



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DEL
CONEJO ZACATUCHE (MAMMALIA:
ROMEROLAGUS DIAZI) UTILIZANDO
ADN DE HECES FECALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CECILIA ARANA ACOSTA

TUTOR

DR. FERNANDO A. CERVANTES

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Identificación del sexo del conejo Zacatuche (Mammalia: *Romerolagus diazi*) utilizando DNA de heces
fecales**

realizado por **Arana Acosta Cecilia** con número de cuenta **4-0110911-5** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Livia Socorro León Paniagua

Propietario Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Propietario Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza
Tutor

Suplente M. en C. Fernando Gual Sill

Suplente Dra. Gloria Luz Portales Betancourt

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 26 de septiembre de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres ya que gracias su apoyo, paciencia y gran cariño me han permitido terminar con éxito mis estudios y metas, gracias los quiero mucho!!!.

A mi hermano quien a pesar de que en ocasiones no concuerdo también siempre ha sido de gran ayuda para mi formación tanto profesional como personal, además del gran apoyo y ejemplo que siempre me ha brindado.

A mi tutor de tesis Dr. Fernando Cervantes pues me ha permitido aprender tanto de esta maravillosa carrera y con quien comparto mi gran afición por los mamíferos, gracias por su paciencia, y valiosos consejos.

Al Dr. Moisés Martínez Vázquez, apoyo y asesoría en el laboratorio en la parte experimental de este trabajo además de su valiosa amistad.

A Lázaro, Luis, Joel, Xóchitl, Omar, Salvador, Nahú, Bety, Oscar, Aida, Jonathan, Jérica, Karina mis compañeros y amigos de quienes he aprendido mucho académicamente además de que hicieron mi estancia en la Colección Nacional de Mastozoología del Instituto de Biología, UNAM, una experiencia muy gratificante e inolvidable.

A la maestra Yolanda que fue la primera en recibirme con una gran sonrisa en la colección.

A la maestra Julieta una persona con quien tengo una amistad invaluable, quien siempre me ha dado buenos consejos y que estimo mucho.

A Carina mi amiga de toda la vida quien me ha apoyado desde hace muchos años, gracias por el libro BF4E!

A mi amiga Pera a quien admiro mucho y de quien he aprendido tanto, me alegra que hayamos compartido tantas experiencias divertidas en muchas de las clases que tomamos juntas, te quiero pequeña!

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por haberme otorgado una beca de licenciatura como parte del proyecto de investigación "Identificación del Sexo en Mamíferos" dentro del cual se encuentra el presente estudio.

Al Zoológico de Chapultepec, por proporcionar los hígados de los conejos Zacatuches necesarios para la realización de esta tesis de Licenciatura. En particular, al Dr. Fernando Gual Sill, a la Dra. Rosalía Pastor Nieto y al M.V.Z. Ignacio Carlos Rangel.

Contenido

Agradecimientos.....	I
Contenido.....	III
Índice de figuras.....	V
Índice de cuadros.....	VI
Introducción.....	1
Orden Lagomorpha.....	1
Familia Ochotonidae.....	3
Familia Leporidae.....	3
<i>Romerolagus diazi</i>	4
Heces Fecales.....	6
Técnicas no invasivas para el estudio de la Fauna silvestre.....	7
Identificación del sexo.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	10
Materiales y método.....	11
Muestras.....	11
Extracción del Ácido desoxirribonucleico (ADN).....	12
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
Resultados.....	16
Obtención de secuencias y diseño de primers.....	16
Amplificaciones positivas de ADN extraído de hígados.....	17
Amplificaciones positivas de ADN extraído de heces de ejemplares silvestres.....	19

Discusión.....	21
Muestras y estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa.....	21
Identificación del sexo.....	21
Análisis molecular de heces.....	22
Análisis y comparación de secuencias.....	24
Producto de los primers SORF1C y SORR1C.....	24
Producto de los primers RDIAR y RDIAR.....	27
Conclusiones.....	29
Recomendaciones.....	30
Literatura Citada.....	31
Apéndice 1.....	35
Apéndice 2.....	37
Apéndice 3.....	39

Índice de Figuras

Figura 1. Cráneo fenestrado de la liebre <i>Lepus alleni</i>	2
Figura 2. Ejemplar de una Pika (<i>Ochotona princeps</i>).....	3
Figura 3. Ejemplar de una liebre de la especie <i>Lepus americanus</i>	4
Figura 4. (A) Conejo Zacatucho <i>Romerolagus diazi</i> (B) Vista de lado de un macho....	5
Figura 5. Comparación de excretas de los conejos <i>Romerolagus diazi</i> , <i>Sylvilagus cunicularius</i> y <i>S. floridanus</i>	6
Figura 6. Distribución geográfica del conejo Zacatucho.....	7
Figura 7. (A) Fotografía del Volcán Popocatepetl, (B) Volcán Iztaccíhuatl, (C) Zacatones en el Volcán Pelado, Parres, (D) Letrina de <i>Romerolagus diazi</i>	11
Figura 8. Gel de agarosa al 1.5%. de la amplificación de los fragmentos del gen de la transferrina y del gen <i>Sry</i> en una misma reacción. Muestras de hígado.....	18
Figura 9. Gel de agarosa al 1.5% con las bandas de amplificación de ADN de heces utilizando el gen <i>Sry</i> una temperatura de alineamiento de 60° C.....	19
Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de ADN de Heces utilizando los primers de la transferrina una temperatura de alineamiento de 58° C.....	20

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Secuencias de los primers SORF1C y el SORR1C	12
Cuadro 2. Secuencias de los primers TRANSR y TRANS	13
Cuadro 3. Condiciones de amplificación para tejidos de <i>Romerolagus diazi</i>	13
Cuadro 4. Condiciones de amplificación para heces de <i>Romerolagus diazi</i>	14
Cuadro 5. Programa de PCR para ADN de hígados de <i>R. diazi</i> para los primers del exón de la transferrina y para el fragmento del gen <i>Sry</i>	14
Cuadro 6. Programa de PCR para ADN de heces de <i>R. diazi</i> para los primers del gen <i>Sry</i>	14
Cuadro 7. Programa de PCR para ADN de heces de <i>R. diazi</i> , para los primers del exón de la transferrina	14
Cuadro 8. .- Secuencia del gen <i>Sry</i> de <i>Romerolagus diazi</i> , esta secuencia fue obtenida utilizando los primers SORR1C y SORF1C.....	16
Cuadro 9. Secuencias de los primers RDIAR y RDIAF específicos para <i>Romerolagus diazi</i>	16
Cuadro 10. .- Secuencia del gen <i>Sry</i> de <i>Romerolagus diazi</i> , esta secuencia fue obtenida utilizando los primers RDIAR y RDIAF.....	17
Cuadro 11. Hígados de zacatuche utilizados para las extracciones de ADN.....	18
Cuadro 12. .- Comparación de secuencias del gen <i>Sry</i> entre <i>Oryctolagus</i> y <i>Romerolagus diazi</i>	25
Cuadro 13. .- Comparación de secuencias del gen <i>Sry</i> entre <i>Lepus europaeus</i> y <i>Romerolagus diazi</i>	26
Cuadro 14. .- Comparación de secuencias del gen <i>Sry</i> entre <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Oc) y <i>Lepus europaeus</i>	26

Cuadro 15. Comparación de secuencias del gen *Sry* entre *Oryctolagus cuniculus*,
Lepus europaeus y *Romerolagus diazi*.....27

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DEL CONEJO ZACATUCHE (MAMMALIA: *Romerolagus diazi*)

UTILIZANDO ADN DE HECES FECALES

CECILIA ARANA ACOSTA

Departamento de Zoología, Instituto de Biología
y Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Código Postal 04510, México, Distrito Federal.

INTRODUCCIÓN

México es extremadamente rico y diverso en la fauna de vertebrados, compuesta aproximadamente por 1054 especies de aves, 704 especies de reptiles, 361 especies de anfibios y 2122 especies de peces (CONABIO, 2000). En la fauna de mamíferos de México se han registrado 525 especies nativas, que representan 193 géneros, 47 familias y 12 órdenes. El endemismo de mamíferos es muy alto en nuestro país, alrededor del 30% de las especies (161) y 4% de géneros, entre los que destaca el conejo *Romerolagus diazi* (Ceballos y Oliva 2005). En México existen 15 especies de conejos y liebres (Villa y Cervantes, 2003; Ruedas, 1998), esta riqueza representa una elevada diversidad de lagomorfos en el continente americano y sitúa a México como uno de los países que aloja más especies de conejos y liebres en el mundo. En su territorio alberga diez especies de conejos: nueve del género *Sylvilagus* y una de *Romerolagus*, y cinco especies de liebres del género *Lepus*. Además, nuestro país cuenta con el mayor número de endemismos de lagomorfos, 5 especies de conejos y 3 de liebres (Cervantes y Gonzáles, 1996).

ORDEN LAGOMORPHA

A pesar de que los conejos y liebres (Leporidae) y las pikas (Ochotonidae) no son un grupo muy diverso, son miembros muy importantes de las comunidades terrestres pues ocupan diversos ambientes desde los trópicos hasta la región ártica y se encuentran en algunas zonas templadas y boreales. Por ejemplo, las liebres de zonas boreales están sometidas a



sorprendentes ciclos poblacionales, marcados por periodos de enorme abundancia alternados por épocas de extrema escasez. En tales regiones, los ciclos de los carnívoros están determinados notablemente por los cambios en densidades de la población de liebres (Ceballos y Oliva, 2005).

Las características importantes de los lagomorfos se asocian con sus hábitos herbívoros y en el caso de los lepóridos con su locomoción cursorial. Los lagomorfos tienen un cráneo fenestrado (fig. 1), una característica muy notable en ciertos lepóridos (Vaughan *et al.*, 2000).

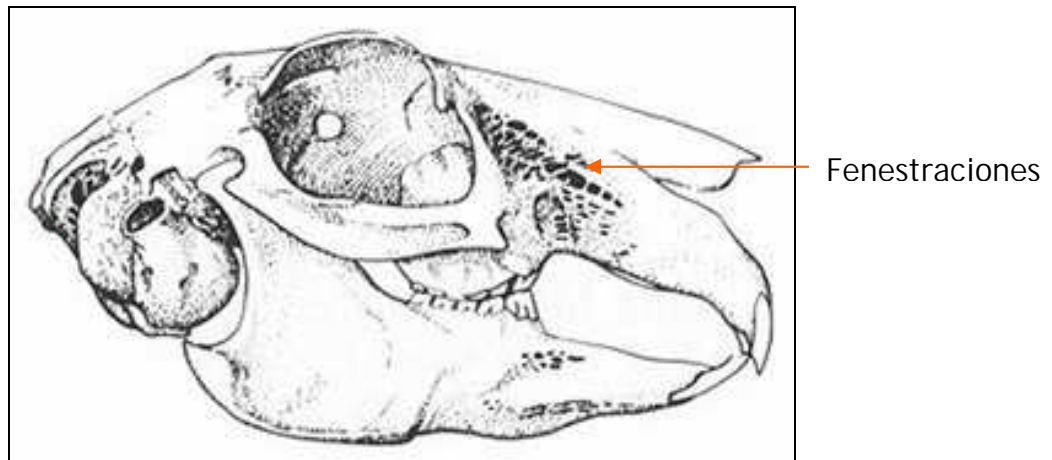


Fig. 1. - Cráneo fenestrado de la liebre *Lepus alleni*
(http://www.mnh.si.edu/mna/images/skulls/LEPUS_ALLENI_LN3.jpg)

La dentadura anterior se parece a la de los roedores pero difieren en que estos últimos tienen 1/1 incisivos y los lagomorfos poseen 2/1 incisivos; el segundo incisivo es más pequeño y tiene forma de clavija. Como sucede en roedores, también los incisivos de los lagomorfos tienen crecimiento permanente. Poseen un largo diastema posincisivo y no tienen caninos. Los molares y premolares son hipsodontos y carecen de raíz. La clavícula está bien desarrollada en Ochotonidae y es rudimentaria en Leporidae. La postura de la pata es digitígrada durante la carrera, pero plantígrada cuando el movimiento es lento (Vaughan *et al.*, 2000).



Familia Ochotonidae

Las pikas están representadas por 2 géneros con 26 especies y tienen pocas adaptaciones cursoriales. Son más pequeñas que los conejos y pesan entre 100 y 150 g. Tienen patas cortas, orejas redondas y cortas y cola no visible (Fig. 2). Se distribuyen en las montañas del oeste de Estados Unidos, sur de Alaska y en el este de Europa (Irán, Pakistán, India y Burma).



Fig. 2. - Ejemplar de una Pika (*Ochotona princeps*; fotografía de Brian Crawford http://raysweb.net/wildlife/images/pika_new.jpg).

Familia Leporidae

Los conejos y las liebres son un grupo muy próspero en términos de que ocupan ambientes diversos, pueden habitar en la tundra ártica, montañas, bosques tropicales, sabana y desiertos. Se alimentan de una amplia variedad de pastos y hierbas. Los lepóridos han sufrido muchas modificaciones evolutivas debido a la estricta herbivoría: los dientes de la mejilla son hipsodontos y algunos de los premolares se han vuelto molariformes. Las extremidades se han alargado y las articulaciones tienen especializaciones que incrementan la habilidad cursorial. Las orejas se caracterizan por que



su parte proximal es tubular. Los testículos se vuelven escrotados durante la época de apareamiento.

Todos los lagomorfos de México forman parte de la Familia Leporidae, que incluye a los géneros *Lepus*, *Sylvilagus* y *Romerolagus*, en total nuestro país cuenta con 14 especies. Una de las cuales es el conejo *Romerolagus diazi*, que es uno de los lepóridos más interesantes y poco estudiado (Ceballos y Oliva, 2005).



Fig. 3.- Ejemplar de una liebre de la especie *Lepus americanus* (<http://www.csaffluents.qc.ca/animalier/dessins/lievre.jpg>)

Romerolagus diazi

El Zacatuche, Teporingo o conejo de los volcanes (*Romerolagus diazi*) es un conejo de pelaje corto y denso de color ocre mezclado con negro en el dorso y en las partes laterales, con la cola del mismo color, las partes apicales y basales de los pelos de guardia son negros; presenta un triángulo de pelo amarillento en la nuca y entre la base de las orejas. Tiene un tamaño relativamente pequeño (30 cm de longitud total) en comparación con los otros miembros de la familia Leporidae. Sus miembros anteriores y posteriores son cortos; las orejas son pequeñas y redondas; la cola es tan pequeña que no se distingue a



simple vista (Fig. 4). Como característica particular, utiliza vocalizaciones agudas y fuertes probablemente para informar a otros individuos sobre la presencia de depredadores; ningún otro lepórido vocaliza. Por lo general, el zacatuche huye ante cualquier señal de peligro y se aleja vocalizando intensamente. Incluso se puede ocultar, y continuar vocalizando, lo cual propicia que otros zacatuches de los alrededores también vocalicen (Cervantes y Martínez, 1996). *Romerolagus diazi* se diferencia de otros lepóridos por que el tamaño de su cuerpo es más pequeño, además requiere de una mayor cobertura vegetal que le permita protegerse de los depredadores, pues es relativamente lento y vulnerable en hábitats más abiertos (Fa , Romero, y Lopez-Paniagua, 1992).

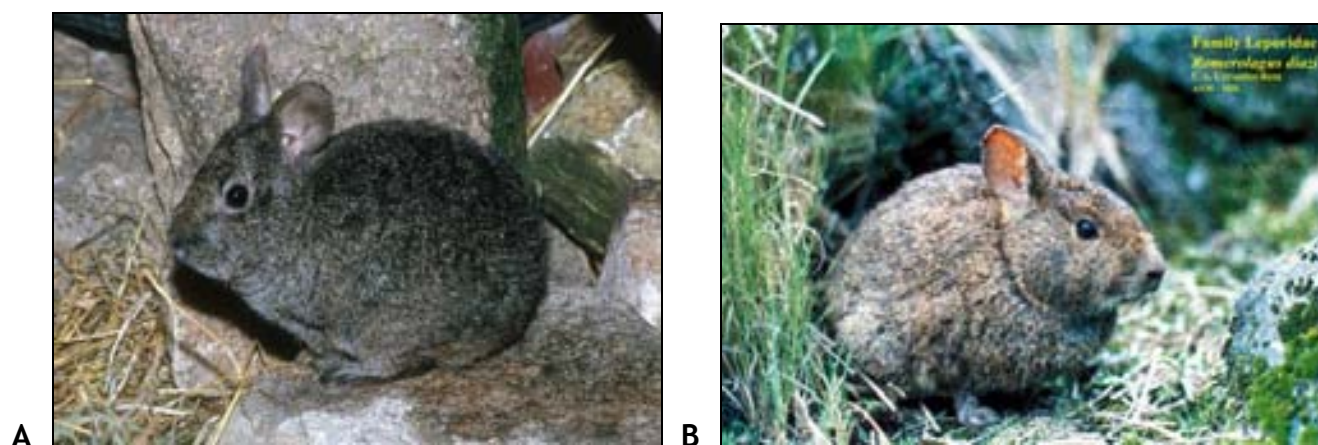


Fig. 4.- A: Conejo Zacatuche (*Romerolagus diazi*; <http://www.biolib.cz/cz/image/id12002>).
B: Vista de lado de un macho adulto (Fotografía tomada por Fernando A. Cervantes http://www.mammalogy.org/mil_images/mid/668.jpg).

Heces fecales

Las heces fecales de los zacatuches son bolitas de excremento cuya forma es como una esfera que hubiera sido comprimida en dos extremos, y si se observan por su cara ancha, son redondeadas. Las bolitas miden de 5 a 9 mm de diámetro y frescas son de color ocre, brillosas y de textura lisa; se tornan amarillentas cuando se secan. Las heces son encontradas por lo regular en grupos de más de 90 bolitas en la base de los zacatones, a lo largo de los corredores, bajo la cobertura de los zacatones, cerca de los nidos y en la



entrada a las madrigueras. Por lo tanto las heces pueden funcionar como un indicador de presencia de zacatuches en un área. De acuerdo con observaciones en el campo, un zacatuche deposita las heces en el mismo lugar donde se alimenta (Cervantes y Martínez, 1996; Velázquez, 1994).

El conejo zacatuche coexiste con otros dos lepóridos, el conejo castellano (*Sylvilagus floridanus*) y el conejo de monte (*Sylvilagus cunicularius*). Sin embargo, los excrementos del zacatuche son virtualmente inconfundibles. Viendo las excretas de los tres conejos por su cara ancha, las del zacatuche son pequeñas y redondeadas, de máximo 1 cm de diámetro; las del conejo castellano son aproximadamente del mismo tamaño, a veces un poco más grandes, pero la diferencia es que siempre son irregulares y no redondeadas; las bolitas del conejo del monte son de forma similar a las del zacatuche, pero mucho más grandes, alrededor de 1.5 cm de diámetro (Fig. 5; Aranda, 2000).



Fig. 5.- Comparación de excretas de los conejos *Romerolagus diazi*, *Sylvilagus cunicularius* y *S. floridanus*.



Es considerada como una de las especies con la distribución geográfica más restringida en comparación con otros mamíferos de México, pues se limita a la zona en los estados de México, Puebla, Morelos y el Distrito Federal, de las sierras Chichinautzin, Ajusco y Sierra Nevada, el área total de distribución está fragmentada en 16 zonas aisladas, 4 núcleo y 12 periféricas (Fig. 6). Con un total de aproximadamente 280 a 386.5km² (Ceballos, 2005). Esta fragmentación se debe principalmente a las actividades humanas, además de que esta especie es altamente selectiva pues muestra fuertes preferencias por hábitats que están caracterizados principalmente por vegetación subalpina, pastizales y bosques de pino (Velázquez y Gerrit, 1996).

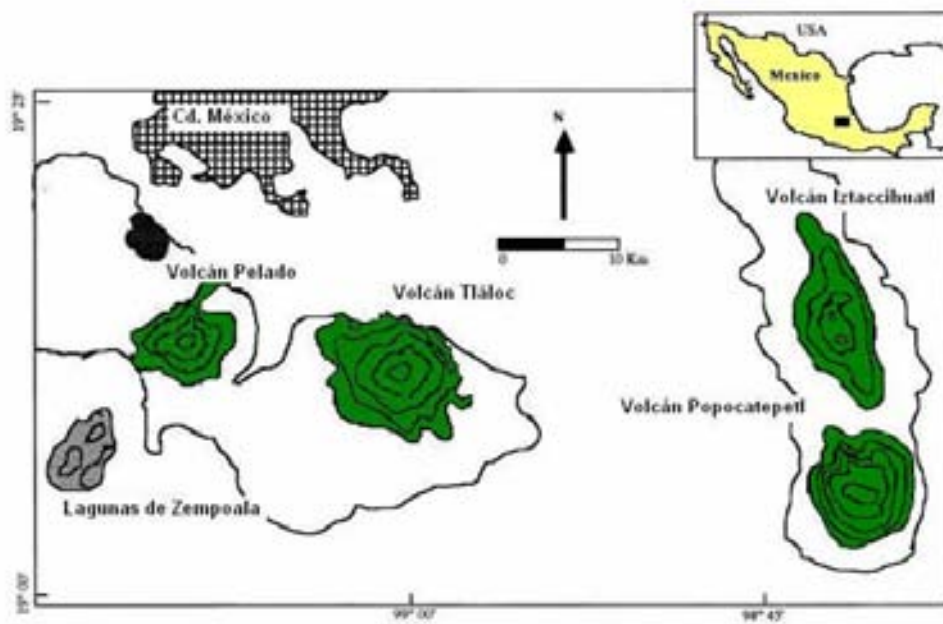


Fig. 6. - Distribución geográfica del conejo Zacatuche, *Romerolagus diazi*. En color verde se señalan las zonas núcleo (Velázquez y Gerrit, 1996).

TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL ESTUDIO DE LA FAUNA SILVESTRE

En muchas ocasiones para realizar cualquier estudio de alguna especie en particular es común hacer colectas o trampeos que pueden llegar a lesionar o incluso matar a los individuos de interés (Piggot y Taylor, 2003). Sin embargo, para el manejo y conservación



de algunas especies de mamíferos como el Zacatuche que están en peligro de extinción, se debe evitar su colecta o sacrificio (Smith *et al.*, 1996), y buscar formas alternativas para obtener información ecológica (densidad, supervivencia, ciclos reproductivos, abundancia, estructura social, hábitat entre otros) y genética. Ante esta situación solo se pueden obtener cierto tipo de muestras de estas especies como el pelo, plumas o las heces; con esto anteriormente solo se podían realizar análisis de densidad de poblaciones y presencia y ausencia de especies, en las que en ocasiones se podía confundir una especie con otra. Actualmente al uso de este tipo de muestras (pelo, plumas o heces) obtenidas a través de técnicas no invasivas, proveen de una fuente de ADN sin tener que capturar o molestar al animal (Taberlet *et al.*, 1999) que en conjunto con técnicas moleculares permite el estudio de muchas especies. Por ejemplo, las heces son fáciles de coleccionar y usualmente contienen células del intestino de donde es posible obtener ADN y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés, podemos amplificar más ADN a partir de una pequeña cantidad de muestra, lo cual es muy útil cuando ésta es muy pequeña, vieja o está degradada (Reed *et al.*, 1997). Por lo tanto, los estudios que utilizan técnicas no invasivas de obtención de muestras biológicas se han visto ampliamente beneficiados por el manejo de técnicas moleculares que dependen de la amplificación de copias de fragmentos específicos de ADN utilizando el proceso de la PCR. Desde luego, este procedimiento depende del uso de iniciadores específicos para la obtención de productos de PCR deseados. Por lo tanto, con el análisis de las muestras coleccionadas en el campo de forma no invasiva, es posible determinar la identificación de la especie, del individuo, reconstrucción de linajes y la identificación del sexo.



Identificación del Sexo

La identificación del sexo resulta importante cuando se consideran aspectos ecológicos de poblaciones silvestres, como por ejemplo, la determinación de las distancias de movimiento diario, y la tasa de solapamiento de individuos. Además algunas especies no presentan dimorfismo sexual aparente como es el caso de hienas, castores, musarañas y muchas especies de aves; pero incluso en animales con dimorfismo sexual la observación de éstos puede ser difícil. En el caso de animales raros o de especies en peligro de extinción, no es posible la captura de los individuos para realizar una determinación por visualización. Debido a las razones anteriores es necesario realizar estas determinaciones sexuales con muestras biológicas como pelo, plumas y heces, las cuales pueden ser muy útiles en museos o colecciones donde hay especímenes preservados; también pueden ser una alternativa cuando se encuentran ejemplares en las carreteras arrollados por automóviles y cuando no es posible determinar su sexo (Statham *et al.*, 2007).

Existen diversas técnicas para determinar el sexo genético de mamíferos, entre estos métodos están los análisis citogenéticos, la detección de antígenos H-Y, la medición de enzimas antes de la formación del corpúsculo de Barr y pruebas específicas del cromosoma Y. Recientemente la amplificación por PCR de fragmentos de DNA específicos ha permitido un gran avance en la identificación molecular del sexo. Estas técnicas pueden utilizar diferentes genes como el *Amg*, *Zfy* y el *Sry*. Este último gen es específico de los machos, es decir que solo amplifica un producto de las muestras de los machos y se encuentra en la mayoría de los mamíferos placentarios y marsupiales, pues se sabe que sus genes tienen una región conservada en los mamíferos. Además se cree que produce un factor de transcripción del grupo de proteínas de alta movilidad o HMG (por sus siglas en inglés), el



cual reconoce y se une a secuencias específicas de ADN. Esto comienza el proceso de diferenciación de la gónada bipotencial en testículos durante el desarrollo embrionario (Bryja y Konecny, 2003). La amplificación del gen *Sry* ha sido utilizada exitosamente en diferentes especies de mamíferos como cetáceos, osos, ovejas, caballo, puercos, conejos, perros, gatos, ratones y en el hombre, entre otros (Statham *et al.*, 2007; Bryja y Konecny, 2003).



HIPÓTESIS

Por lo tanto, se esperaría obtener amplificaciones positivas del ADN obtenido de las heces fecales de machos de *Romerolagus diazi* utilizando primers específicos para el gen *Sry*.

OBJETIVOS

General

Identificar el sexo del conejo Zacatucho utilizando ADN de heces fecales

Específicos

Estandarizar la técnica de amplificación del gen SRY utilizando muestras de hígado de ejemplares de conejo zacatucho provenientes de zoológico.

Amplificación del gen *Sry* del conejo zacatucho utilizando ADN proveniente de heces fecales de ejemplares silvestres.



MATERIALES Y MÉTODO

MUESTRAS

Se realizaron experimentos con hígados de Zacatucho para estandarizar la técnica, estos fueron obtenidos del Zoológico y de la Colección de Tejidos Congelados de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA); En total se utilizaron 13 muestras de hígado de *Romerolagus diazi*. Una vez lograda la estandarización de la técnica, se procedió a la determinación del sexo con el análisis de las heces obtenidas en el campo. Se acudieron a zonas pobladas por el conejo Zacatucho en el Volcán Pelado, a Tlamacas en las faldas del volcán Popocatepetl y en La Joya en las faldas del volcán Iztaccíhuatl. Se colectaron excrementos de letrinas individuales, cada una de éstas estaban a no menos de 55 m una de otra para asegurar que son letrinas de diferentes organismos (Fig. 7), a partir de las cuales se realizaron las extracciones de ADN para después hacer las amplificaciones con el gen *Sry*.

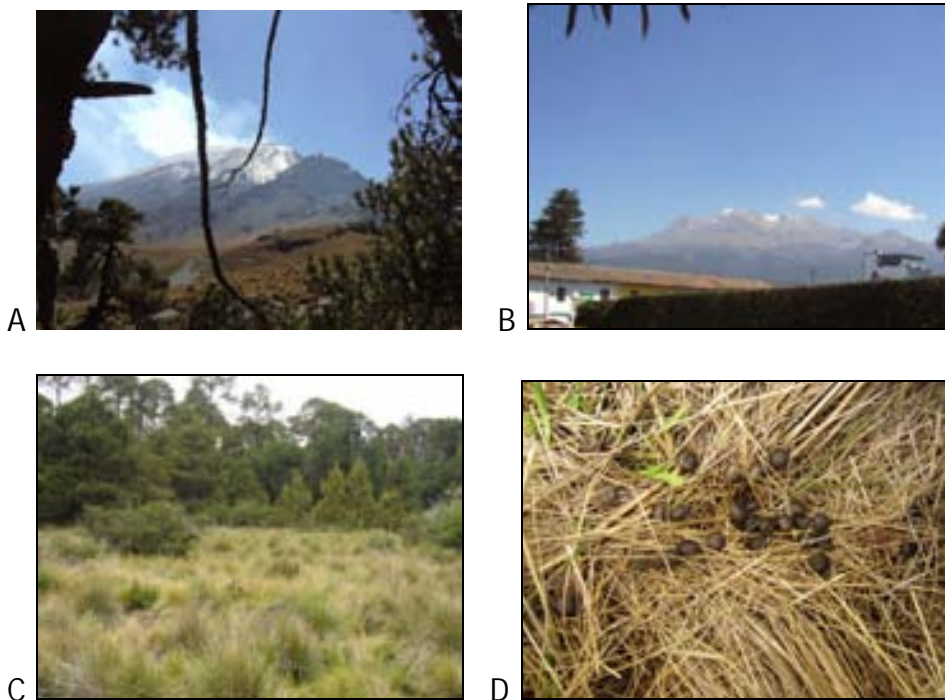


Fig. 7. - **A:** Fotografía del Volcán Popocatepetl. **B:** Volcán Iztaccíhuatl, **C:** Zacatones en el Volcán Pelado, Parres. **D:** Letrina de *Romerolagus diazi*.



EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

La extracción del ADN se hizo utilizando un kit comercial (DNeasy Tissue Kit, Quiagen Cat^{MR} No. 69504, para muestras de hígado Apéndice 1; y el QIAamp DNA Stool Mini kit Cat. No. 51504 para las muestras de heces. Apéndice 2). Se utilizaron 25 mg de hígado y de 180 a 220mg de heces para posteriormente seguir el protocolo de extracción de ADN de cada uno de los kits. Para determinar la presencia e integridad del ADN extraído se corrieron 5µl de cada extracción mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Sanbrook y Rusell, 2001. Apéndice 3) a 80 volts por una hora. El ADN se visualizó con bromuro de etidio (para un volumen final de 10µg/ml) en un transiluminador de rayos ultra violeta (marca Hoefer) y posteriormente se tomó una fotografía con una cámara digital marca Kodak. Las concentraciones de ADN y su pureza se cuantificaron por espectrofotometría y están expresadas en µg/ml; las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro (marca Biomate).

AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se utilizaron unos primers específicos que amplifican un fragmento de la región de la caja HMG del gen *Sry* (Sánchez *et al*, 1995; Cuadro 1). A partir de los cuales se diseñaron los primers RDIAR y RDIAF, con el Software Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>); estos primers son específicos para el conejo zacatuche y amplifican un fragmento de 164 pb.

Cuadro 1. - Secuencias de los primers SORF1C y el SORR1C (Sánchez *et al.*, 1995) con los que se amplificó un fragmento de *Romerolagus diazi* de 202pb para el diseño de nuevos primers

Nombre	Secuencia	Longitud (b)
Sor F1C	5'- GTC AAG CGC CCC ATG AAT GCA T-3'	24
Sor R1C	5'- AGT TTG GGT ATT TCT CTC TGT G-3'	21



Para validar el método anterior se debe utilizar como control positivo la amplificación de algún otro fragmento de ADN. En este caso se utilizó un segmento de 500 pb del gen exón de la transferrina (Cuadro 2). Las transferrinas son proteínas encargadas de solubilizar, transportar y distribuir el hierro (Baker *et al.*, 2003). Su amplificación tiene como propósito evidenciar que el ADN utilizado está lo suficientemente íntegro como para permitir la amplificación de los genes de interés. Asimismo, como control negativo se hicieron amplificaciones sin ADN.

Cuadro 2.- Secuencias de los primers TRANSR y TRANSF los cuales fueron utilizados como control positivo durante este estudio en la amplificación (Wallner *et al.*, 2001).

Nombre	Secuencia	Longitud (b)
TRANSF	5'- GCC TTT GTC AAG CAA GAG ACC -3'	21
TRANSR	5'- CAC AGC AGC TCA TAC TGA TCC -3'	21

Las reacciones de amplificación (Cuadros 3 y 4) fueron realizadas en un termociclador (marca Termo Hybaid) el programa varió durante la amplificación de heces (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 3.- Condiciones de amplificación para tejidos de *Romerolagus diazi* donde se muestran las soluciones a utilizar en cada individuo para la PCR utilizando los 2 pares de primers; el ADN y el agua en cada reacción varía según el individuo, se debe tener un volumen final de 25 µl.

Reactivo	Concentración en stock	Cantidad	Concentración en volumen de reacción
Buffer de PCR	10X	2.5 µl	1X
Primer 1 (RDI AF)	10mM	1.0µl	0.4mM
Primer 2 (RDI AR)	10mM	1.0µl	0.4mM
Primer 3 (TRANSF)	10mM	1.0µl	0.4mM
Primer 4 (TRANSR)	10mM	1.0µl	0.4mM
MgCl ₂	50mM	1.25µl	2.5mM
dNTPs	100mM	0.5 µl	2mM
Taq	5u/ml	0.25	0.2 u/ml
ADN		El necesario para obtener 100ng	
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl.	



Cuadro 4. - Condiciones de amplificación para heces de *Romerolagus diazi* donde se muestran las soluciones a utilizadas en cada individuo para la PCR. Se usa la misma cantidad de primers ya sea para los específicos para el conejo y los de transferrina. Los primers fueron utilizados en amplificaciones separadas, la cantidad de ADN y de agua en cada reacción varía según el individuo, se obtuvo un volumen final de 25 µl.

Reactivo	Concentración en stock	Cantidad	Concentración en volumen de reacción
Buffer	10X	2.5 µl	1X
Primer 1	10mM	1.0µl	0.4 mM
Primer 2	10mM	1.0µl	0.4 mM
MgCl ₂	50mM	2mM	2.5mM
dNTPs	100mM	0.5 µl	2mM
Taq	5u/ml	0.25 µl	0.2 u/ml
ADN		El necesario para obtener 100ng	
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl.	

Cuadro 5. - Programa de PCR para el ADN hígados de *R. diazi* para los primers del exón de la transferrina y para el fragmento del gen *Sry*.

No. de Ciclos	Proceso	Temperatura (° C)	Tiempo (seg)
1	Desnaturalizar	95	600
35	Desnaturalizar	95	30
	Alineación	65	30
	Extensión	72	60
1	Extensión Final	72	300

Cuadro 6. - Programa de PCR para ADN de heces de *R diazi* para los primers del gen *Sry*.

No. de Ciclos	Proceso	Temperatura (° C)	Tiempo (seg)
1	Desnaturalizar	95	600
35	Desnaturalizar	95	30
	Alineación	60	30
	Extensión	72	60
1	Extensión Final	72	300



Cuadro 7. - Programa de PCR de heces de *R. diazi*, para los primers del exón de la transferrina.

No. de Ciclos	Proceso	Temperatura (° C)	Tiempo (seg)
1	Desnaturalizar	95	600
35	Desnaturalizar	95	30
	Alineación	58	30
	Extensión	72	60
1	Extensión Final	72	300

Utilizando geles de agarosa al 1.5%, se separaron las bandas de ADN producto de PCR cargando 5 µl de reacción (Sanbrook y Rusell, 2001), los cuales corrieron a 80 volts por 90 minutos. La lectura de los resultados se llevó acabo de manera directa sobre las bandas de ADN amplificado en los geles de agarosa.

A continuación, se realizó la purificación del ADN amplificado producto de PCR con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit Qiagen Cat^{MR} No. 28704) y se envió a un secuenciador automático. La secuenciación se realizó para establecer la identidad del amplificado, además sirve para comparar con secuencias del mismo gen en otras especies y establecer el nivel de conservación de la secuencia en los organismos. Los fragmentos de ADN se secuenciaron en varias direcciones utilizando los primers diseñados para *Romerolagus diazi*. La edición y el análisis de las secuencias fueron realizadas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.0. La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN del gen *Sry* amplificado no era conocida, por lo que fue depositada en GeneBank (No. de acceso EF568105).



RESULTADOS

OBTENCIÓN DE SECUENCIAS Y DISEÑO DE PRIMERS.

Los primeros ensayos de amplificación del gen *Sry* se realizaron utilizando los primers SORR1C y SORF1C (Sánchez *et al.*, 1996), esta secuencia es un fragmento del gen *Sry* de 202 pares de bases (Cuadro 8). A partir de este fragmento, se diseñaron los primers específicos para el gen *Sry* de *Romerolagus diazi* (Cuadro 9), fragmento del gen *Sry* de 164 pares de bases (Cuadro 10).

Cuadro 8. - Secuencia del gen *Sry* de *Romerolagus diazi*, esta secuencia fue obtenida utilizando los primers SORR1C y SORF1C (Sánchez *et al.*, 1996), los números indican el número de pares de bases (pb). El fragmento en total tiene 202 pb

.....102030405060
~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~G	TCAAGCGCCC	CATGAATGCA
.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
TTCATGCTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
AACTCGGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAATGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
TGGCCTTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAGAGAGAA	ATACCCAAAC
.....250	.....260	.....270	.....280	.....290	.....300
T.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Cuadro 9.** - Secuencias de los primers RDIAR y RDIAF específicos para *Romerolagus diazi* diseñados a partir del fragmento amplificado con los primers SorF1C y el SorR1C (Sánchez *et al.*, 1995).

Nombre	Secuencia	Longitud (pb)
RDIAF	5´ - TGT GGT CCC AAC ATC AGA GA-3´	20
RDIAR	5´ - ATG GCC TGC AGT CTT TGC-3´	18



**Cuadro 10.**- Secuencia del gen *Sry* de *Romerolagus diazi*, esta secuencia fue obtenida utilizando los primers RDIAR y RDIAF, los números indican el número de pares de bases (pb). El fragmento en total tiene 164 pb.

.....10	.....20	.....30	.....40	.....50	.....60
-----					-----AATGCA
.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
<b>TT</b> CATGCTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
AAC	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAATGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
<b>TG</b> GCCTTTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCAT--	-----	-----

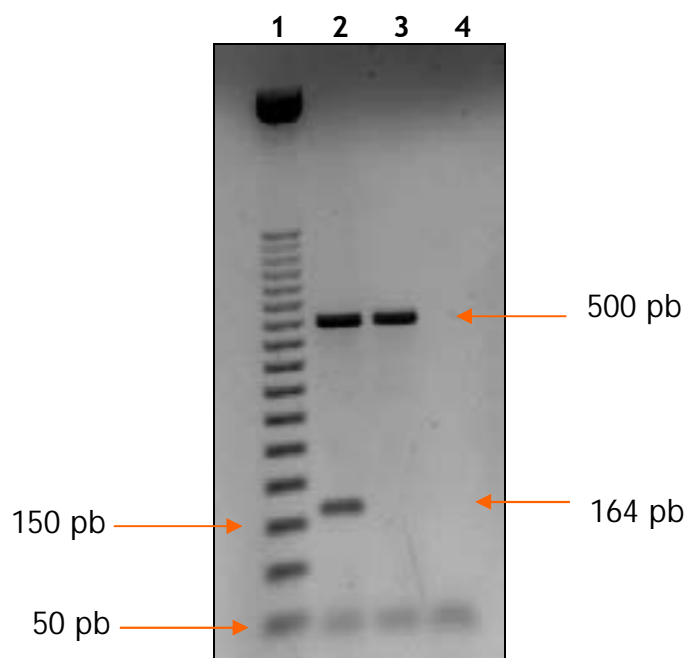
#### AMPLIFICACIÓN POSITIVA DE ADN OBTENIDO DE MUESTRAS DE HÍGADO.

Se realizaron ensayos de amplificaciones a partir de ADN extraído de hígados congelados proporcionados por la CNMA, así como en tejidos proporcionados por el Zoológico (se extrajo de 10 a 286 µg/ml de ADN aproximadamente, Cuadro 11). Se logró amplificar el fragmento del gen *Sry* de 164 pb presente solo en ejemplares del sexo masculino (en total se determinó el sexo a 13 muestras, 6 machos y 7 hembras), al mismo tiempo se logró amplificar de el fragmento del exón de la transferrina de 500 pb, utilizado como control positivo (Fig. 8).



**Cuadro 11.** - Hígados de zacatuche utilizados para las extracciones de ADN donde se especifica la fecha de la muestra, su sexo, cuales de ellos fueron proporcionados por el Zoológico de Chapultepec y los que fueron colectados por investigadores para la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA).

No. Catálogo CNMA	Fecha de la muestra	Sexo	Notas
34339	21-Mayo-1992	♂	CNMA
	24-October-1992	♀	CNMA
34338	08-Abril-1992	♂	CNMA
	27-Septiembre-2006	♀	Zoológico
	21-Abril-2006	♀	Zoológico
	16-Noviembre-2005	♀	Zoológico
34840	06-Junio-1992	♂	CNMA
37823	20-Enero-1991	♂	CNMA
	24-Septiembre-2007	♂	Zoológico
	24-Septiembre-2007	♂	Zoológico
	24-Septiembre-2007	♀	Zoológico
	28-Enero-2008	♀	Zoológico
	28-Enero-2008	♀	Zoológico
	28-Enero-2008	♀	Zoológico

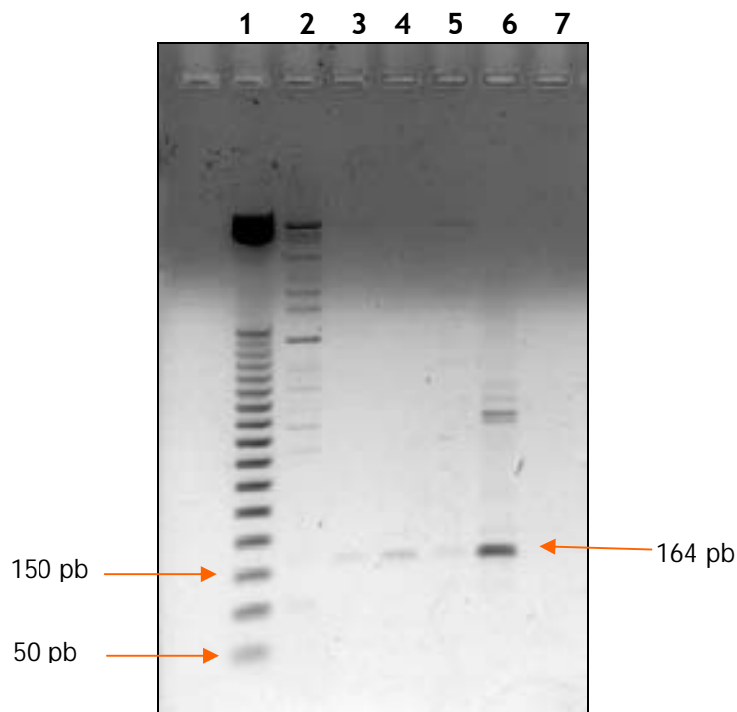


**Fig. 8.** -Gel de agarosa al 1.5%. Donde se observa la amplificación de los fragmentos del gen de la transferrina y del gen *Sry* en una misma reacción. Se cargaron 5 µl de producto de PCR. (1) Marcador de peso molecular de 50 pb, (2) ejemplar macho de *R. diazi* donde se observan los 2 fragmentos: transferrina de 500pb y el del gen *Sry* de 164pb, (3) ejemplar hembra de *R. diazi* donde solo encontramos el fragmento de transferrina de 500pb, (4) Control Negativo. Los dos tejidos de los ejemplares usados en este experimento fueron proporcionados por el Zoológico de Chapultepec.



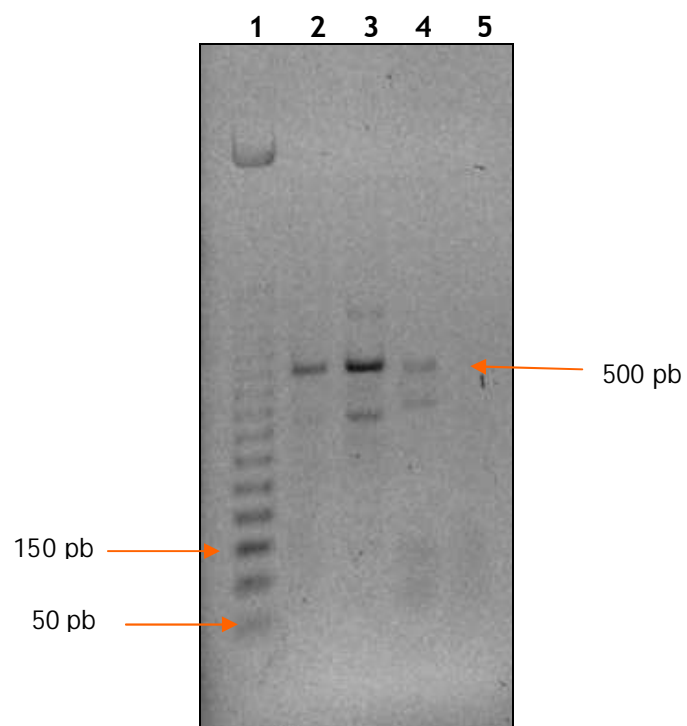
## AMPLIFICACIONES POSITIVAS DE ADN EXTRAÍDO DE HECES DE EJEMPLARES SILVESTRES.

En las amplificaciones de ADN de heces colectadas de ejemplares silvestres en el conejo se obtuvo de 1 a 80 µg/ml de ADN aproximadamente. Se logró amplificar el fragmento del gen *Sry* de 164 pb presente solo en ejemplares del sexo masculino. En total, se realizó la amplificación a 25 muestras de heces, de las cuales se determinó el sexo en 14 de ellas, 8 machos y 6 hembras. A diferencia de las amplificaciones realizadas en hígados, las amplificaciones en heces no se llevaron a cabo con los 2 pares de primers simultáneamente, sino que se realizaron por separado (Figura 9 y 10).



**Fig. 9.** - Gel de agarosa al 1.5% con las bandas de amplificación de ADN de heces utilizando el gen *Sry* una temperatura de alineamiento de 60° C. Se cargaron 5 µl de cada muestra. (1) Escalera de 50 pb, (2-5) ADN de heces fecales, (6) ADN de hígado de un macho, (7) Control Negativo.





**Fig. 10.**-Gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de ADN de Heces utilizando los primers de la Transferrina una temperatura de alineamiento de 58° C. (1) Escalera de 50 pb, (2-4) ADN de heces fecales, (5) Control Negativo.



## DISCUSIÓN

### MUESTRAS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Como se ha mencionado anteriormente, la captura o sacrificio de ejemplares silvestres del conejo Zacatuche no es un método adecuado para su estudio, pues se trata de una especie endémica en peligro de extinción. En este estudio se utilizaron muestras extraídas de animales cautivos que morían por causas naturales. Por lo tanto, el uso de tejidos provenientes de animales del zoológico fue de gran utilidad para la estandarización de la técnica utilizada.

La técnica para amplificar el fragmento del gen *Sry* de tejidos de *Romerolagus diazi* se basó en el artículo de Wallner *et al* (2001) cuyas condiciones y programas de PCR fueron los mismos para este estudio (Cuadro 6) y no se presentó ningún problema al utilizar esta metodología.

### IDENTIFICACIÓN DEL SEXO

Al comenzar este trabajo se había elegido trabajar con los genes ZFX y ZFY, ya que de acuerdo a la literatura se ha determinado el sexo exitosamente con éstos en diferentes especies como hipopótamos (*Hippopotamus amphibious*; Beckwitt *et al.*, 2002), zorritas (*Vulpes macrotis*) y otros cánidos (Ortega *et al.*, 2004), hienas (*Crocuta crocuta*; Schwerin y Pitra, 1994), ratones (*Tokudaia osimensis osimensis* y *Tokudaia osimensis spp.*; Sutou *et al.*, 2001), búfalos (*Bubalus bubalis*; Pande y Totey, 1998), cetáceos (*Balaena mysticetus*, *Stellena longirostris*; Morin *et al.*, 2005), chivos, cabras y ovejas (Aasen y Medrano 1990). Para estos genes, la distinción del sexo se basa en la presencia o ausencia de sitios específicos de restricción para enzimas específicas después de la amplificación, como la Taq^α1 (Ortega *et al.*, 2004), y la HaeIII (Beckwitt *et al.*, 2002). El corte de estas enzimas





produce 2 fragmentos en el macho (*zfx* = 195pb y *zfy* = 154 pb) y uno en la hembra (*zfx* = 195pb).

En el presente estudio se realizaron 35 ensayos con ADN de hígado del conejo zacatuche con estos genes. Los resultados mostraron que los productos amplificados contenían el mismo patrón de sitios de restricción en ambos sexos, por lo que no se podía distinguir uno del otro. Por lo tanto, se decidió buscar otra alternativa para identificar el sexo con otro marcador molecular distinto. Así, se decidió usar el gen *Sry* en lugar de los genes *ZFX* y *ZFY*.

El gen *Sry* es uno de los genes más utilizados para la determinación del sexo en mamíferos. Se ha utilizado exitosamente en el oso pardo (*Ursus arctos*; Murphy *et al.*, 2003), en leopardo (*Felis bengalensis*), marta japonesa (*Martes melamphus*), y en la comadreja siberiana (*Mustela sibirica*; Kurose *et al.*, 2005). Asimismo, Arcángeli (2007) determinó exitosamente el sexo de individuos de tres géneros de musarañas (*Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex*) utilizando este gen.

## ANÁLISIS MOLECULAR DE HECES

La obtención de muestras de puede resultar difícil por diversas circunstancias. Las heces fecales tradicionalmente han sido una fuente de información para conocer algunos aspectos de la biología de ciertas especies de la fauna silvestre. En el caso de especies en peligro de extinción, las heces fecales han sido las únicas muestras a las que se puede tener acceso en virtud de que no se puede perturbar a estos tipos de taxa o no es permitido el acceso a los mismos.

Afortunadamente, en la actualidad, si se logran conseguir heces fecales de una especie las posibilidades de obtener información sobre su biología han crecido



considerablemente. Por ejemplo, gracias a los avances tecnológicos de la biología molecular, como el uso de la PCR, se puede amplificar fragmentos específicos de ADN de interés de diferentes fuentes como las heces, que antes eran consideradas solamente como un desecho del cuerpo. Por lo tanto, las heces representan una fuente de información relativamente fácil de coleccionar, generalmente disponibles en tiempo y espacio y que además funcionan como un indicador de la presencia de la especie a estudiar (Putman, 1984).

El análisis molecular de las heces es uno de los métodos de muestreo menos invasivo para la obtención de datos biológicos de diferentes especies (Kohn y Wayne 1997; Palomares *et al.*, 2002), pues permite el acceso a información biológica y muestras de especies que de otra manera su estudio sería muy difícil. Tal es el caso del conejo Zacatuche; pues Del Rio (2007) tuvo éxito al amplificar fragmentos de ADN de microsatélites a partir de excrementos del Zacatuche.

Sin embargo, a pesar de que las heces frescas contienen algunas células epiteliales del organismo que las depositó, la recuperación del ADN contenido en estas células no es tan sencillo. El problema al que nos enfrentamos durante el análisis de las heces es que al extraer ADN, éste se puede obtener con poca calidad o bien poca cantidad de éste como reportan algunos autores (Statham *et al.*, 2007). Esto se debe que la muestra ya estaba degradada durante la colecta y por ello al cuantificar el ADN se obtienen cantidades muy pequeñas de ADN (0.045 - 0.548 µg/ml). Para obtener el resultado deseado, en este proyecto fue necesario realizar cambios al protocolo descrito por Wallner *et al* (2001), donde la temperatura de alineamiento fue disminuida de 65° C a 60° C, además fue necesario aumentar el número de ciclos de 35 a 38. Algunos autores reportan que hay factores como la humedad a la que son coleccionadas las heces que pueden provocar una



mayor degradación de ADN o bien algunos compuestos vegetales pueden inhibir la PCR (Farrell *et al.*, 2000; Kohn y Wayne, 1997).

El estudio de muestras de heces en conjunto con el uso de técnicas moleculares, entonces, permite obtener información muy valiosa de las especies de interés. Existen casos bien documentados a este respecto, como cuando se desea determinar la distribución geográfica de especies que viven en simpatria (Kovach *et al.*, 2003; Kurose *et al.*, 2005). Similarmente, como cuando existe interés por documentar la presencia y abundancia de alguna especie en particular (Palomares *et al.*, 2002), así como para analizar la dieta de especies para su conservación (Farrell *et al.*, 2000).

#### ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS

Producto de primers SORR1C y SORF1C

Los resultados mostraron que la longitud de los fragmentos del gen *Sry* en cada uno de las especies comparadas es distinta. Esto es, el fragmento de *Romerolagus diazi* es de 202 pares de bases, el de *Oryctolagus cuniculus* es de 294 pb y el de *Lepus europaeus* es de 245 pb.

La secuencia obtenida del gen *Sry* de *R. diazi* obtenido de los primers SORR1C y SORF1C (Sánchez *et al.*, 1996; Cuadro 8) fue comparada con las secuencias del gen *Sry* de *O.s cuniculus*, y *L. europaeus* (Wallner *et al.*, 2001). De la comparación entre *R. diazi* y *O. cuniculus* (Cuadro 12), notamos que sus secuencias son diferentes en 9 pares de bases (4.45%), mientras que *R. diazi* y *L. europaeus* (Cuadro 13) difieren en 12 pares de bases (5.94%). Finalmente *O. cuniculus* y *L. europaeus* (Cuadro 14) difieren entre si solo por 4 pares de bases (1.64%). Se ha reportado que *Oryctolagus cuniculus* tiene una alta variabilidad de nucleótidos, la más alta reportada hasta ahora en mamíferos (Gerald *et al.*, 2005).



Estas variaciones en la secuencia nucleotídica el gen *Sry* se deben a que este fragmento tiene una rápida evolución en sus secuencias y varía según la especie (Whitfield *et al.*, 1993). Las secuencias encontradas en los extremos de esta caja, las secuencias terminal N y terminal C, son las que varían constantemente, en especial la segunda. La función del gen no se ve afectada por la variación de estas secuencias pues la región conservada se encuentra en la caja HMG que es la que mantiene la función del gen *Sry* (Whitfield *et al.*, 1993; Haqq y Donahoe 1998; Tucker y Lundrigan 1993).

**Cuadro 12.-** Comparación de secuencias del gen *Sry* entre *Oryctolagus* (Oc) y *Romerolagus diazi* (Rd), en azul se observan las bases en las que difieren en total son 9, es decir que convergen en un 95.55% y difieren en un 4.45%. Los números indican el número de pares de bases del fragmento analizado.

	.....10	.....20	.....30	.....40	.....50	.....60
Oc	AATACAGGAG	GAACACGTAA	AGTGAGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAAACGCA
Rd	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~G	TCAAGCGCCC	CATGAATGCA
	.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
Oc	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
Rd	TTCATGCTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
	.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
Oc	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAGTGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
Rd	AACTCGGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAATGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
	.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
Oc	TGGCCAATCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
Rd	TGGCCTTTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAGAGAGAA	ATACCCAAAC
	.....250	.....260	.....270	.....280	.....290	.....300
Oc	TACAAGTACA	GACCTCGTCG	GAAGGTTAAA	ATCCTACAGA	AGAGCGACAG	TTTG.....
Rd	T.....	.....	.....	.....	.....	.....



**Cuadro 13.-** Comparación de secuencias del gen *Sry* entre *Lepus europaeus* (Le) y *Romerolagus diazi* (Rd), en color rosa se observan las bases en las que difieren en total son 12, coinciden en un 94.06% y difieren en un 5.94%. Los números indican el número de pares de bases del fragmento analizado.

	.....10	.....20	.....30	.....40	.....50	.....60
<b>Le</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~AGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAACGCG
<b>Rd</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~G	TCAAGCGCC	CATGAATGCA
	.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
<b>Le</b>	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
<b>Rd</b>	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
	.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
<b>Le</b>	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAGTGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
<b>Rd</b>	AACTCGGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAATGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
	.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
<b>Le</b>	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCGTGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
<b>Rd</b>	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAGAGAGAA	ATACCCAAAC
	.....250	.....260	.....270	.....280	.....290	.....300
<b>Le</b>	TACAAGTACA	GACCTCGCCG	GAAGGTTAAA	.....	.....	.....
<b>Rd</b>	T.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Cuadro 14.-** Comparación de secuencias del gen *Sry* entre *Oryctolagus cuniculus* (Oc) y *Lepus europaeus* (Le), en rojo se observan las bases en las que difieren en total son 4, es decir que coinciden en el 98.38 % y difieren en un 1.62%. Los números indican el número de pares de bases del fragmento analizado.

	.....10	.....20	.....30	.....40	.....50	.....60
<b>Oc</b>	AATACAGGAG	GAACACGTAA	AGTGAGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAACGCA
<b>Le</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~AGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAACGCG
	.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
<b>Oc</b>	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
<b>Le</b>	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAAATGCGA
	.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
<b>Oc</b>	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAGTGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
<b>Le</b>	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAGTGGAAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAAA
	.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
<b>Oc</b>	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
<b>Le</b>	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCGTGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
	.....250	.....260	.....270	.....280	.....290	.....300
<b>Oc</b>	TACAAGTACA	GACCTCGTCG	GAAGGTTAAA	ATCCTACAGA	AGAGCGACAG	TTTG.....
<b>Le</b>	TACAAGTACA	GACCTCGCCG	GAAGGTTAAA	.....	.....	.....



Producto de los primers RDIAF y RDIAR

Se realizaron comparaciones entre las secuencias de estos mismos individuos pero con el fragmento de 164 pares de bases, amplificado con los primers diseñados RDIAF y RDIAR para observar si las diferencias en las secuencias se mantienen o cambian. En este caso, *Oryctolagus cuniculus* y *Lepus europaeus* difieren solo en 2 pares de bases (1.21%) y coinciden en un 98.78%, mientras que ambos difieren de *Romerolagus diazi* en 4 pares de bases (2.43%), es decir que tienen una similitud del 97.56% (Cuadro 15).

**Cuadro 15.**- Comparación de secuencias del gen *Sry* entre *Oryctolagus cuniculus* (Oc) , *Lepus europaeus*(Le) y *Romerolagus diazi* (Rd), en verde se muestran las bases que varían en *R. diazi* (2.4%) y en amarillo las diferencias entre *O. cuniculus* (Oc) y *L. europaeus* (Le) (1.2%). Los números indican el número de pares de bases del fragmento analizado.

	.....10	.....20	.....30	.....40	.....50	.....60
Oc	AATACAGGAG	GAACACGTAA	AGTGAGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAACGCA
Le	-----	-----	----AGCGGC	CAGGAACGGG	TCAAGCGACC	CATGAACGCG
Rd	-----	-----	-----	-----	-----	----AATGCA
	.....70	.....80	.....90	.....100	.....110	.....120
Oc	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAATGCGA
Le	TTCATGGTGT	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAATGCGA
Rd	<b>TTCATGGTGT</b>	GGTCCCAACA	TCAGAGACGC	CAGGTGGCTC	TGCAGAATCC	CAAATGCGA
	.....130	.....140	.....150	.....160	.....170	.....180
Oc	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CATGGGAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAA
Le	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CATGGGAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAA
Rd	AACTCAGACA	TCAGCAAGCA	GCTGGGACAC	CAATGGAAA	TGCTTTCAGA	AGCTGAAAA
	.....190	.....200	.....210	.....220	.....230	.....240
Oc	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCATGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
Le	TGGCCATTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCGTGC	ACAAAGAGAA	ATACCCGGAC
Rd	TGGCCTTTCT	TCCAGGAGGC	GCAAAGACTG	CAGGCCAT--	-----	-----
	.....250	.....260	.....270	.....280	.....290	.....300
Oc	TACAAGTACA	GACCTCGTCG	GAAGGTTAAA	ATCCTACAGA	AGAGCGACAG	TTTG-----
Le	TACAAGTACA	GACCTCGCCG	GAAGGTTAAA	-----	-----	-----
Rd	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Con esto se encontró que disminuyen las diferencias entre las tres secuencias. El éxito de la amplificación del fragmento del gen *Sry* con primers diseñados en este estudio fue de gran importancia, pues como ya hemos mencionado anteriormente, el ADN



contenido en las heces se encuentra degradado, es decir, que está fragmentado. Por lo tanto, mientras más pequeño sea el fragmento hay mayor probabilidad de que éste sea amplificado (Bonacun *et al*, 2002).

Para comprender completamente la biología de cualquier especie y su reproducción es necesario conocer su sexo, esto se debe a que el sexo en cada especie presenta diferencias en la fisiología, comportamiento y ecología. (Griffiths y Tiwari, 1993). La identificación del sexo es una herramienta muy útil para una especie ya sea endémica, en peligro de extinción o rara. Asimismo permite la distinción del sexo en especies que no presentan un dimorfismo sexual aparente. Mediante las técnicas no invasivas para la obtención de muestras, se evita su manipulación y captura, permite la realización de diversos estudios ecológicos y de biología de la conservación los cuales permiten plantear una mejor estrategia para manejar a las especies ya sea en su hábitat natural o bien en cautiverio.



## CONCLUSIONES

- I. Se cumplieron los objetivos específicos de:
  1. Estandarizar la técnica de amplificación del gen *Sry* del ADN proveniente de muestras de hígado de ejemplares de zoológico.
  2. Amplificar el gen *Sry* del ADN extraído de heces fecales.
- II. Entonces, se confirmó la predicción de que utilizando primers específicos se obtienen amplificaciones positivas de un fragmento específico del gen *Sry* de ADN extraído de excrementos de ejemplares machos del conejo zacatuche.
- III. Por lo tanto, se identificó exitosamente el sexo del conejo zacatuche utilizando ADN de heces fecales.
- IV. Las secuencias obtenidas del gen *Sry* son una aportación al conocimiento del genoma del zacatuche, y representan un dato biológico relevante de la especie.
- V. Asimismo, se confirma que es factible efectuar un estudio de una especie en peligro de extinción sin manipularla ni perturbarla gracias al uso combinado de muestreo no invasivo con la aplicación de técnicas moleculares.
- VI. Finalmente, el estudio del ADN de heces fecales representa una fuente de información muy valiosa para la conservación de la fauna silvestre.





## RECOMENDACIONES

Es importante realizar el diseño de primers específicos para la especie de interés ya que se obtiene mayor precisión la amplificación del fragmento de interés, sobre todo si se utiliza ADN de heces fecales.

Debido a que es necesario realizar la estandarización de las técnicas moleculares utilizando tejidos frescos, es de gran importancia trabajar en colaboración con los zoológicos para no sacrificar ejemplares silvestres ya que al morir los ejemplares en cautiverio sus tejidos pueden proporcionar valiosa información para realizar diversos estudios para la conservación de especies silvestres.

Promover en México el uso de técnicas moleculares como parte de los métodos no invasivos de estudio de la fauna silvestre.



## LITERATURA CITADA

- AASEN, E. y J. MEDRANO 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology*, 8:1279-1281.
- ARANDA, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México. Pp.212.
- ARCANGELI, J. 2007. Determinación Molecular del sexo en Musarañas (Mammalia, Soricomorpha). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- BAKER, H, B. ANDERSON, E. BAKER. 2003. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences*, 100:3579-3583.
- BECKWITT, R, J. SHEA, D. OSBORNE, S. KRUEGER, y W. BARKLOW 2002. A PCR-based method for sex identification in Hippopotamus amphibious. *African Zoology*, 37(2): 127-130.
- BONACUM, J., J STARK y E. BONWICH. 2002. PCR Methods and Approaches. Pp. 303-325, in *Methods and Tools in Biosciences and Medicine: Techniques in molecular systematics and evolution*. (DeSalle R., G. Giribet, y W. Wheeler) Birkhäuser Verlagbasel, Suiza.
- BRYJA, J., y A. KONECNY 2003. Fast Sex identification in wild mammals using PCR amplification of the *Sry* gene. *Folia Zool.*, 52 (3): 269-274.
- CEBALLOS, G., y G. OLIVA 2005. Los Mamíferos Silvestres de México. Fondo de Cultura Económica, CONABIO, México, Distrito Federal.
- CERVANTES, R., y C. GONZÁLEZ. 1996. Los conejos y liebres silvestres de México. Pp. 17-25, in *Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat* (A. Velázquez, F. Romero, y J. Lopez-Paniagua). Ediciones Científicas Universitarias, Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México.
- CERVANTES, R., y V. MARTÍNEZ. 1996. Historia Natural del conejo zacatuche o teporingo. Pp. 29-40, in *Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat*. (A. Velázquez, F. Romero, y J. Lopez-Paniagua). Ediciones Científicas Universitarias, Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México.
- NEYRA, G., y S. DURAND. 2000. Biodiversidad en: CONABIO 2000. Estrategia Nacional sobre la biodiversidad de México. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México. Edición digital: Conabio 2000.
- DEL RIO, C. 2007. Uso de microsatélites para la genotificación no invasiva a partir de muestras fecales de conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). Tesis de Maestría. Ciencias de la producción y Salud animal. México D.F.



- FA, J., F. ROMERO, y J. LOPEZ-PANIAGUA. 1992. Hábitat use by parapatric rabbits in a Mexican high-altitude grassland system. *Journal of Applied Ecology*, 29:357-370.
- FARRELL, L., J. ROMAN, y M. SUNQUIST. 2000. Dietary Separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9:1583-1590.
- GERALDES, A., C. ROGEL-GAILLARD, y N. FERRAND. 2005. High levels of nucleotide diversity in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) SRY gene. *Animal Genetics*, 36:349-351.
- GRIFFITHS, R., y B. TIWARI. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Genetics*. 90:8324-8326.
- HAQQ, C., y P. DONAHOE. 1998. Regulation of Sexual Dimorphism in Mammals. *Physiological Reviews* 78(1): 1-33.
- KOHN, M., y R.WAYNE. 1997. Facts from faeces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12:223-227.
- KUROSE, N., R. MASUDA, y M. TATARA. 2005. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of Simpatric Carnivores: A noninvasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity*, 90: 688-697.
- MORIN, P., A. NESTLER, N. RUBIO-CISNEROS, K. ROBERTSON, y S. MESNICK. 2005. Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Molecular Ecology*, 14: 3275-3286.
- MURPHY, M., L. WAITS, y K. KENDALL. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 12:2261-2265.
- ORTEGA, J., M. FRANCO, A. ADAMS, K. RALLS, y E. MALDONADO. 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics*, 5: 715-718.
- PALOMARES, F., J. GODOY, A. PIRIZ, y W. O'BRIEN. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11:2171-2182.
- PANDE, A., y S. TOTEY. 1998. ZFX and ZFY loci in water buffalo (*Bubalus bubalis*): Potential for sex identification. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14:85-88.
- PIGGOT, P. y C. TAYLOR A. 2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research*, 30: 1-3.
- PUTMAN, R. J. 1984. Facts from faeces. *Mammal Review*, 14(2): 79-97.



- REED, J., D. TOLLIT, P. THOMPSON, y W. AMOS. 1997. Molecular Scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal feces. *Molecular Ecology*, 6:225-234.
- RUEDAS, L. 1998. Systematics of *Sylvilagus* Gray, 1867 (Lagomorpha: Leporidae) from southwest North America. *Journal of Mammalogy*, 79(4):1355-1378
- STATHAM, M. P. TURNER, y C. O´REILLY. 2007. Molecular Sex Identification of Five Mustelid Species. *Zoological Studies*, 46(5): 600-608.
- SANBROOK, J. y D. W RUSELL. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury.
- SÁNCHEZ, A., M . BULLEJOS, M. BURGOS, C. HERA, R. JIMENEZ, y R. DIAZ. 1996. High secuence identity between the *Sry* HMG-BOX from humans and insectivores. *Mammalian Genome*, 7:536-538.
- SCHWERIN, M., y C. PITRA. 1994. Sex Determination in spotted hyena (*Crocuta crocuta*) by Restriction Fragment Length Polymorphism of amplified ZFX/ZFY loci. *Theriogenology*, 41:553-559.
- SMITH, B., y K. WAYNE .1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press. Pp.298-315, United States of America.
- SUTOU, S., Y. MITSUI, y K. TSUCHIYA. 2001. Sex determination without the Y Chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis spp.* *Mammalian Genome*, 12:17-21.
- TABERLET, P., P. WAITS, y G. LUIKART. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 323-327.
- TUCKER, P., y B. LUNDRIGAN. 1993. Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature*, 364: 715-717.
- VAUGHAN, A., M. RYAN, J. CZAPLEWSKI. 2000. *Mammalogy*. Fourth edition. Saunders College Publishing. United States of America.
- VILLA, R., y R. CERVANTES. 2003. *Los Mamíferos de México*. Grupo Editorial Iberoamericana, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, México.
- VELÁZQUEZ, A. 1994. Distribution and population size of *Romerolagus diazi* on el Pelado Volcano, México. *Journal of Mammalogy*, 75(3):743-749.
- VELÁZQUEZ, A., y W. GERRIT. 1996. Habitat suitability study for the conservation of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). *Journal of Applied Ecology*, 33:543-554.
- WALLNER, B., S. HUBER, R. ACHMAN. 2001. Non- invasive PCR sexing of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and hares (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology*, 66:190-192.



WHITFIELD, S., R. LOVELL-BADGE, y P. GOODFELLOW. 1993. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*, 364: 713-715.



## APÉNCIDE 1.

Protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos (DNeasy Tissue Kit, Quiagen Cat^{MR} No. 69504). Todos los buffers aquí mencionados son proporcionados por el kit.

1. Cortar un poco más de 25 mg de tejido (más de 10mg). Colocarlo en un tubo y agregar 180µl de buffer (se puede cortar el tejido en pedazos más pequeños para hacer más eficiente la lisis).
2. Agregar 200 µl de proteinasa k, mezclar con el vortex e incubar a 55° C (baño maria) hasta que el tejido este completamente lisado. (es recomendable mezclar con el vortex cada 15 minutos). El tiempo de la lisis varía dependiendo del tejido procesado (de 1 a 3 horas).

**Opcional:** Tratamiento de la muestra con RNAsa.

Agregar 4 µl de RNAsa (100mg/ml), mezclar con el vortex y después incubar por 2 minutos a temperatura ambiente (15 a 20° C). Los tejidos transcripcionalmente activos como el hígado y el riñón contienen grandes cantidades de RNA, este paso purificará el ADN genómico.

3. Mezclar con el vortex por 15 segundos. Agregar 200µl del buffer **AL** a la muestra, mezclar con el vortex e incubar a 70° C por 10 minutos. (Se puede formar un precipitado blanco, el cual desaparece al incubar, este precipitado no afecta el procedimiento).
4. Agregar 200 µl de etanol (96-100%, no incluido en el kit) a la muestra y mezclar vigorosamente con el vortex (en este paso si se forma un precipitado blanco si es importante quitarlo).



5. Agregar el contenido resultante del paso 4 con una pipeta a la columna DNeasy Mini Spin Column (proporcionada por e kit) y centrifugar por  $\geq 6000$  g (8000rpm) por un minuto y eliminar el líquido restante.
6. Agregar a la columna 500  $\mu$ l del buffer **AW1** y centrifugar a  $\geq 6000$  x g (8000rpm) durante un minuto y eliminar el líquido restante.
7. Agregar a la columna 500  $\mu$ l del buffer **AW2** y centrifugar a  $\geq 20,000$  x g (14,000rpm) durante 3 minutos y eliminar el líquido restante.
8. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml o 2 ml de microcentrifuga y pipetear 200  $\mu$ l de buffer **AE** directamente sobre la membrana. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto y centrifugar a  $\geq 6000$  x g (8000rpm). Esta elusión incrementa la concentración final de ADN.
9. Repetir la elusión descrita en el paso 8.



## APÉNDICE 2.

Protocolo de extracción de ADN a partir de heces. (QIAamp DNA Stool Mini kit Cat. No. 51504).

Todos los buffers aquí mencionados son proporcionados por el kit.

1. Pesar de 180 a 220 mg de la muestra y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 ml. Colocar el tubo con la muestra en hielo (si la muestra está congelada no dejar que ésta se descongele antes del paso 2).
2. Agregar 1.6 ml de buffer **ASL** a cada muestra. Mezclar continuamente (vortex) por un minuto o hasta que la muestra este totalmente homogenea.
3. Centrifugar la muestra a 14 000 rpm por un minuto. Se formaran partículas del pellet.
4. Pasar 1.4 ml del sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml y desechar el pellet.
5. Agregar una tableta **INHIBITEX** y mezclar con el vortex inmediatamente hasta que la muestra este totalmente suspendida.
6. Incubar la suspensión un minuto a temperatura ambiente (No procesar más de 12 muestras por que los pellets se rompen si no se quita inmediatamente el sobrenadante).
7. Inmediatamente poner el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml y desechar el otro pellet, centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos.
8. Agregar 25 µl de proteinasa K a un tubo de 2 ml.
9. Agregar 600 µl del sobrenadante (paso 7) al tubo que contiene proteinasa K.
10. Agregar 600 µl del buffer **AL** y mezclar con el vortex durante 15 segundos.





11. Incubar a 70° C durante 10 minutos.
12. Agregar 600 µl de etanol (96 o 100%, no incluido en el kit) para lisar. Mezclar con el vortex.
13. Marcar las **columnas QIAMP** (incluidas en el kit) y ponerlas en un tubo de 2 ml (incluido en el kit). Cuidadosamente agregar 600 µl del lisado del paso 12 y centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Colocar la columna en otro tubo y desechar el filtrado.
14. Agregar 600 µl del lisado y centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto.
15. Repetir el paso anterior.
16. Agregar 500 µl del buffer **AW1** y centrifugar por un minuto a 14 000 rpm. Desechar el filtrado.
17. Agregar 500 µl del buffer **AW2** y centrifugar 3 minutos a 14 000 rpm. Desechar el filtrado.
18. Poner la columna en un tubo marcado de 1.5 ml y agregar 200 µl del buffer AE directamente en la membrana. Incubar durante un minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 14 000 rpm por un minuto.



### APÉNDICE 3.

Preparación de geles de agarosa para visualizar ADN (Sanbrook y Rusell, 2001, con modificaciones).

- Pesar agarosa de acuerdo a la concentración deseada (0.53 g para un gel al 1.5%).
- Agregar Buffer TBE o TAE 1X (35 ml).
- Calentar en horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente.
- Agregar una gota de bromuro de etidio (para una concentración final de 10µg/ml).
- Verter la mezcla en el molde del gel y acomodar el peine.
- Dejar solidificar de 20 a 30 minutos.
- Colocar el gel en una cámara de electroforesis y llenarla con buffer TAE o TBE 1X.
- Colocar las muestras mezcladas con buffer de carga en cada pozo.
- Conectar los cables a la cámara de electroforesis y a la fuente de poder.
- Ajustar el voltaje.
- Correr el gel de 1 a 2 horas.

#### Preparación de Buffers y Soluciones Stock

- EDTA (ethylenediamine teraacetic acid), 0.5M (pH 8).  
Disolver 18.1 g de Na₂ EDTA-2H₂O en 100 ml de agua.  
Ajustar a pH 8.0 con 10 N NaOH.
- NaOH 10 N  
Disolver 8 g de NaOH en 20 ml de agua
- TBE (Tris-borato-EDTA).  
Solución Stock 10X, 1 litro  
108 g de Tris base (890mM)  
55 g de ácido bórico  
40 ml 0.5 M de EDTA, pH 8.  
Aforar con agua a 1000ml.

