



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

USO DE MICROSATÉLITES PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN NO INVASIVA A PARTIR DE
MUESTRAS FECALES DE CONEJO ZACATUCHE
(*Romerolagus diazi*)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

CAROLINA DEL RÍO ÁVILA

TUTOR: FERNANDO A. CERVANTES REZA

COMITÉ TUTORAL: FERNANDO GUAL SILL

ROGELIO ALONSO MORALES

México, D.F.

2007



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.

¿Tienes fe, Vinicio?... Pues mantente firme en la fe hasta el último instante; porque la fe mueve las montañas. Y aunque veas a Ligia bajo la cuchilla del verdugo o en las garras del león, cree con fe ciega que Cristo puede salvarla.

Sienkiewicz E, Quo Vadis?

Dedicatoria.

Para mi Papá, por ayudarme a llegar hasta este día, y por todo lo que ha dado por mí.

Para mi Mamá, por estar a mi lado cuando la necesito.

Para mi hermano, por sus muchas aportaciones técnicas para el desarrollo del formato de este trabajo.

Para Ricardo, por ser mi apoyo, mi alegría, y por ayudarme a seguir adelante.

Para mis amigos, en especial a Claudia, por hacer mi vida completa.

Para mi primaria Colegio Virrey de Mendoza, secundaria y preparatoria Universidad Motolinía; y en especial a mi Universidad por permitirme cursar una licenciatura y un posgrado gratuitos y de calidad.

Para Cleopatra, nunca te olvidaré.

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado mediante la beca con registro 193021.

A la Asociación Unidos para la Conservación, A.C. por el apoyo económico recibido para el desarrollo de este trabajo, con base en el Convenio de Colaboración que celebró con la Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México y la Dirección General de Recursos Naturales y de Desarrollo Rural.

Al MSc MVZ Fernando Gual Sill, Director de Zoológicos de la Ciudad de México, MVZ Rafael Tinajero Ayala, Dr. Juan Arturo Rivera Rebolledo, MVZ Carlos Olivera Ávila, MVZ Rogelio Campos Morales, y a todo el personal que labora en el Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, por su apoyo para la realización de este trabajo.

A mi Tutor Dr. Fernando A. Cervantes Reza, y Comité Tutoral Dr. Rogelio Alonso Morales y MSc MVZ Fernando Gual Sill por sus comentarios en las revisiones del manuscrito.

A los integrantes del jurado, Dr. Carlos González Rebeles y Dr. Pablo Maravilla Campillo por sus comentarios en beneficio del trabajo.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro, y todas las personas que desinteresadamente aportaron sus valiosos comentarios y su trabajo para la realización de esta tesis.

Contenido.

1. Introducción	1
1.1 El conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>).....	1
1.2 Conservación del conejo zacatuche en vida libre.....	4
1.3 Colonias reproductivas de conejo zacatuche en cautiverio en México y la importancia de su estudio genético.....	6
1.4 Muestreo no invasivo para estudios genéticos.....	7
1.5 Estudio genético a partir de heces.....	8
1.6 Marcadores microsatelitales.....	9
1.7 Estudios genéticos combinando marcadores microsatelitales y muestreo no invasivo.....	10
1.8 Justificación.....	11
1.9 Objetivo.....	12
1.10 Hipótesis.....	12
2. Materiales y Método	13
2.1 Animales.....	13
2.2 Muestreo de conejos zacatuche en cautiverio.....	13
2.3 Muestreo de heces de conejos zacatuche en vida libre.....	13
2.4 Extracción de ADN.....	16
2.5 Amplificación de microsatélites de ADN.....	16
2.6 Secuenciación automática de los microsatélites de ADN.....	20
3. Resultados	21
3.1 Extracción de ADN.....	21
3.2 Amplificación de microsatélites de ADN.....	21
3.3 Secuenciación de microsatélites de ADN.....	22
4. Discusión	33
4.1 Fiabilidad y robustez de la técnica.....	33
4.2 Importancia del estudio en la conservación del conejo zacatuche.....	35
4.3 Consideraciones a futuro.....	36
4.4 Conclusión.....	37

5. Apéndice.....	39
6. Referencias.....	41

Lista de Cuadros.

1. Microsatélites de ADN para amplificación en el conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>).....	17
2. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación de microsatélites de ADN del conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>) por medio de la técnica de PCR.....	18
3. Programa del termociclador para la amplificación de los microsatélites de ADN Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 en el conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>) por medio de la técnica de PCR.....	19
4. Rendimiento y pureza promedio del ADN extraído de muestras de heces frescas, de 15 y 30 días de 5 conejos zacatuche en cautiverio.....	22
5. Éxito de amplificación del microsatélite Sol08 de ADN de muestras de heces frescas, de 15 y 30 días de 5 conejos zacatuche en cautiverio.....	26
6. Éxito de amplificación del microsatélite Sol30 en ADN de muestras de heces frescas, de 15 y 30 días de 5 conejos zacatuche cautiverio.....	26
7. Éxito de amplificación del microsatélite Sat2 en ADN de muestras de heces frescas, de 15 y 30 días de 5 conejos zacatuche en cautiverio.....	27
8. Éxito de amplificación del microsatélite Sat5 en ADN de muestras de heces frescas, de 15 y 30 días de 5 conejos zacatuche en cautiverio.....	27
9. Porcentaje de amplificaciones correctas, incorrectas y sin amplificación de ADN de 3 muestras de heces de conejos zacatuche en vida libre para los <i>loci</i> Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5.....	28
10. Tamaño aproximado de los alelos amplificados de ADN de heces de 3 conejos zacatuche en vida libre para los <i>loci</i> Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 y número de conejos heterocigotos para cada locus.....	28
11. Tamaño en pares de bases de los alelos, secuencia repetida del microsatélite y porcentaje de identidad con el mismo <i>locus</i> en conejo europeo para los <i>loci</i> Sat2 y Sat5 amplificados de ADN de conejo zacatuche en cautiverio.....	29

Lista de Figuras.

1. Conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>).....	2
2. Muestreo de cartílago de oreja en un conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>) en cautiverio.....	14
3. Heces de conejo zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>).....	15
4. Jaulas individuales para albergue de conejos zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>) en el Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México...	15
5. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 5 muestras de oreja de conejos zacatuche en cautiverio.....	22
6. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 5 muestras de heces de 30 días de conejos zacatuche en cautiverio.....	23
7. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 4 muestras de heces de conejos zacatuche en vida libre.....	23
8. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol08 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 030.....	30
9. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol30 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 118.....	30
10. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sat2 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 030.....	31
11. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sat5 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 376.....	31
12. Gel de agarosa al 4% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol08 de ADN de 3 conejos zacatuche en vida libre.....	32

Resumen.

El conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) es un lagomorfo endémico de la Sierra Nevada y la Sierra Chichinautzin-Ajusco, de alto valor biológico y cuyas poblaciones se encuentran fragmentadas y en franco peligro de extinción. Documentar la variabilidad genética de las poblaciones de esta especie es un paso esencial en el diseño de un plan de conservación de la misma.

El uso de las técnicas no invasivas de muestreo ha permitido llevar a cabo estos estudios sin la necesidad de capturar y perturbar a los ejemplares bajo estudio y un ejemplo es el análisis genético a partir de ADN de muestras fecales. La extracción de ADN de células epiteliales de descamación encontradas en las heces puede permitir la genotipificación de poblaciones, sin embargo, el ADN obtenido es generalmente de pobre calidad y en baja cantidad dando como resultado genotipos poco confiables. El estudio de microsatélites proporciona amplia información sobre la variabilidad genética de poblaciones y puede combinarse con el muestreo no invasivo.

En este estudio se trabajó con 5 conejos zacatuche de la colección del Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, identificados y alojados individualmente en jaulas. Se tomaron muestras de oreja y se colectaron heces frescas, de 15 y 30 días de edad de cada conejo para comparar los genotipos obtenidos. Se tomaron 4 muestras de heces de 3 letrinas de conejos zacatuche en Parres, Distrito Federal. Se utilizaron los microsatélites de ADN Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5, los cuales son reportados como polimórficos para el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*. Se secuenciaron los productos amplificados de los microsatélites. Se determinó fiabilidad y robustez de cada locus. Finalmente se demuestra que de las heces de conejo zacatuche, desde 24 horas hasta 30 días de edad, es posible extraer ADN amplificable, con el cual se podrían realizar estudios de genotipificación no invasiva. Sin embargo, el éxito de amplificación para los microsatélites Sol08 y Sol30 es aparentemente limitado y poco consistente.

Palabras clave:, *Romerolagus diazi*, muestreo no invasivo, ADN fecal, microsatélites, genotipificación.

Abstract.

The volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) is an endemic lagomorph from the hills of Sierra Nevada and Sierra Chichinautzin-Ajusco (Mexico), with high biological value, whose populations are fragmented and in danger of extinction. Documenting the genetic diversity of this species is an essential part of designing a conservation plan.

The use of non-invasive sampling techniques has allowed studying the volcano rabbit without capturing and disturbing the units under study. The fecal DNA genetic analysis is an example of non-invasive sampling. The extraction of DNA from desquamation epithelial cells found in the feces may allow the populations genotyping. Nevertheless, the DNA obtained is generally of poor quality and in low quantity, giving unreliable genotypes. The microsatellites study supplies ample information about the populations' genetic variability and can be combined with non-invasive sampling.

For this research we worked with 5 volcano rabbits from the Chapultepec Zoo collection in Mexico City, identified and caged individually. We took ear samples and collected fresh, 15 and 30 day old feces from each rabbit to compare their obtained genotypes. We also took 4 samples of feces from 3 volcano rabbit latrines at Parres, Distrito Federal, Mexico.

The DNA microsatellites Sol08, Sol30, Sat2 and Sat5 were used, which are reported as polymorphic for the european rabbit *Oryctolagus cuniculus*. The amplified products of each microsatellite were sequenced. Reliability and robustness were determined for each locus. Finally, it is demonstrated that it is possible to extract amplifiable DNA from volcano rabbit feces, from 24 hours to 30 day old samples, with which it would be possible to do non-invasive genotyping studies. Nevertheless, the amplification success for Sol08 and Sol30 microsatellites is apparently limited and less consistent.

Key words: *Romerolagus diazi*, non-invasive sampling, fecal DNA, microsatellites, genotyping.

1. Introducción.

México cuenta con la mayor diversidad de lagomorfos en el continente americano y es uno de los primeros a nivel mundial. En México existen 15 especies de conejos y liebres, de las cuales el 57% (5 conejos y 3 liebres) son endémicos del país. Con excepción del conejo montés (*Sylvilagus cunicularius*) y de la liebre torda (*Lepus callotis*), los lagomorfos endémicos mexicanos ocupan áreas de distribución muy reducidas (Cervantes y Gonzáles, 1996). Este orden de mamíferos es de gran importancia ecológica por ser, junto con los roedores, la base de las redes tróficas en la mayoría de los ecosistemas. Al mismo tiempo que, gracias a su dieta, ayudan a regular las poblaciones de especies vegetales, controlando unas y dispersando otras (AMCELA, 2003).

1.1 El conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

El conejo zacatuche, conejo de los volcanes o teporingo (figura 1), es una especie endémica de distribución restringida, asignada a un género monotípico (Ramírez-Pulido *et al*, 2005), de hábitos especializados lo cual la hace muy sensible a cambios y alteraciones ambientales. Se considera al zacatuche como un conejo primitivo por sus características craneales, dentales y cromosómicas, así como por la relación con sus parásitos que son específicos. Estos aspectos lo relacionan estrechamente con el conejo de las rocas rojas del sur y este de África (*Pronolagus rupestris*) y con el conejo de Amami del suroeste de Japón (*Pentalagus furnessi*), con quienes tradicionalmente había sido considerado como parte de la subfamilia *Paleolaginae*, la más primitiva de los conejos existente. Sin embargo, en 1983 Corbet, citado por Robinson (2005), consideró que el zacatuche es un lepórido de la subfamilia *Leporinae* de acuerdo con las características de su tercer premolar inferior.

El zacatuche es un organismo de talla pequeña que no rebasa los 30 cm de longitud y 600 g de peso, considerado como el conejo más pequeño de México.



Figura 1. Conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

El zacatuche se caracteriza por tener orejas cortas y redondeadas, sus piernas son cortas en relación con su cuerpo y una característica muy particular es que, a diferencia de los demás conejos, su cola es tan pequeña que casi no es visible a simple vista. Su pelaje es corto y denso, de color ocre mezclado con negro en el dorso y en las partes laterales, con la parte ventral de color marrón pálido y la parte superior de las patas de color ante. Presenta un triángulo de pelo amarillento en la nuca entre la base de las orejas. Como una característica particular utiliza frecuentemente vocalizaciones agudas y fuertes, ya que entre los lagomorfos ningún otro lepórido vocaliza a excepción de las pikas de la familia *Ochotonidae*. El zacatuche es gregario y vive en grupos de dos a cinco individuos. Se alimenta sobre todo de gramíneas amacolladas denominadas localmente zacatones, principalmente *Festuca amplissima*, *F. rosei*, *Muhlenbergia macroura*, *Stipa ichu* y *Epicampes sp.* Los zacatuches seleccionan las hojas jóvenes que son suaves y verdes, ya que carecen de demasiado sílice y oxalatos, y usualmente consumen las partes cercanas a la base de las hojas (Romero y Cervantes, 2005).

Dentro del área de distribución del zacatuche existen cinco zonas consideradas como Áreas Naturales Protegidas, sin embargo su cacería no ha cesado; gran parte de su hábitat se encuentra en zonas ejidales o de propiedad privada (Cervantes y Martínez, 1996). De nueve áreas potenciales de distribución, actualmente el zacatuche se encuentra solo en las cuestas de los volcanes Popocatepetl e Iztaccihuatl (Sierra Nevada), y El Pelado y Tlaloc (Sierra Chichinautzin-Ajusco), particularmente entre los 2800 y 4250 metros sobre el nivel del mar. Se ha calculado que el área de distribución de esta especie es de 386.5 km² (Romero y Cervantes, 2005).

Estos mamíferos forman agrupaciones fáciles de distinguir por la abundante presencia de excrementos y un sistema de veredas que construyen por debajo de las gramíneas. Los excrementos del zacatuche son claramente distinguibles con respecto a los de los otros dos conejos con los que comparte su hábitat (*Sylvilagus floridanus* y *S. cunicularius*). Las heces son discoidales, con la parte central hinchada, y miden en promedio de 5 a 9 mm de diámetro. Los

excrementos son encontrados por lo regular en grupos de más de 25 bolitas en la base de los zacatones y cerca de nidos o entradas de madrigueras; estos grupos son conocidos como letrinas, y de acuerdo con observaciones de campo, éstas denotan verazmente la presencia de zacatuches. El patrón de huellas del zacatuche se asemeja al de los otros lepóridos durante la carrera, pero siempre con distancias más cortas entre un grupo de huellas y el otro.

Las especies de conejo que comparten hábitat con el zacatuche rebasan los 38 cm de longitud y 950 g de peso, tienen una gran cola blanca visible, orejas grandes y alargadas, y el suelo donde se encuentran no muestra sus excrementos en abundancia formando letrinas (Cervantes y Gonzáles, 1996; Cervantes-Reza, 1990; Romero y Cervantes, 2005).

1.2 Conservación del conejo zacatuche en vida libre.

Durante las últimas décadas, el hábitat del conejo zacatuche ha sufrido un intenso proceso de fragmentación debido a diversas actividades humanas. Tanto el pastoreo como el fuego están disminuyendo la calidad y cobertura de pastos amacollados y esto tiene un efecto directo sobre la presencia del zacatuche. También lo afectan la tala, el ocoteo (corte fraccionado de los pinos para hacer fogatas), la extracción de pastos y tierra, así como la caza. De particular importancia es la cercanía que tiene su hábitat con la Ciudad de México, por lo que se ha incrementado en éste el desarrollo urbano, las autopistas y caminos transitables, provocando que las poblaciones de esta especie se encuentren cada vez más fragmentadas, disminuidas y aisladas. Todo esto dificulta el mantenimiento de la variabilidad genética de la especie, necesaria para su conservación, al disminuir la posibilidad de migración y transferencia genética (López-Paniagua *et al*, 1996; AMCELA, 2003). La conservación de la biodiversidad presupone el mantenimiento de la diversidad genética, y no solo de especies y de ecosistemas. El conejo zacatuche no es una excepción (Galindo-Leal y Velázquez, 1996). La pérdida de variabilidad genética puede llegar a generar un fenómeno biológico conocido como depresión endogámica o consanguínea, que se define como "la reducción del valor fenotípico medio

mostrado por caracteres conectados con la capacidad reproductiva o con la eficiencia fisiológica” (Falconer, 1996). La consanguinidad incrementa la tasa de morbilidad (número de individuos enfermos en una población) y mortalidad: genes peligrosos se presentan rara vez en poblaciones con alta variación genética, pero pueden expresarse cuando la variabilidad disminuye.

Esta problemática ha generado que *R. diazi* sea considerada una especie rara y en peligro de extinción, registrada así desde 1966 en el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN); y considerada también en peligro de extinción por el gobierno mexicano en la NOM 059-ECOL01. Su comercio se encuentra regulado por el Convenio sobre el Tratado Internacional de Especies en Peligro de Flora y Fauna (CITES, 1996; Romero y Cervantes, 2005).

Entre los interrogantes genéticos que surgen para un programa de conservación del zacatuche en vida libre están los siguientes: ¿Existen poblaciones aisladas de zacatuches en los diferentes sistemas volcánicos? ¿Como afecta a su variabilidad genética el aislamiento de las poblaciones? ¿Existen diferencias genéticas entre las poblaciones de Sierra Nevada y Sierra Chichinautzin-Ajusco? ¿Puede haber consecuencias de introgresión genética como resultado de la fragmentación y aislamiento de poblaciones? (Galindo-Leal y Velázquez, 1996). Campos (2005) afirma que las poblaciones silvestres de las regiones del Popocatepetl, El Pelado, Chingueretería y Yecahuazac se encuentran en proceso de diferenciación genética, y que estas diferencias pueden ser debidas al aislamiento geográfico en el que se encuentran.

Lo anterior ha despertado el interés de varias organizaciones y fundaciones nacionales e internacionales que han reconocido la importancia de fomentar la conservación de este lagomorfo. A los esfuerzos de estas organizaciones se unieron algunas instituciones zoológicas, contribuyendo con el mantenimiento de colonias reproductivas en cautiverio (Durrel y Mallison, 1968; Matsuzaki *et al*, 1982; Hoth y Granados, 1987), de las que sobreviven únicamente las colonias de la Ciudad de México.

1.3 Colonias reproductivas de conejo zacatuche en cautiverio en México y la importancia de su estudio genético.

La Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre de la Ciudad de México cuenta con las colonias del Zoológico de Chapultepec y del Zoológico Los Coyotes, representando actualmente las únicas colonias reproductivas exitosas en cautiverio de zacatuche en todo el mundo. La colonia de zacatuches se inició en el Zoológico de Chapultepec en 1984 con 12 ejemplares (4 machos y 8 hembras) originarios de Parres, Distrito Federal, y en la actualidad cuenta aproximadamente con 152 individuos. En 1998 se fundó una segunda colonia con 6 ejemplares (2 machos y 4 hembras) originarios también de la zona de Parres, que actualmente cuenta con aproximadamente 16 individuos. En diciembre de 2003 se fundó una nueva colonia en el Zoológico Los Coyotes con 9 hembras provenientes de la primera colonia de Chapultepec y 4 machos provenientes de la segunda.

Algunos de los objetivos primordiales de mantener una colonia reproductiva de zacatuches que ha establecido la Dirección de Bioética, Investigación y Conservación de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre a través del Programa Institucional de Conservación por Especie (PICE) para el conejo zacatuche son:

- 1) Realizar un programa permanente de educación y concientización.
- 2) Mantener un resguardo saludable de esta especie en cautiverio a largo plazo.
- 3) Colaborar activamente en un programa de reintroducción.
- 4) Con base en la experiencia de su manejo en cautiverio, apoyar los esfuerzos de conservación en vida libre.

Para alcanzar estos objetivos, es de vital importancia el mantenimiento sano desde el punto de vista genético de su colonia reproductiva, y para lograrlo es necesario elaborar un análisis genético de esta población, determinando la pérdida de diversidad genética que pudiera observarse entre sus individuos, el coeficiente de consanguinidad, así como la identificación de los individuos dominantes, entre otros puntos. Las técnicas actuales de laboratorio permiten

elaborar estudios genéticos de manera confiable y accesible con una pequeña muestra de material biológico, inclusive de restos fecales, cuya obtención es un ejemplo de muestreo no invasivo.

1.4 Muestreo no invasivo para estudios genéticos.

Documentar la presencia, abundancia y variabilidad genética de las especies es el primer paso en el diseño de planes de conservación para especies amenazadas y para el entendimiento de la ecología de poblaciones. Sin embargo, en muchos casos ésta no es una tarea sencilla debido a que los individuos no son fáciles de detectar y los métodos requeridos para la captura y manejo de estos animales no son viables debido a problemas logísticos y éticos. Este problema es particularmente grave en el caso de especies en peligro de extinción que son difíciles de observar en vida libre, se encuentran en bajas densidades, son elusivos, y en la mayoría de los casos su captura es contraproducente y no recomendable debido a la fragilidad de las poblaciones y al estatus de conservación en el que se encuentran, como es el caso del conejo zacatuche. Los métodos de muestreo no invasivo, es decir, aquellos que no requieren necesariamente de la captura del ejemplar o de perturbar a sus poblaciones, cobran día a día una mayor importancia en el estudio de estas especies. La mayoría de las veces, los únicos rastros más factibles de encontrar son huellas y heces. El muestreo fecal es el método menos invasivo comparado con cualquier otro método de muestreo y permite el acceso a especies y poblaciones que de otra manera serían casi imposibles de estudiar. Diversos trabajos y recomendaciones para realizar estudios poblacionales utilizando marcadores genéticos a partir de muestras no invasivas han sido desarrollados, algunos de ellos mostrando su efectividad en campo (Taberlet *et al*, 1996; Taberlet y Camarra, 1997; Taberlet *et al*, 1999; Flagstad *et al*, 1999; Marchant *et al*, 2000; García y Estrada, 2004; Pilgrim *et al*, 2004).

1.5 Estudio genético a partir de heces.

Las heces generalmente contienen células de descamación del tracto digestivo y por consiguiente ADN del individuo en cuestión, lo cual permite emplear técnicas de escatología molecular basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (Polymerase Chain Reaction), para amplificar regiones específicas del ADN. Sin embargo, la recuperación de ADN contenido en las células de descamación encontradas en las muestras fecales no es sencilla. Típicamente el ADN nuclear obtenido es de pobre calidad y se encuentra en baja cantidad.

Las heces son ensamblajes complejos de biomoléculas y contienen sustancias que se sabe interfieren con el análisis del ADN. Los herbívoros potencialmente representan un reto cuando se trata de extraer ADN a partir de sus heces, debido a los efectos inhibitorios de compuestos secundarios de las plantas contenidas en su dieta que afectan la efectividad de la técnica de PCR. Además de esto, el alto contenido bacteriano del material fecal puede causar la rápida degradación del ADN presente originalmente. Al parecer, el éxito de la extracción depende casi por completo de la condición física de la muestra fecal y del método de extracción utilizado (Taberlet *et al*, 1996; Reed *et al*, 1997; Frantzen *et al*, 1998; Flagstad *et al*, 1999; Beaumont, 2000; Palomares *et al*, 2000; Nsubuga, 2004). En el caso del conejo zacatuche, el tamaño tan pequeño de las heces representa otra dificultad, al disminuir la cantidad de muestra disponible por individuo. Wehausen (2004) demostró en borrego cimarrón que el índice de PCR exitosos aumenta cuando se utiliza únicamente la parte superficial de la muestra fecal, a comparación de cuando se utiliza la muestra completa, lo cual además, incrementa la variación presente entre las muestras, posiblemente debido a la presencia de diferentes compuestos secundarios de las plantas presentes en la dieta consumida en cada región geográfica. Sin embargo, las heces del zacatuche son tan pequeñas que podría ser necesario utilizar la muestra completa.

1.6 Marcadores microsatelitales.

Existe una gran variedad de marcadores moleculares que pueden ser usados para estudiar la genética poblacional y evolutiva de un amplio intervalo de organismos a través de PCR. El estudio de microsatélites proporciona una amplia información sobre la diversidad y variabilidad genética de poblaciones. Un marcador microsatelital o microsatélite es una secuencia corta de ADN eucariótico (en particular di-, tri- o tetra- nucleótidos) altamente repetitivo en tandem, que presenta variaciones en el número de repeticiones. Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo *locus*. Los microsatélites se encuentran distribuidos al azar permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucarionte. Los *primers* o iniciadores utilizados para iniciar el proceso de PCR son secuencias cortas (aproximadamente 20 a 30 nucleótidos de largo) que exhiben alta similaridad secuencial con las regiones que flanquean la secuencia microsatelital blanco (Awise, 1994). Las principales aplicaciones de estos marcadores en el área de genética de poblaciones son estudios de hibridación, historia de poblaciones y filogeografía, así como la detección de cuellos de botella poblacionales y consanguinidad de poblaciones (Beaumont, 2000).

La variabilidad genética puede ser evaluada por cambios en la heterocigocidad, en el número de alelos, o en ambos. Debido a que los microsatélites presentan gran variación alélica, son herramientas potencialmente sensibles para la detección de variación genética. Otras ventajas que presentan son su alta tasa de mutación (10^{-3} eventos por *locus* por generación en humanos), codominancia, espaciamiento al azar y abundancia en el genoma, así como fácil aislamiento y detección vía PCR, así como la posibilidad de utilizar marcadores previamente aislados de especies relacionadas (Hancock, 1999; Beaumont, 2000).

1.7 Estudios genéticos combinando marcadores microsatelitales y muestreo no invasivo.

El trabajo con marcadores microsatelitales puede combinarse con el muestreo no invasivo. Algunos investigadores han reportado altos porcentajes de amplificación exitosa de *loci* microsatelitales por PCR a partir de ADN fecal (95%, Flagstad *et al*, 1999; 98%, Parsons, 2001; 99%, Palomares *et al*, 2002), aunque en otros casos el éxito ha sido menor (67%, Gerloff *et al*, 1995; 75%, Ernest *et al*, 2000). Estos estudios fueron realizados en múltiples especies con gran variedad de dietas y condiciones de vida, así como diferentes métodos de conservación de las muestras, de extracción de ADN y de amplificación por PCR. Los diferentes ambientes ecológicos y sociales entre animales en cautiverio y animales en vida libre significan que los resultados de estudios en animales cautivos no siempre son válidos para extrapolación a la vida libre (Nsubuga *et al*, 2004).

Uno de los problemas que presenta este método de muestreo para los estudios de genotipificación de poblaciones es el llamado “efecto de sombra”, ya que ejemplares que no han sido capturados previamente pueden ser clasificados como recapturas debido a que su perfil genético es una “sombra” indistinguible de ejemplares previamente capturados. Sin embargo, este efecto puede ser minimizado incrementando el número de *loci* individuales muestreados (Mills, 2000). Generalmente, para la realización de análisis genéticos de poblaciones, se trabaja con 10 a 15 *loci* microsatelitales diferentes (Zamorano *et al*, 1998; Van Hooft *et al*, 2000; Ernest *et al*, 2000).

Otro problema que llega a presentarse es la amplificación de artefactos ó falsos alelos derivados de ADN bacteriano, de parásitos y de componentes de la dieta; sin embargo la mayoría de los reportes de incidencia de resultados anómalos e irreproducibles en estudios de genotipificación con microsatélites son bajos, con una ocurrencia menor del 1% (Bradley *et al*, 2002).

Se ha documentado el trabajo con marcadores microsatelitales para estudios poblacionales en lagomorfos. Burton (2002) publicó un trabajo sobre la estructura genética poblacional de *Lepus americanus* en Yukon, Canadá,

trabajando con 7 microsatélites diferentes y Zhu (2002) estudió la variación genética dentro y entre 5 poblaciones de conejo doméstico trabajando con 5 microsatélites. SurrIDGE (1997) trabajó en la amplificación de 6 marcadores microsatelitales diseñados para el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) en otras 20 especies diferentes de lagomorfos, incluyendo a *R. diazi*.

Para el presente estudio se amplificaron los microsatélites Sol08 y Sol30 evaluados por Rico (1994) en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) quien encontró 5 alelos entre 111 y 120 pares de bases (pb) para Sol08, y 4 alelos entre 153 y 172 pb para Sol30. SurrIDGE (1997) encontró alelos entre 114 y 136 pb para el *locus* Sol08, y entre 142 y 187 pb para el *locus* Sol30 en 20 especies de lagomorfos, incluyendo un alelo de 120 pb y uno de 161 pb, respectivamente, en *R. diazi*. Se incluyeron también los microsatélites Sat2 y Sat5 evaluados por Mougél (1997) en *O. cuniculus* quien observó 4 alelos de tamaño entre 241 y 253 pares de bases y 6 alelos entre 206 y 234 pares de bases, respectivamente.

La posibilidad de amplificar *loci* microsatelitales en especies amenazadas de lagomorfos a partir de iniciadores desarrollados para el conejo europeo y más aún, a partir de muestras fecales como muestreo no invasivo, abre las puertas a un gran potencial para su uso en la conservación de estas especies en peligro, como es el caso del conejo zacatuche.

1.8 Justificación.

El conejo zacatuche es una especie endémica de alto valor biológico y cuyas poblaciones se encuentran fragmentadas y en franco peligro de extinción. Organizaciones nacionales e incluso internacionales, así como diferentes zoológicos, han reconocido la importancia de trabajar en la conservación de esta especie, entre ellos, la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre de la Ciudad de México.

Un plan de conservación de cualquier especie requiere de un análisis que determine la variabilidad genética existente en sus poblaciones, y el conejo zacatuche no debe ser una excepción. El uso de las técnicas no invasivas de muestreo permite llevar a cabo estos estudios sin la necesidad de capturar y perturbar a los ejemplares bajo estudio, y el desarrollo de métodos de análisis biológico a partir de este tipo de muestreos en especies silvestres se ha convertido en una necesidad. Un ejemplo de estos métodos es el análisis genético a partir de muestreo fecal. La extracción de ADN fecal de células epiteliales de descamación pueden permitir la genotipificación de poblaciones, sin embargo, diversas investigaciones señalan la dificultad de trabajar con ADN extraído de heces debido a que éste es generalmente de pobre calidad y en baja cantidad, a la gran cantidad de inhibidores que presentan y que interfieren con la actividad de la enzima polimerasa, y a la presencia de parásitos y bacterias que pueden degradar y contaminar el ADN, dando como resultado genotipos poco confiables.

Todo lo anterior justifica el esfuerzo de trabajar en el desarrollo y optimización de una técnica específica y confiable de amplificación de microsatélites de ADN fecal de zacatuche para poder aplicarla en la genotipificación de individuos en cautiverio y en vida libre en estudios posteriores.

1.9 Objetivo.

Desarrollar un sistema para la genotipificación no invasiva a partir de muestras fecales utilizando los microsatélites Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 en el conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

1.10 Hipótesis.

Es posible llevar a cabo la genotipificación de poblaciones de conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) utilizando ADN extraído de muestras fecales y trabajando con los microsatélites Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 diseñados para el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*).

2. Materiales y Método.

2.1 Animales.

Se trabajó con 5 conejos zacatuche (3 machos y 2 hembras) de la colección del Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, identificados por medio de microchip, y que serán identificados con los números 030, 109 y 376 para fines de este trabajo, los cuales son descendientes de la colonia formada en 1984; y con los números 118 y 639, los cuales son descendientes de la colonia formada en 1998. Los 5 ejemplares se encontraban alojados en jaulas individuales fuera de exhibición.

2.2 Muestreo de conejos zacatuche en cautiverio.

Oreja. Se realizaron 3 muescas de 2 mm de diámetro de la oreja de los conejos en cautiverio (figura 2). La extracción de ADN se realizó el mismo día.

Heces. Se colectaron heces de cada conejo directamente de las jaulas individuales donde se albergan (figuras 3 y 4). De cada ejemplar se colectaron 9 muestras de las cuales 3 fueron procesadas inmediatamente y las demás se mantuvieron a la intemperie, simulando en la medida de lo posible las condiciones de campo, 3 de éstas fueron procesadas 15 días después de la colecta, y 3 muestras fueron procesadas 30 días después de la colecta.

Hígado. También se utilizó una muestra de hígado de conejo zacatuche de un ejemplar recién fallecido de la colección del Zoológico de Chapultepec, así como otras 4 muestras de hígado de conejo zacatuche que permanecían congeladas a -70°C y que pertenecen a la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la UNAM.

2.3 Muestreo de heces de conejos zacatuche en vida libre.

Se tomaron 4 muestras de heces de 3 letrinas de conejos zacatuche en Parres El Guarda, Delegación Tlalpan, en el Distrito Federal, encontradas en las bases de los zacatones, y separadas entre sí por 500-600 m aproximadamente. Se tomaron las heces de color ocre, más brillosas y de textura lisa, para procurar que fueran lo

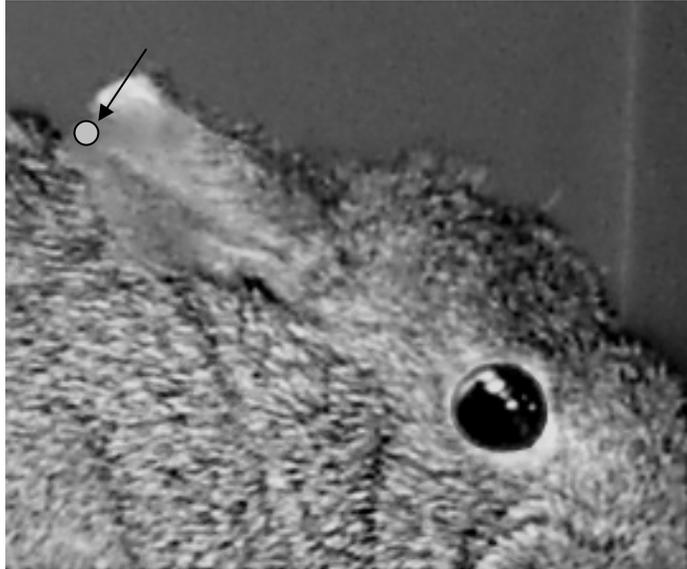


Figura 2. Muestreo de cartílago de oreja en un conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) en cautiverio. La flecha y el círculo muestran la muesca realizada en la oreja para la posterior extracción de ADN.



Figura 3. Heces de conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).



Figura 4. Jaulas individuales para albergue de conejos zacatuche (*Romerolagus diazi*) en el Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México.

más frescas posible. Se transportaron en hielo y se procesaron dos días después de la recolección, mientras tanto se mantuvieron congeladas a -70°C .

2.4 Extracción de ADN.

La extracción de ADN de oreja e hígado así como del ADN fecal, se realizó con los kits comerciales DNeasy Tissue Kit y QiAamp DNA Stool Mini Kit, de QIAGEN^{MR}. Se comprobó la presencia e integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración del ADN se determinó por espectrofotometría (260 nm) y su pureza se obtuvo mediante la relación 260 nm/ 280 nm, utilizando el espectrofotómetro BioMate 3 ThermoSpectronic^{MR}.

2.5 Amplificación de microsatélites de ADN.

Se trabajó con los microsatélites de ADN Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 (cuadro 1), los cuales son reportados como polimórficos para el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus* (Rico *et al*, 1994; Mougel *et al*, 1997; Surridge *et al*, 1997); las amplificaciones fueron obtenidas mediante PCR utilizando iniciadores diseñados originalmente para el conejo europeo, y siguiendo el protocolo descrito en los cuadros 2 y 3. El ADN obtenido de hígado fue utilizado para definir estas condiciones ideales de amplificación.

Muestras obtenidas en cautiverio. De cada muestra de ADN de oreja se llevaron a cabo dos amplificaciones independientes. Se realizaron tres amplificaciones independientes de una muestra fecal de cada grupo de tiempo transcurrido entre la expulsión y la extracción de ADN (frescas, 15 y 30 días) y de cada conejo, sumando un total de 9 repeticiones por conejo, satisfaciendo la propuesta de Múltiples Tubos de Taberlet (1996) la cual toma en cuenta las tres principales fuentes potenciales de error: muestreo estocástico, falsos alelos y contaminación esporádica. Cuando se hace un PCR con pocas cantidades de ADN es posible que un alelo de un individuo heterocigoto no sea detectado o que se produzcan falsos alelos. Se registra un alelo solo si ha sido observado al menos dos veces,

Cuadro 1. Microsatélites de ADN para amplificación en el conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

Microsatélite	Secuencia de los primers	Código de acceso Gen Bank	Secuencia repetida
<i>Sol08</i>	5'GGATTGGGCCCTTTGCTCACACTTG3' 5'ATCGCAGCCATATCTGAGAGAACTC3'	X79217	(TG) ₁₉ (N) ₁₅ (TG) ₅
<i>Sol30</i>	5'CCCGAGCCCCAGATATTGTTAGGA3' 5'TGCAGCACTTCATAGTCTCAGGTC3'	X79215	(TC) ₁₄ A(T) ₄ (TC) ₅
<i>Sat2</i>	5'GCTCTCCTTTGGCATACTCC3' 5'GCTTTGGATAGGCCAGATC3'	M77195	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀
<i>Sat5</i>	5'GCTTCTGGCTTCAACCTGAC3' 5'CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG3'	X99887	(TC) ₂₃ TTT (CT) ₅

Cuadro 2. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación de microsatélites de ADN del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Reactivo	Concentración original	Volumen a tomar	Concentración final en la reacción
Buffer	10 X	2.5 µl	1 X
MgCl ₂	25 mM	Sol08 y Sol30: 1.5 µl Sat2 y Sat5: 1 µl	1.5 mM 1 mM
dNTPs (Promega ^{MR})	10 mM	0.5 µl	200 µM
<i>Primer F</i>	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
<i>Primer R</i>	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Taq polimerasa (Invitrogen ^{MR})	5 U/µl	0.2 µl	1 U/µl
BSA (Promega ^{MR})	10mg/ml	0.2 µl	2µg
DNA		El necesario para obtener 100 ng	100 ng/25 µl
Agua destilada		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl	

Cuadro 3. Programa del termociclador para la amplificación de los microsatélites de ADN Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5 en el conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Microsatélite Sol08			
Evento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Desnaturalización	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	7
Alineación	58°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Desnaturalización	89°C	30 seg	23
Alineación	58°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Microsatélite Sol30			
Evento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Desnaturalización	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	7
Alineación	52°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Desnaturalización	89°C	30 seg	23
Alineación	52°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	

Microsatélite Sat2			
Evento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Desnaturalización	94°C	4 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	30
Alineación	55°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión	72°C	5 min	1
Microsatélite Sat5			
Evento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Desnaturalización	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	30
Alineación	60°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión	72°C	5 min	1

con esto la probabilidad de registrar un falso alelo no excede del 5%, y sólo se registra un individuo como homocigoto si se detecta el mismo alelo en 7 experimentos independientes, con esto la probabilidad de obtener sólo uno de dos alelos de un individuo heterocigoto es de 0.5^n donde n =número de experimentos independientes. Cuando $n=7$ la probabilidad de detectar solo un alelo es menor del 1% (Taberlet, 1996).

Muestras obtenidas en campo. Con cada muestra de ADN se realizaron 3 reacciones independientes si el individuo era heterocigoto, y 6 ó 7 si era homocigoto.

Visualización de los microsatélites. Los productos de las amplificaciones se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas de ADN amplificadas mediante luz ultravioleta y se fotografiaron con un sistema de imagen digital (Kodak^{MR} EDAS 290). Para las amplificaciones de heces de campo se utilizaron geles de agarosa al 4% para permitir una mayor separación entre las bandas. Para todos los casos se utilizó un control negativo.

2.6 Secuenciación automática de los microsatélites de ADN.

Para corroborar la amplificación del *locus* deseado, se secuenciaron los productos amplificados de uno ó dos conejos en cautiverio por microsatélite. Se cortaron las bandas amplificadas directamente del gel de agarosa y se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit, de QIAGEN^{MR}. Posteriormente fueron remitidos para su análisis con el secuenciador automático ABI PRISM^{MR}. Las secuencias obtenidas se alinearon con las obtenidas en GenBank con el número de referencia respectivo de cada microsatélite para el conejo europeo, utilizando el programa FASTA LALIGN/PLALIGN de la Universidad de Virginia.

3. Resultados.

3.1 Extracción de ADN.

Se obtuvieron el rendimiento y la pureza del ADN extraído de las muestras de oreja (n=5). El peso promedio de las muestras fue de 2.04 mg y la concentración promedio de ADN fue de 6.2 μg , dando un rendimiento promedio de 3.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$, con una pureza promedio de 1.8. En la figura 5 se muestra la integridad del ADN.

También se obtuvieron el rendimiento y pureza del ADN de los diferentes grupos de las muestras de heces de conejos en cautiverio, es decir, heces frescas (n=15), heces de 15 días de edad (n=15) y heces de 30 días de edad (n=15), los resultados se muestran en el cuadro 4. En la figura 6 se muestra la integridad del ADN obtenido de una extracción de heces de 30 días de los 5 conejos zacatuche en cautiverio.

Para las muestras de hígado (n=5), el peso promedio de las muestras fue de 25 mg y la concentración promedio de ADN fue de 34.02 μg , dando un rendimiento promedio de 1.36 $\mu\text{g}/\text{mg}$, con una pureza promedio de 1.7.

De las muestras de heces obtenidas en campo (n=4), únicamente se pudo obtener ADN de tres; el peso promedio fue de 42.66 mg y la concentración promedio de ADN fue de 5.5 μg , dando un rendimiento promedio de 0.126 $\mu\text{g}/\text{mg}$, con una pureza promedio de 1.5. En la figura 7 se muestra la integridad del ADN extraído de estas muestras.

3.2 Amplificación de microsatélites de ADN.

Muestras obtenidas en cautiverio. Para cada conejo en cautiverio se realizaron 2 amplificaciones por microsatélite de una muestra de oreja. Para el microsatélite Sol08, dos de las muestras requirieron una tercera amplificación ya que los resultados no eran consistentes; para el microsatélite Sol30 todas las muestras requirieron una tercera ó cuarta amplificación.

Los alelos obtenidos en la amplificación de las muestras de oreja se compararon con los obtenidos de las muestras de heces del mismo conejo.

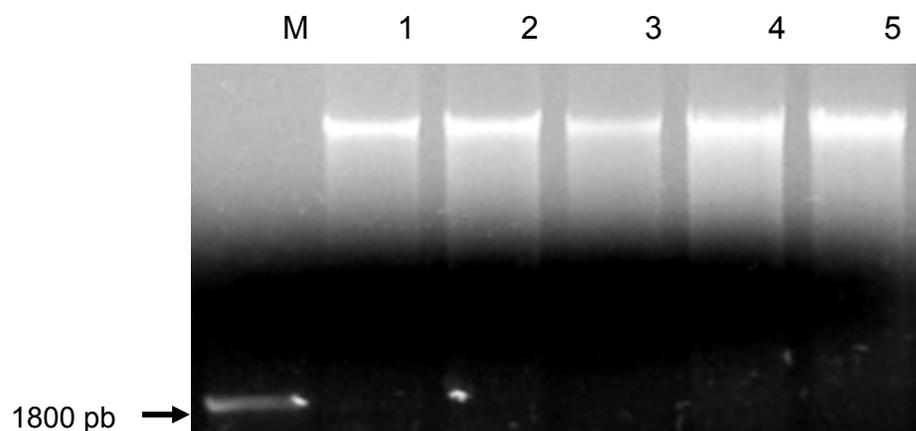


Figura 5. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 5 muestras de oreja de conejos zacatucho en cautiverio.

Columnas: M, marcador de peso molecular 1800 pares de bases (pb); 1, muestra 030; 2, muestra 109; 3, muestra 118; 4, muestra 376; 5, muestra 639.

Cuadro 4. Rendimiento y pureza promedio del ADN extraído de muestras de heces frescas (n=15), de 15 (n=15) y 30 días (n=15) de 5 conejos zacatucho en cautiverio.

Heces	Concentración promedio de ADN (μg)	Rendimiento promedio ($\mu\text{g ADN/ mg tejido}$)	Pureza promedio
Frescas	4.52+/- 1.60	0.056+/- 0.02	1.7
15 días	6.66+/- 0.83	0.166+/- 0.04	1.4
30 días	6.33+/- 1.28	0.134+/- 0.06	1.5
Total	5.84+/- 1.57	0.119+/- 0.06	1.6

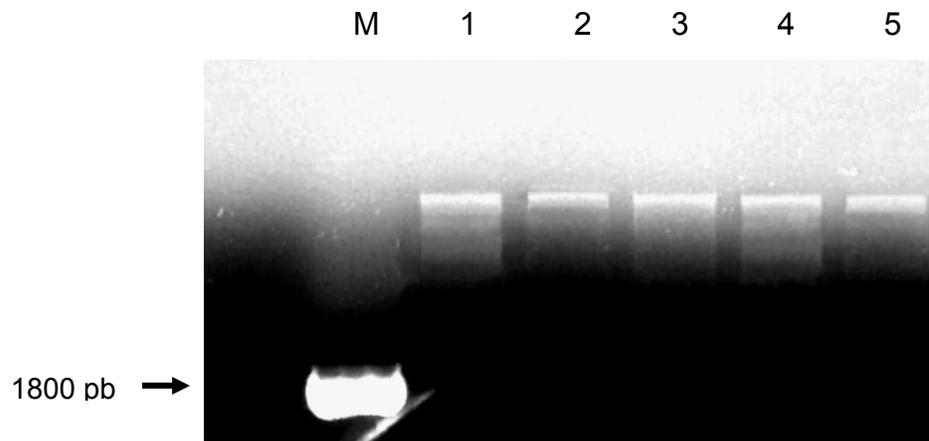


Figura 6. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 5 muestras de heces de 30 días de conejos zacatuche en cautiverio. Columnas: M, marcador de peso molecular 1800 pares de bases (pb); 1, muestra 030; 2, muestra 109; 3, muestra 118; 4, muestra 376; 5, muestra 639.

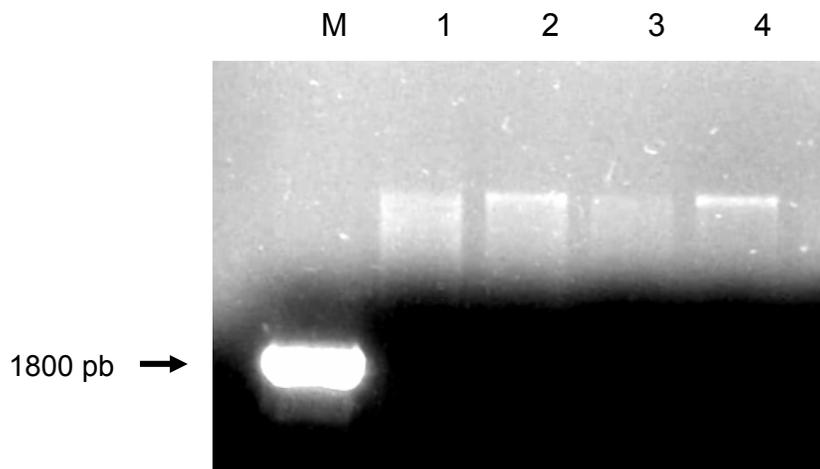


Figura 7. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del ADN extraído de 4 muestras de heces de conejos zacatuche en vida libre. Columnas: M, marcador de peso molecular 1800 pares de bases (pb); 1, muestra A; 2, muestra B; 3, muestra C; 4, muestra D; N, negativo.

En los cuadros 5 al 8 se muestra el número de amplificaciones correctas, incorrectas y sin amplificación para cada grupo de heces (frescas, 15 y 30 días) y para cada microsatélite. Se define como amplificación correcta aquella amplificación de ADN de heces que haya mostrado el mismo patrón de bandas que el obtenido a partir de ADN de oreja del mismo individuo. Se define como

amplificación incorrecta aquella amplificación de ADN de heces que haya mostrado un patrón de bandas diferente al obtenido a partir de ADN de oreja del mismo individuo.

En las figuras 8 a 11 se muestran series de amplificaciones correctas para cada microsatélite, es decir, las bandas amplificadas para las muestras de oreja y heces son iguales.

Muestras obtenidas en campo. De las tres muestras de heces de campo se obtuvieron resultados exitosos de acuerdo con las reglas propuestas por Taberlet (1996). Para cada *locus* homocigoto se obtuvieron al menos 6 veces una misma banda, y para cada *locus* heterocigoto se obtuvo la misma amplificación al menos dos veces. En el cuadro 9 se muestran los porcentajes de amplificaciones correctas, incorrectas y negativas. El cuadro 10 muestra el tamaño aproximado de los alelos obtenidos y el número de conejos heterocigotos. En la figura 12 se muestra la amplificación de las tres muestras para el *locus* Sol08.

3.3 Secuenciación de microsatélites.

Se obtuvo la secuencia de ADN de las bandas amplificadas de dos conejos para los *loci* Sat2 y Sat5. Estas secuencias se alinearon con las obtenidas en GenBank con el número de referencia respectivo de cada microsatélite para *O. cuniculus*. En el cuadro 11 se muestra el tamaño del alelo, la secuencia repetida del microsatélite, y el porcentaje de identidad de ambas secuencias alineadas sin la secuencia repetida. En el Apéndice se muestran las secuencias completas de cada microsatélite para el conejo zacatuche y la alineación con las obtenidas

de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) para el conejo europeo. No se pudo obtener una secuencia confiable de los *loci* Sol08 y Sol30, al obtenerse un gran cantidad de bases imprecisas o “N”.

Cuadro 5. Éxito de amplificación del microsatélite Sol08 de ADN de muestras de heces frescas (n=15), de 15 (n=15) y 30 días (n=15) de 5 conejos zacatucho en cautiverio.

Muestras	Amplificaciones correctas	Amplificaciones incorrectas	Sin amplificación
Frescas	11	2	2
15 días	13	1	1
30 días	11	1	3
Porcentaje	~ 78%	~ 9%	~ 13%

Cuadro 6. Éxito de amplificación del microsatélite Sol30 en ADN de muestras de heces frescas (n=15), de 15 (n=15) y 30 días (n=15) de 5 conejos zacatucho en cautiverio.

Muestras	Amplificaciones correctas	Amplificaciones incorrectas	Sin amplificación
Frescas	10	3	2
15 días	11	4	0
30 días	9	4	2
Porcentaje	~ 67%	~ 25%	~ 8%

Cuadro 7. Éxito de amplificación del microsatélite Sat2 en ADN de muestras de heces frescas (n=15), de 15 (n=15) y 30 días (n=15) de 5 conejos zacatucho en cautiverio.

Muestras	Amplificaciones correctas	Amplificaciones incorrectas	Sin amplificación
Frescas	13	2	0
15 días	14	1	0
30 días	12	3	0
Porcentaje	~ 87%	~ 13%	0%

Cuadro 8. Éxito de amplificación del microsatélite Sat5 en ADN de muestras de heces frescas (n=15), de 15 (n=15) y 30 días (n=15) de 5 conejos zacatucho en cautiverio.

Muestras	Amplificaciones correctas	Amplificaciones incorrectas	Sin amplificación
Frescas	14	0	1
15 días	13	1	1
30 días	13	1	1
Porcentaje	~ 89%	~ 4%	~ 7%

Cuadro 9. Porcentaje de amplificaciones correctas, incorrectas y sin amplificación de ADN de 3 muestras de heces de conejos zacatucho (*Romerolagus diazi*) en vida libre para los *loci* Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5.

<i>Locus</i>	Porcentaje de amplificaciones correctas	Porcentaje de amplificaciones incorrectas	Porcentaje sin amplificación
Sol08	63%	6%	31%
Sol30	78%	7%	15%
Sat2	78%	16%	6%
Sat5	86%	7%	7%

Cuadro 10. Tamaño aproximado de los alelos amplificados de ADN de heces de 3 conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*) en vida libre para los *loci* Sol08, Sol30, Sat2 y Sat5, y número de conejos heterocigotos para cada *locus*.

<i>Locus</i>	Tamaño de los alelos amplificados	Número de heterocigotos
Sol08	125, 130, 140	2
Sol30	150, 155, 162, 170	1
Sat2	155, 160, 175	1
Sat5	215, 222, 230	2

Cuadro 11. Tamaño en pares de bases (pb) de los alelos, secuencia repetida del microsatélite y porcentaje de identidad con el mismo *locus* en conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), para los *loci* Sat2 y Sat5 amplificados de ADN de conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) en cautiverio.

<i>Locus</i>	Tamaño del alelo	Secuencia repetida del microsatélite	Porcentaje de identidad con <i>Oryctolagus cuniculus</i> (sin secuencia repetida)
Sat2	224 pb	(TC) ₆ TG (TC) ₁₀	91.8% 14 bases diferentes de 171
Sat5	207 pb	(CT) ₁₄	97.8% 3 bases diferentes de 136

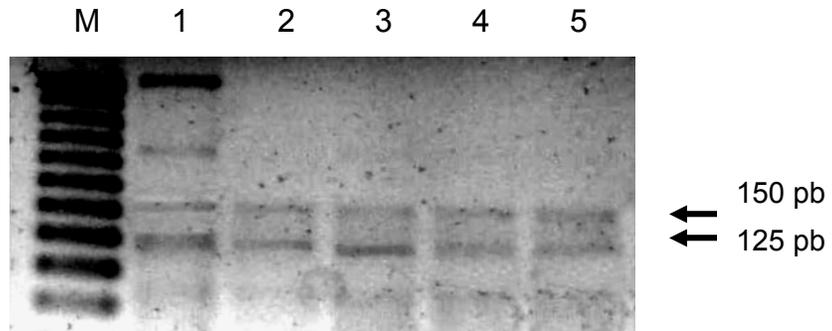


Figura 8. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol08 de ADN de muestras del conejo zacatucho con identificación 030.

Columnas: M, marcador de peso molecular; 1, oreja; 2, oreja; 3, heces frescas; 4, heces de 15 días; 5, heces de 30 días.

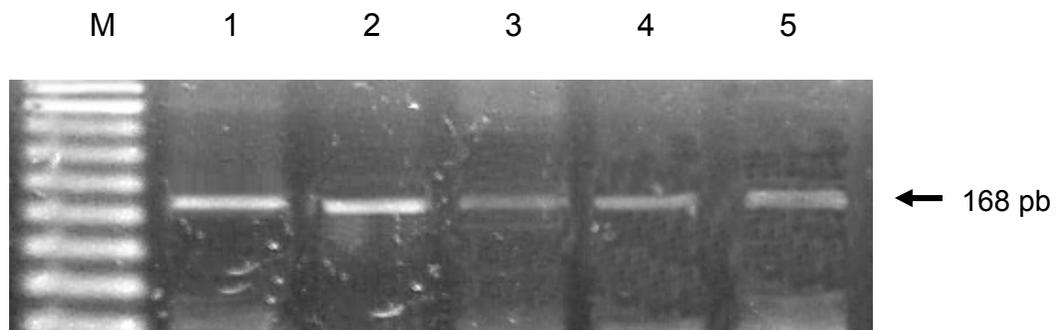


Figura 9. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol30 de ADN de muestras del conejo zacatucho con identificación 118.

Columnas: M, marcador de peso molecular 300 pares de bases (pb); 1, oreja; 2, oreja; 3, heces frescas; 4, heces de 15 días; 5, heces de 30 días.

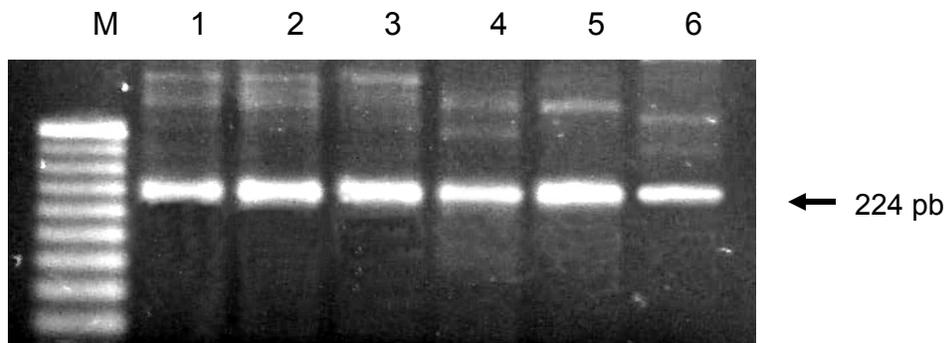


Figura 10. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sat2 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 030.

Columnas: M, marcador de peso molecular 300 pares de bases (pb); 1, muestra de oreja; 2, muestra de oreja; 3, muestra de heces frescas; 4, muestra de heces de 15 días; 5, muestra de heces de 15 días; 6, muestra de heces de 30 días.

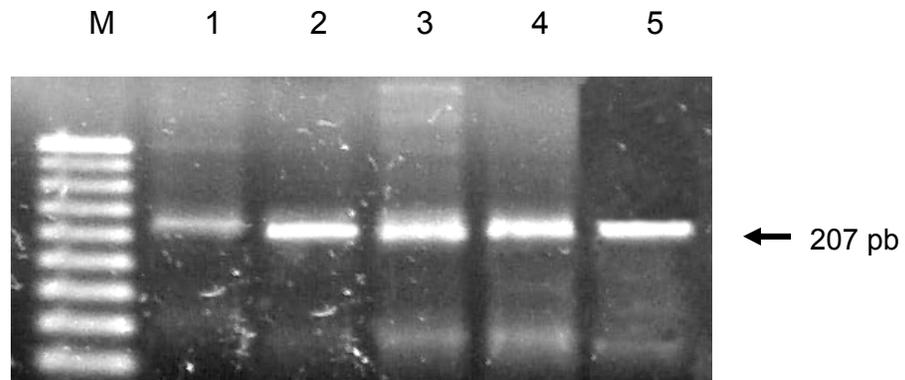


Figura 11. Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sat5 de ADN de muestras del conejo zacatuche con identificación 376.

Columnas: M, marcador de peso molecular 300 pares de bases (pb); 1, oreja; 2, oreja; 3, heces frescas; 4, heces de 15 días; 5, heces de 30 días.

M 1 2 3

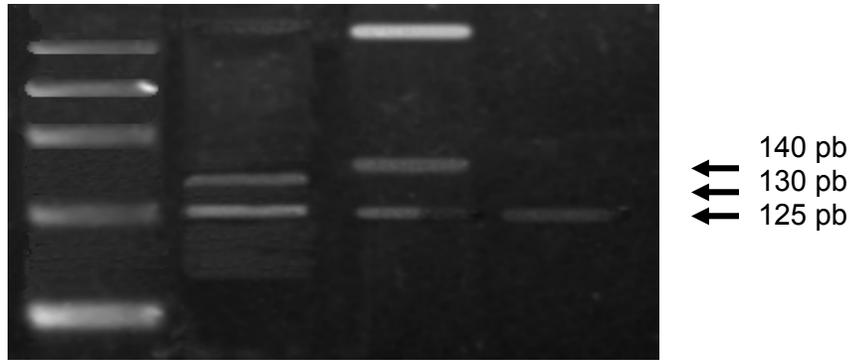


Figura 12. Gel de agarosa al 4% donde se muestran las bandas amplificadas del microsatélite Sol08 de ADN de 3 conejos zacatucho en vida libre.

Columnas: M, marcador de peso molecular 300 pares de bases (pb); 1, muestra A; 2, muestra C; 3, muestra D.

4. Discusión.

El mantenimiento de la diversidad genética es una de las prioridades mundiales para la conservación y el manejo de poblaciones de especies silvestres amenazadas reconocida por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Ya que las poblaciones requieren de diversidad genética para evolucionar como respuesta a los constantes cambios ambientales, ésta representa el potencial evolutivo de una población. Para el estudio genético de los animales silvestres, ya sea en cautiverio y con mayor razón en vida libre, el muestreo no invasivo ha dejado de ser un lujo para convertirse en una necesidad. Con esta realidad en mente se comenzaron a desarrollar técnicas para realizar estudios genéticos con la esperanza de que el muestreo genético no invasivo pudiera proveer la misma información que el ADN extraído de sangre o tejido.

La fiabilidad de la genotipificación es objeto de estudio cuando se utiliza el muestreo no invasivo como fuente de ADN. En este trabajo se presentó y evaluó una técnica molecular para la identificación genética de conejos zacatuche (*Romerolagus diazi*) por medio de heces. Este estudio tuvo como objetivo principal el desarrollo de la técnica mediante pruebas en laboratorio con tejido y heces de conejos identificados en cautiverio, e implementación en campo con algunas heces de conejos zacatuche silvestres. Se optimizó la técnica en el laboratorio utilizando heces frescas, de 15 y 30 días posteriores a su expulsión, finalmente, para evaluar la utilidad general de la técnica se utilizaron heces obtenidas en el campo.

En este estudio además se secuenciaron por primera vez *loci* de conejo zacatuche, amplificados utilizando *primers* diseñados para el conejo europeo (*O. cuniculus*) y se demostró que estos *primers* amplifican exitosamente fragmentos microsatelitales de ADN en conejo zacatuche.

4.1 Fiabilidad y robustez de la técnica.

Para las heces de conejos en cautiverio el *locus* Sat5 mostró la mayor fiabilidad al presentar 89% de amplificaciones correctas; sin embargo el *locus*

Sat2 presentó la mayor robustez con 100% de amplificaciones positivas, y alta fiabilidad con 87% de amplificaciones correctas. El *locus* Sol30 reveló la menor fiabilidad con únicamente 67% de amplificaciones correctas y el *locus* Sol08 mostró la menor robustez con 13% de reacciones sin amplificación. Tanto el *locus* Sol08 como el *locus* Sol30 mostraron bandas con mucha menor intensidad comparadas con las mostradas para los *loci* Sat2 y Sat5 que presentaron bandas muy intensas. Para el caso de Sat2 y Sat5 se puede considerar un éxito alto de la reacción, en cambio los *loci* Sol08 y Sol30 tuvieron un éxito moderado. Sin embargo, aunque no existen reportes de estudios genéticos con heces en lagomorfos para comparar estos resultados, el porcentaje de éxito de los *loci* Sol08 y Sol30 no es menor al de otros trabajos como el de Ernest (2000) de 75% en pumas y Gerloff (1995) de 67% en bonobos, respectivamente. Sin embargo, la baja intensidad de las bandas de estos dos últimos *loci* dificulta su clara evaluación.

Todos los *loci* en ADN de heces amplificaron la misma o mismas bandas que las amplificadas en ADN de tejido al menos en 7 reacciones de PCR, que es el número de veces sugeridas por Taberlet (1996) para registrar un individuo como homocigoto. Únicamente la muestra 118 para el *locus* Sol30 dio resultados imprecisos ya que en cuatro reacciones se amplificaron dos bandas, incluyendo la amplificada en tejido, y en cuatro reacciones se amplificó únicamente la banda esperada. El *locus* Sol08, el único que presentó heterocigosidad, amplificó ambas bandas al menos en 6 reacciones, 3 veces más que las sugeridas como necesarias para registrar un alelo como correcto, en este caso, hubiera bastado con un promedio de 3 reacciones para poder obtener un genotipo confiable. Para todos los conejos se presentaron el mismo número y aparentemente el mismo tamaño de alelos para cada *locus*.

Para las heces de campo también el *locus* Sat5 presentó la mayor fiabilidad con 86% de amplificaciones correctas; el *locus* Sat2 presentó una fiabilidad menor con 78% de amplificaciones correctas y menor robustez con 16% de amplificaciones negativas. El *locus* Sol08 presentó la menor robustez con 31% de amplificaciones negativas y la menor fiabilidad con 63% de amplificaciones

correctas. Puede concluirse también que al trabajar con heces obtenidas en campo, aunque con un éxito moderado, fue posible extraer ADN amplificable de conejo zacatuche.

En ningún caso se observó una diferencia importante en el éxito de amplificación con respecto al tiempo transcurrido entre la expulsión de las heces y la extracción del ADN. El número de muestras no es suficiente para realizar una prueba estadística en este sentido, sin embargo, aparentemente el factor tiempo, entre 24 horas y 30 días, no influye de manera importante en el éxito de la extracción y amplificación de ADN en heces.

4.2 Importancia del estudio en la conservación del conejo zacatuche.

Cualquier avance relacionado con el tema del muestreo no invasivo en especies silvestres en peligro de extinción será de suma importancia para su conservación. Incluso para realizar estudios en ejemplares en cautiverio, el muestreo no invasivo facilita el manejo y reduce el estrés de los animales bajo estudio.

En el caso de las poblaciones en cautiverio, como es el caso de las que se encuentran en los zoológicos de Chapultepec y Los Coyotes en la Ciudad de México, un plan de reproducción genéticamente controlado aumentaría en gran medida el valor potencial de estas poblaciones desde el punto de vista de la conservación de la especie, al permitir la posibilidad de seleccionar como parejas reproductoras a los individuos menos emparentados y que presenten heterocigocidad en un mayor número de *loci*, así como alelos silvestres que se estén perdiendo dentro de la población cautiva; también sería posible reconocer a los individuos con mayor éxito reproductivo y finalmente se podría seleccionar aquellos conejos con mayor potencial para integrarse a un plan de repoblación en vida libre, al estudiar cada una de las poblaciones silvestres y repoblarlas con individuos que aporten alelos nuevos.

Este trabajo representa uno de los primeros pasos en el desarrollo de técnicas de estudio genético no invasivo para poblaciones de conejo zacatuche. Como se

discutió anteriormente, este tipo de estudios son básicos para la toma de decisiones y para la realización de planes de conservación.

4.3 Consideraciones a futuro.

Como siguiente paso se recomiendan estudios futuros enfocados en los polimorfismos de los microsatélites estandarizados en el presente trabajo, así como proponer y estudiar nuevos *loci* microsatelitales en el conejo zacatuche, los cuales pueden ser sugeridos a partir de otros *loci* del conejo europeo. Estos estudios a futuro pueden realizarse utilizando ADN extraído de heces, tomando seriamente en cuenta las limitaciones de este tipo de muestras, y realizando las repeticiones necesarias.

Todas las limitaciones del muestreo no invasivo resultan ya sea de la pobre calidad y baja cantidad de ADN extraído, o de la baja calidad del extracto, dando la posibilidad de obtener errores de genotipificación. Una manera de contrarrestar estos problemas es utilizar un método correcto de preservación de la muestra y realizar suficientes repeticiones independientes de cada muestra, por ejemplo, un método que ha probado ser efectivo es el de los Tubos Múltiples propuesto por Taberlet (1996). En este estudio, al comparar las bandas obtenidas de la amplificación de ADN de tejido con las obtenidas de la amplificación de ADN de heces, se puede concluir que en la amplificación con ADN de heces se presentaron tanto falsos alelos como ausencia de alelos correctos, sin embargo, gracias a las repeticiones realizadas, fue posible descartar los genotipos que tenían alta probabilidad de ser incorrectos.

Otra limitante que se hace evidente en el caso del conejo zacatuche es el tamaño de las muestras de heces. Al ser éstas tan pequeñas y formadas principalmente por forrajes, la cantidad de ADN que es posible obtener por muestra se reduce notablemente. Para resolver este problema se sugiere buscar la co-amplificación de varios *loci* durante un mismo PCR permitiendo un uso más eficiente de cantidades limitadas de ADN y utilizar marcadores más informativos (con mayor heterocigosidad) para obtener la misma información con menos *loci*. Esto es especialmente importante, ya que en el caso de muestras tan pequeñas,

el máximo número de reacciones (utilizando 100 ng en reacciones de 25 µl) que fueron posibles realizar por extracto de ADN y por lo tanto, por muestra, fue de 80, lo cual permitiría utilizar 11 microsátélites con 7 repeticiones cada uno. Sin embargo, en algunos casos, únicamente era posible realizar 23.

El tamaño tan pequeño de las heces también dificulta la posibilidad de utilizar únicamente la parte superficial de las mismas para realizar la extracción de ADN. La mayoría de los estudios genéticos que utilizan heces como fuente de ADN recomiendan no utilizar la parte interior de la muestra. Wehausen (2004) trabajando con heces de borrego comprobó que cuando se utilizó únicamente la parte externa de las heces, las amplificaciones por PCR fueron consistentemente excelentes, y cuando cualquier parte interior de la muestra se incluía, el éxito de la reacción de PCR disminuía notablemente acompañado por un aumento en la variación entre muestras. En este trabajo se utilizó la muestra completa de heces, y aunque los resultados para algunos *loci* fueron satisfactorios, todavía puede considerarse un porcentaje de éxito relativamente bajo que podría ser mejorado. Sería recomendable intentar hacer lavados de la parte exterior de las muestras más grandes y evaluar si aumenta el éxito de amplificación y disminuye la variación del resultado entre las muestras, evaluando si disminuye considerablemente o no la cantidad de ADN extraído.

Se debe estar consciente de que no todas las preguntas pueden ser respondidas con estudios no invasivos. Debe tomarse en cuenta la relación costo-beneficio, el impacto biológico que supondría hacer un muestreo invasivo, y si es posible contestar estas preguntas con cantidades tan bajas de ADN por muestra. Lo más importante para poder llevar a cabo esta decisión es poder conducir un estudio piloto apropiado en el campo.

4.4 Conclusión.

En este estudio se demostró que de las heces de conejo zacatuche, desde 24 horas hasta 30 días después de su expulsión, fue posible extraer ADN amplificable, con el cual se podrían realizar estudios de genotipificación no invasiva, sin necesidad de capturar y perturbar a los animales bajo estudio. Se

demostró también que fue posible extraer ADN amplificable de heces obtenidas directamente de campo, tratando de seleccionar las más frescas. Este dato es alentador ya que permite extrapolar el presente estudio a investigaciones de campo directamente en el hábitat del conejo zacatuche. Los microsatélites Sat2 y Sat5 obtuvieron un éxito que puede ser considerado alto, exponiendo en el gel de agarosa bandas de gran intensidad fáciles de distinguir, por lo que se puede concluir que estos *loci* se encuentran altamente conservados entre el conejo europeo y el conejo zacatuche. Sin embargo, el éxito de amplificación para los microsatélites Sol08 y Sol30 fue limitado y poco consistente, además las bandas expuestas en el gel de agarosa son de muy baja intensidad lo que puede aumentar el riesgo de registrar falsos alelos o no registrar alelos correctos. Se recomienda utilizar los microsatélites Sat2 y Sat5 para estudios de polimorfismo en conejo zacatuche, y a su vez, se recomienda descartar los microsatélites Sol08 y Sol30.

Por primera vez se secuenciaron microsatélites amplificados de ADN de zacatuche, comparándolos con los mismos *loci* en conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), y se encontraron porcentajes de identidad mayores al 90%, comprobando así que los *loci* amplificados fueron los esperados.

Como un primer paso exitoso en el estudio genético no invasivo de lagomorfos, los resultados aquí presentados pueden abrir una puerta para la inversión en mayor número de trabajos relacionados con este tema, así como trabajos de investigación que lo continúen.

5. Apéndice. Secuencias completas de los *loci* Sat2 y Sat5 para el conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*), se marcan en *negritas* la secuencia de los *primers* en los extremos y la secuencia repetida del microsatélite al centro; y alineación con las secuencias obtenidas de GenBank del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), se marcan en *negritas* la secuencia de los *primers* en los extremos y las diferencias entre ambas secuencias al centro, sin la secuencia repetida.

Locus Sat2

GCTCTCCTTTGGCATACTCCTATTTACCACATAATCTTTAACTATATGCTTCTGCTTAA
 TGTCCAGAGCTGTTTTTTTAAAATTAGCATATTTATTTGAAAGGCAGAATTATGC**AGAGA**
GAGGGAGACAGAGAGAGAGAGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCTTCCTTCTTCTAG
 TTCACTCCCCAAATGCCACAAAGCCC**GATCTGGGCCTATCCAAAGC**

Porcentaje de identidad: 91.8% (14/171)

1. Conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*)
2. Conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*)

(1) **GCTCTCCTTTGGCATACTCC**TATTT**ATCTCATGATCTTTAACTATATGCTTCTGT**TTAAT
 :::::::::::::::::::::::::::::: : :: :::::::::::::::::::::::::::::: :::::
 (2) **GCTCTCCTTTGGCATACTCC**TATTT**ACCACATAA**ATCTTTAACTATATGCTTCTG**CTTAA**T

(1) GTCCAGAGCTG**GT**TTTTTT**TAA**ATTAG**T**ATATTTATTTGAAAGGCAGAATTATGCAGAGA
 :::::::::::::: : ::::: :::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::: :::::
 (2) GTCCAGAGCTG--TTTTTT**AAA**ATTAG**C**ATATTTATTTGAAAGGCAGAATTATGCAGAGA

(1) GAGGGAGAT**GT**ATCTTCCTTCT---AGTTCACTCCCCAAAT**GGCCACAAAGCCCAGATCTG**
 :::::::::: : :::::::::::::: : :::::::::::::::::::::: : :::::::::::::::::::::: :::::
 (2) GAGGGAGAC-ATCTTCCTTCT**TCT**AGTTCACTCCCCAAATG-CCACAAAGCCC**AGATCTG**

(1) **GGCCTATCCAAAGC**
 :::::::::::::: :::::
 (2) **GGCCTATCCAAAGC**

6. Referencias.

1. Cervantes F, Gonzáles F. Los conejos y liebres silvestres de México. En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J, compiladores. Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. DF: Ediciones Científicas Universitarias UNAM; 1996: 17-25.
2. Asociación Mexicana para la Conservación y Estudio de los Lagomorfos A.C. (AMCELA). Conejo Zacatuche (*Romerolagus diazi*). 2003. [Citado 5 Jun 2005]: [1 página]. Disponible en:
URL: <http://www.ibiologia.unam.mx/amcela/>
3. Ramírez-Pulido J, Arroyo-Cabrales J, Castro-Campillo A. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. Acta Zool Mex 2005; 21: 21-82.
4. Robinson T, Matthee C. Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: a review of cytogenetics, molecular analyses and a supermatrix analysis. Mammal Rev 2005; 35: 231.
5. Romero F, Cervantes F. Conejo zacatuche. En: Ceballos G, Oliva G, coordinadores. Los Mamíferos Silvestres de México. DF: CONABIO. Fondo de Cultura Económica; 2005: 832-837.
6. Cervantes F, Martínez J. El conejo zacatuche o teporingo (*Romerolagus diazi*). En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J, compiladores. Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. DF: Ediciones Científicas Universitarias UNAM; 1996: 29-40.
7. Cervantes-Reza F, Lorenzo C, Hoffmann R. *Romerolagus diazi*. Mamm Species 1990; 360: 1-7.
8. López-Paniagua J, Romero F, Velázquez A. Las actividades humanas y su impacto en el hábitat del conejo zacatuche. En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J, compiladores. Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. DF: Ediciones Científicas Universitarias UNAM; 1996: 119-132.
9. Galindo-Leal C, Velázquez A. Recomendaciones para la conservación del zacatuche. En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J, compiladores.

- Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. DF: Ediciones Científicas Universitarias UNAM; 1996: 147-157.
10. Falconer. Introducción a la genética cuantitativa. Zaragoza: Acribia; 1996.
 11. Campos P. Comparación genética entre poblaciones aisladas del conejo zacatuche *Romerolagus diazi* (MAMMALIA: LAGOMORPHA) (tesis de maestría). México (DF) México: UNAM, 2005.
 12. Durrel G, Mallison J. The volcano rabbit *Romerolagus diazi*, in the wild and at Jersey zoo. *Int Zoo Yb* 1968; 10: 118-122.
 13. Matsuzaki T, Saito M, Kamiya M. Breeding and rearing of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) in captivity. *Exp Anim* 1982; 31: 185-188.
 14. Hoth J, Granados H. A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) at the Chapultepec Zoo, Mexico City. *Int Zoo Yb* 1987; 26: 261-265.
 15. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits L, Bouvet J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucl Acids Res* 1996; 24: 3189-3194
 16. Taberlet, Camarra. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear. *Mol Ecol* 1997; 6: 1091-1097.
 17. Taberlet P, Waits L, Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol Evol* 1999; 14: 323-327.
 18. Flagstad Ø, Røed K, Stacy J, Jakobsen K. Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Mol Ecol* 1999; 8: 879-883.
 19. Marchant L, Ensminger A, Pruetz J. Highly Successful Non-Invasive Collection of DNA from Wild Chimpanzees. *Pan Africa News* [serial online] 2000 [Citado 12 Ago 2004]; [1 página]. Disponible en: URL: [http://mahale.web.infoseek.co.jp/PAN/7_2/7\(2\)-04.html](http://mahale.web.infoseek.co.jp/PAN/7_2/7(2)-04.html)
 20. García Y, Estrada A. Genetic studies through faecal DNA. Laboratorio de Primatología, Estación de Biología "Los Tuxtlas" IB-UNAM. [Citado 15 de Marzo de 2006] [1 página]. Disponible en: URL: <http://www.primatesmx.com/fecaldna.htm>

21. Pilgrim K, Mckelvey K, Riddle A, Schwartz M. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Mol Ecol Notes* 2004.
22. Reed J, Tollit D, Thompson P, Amos W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol Ecol* 1997; 6: 225- 234.
23. Frantzen M, Silk J, Ferguson J, Wayne R, Kohn M. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol Ecol* 1998; 7: 1423-1428.
24. Beaumont M, Bruford M. Microsatellites in conservation genetics. En: Goldstein D, Schlötterer C, editores. *Microsatellites. Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press; 2000: 165-182.
25. Palomares F, Godoy A, Piriz A, O'Brien J, Jonson E. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian Lynx. *Mol Ecol* 2000; 11: 2171-2181.
26. Nsubuga M, Robbins M, Roeder A, Morin A, Boesch C, Vigilant L. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol* 2004; 13: 2089-2094.
27. Wehausen J, Ramey II R, Epps C. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. *J Hered* 2004; 95: 503-509.
28. Avise J. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman and Hall, 1994.
29. Hancock J. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D, Schlötterer C, editores. *Microsatellites*. New York: Oxford University Press; 1999: 1-9.
30. Parsons K. Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Mol Ecol Notes* 2001; 1: 341-344.
31. Gerloff U, Schlötterer C, Rassmann K, Rambold I, Hohmann G, Fruth B, Tautz D. Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Mol Ecol* 1995; 4: 515-518.

32. Ernest H, Penedo M, May B, Syvanen M, Boyce W. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Mol Ecol* 2000; 9: 433-441.
33. Mills S, Citta J, Lair K, Schwartz M, Tallmon D. Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecol Appl* 2000; 10: 283-293.
34. Zamorano M, Ruitter J, Rodero A, Vega-Pla J. Análisis genético de marcadores microsatélites en dos poblaciones de la raza bovina berrenda en negro. *Arch Zootec* 1998; 47: 195-200.
35. Van Hooft W, Groen A, Prins H. Microsatellite analysis of genetic diversity in African buffalo (*Syncerus caffer*) populations throughout Africa. *Mol Ecol* 2000; 9: 2017-2025.
36. Bradley B, Vigilant L. False alleles derived from microbial DNA pose a potential source of error in microsatellite genotyping of DNA from faeces. *Mol Ecol Notes* 2002; 2: 602-605.
37. Burton C, Krebs C, Taylor E. Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in Southwestern Yukon, Canada. *Mol Ecol* 2002; 11: 1689-1701.
38. Zhu Y, Zhang J, Ren W, Wang Y. Genetic variation within and among five rabbit populations using microsatellite markers. 2002 [Citado 22 Ene 2006]; [5 páginas]. Disponible en: URL: http://www.dcam.upv.es/8wrc/docs/Genetics%20and%20Biotechnology/S hort%20Papers/181-185_zhuyufp_mod.pdf
39. Surridge A, Bell D, Rico C. Polymorphic microsatellite *loci* in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Anim Genet* 1997; 28: 302-305.
40. Rico C, Rico I, Webb N, Smith S, Bell D, Hewitt G. Four polymorphic microsatellite *loci* for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Genet* 1994; 25:367.
41. Mougél F, Mounolou J-C, Monnerot M. Nine polymorphic microsatellite *loci* in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Genet* 1997; 28: 58-71.

42. GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html