
Sat 2	20	3.8	0	0.0000
Sat 3	20	16.2	1	0.0000
Sat 5	20	13.4	4	0.0003
Sat 16	20	14	8	0.0009
Promedio	20	11.85	3.25	0.0000

Cuadro 11. Número de heterocigotos esperados (H_e) y observados (H_o), de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de la liebre *Lepus flavigularis* de Tehuantepec, Oaxaca México.

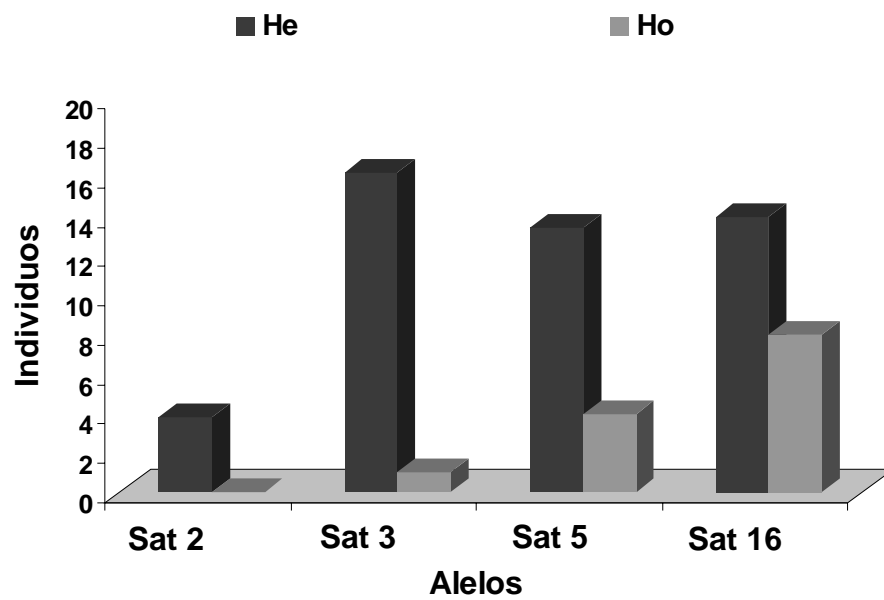


Figura 13. Comparación de heterocigotos esperados (H_e) y observados (H_o), para la liebre *Lepus flavigularis* de Tehuantepec, Oaxaca México. En todos los casos es mayor H_e .

Endogamia

Los resultados de la endogamia, F_{is} (Cuadro 12), calculada de acuerdo con Weir y Cockerham (1984; Hoelzel y Dover, 1991), están basados en la estructura intrapoblacional, como la variación y la heterocigosidad genética dentro de la población, en donde se indica el nivel de endogamia por locus y poblacional (Hartl y Clark 1989; Goldstein y Schlötterer, 2000). Si los valores de F_{is} van de -1 a $+1$, en donde el valor negativo indican mayor endogamia o un exceso de heterocigotos y el positivo un déficit de éstos (Goldstein y Schlötterer, 2000). Para el Sat 2 una F_{is} de 1.00, siendo la más alta, y la más baja fue para el Sat 16 con una F_{is} de 0.43 siendo esta la más baja, en cuanto al F_{is} poblacional fue de 0.73.

Locus	F_{is}
Sat 2	1.00
Sat 3	0.94
Sat 5	0.71
Sat 16	0.43
Total	0.73

Cuadro 12. Niveles de endogamia F_{is} , en la población de la liebre *Lepus flavigularis* de Tehuantepec, Oaxaca México.

DISCUSIÓN

Se analizaron cuatro microsatélites, en 20 individuos de la población de la liebre de Tehuantepec *Lepus flavigularis* en el estado de Oaxaca. Los análisis entre pares de microsatélites no mostraron ligamiento entre ellos, esto es favorable ya que de lo contrario se habría optado por descartar a los que mostraran algún ligamiento.

En cuanto al tamaño de los microsatélites se observaron diferencias entre *L. flavigularis* y *Oryctolagus cunicularius* (Mougel et al. 1997), encontrando que: Sat 2 presentó una diferencia de 41 a 47 pb, en el Sat 3 una divergencia de 36 a 12 pb, en el Sat 5 una discrepancia de 16 a 14 pb y el Sat 16 un contraste de 29 pb, todas estas comparadas con *Oryctolagus cuniculus*. Esto es de esperarse ya que el tamaño de los alelos cambiará de una especie a otra.

El número de alelos encontrado en los cuatro microsatélites analizados mostró una variación de 3 a 6 (Sat 2 y Sat 3 respectivamente), lo cual contrasta con lo reportado en *L. americanus* (Burton, 2002), quien presenta un intervalo de 10 a 22 alelos (Sat 5 y Sat 2 respectivamente). Sin embargo, estos resultados son similares a *Romerolagus diazi* (Campos-Chávez, 2005), quien en una población presentó (Volcán Chinguetería), dos alelos en el Sat 3, en tanto que en el otra población (Volcán Popocatepetl) presentó ocho alelos para este mismo microsatélite. Un número pequeño de alelos indica poca variación genética, lo que es de esperarse entre estas dos especies ya que presentan características similares, ambas son endémicas sus poblaciones son pequeñas y aisladas. En contraste con *L. americanus* que tiene una amplia distribución. Por lo tanto estos resultados apoyan el estatus en el que se encuentra *L. flavigularis* que es la de en peligro de extinción.

La frecuencia alélica reportada en *L. timidus* y *L. europaeus* fue de 0.1 y 0.6 respectivamente en el alelo 2 del Sat 2 (Andersson et al. 1999). En tanto que en otra liebre como *L. americanus* se reporta una frecuencia de 0.014 para ese mismo microsatélite, aunque no se menciona en que alelo (Burton et al. 2002).

En comparación con nuestros resultados, el Sat 2 en el alelo 2, presentó una frecuencia de 0.9, siendo la más alta, mientras que la frecuencia más baja fue para el microsatélite 16 en el alelo 5, con una frecuencia de 0.5. Si se compara con lo mencionado anteriormente en ambos casos estos resultados son altos. La frecuencia alélica para cada locus de la población, indica la posibilidad de poder encontrar un determinado alelo en una población, valores altos en las frecuencias indican una mayor probabilidad de localizar el alelo, en tanto que, un alelo con una frecuencia baja será poco probable de encontrarlo en la población. Por consiguientemente los valores encontrados en *L. flavigularis* nos están indicando pérdida en la variabilidad genética, en la población en estudio.

En el porcentaje de individuos homocigotos, para cada uno de los microsatélites, como a nivel poblacional (55%) fue alto, esto se observa claramente con lo reportado en otros lagomorfos, en donde por ejemplo, a nivel poblacional en *Romerolagus diazi* fue del 33% (Campos-Chávez. 2005), *L. americanus* del 33% (Burton et al. 2002), *L. timidus* del 46% y *L. europaeus* del 30% (Andersson et al. 1999). Hay que enfatizar que, estas liebre aunque son silvestres, difieren con *L. flavigularis*, en presentar una amplia distribución, reflejándose en el porcentaje de homocigotos, el cual es bajo y por ende el de heterocigotos es alto, equivalente a una mayor variabilidad. En el caso particular de *Romerolagus diazi* (Campos-Chávez. 2005) y *L. flavigularis* comparten características biológicas muy semejantes, pero encontrando gran diferencia entre

ellas.

Con respecto a la heterocigosis es baja, para cada uno de los microsatélites ($P < 0.0000$ a 0.0009), y poblacional ($P < 0.0000$), comparada con la reportada en *L. americanus*, en donde el Sat 2 hay una $P > 0.839$, para Sat 3 una $P > 0.221$ y para el Sat 16 una $P > 0.659$ (Burton, 2002). En *Romerolagus diazi* el Sat 3 y Sat 5 se reporta con una $P > 0.6038$ y $P > 0.2037$ respectivamente (Campos-Chávez, 2005), por lo que la diversidad en estos casos es alta. Las características de *Romerolagus diazi* y *L. flavigularis*, son muy parecidas pero nuevamente nuestros resultados son bajos. El polimorfismo se da a través de la evolución molecular, en donde hay una correlación entre la variabilidad ambiental y la genética (Kimura, 1980; Surridge et al. 1998), por lo que la heterocigosis es un indicador efectivo de cómo se encuentra una población en términos genéticos en su ambiente (Ciofi et al. 1999). En comparación, con nuestros resultados encontramos que este polimorfismo es bajo, expresado en una desviación estadística significativa, en forma de déficit del número de heterocigotos.

En nuestros resultados el Sat 3 presentó una Fis de 0.94 siendo ésta alta comparada con la reportada para *Romerolagus diazi*, con una Fis de 0.33, para este mismo microsatélite en la población del Volcán Popocatepetl (Campos-Chávez, 2005). A nivel poblacional, obtenemos una Fis es de 0.73 la cual también es alta comparada con *Romerolagus diazi*, en donde se reporta una Fis de 0.5185 nuevamente en la población del Volcán Popocatepetl (Campos-Chávez, 2005). Por otro lado, *Oryctolagus cuniculus* (Mougel et al. 1997), se ha reportado una Fis de 0.5041, mostrando con esto una deficiencia de heterocigotos y por ende una mayor endogamia en la población.

CONCLUSIONES

Analizando en conjunto todas las variables antes mencionadas (ligamiento, tamaño de microsatélites, número, frecuencia y porcentaje de alelos, polimorfismo y equilibrio de Hardy-Weinberg), se puede decir que la población de la liebre del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca, *L. flavigularis* se encuentra genéticamente pobre, lo que no es favorable para su conservación. La tasa genética depende mucho del ambiente, ya que si esta es alta para la especie, se le ofrecen nuevas oportunidades ecológicas (Kimura, 1980; Galbusera et al. 2000; Goldstein y Schlötterer, 2000). Pero en el caso de la liebre del Istmo *L. flavigularis*, su ambiente ha sido alterado, lo cual se refleja claramente en su acervo genético, haciéndolo cada vez más pobre.

Esto también se ha observado en organismos que se cruzan entre parientes, mostrando una menor adecuación, la cual se le ha llamado depresión endogámica (Ñúñez-Farfan y Eguiarte, 1999; Galbusera et al. 2000), efectuado así a la especie y es en donde la conservación de esta tiene implicaciones muy importantes, ya que teniendo una pequeña pero valiosa información sobre su estado a nivel genético, podemos dentro de este mismo campo profundizar para conocer aun más a esta liebre, pues se sabe que los genomas de las especies vivientes son archivos de información genética sobre patrones de desarrollo y de ciclos de vida (Ñúñez-Farfan y Eguiarte, 1999; Goldstein y Schlötterer, 2000).

La variabilidad genética intrapoblacional de la liebre del Istmo *Lepus flavigularis* fue extremadamente baja. Sobre todo si se compara con otros lagomorfos como la liebre *Lepus americanus*, el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus* y *Romerolagus diazi*.

SUGERENCIAS PARA LA CONSERVACIÓN DE *Lepus flavigularis*

Debido a que *Lepus flavigularis* es una especie en peligro de extinción y al resultado del estudio intrapoblacional, se recomienda:

- 1.- Efectuar evaluaciones más detalladas de su variación genética.
- 2.- Incluir todas sus poblaciones.
- 3.- Efectuar su monitoreo genético constante.
- 4.- Manejar su hábitat de manera favorable para el flujo genético adecuado entre sus poblaciones.

APÉNDICE 1

Extracción de ADN.

Recomendaciones.

- ◆ Para las soluciones se debe utilizar agua destilada desionizada y reactivos de grado molecular, se deben de almacenar en botellas ámbar con fecha de elaboración.
 - ◆ Los disolventes orgánicos como el fenol son muy irritantes, por lo que se deben de tener cuidado con tener contacto directo con la piel y ojos.
 - ◆ Usar bata y guantes.
 - ◆ Para la extracción de ADN se debe trabajar siempre en frío con los reactivos en hielo.
 - ◆ No usar material de vidrio para la extracción ya que el ADN se adhiere fácilmente a este.
-
- ◆ **Primer día:** La muestra se parte en pequeños trozos y se colocan en tubos de microcentrifuga de 1.5 µl de capacidad, se le agrega 300 µl de EDTA (0.1M) + NaCl (0.15 M) y 17 µl de SDS (10%), se mezclan en el vórtex, posteriormente se le agrega 30 µl de Proteasa K a una concentración final de 0.1 mg/ml, se agita en el vórtex y se incuba a baño maría a 60° C hasta el día siguiente.
-
- ◆ **Segundo día:** A la muestra se le agrega un volumen de fenol (estabilizado a pH = 8), previamente calentado (10 segundos en el horno de microondas), se homogeniza en el vórtex y se centrifuga durante 10 minutos a 12,000 rpm. Se recoge el sobrenadante, este se mezcla con un volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1; se homogeneiza en el vórtex y se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm a una temperatura aproximada de 4 ° C. Se recoge el sobrenadante, se agrega un volumen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción de 24:1, se homogeneiza en el vórtex y se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm. Se recoge el sobrenadante, se agrega un volumen de éter etílico absoluto, se homogeniza en el vortex y se centrifugan 3 minutos a 12,000 rpm, en este caso el sobrenadante es el éter, este se extrae de

la muestra, los tubos destapados se colocan a baño maría durante 4 minutos, posteriormente se agrega 0.1 volumen de NaAc (3M) y 2.5 volúmenes de alcohol etílico absoluto. El alcohol se debe dejar resbalar lentamente por las paredes del tubo, para observar como se va formando la madeja de ácidos nucleicos, se mezcla suavemente hasta que se homogeniza. En seguida la muestra se coloca en refrigeración a -20°C durante 12 h, para que los ácidos nucleicos precipiten.

◆ **Tercer día:** La muestra se centrifuga a 12,000 rpm. Se extrae el alcohol, debe de hacer con mucho cuidado ya que se forma un botón de ácidos nucleicos, se añade 100 μl de alcohol etílico al 80 %, se centrifuga 5 minutos a 12,000 rpm, se extrae el alcohol todo lo posible, se centrifuga al vacío por 3 minutos para secarlos. Posteriormente se añade 100 μl de TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a pH 8), el botón es resuspendido golpeándolo suavemente con la punta de los dedos, se añade 11.1 μl de RNAsa (a una concentración de 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ para una concentración final de 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$), se homogeniza y centrifuga en la nanofuga por unos segundos, se incuban a 37°C durante 60 minutos. En seguida se añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico en proporción 25:24:1, se homogeniza y se centrifuga por 5 minutos a 12,000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se le agrega 0.1 volumen de NaAc (3 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcla suavemente y se observa la madeja de ADN que se forma, los tubos se colocaron a -20°C por 12 h.

◆ **Cuarto día:** La muestra se centrifuga 20 minutos a 12,000 rpm, se elimina el alcohol y se agrega 100 μl de etanol al 80 %, se colocan en la nanofuga por unos segundos, posteriormente se centrifuga 5 minutos a 12.000 rpm, se retira el alcohol, en seguida se centrifuga en vacío 3 minutos, por último se le agrega 50 μl de H_2O de ampollita, se resuspende el botón, y por ultimo la muestra se guarda a -20°C .

APÉNDICE 2

Electroforesis del ADN en agarosa

La electroforesis se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. El pH alcalino de las moléculas de ADN poseen carga negativa uniforme por unidad de masa, por lo que hace que su movilidad sea hacia el polo positivo y que esté determinado por el número de pares de base.

Preparación de geles de agarosa para visualizar ADN

- ◆ Pesar la agarosa conforme a la concentración deseada (1 % para extracción de ADN, 2 % para PCR).
- ◆ Agregar el buffer (TAE o TBE 1X). Calentar en el horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente (aproximadamente es un minuto por ml de gel).
- ◆ Agregar el bromuro de etidio (0.1 µl/ml), se dejar enfriar un poco la mezcla antes de agregarlo para evitar inhalar los vapores.
- ◆ Agregar la mezcla en el molde de electroforesis y acomodar el peine.
- ◆ Colocar el gel en la cámara de electroforesis y llenarla con buffer hasta cubrir el gel.
- ◆ Colocar las muestras mezcladas con el amortiguador de carga 10 X en cada pozo del gel.
- ◆ Conectar los cables a la cámara y a la fuente de poder.
- ◆ Ajustar el voltaje deseado.
- ◆ Dejar correr según el tiempo indicado.

✂ Amortiguador de carga 10 X

Para preparar 10 ml se requieren 5 ml de glicerol para una concentración final de 50 %, EDTA 0.003733 g quedando a una concentración final de 1 mM, axl de bromofenol 0.0025 g a una concentración final de 0.025 g hasta 0.25%, justar el pH final a 8.

	Agarosa (gr)	Buffer (ml)	Bromuro (μl)
25 ml	0.25	25	0.78
40 ml	0.40	40	1.25

Agarosa al 1 % para visualizar la extracción de ADN

	Agarosa (gr)	Buffer (ml)	Bromuro (μl)
20 ml	0.40	20	0.63
25 ml	0.50	25	0.78
30 ml	0.60	30	0.94
40 ml	0.80	40	1.25

Agarosa al 2 % para visualizar productos de PCR

APÉNDICE 3

Electroforesis en gel de acrilamida.

◆ Todas las soluciones deben de ser preparadas con agua bidestilada y Acrilamida al 30%

◆ Solución stock de acrilamida bis-acrilamida 40% proporción 19:1. Almacenar a 4° C en oscuridad.

Acrilamida	38 gr
Bis acrilamida	2 gr
Agua destilada a	100 ml

◆ Persulfato de amonio (APS) al 10%. Se prepara al momento, a lo más puede durar una semana, después desechar y preparar solución nueva.

Iniciador	10%
Persulfato de amonio	0.1 gr
Agua destilada a	1ml

◆ TBE (Tris-boreta-EDTA) solución stock 10X, 1 litro:

108g de Tris base (890 mM)
55g de ácido bórico (890 mM)
40 ml 0.5 M de EDTA, pH 8.0
Aforar con agua a 1000 ml

◆ Preparación de gel de poli-acrilamida para ADN.

Reactivos	Volúmenes		
	Solución stock 40 %	10 ml	5 ml
	10 ml		
Agua destilada	5.74 ml	6.24 ml	3.12 ml
TBE 10X	1.0 ml	1.0 ml	0.5 ml
Acrilamida 40%	3.0 ml	2.5 ml	1.25 ml
*APS 10%	200 µl	200 µl	100 µl
*TEMED	6 µl	6 µl	3 µl

◆ El TEMED se agrega al final ya que es el principal polimerizante del gel.

APÉNDICE 4

Tinción de plata para gel de acrilamida

◆ **Recomendaciones:** La tinción de los geles de acrilamida, se realiza con el kit Silver Satín Plus de la marca Bio-Rad. Los reactivos se guardan en frascos ámbar, que no debe estar maltratado el interior ya que se acumula la plata, formando cristales los cuales se adhieren al gel y lo manchan.

◆ **Eta**pa de fijación

Solución fijadora:

Metanol	50 ml
Acido Acético	10 ml
Reactivo Fixative Enhancer Concentrate	10 ml
Agua bidestilada	30 ml

Sumergir el gel en solución fijadora durante 20 minutos y agitar suavemente.

◆ **Lavado (20 minutos)**

Eliminar la solución fijadora y enjuagar el gel con suficiente cantidad de agua bidestilada y reemplazarla cuatro veces (aprox. 5 min. cada lavado) .

Tinción (20 minutos)

Prepara la solución antes de usarla.

El vaso en donde se prepare la solución y el molde donde se tiña el gel deben de estar libre de sales minerales o depósitos de plata de soluciones anteriores (de ser así, lavar con HNO₃ 50% y enjuagar abundantemente con agua bidestilada).

Los reactivos deben de estar a temperatura ambiente para mejores resultados.

Solución para tinción.

Agua bidestilada	8.7 ml
Silver Complex Solution	1.25 ml
Reduction Moderator Solution	1.25 ml
Image Development RX	1.25 ml
Development Accelerator Solution	12.5 ml
<u>(Pesar 5 gr y aforar a 10 ml)</u>	

Teñir hasta que las bandas se vean adecuadamente.

4.- Paso de paro (15 min)

Colocar el gel en una solución de ácido acético al 5% (5 ml de ac. acético y aforar a 100 ml) por 15 minutos y reemplazarlo con agua destilada.

APÉNDICE 5

Lectura de bandas de ADN en gel de acrilamida

La lectura de las bandas de ADN se realizó de manera directa sobre los geles de acrilamida para cada uno de los microsatélites de la siguiente manera:

- 1.-** Comprobar que todas las muestras amplificadas se encuentre en los geles.
- 2.-** Observar cuál de todos los individuos fue el que presentó el mayor número de alelos, en pares de bases (pb) y cuál fue presentó menos.
- 3.-** Dentro de este margen se fueron ordenando cada uno de los alelos encontrados, ya sea de forma creciente o decreciente.
- 4.-** Se les asignó un tamaño posible en pares de bases dentro del intervalo encontrado para cada uno de los alelos.
- 5.-** Dentro de este orden, también se contabilizo los individuos que solamente presentaron una banda de ADN como homocigotos y los que presentaron dos bandas como heterocigotos.

LITERATURA CITADA

Amos W y Harwood J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *The Royal Society* 357, 177-186

Andersson A. C., Thulin C. G. y Tegelström H., 1999., Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridization between an introduced and native hare species. *Hereditas* 130: 309 – 315

Aranda M y March I. 1987. Guía de los mamíferos silvestres de Chiapas. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Biotipos (INIRES). Programa para estudios en conservación tropical (PSTC), Universidad de Florida. México, 149 pp

Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. CONABIO. Instituto de Ecología A. C. Xalapa Veracruz. México D. F. 212 pp

Ashley V. M. y B: D: Dow. 1994. The use of microsatellite analysis in population biology. Background, methods and potential applications 185-201

Ashley V. M. 1999. Tools for assaying the structure of DNA prove valuable in protecting endangered species. *Molecular Conservation Genetics* Vol 87, 28-35

Baker J. A. 2000. *Molecular methods in Ecology* Osney Mead. Oxford 337 pp

Barrera S. H. A., Ortiz L. R., Rojas M. A y Reséndez P. D., 1993., Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*. Enero-Febrero 50 – 60

- Burton C. 2002. Microsatellite analysis of multiple paternity and male reproductive success in the promiscuous snowshoe hare. *Canadian Journal of Zoology*. 80: 1948-156
- Burton C., Krebs C. J. y Taylor E. B., 2002., Population genetic structure of the cyclis snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada., *Molecular Ecology*. 11: 1689 – 1701
- Bruford M. W. y Wayne R. K., 1993., Microsatellite and their application to population genetic studies., *Current Opinion in Genetics and Development*. 3: 939 – 943 pp
- Campos-Chávez A. P. 2005., Comparación genética entre poblaciones aisladas del conejo Zacatuche *Romerolagus diazi* (MAMMALIA: LAGOMORPHA). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 46 pp.
- Cervantes A. F. 1993. *Lepus flavigularis*. *Mammalian Species*. 423: 1-3
- Cervantes F. A., Lorenzo C. y Terry L. Y., 2002., Genic variation in populations of mexican lagomorphs, *Journal of Mammalogy*. 83 (4): 1077 - 1086
- Ciofi C y Bruford M. W. 1999. Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*. 8: 517-530
- Clark P. D., y Russell D. L. 2000. *Molecular Biology made simple and fun*. 2nd edition. Cache river press. USA. 486 pp.
- Darbre P. D. 2001. *Basic Molecular Biology Essential Techniques*. John Wiley & Sons New York. 1-25 pp

- Dallas F. J. y Piertney B. S. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molecular Ecology*. 7, 1248-1251
- Dallas F. J, Marshall F., Piertney B. S., Bacon J. P y Racey P. A. 2002. Spatially restricted gene flow and reduced microsatellite polymorphism in the Eurasian otter *Lutra lutra* in Britain. *Conservation Genetic* 3, 15-19
- De Salle R; Gonzales G. y Wheeler W. 2001 *Methods and tools in Biosciences and Medicine. Techniques in Molecular Systematic and Evolution*. Edit Brikhäuser Berlin, 407 pp
- Ferraris D. J. y Palumbi R. S. 1996. *Molecular Zoology Advances, Strategies and Protocols*. Chapter 8 Strassmann J. E., Solis C. R., Peters J. M. y Queller D. C., Edit. Wiley-Liss. New York. 163 – 180 pp.
- Friar E. A., Boose L. D, LaDoux T., Roalson H. E y Robichaux H. R., 2001. Population structure in the endangered Mauna Loa silversword, *Argyroxiphium kauense* (Asteraceae), and its bearing in reintroduction. *Molecular Ecology*. 10: 1657 - 1663
- García C. R., Grattapaglia D. y Hay D. J. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Hereditas*. 86, 60-67
- Galbusera P., Lens L., Schenck T., Waiyaki E. y Matthysen E. 2000. Genetic variability and gene flow in the globally, critically-endangerd *Taita thrush*. *Conservation Genetics*. 1: 45-55

- Goldstein B. D. y Schlötterer C. 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a nature model system. *Genetics* February. 151: 797 - 801
- Goldstein D. B. y Schlötterer C. 2000. *Microsatellites, Evolution and applications*. Oxford. University Press. Capitols 1, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13
- Goudet J. 1995., FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *The Journal of Heredity*. 86: 6. 485 - 486
- Hajeer A., Worthington J. y Sally J., 2000., *SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis.*, Eaton Publishing., USA. Cap. 3 Identification of Microsatellite Markers: Screening for Repeat Sequences and Mapping Polymorphisms. 13 – 33 pp
- Harth L. D. y Clark G. A. 1989. *Principles of population genetics*. 2° edition. Sinauer Associates, INC. Sunderland Massachusetts. 670 pp
- Hoelzel R. A. S. y Dover A. G.. 1991. *Molecular Genetic Ecology*. IRLPRESS at. Oxford University Press. 75 pp
- Hochachka P. W y Mommsen P. J., 1993, *Biochemistry and Molecular Biology of Fisher*. Vol 2 *Molecular Biology Fruntiers* Edit Elsevier. Amsterdam. 469 pp
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., y White T. J. 1990. *PCR Protocols a guide to methods and applications.*, Academic Press., San Diego. 1 – 20 pp
- Jörg T. E. y Lubjuhn T. 1999. *Methods and Tools in Biosciences and Medicine*. DNA Profiling and DNA Fingerprinting. Edit Bir Khäuser. Berlin. 252 pp
- Kimura M., 1980., *Teoría naturalista de la evolución molecular*. *Investigación y Ciencia*. Enero 40 : 46 - 56

- Makova K. D., Patton J. C., Krrysanov E. Y., Chesser R. K. y Baker R. J. 1998, Microsatellite markers in wood mouse and striped field mouse (genus *Apodemus*), *Molecular Ecology*. 7. 247-255
- Mougel F., Fontinillas P., Queney G., Mounolou J. C. y Monnerot M. 1997. Analysis of three wild populations of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) using microsatellite loci. *Gibier Faune Sauvage. Game Wildlife*. Vol. 14 (3) Sep. 451-462
- Mougel F., Mounolou J-C y Monnerot M. 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*. 28: 58 - 71
- Mossaman A. C. y Waser P. M. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Canadian journal of Zoology*. 79: 285-295
- Ñuñez-Farfán J. y Eguiarte E. L. 1999. Evolución Biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, CONABIO. México D. F. 457 pp
- Ostemann S. D., Deforge J. R. y Edge W. D. 2001. Captive Breeding and reintroduction evaluation criteria: a case study of fenunsular bighorn sheep. *Conservation Biology* Vol 15. N° 3. June. 749-760
- Portales B. G. 1996. Estudio histológico comparado del ovario y de la vagina del conejo *Sylvilagus floridanus* y de las liebre *Lepus callotis* y *Lepus flavigularis* (MAMMALIA: LAGOMORPHA). Tesis de Maestro en Producción Animal. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 77 pp
- Prado F. V., Castro A. K. F., Oliveira C. L., Souza K. T. y Pena S. D. J. 1997. Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications on

forensic sciences. Elsevier Science. 14. 41-44

Queney G. Ferrand N. Marchandeu S, Azevedo M, Moufel F. Bronco N. Mougel, Branco M. y Monnerot M. 2000. Absence of a genetic bottleneck in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) population exposed to a severe viral epizootic. *Molecular Ecology*. 9: 12353 - 1264

Raymond M. y Rousset F. 2001. Genepop. Version 3.3. (version 1.2) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249

Romero P. A. C., 2004. Análisis de la distribución de los conejos y liebres (Lagomorpha: Leporidae) de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 59 pp

Rzedowski J. 1983. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. D. F. 4371 pp

Schmidt C. A. 1999. Variation and congruence of microsatellite markers for *Peomyscus leucopus*. *Journal of Mammalogy*, Baltimore. May. Vol. 80. N° 2. 522-529

Sambrook J., Fritsch F. E. y Maniatis T. 1989., *Molecular Cloning a laboratory manual*, second edition, ColdSpring Harbor laboratory Press. Vol 3 A.1-R.4

Sántiz L. E. C. 2002. Distribución y abundancia de la liebre endémica *Lepus flavigularis* y el conejo castellano *Sylvilagus floridanus* (Mammalia: Lagomorpha) en el Istmo de Tehuantepec Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas Escuela de Biología. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. 70 pp.

Saunders C. G. y Parkes H. C. 1999. *Analytical molecular biology Quality and*

Validation. R.S.C Valid Analytical Measureme. Trowbridge, Wiltshire. UK. 190 pp

Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial de la Federación, Segunda Sección, Mamíferos, Miércoles 6 de Marzo, 34 pp.

SurrIDGE K. A, Bell J. D y Hewitt M. G. 1998. Using molecular tools to study biogeography of the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Britain. *Gibier Faune Sauvage* 15 (1): 65-74

SurrIDGE A. K, Ibrahim K. M, Bell D. J, Webb N. J, Rico C. y Hewitt G. M. 1999. Fine-scale genetic structuring in a natural population of European will rabbits (*Oryctolagus cumulus*). *Molecular Ecology*. 8, 299-307

Taylor A. C. y Cooper D. W. 1999. Microsatellite identify introduced New Zealand tamar wallabies (*Macropus eugenii*) as an "extinct" taxon. *Animal Conservation* 2. 41-49

Thulin C.G. 2000. Hybridisation Between Introduced Brown hares and native mountain hares in Sweden. *Acta Universitatis Upsaliensis UPPSALA*. 37 pp

Vargas C. J. 2000. Distribución, abundancia y hábitat de la liebre endémica *Lepus favigularis* (MAMMALIA: LAGOMORPHA). Tesis de Maestro en Ciencias. División de estudios de Posgrado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 70 pp.

Villa R. B. y Cervantes A. F. 2003. Los mamíferos de México. Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México y Grupo Editorial Iberoamericana.
México D. F. formato en CD

Walker M. K. y Rapley R.. 2000. molecular Biology and Biotechnology. 4° Edition.
Edit. RS.C Great Britain. 5563 pp

Weir B. S. y Cockerham C. Clark., 1984., Estimating F-Statistics for the analysis of
population structure. Evolution. 38 (6): 1358 - 1370