

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

237 268



ANÁLISIS GENÉTICO EN EL DNA DEL AVE *Sula nebouxii* UTILIZANDO LA TÉCNICA DE AP-PCR COMO MARCADOR MOLECULAR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
TANIA DEL RIO ALBRECHTSEN

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**A todos los que compartieron conmigo esta emocionante aventura;
en especial a Ian, Toño y Helene.**

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
Perfiles Genéticos de DNA	3
Variabilidad Genética y Marcadores Moleculares	3
Huellas Digitales de DNA	4
Generalidades	4
Aplicaciones	6
Limitaciones	6
Perfiles Genéticos de DNA utilizando PCR	7
Generalidades	7
Aplicaciones	9
Limitaciones	11
Estudios de paternidad	12
Análisis de paternidad	12
Análisis de paternidad en aves	12
Métodos para determinar paternidad	17
¿Por qué <i>Sula neboxii</i> ?	18
Determinación de sexo	21
Importancia de la determinación de sexo en aves	21
Marcadores Moleculares en la determinación de sexo	22
Sondas de DNA	22
PCR	24
Determinación de sexo en <i>Sula neboxii</i>	25
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y METODOS	28
Obtención de las muestras de sangre	28
Purificación de DNA	29
Cuantificación del DNA	30
Técnica de AP-PCR	30
Preparación de los geles de acrilamida	32
Tinción de los geles de acrilamida	34
Análisis de los geles	36
Estrategias alternativas	37

RESULTADOS	38
Obtención de DNA	38
Aplicación de AP-PCR	38
Análisis de los iniciadores informativos	43
Análisis con el iniciador CP2	44
Ejemplo de exclusión de maternidad	48
Marcador de sexo	49
Estrategias alternativas	54
DISCUSION	57
Aplicación de la técnica de AP-PCR	57
Paternidad	62
Marcador de sexo	63
PERSPECTIVAS	65
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68
ANEXO	78
AGRADECIMIENTOS	83

RESUMEN

Los marcadores moleculares han resultado un método efectivo para analizar las relaciones y la diversidad genética entre individuos. El pájaro bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) es un ave marina que presenta estrategias reproductivas mixtas, donde los individuos además de aparearse con su pareja y compartir el cuidado y crianza de los hijos, copulan extra-pareja. El que estas aves sean aparentemente monógamas, puede dar lugar a que algunos padres cuiden y alimenten hijos que no son suyos. Para analizar si las interacciones sociales observadas concuerdan con las relaciones genéticas en el bobo de patas azules, es necesario contar con técnicas adecuadas que permitan establecer las relaciones biológicas entre padres e hijos de manera precisa.

El propósito central de este trabajo es establecer las bases para utilizar la técnica de amplificación de DNA con iniciadores arbitrarios (técnica de AP-PCR "arbitrarily primed-polymerase chain reaction"), para realizar análisis genéticos en *Sula nebouxii*, en la colonia de reproducción de Isla Isabel (Nayarit, México). Para ello, se obtuvo DNA de alto peso molecular a partir de muestras de sangre de diferentes aves. Los productos de amplificación obtenidos mediante AP-PCR, se analizaron en geles de acrilamida (4%) teñidos con plata, para localizar marcadores moleculares. De los 18 iniciadores utilizados, únicamente cuatro generaron *loci* variables entre individuos, es decir, pocos resultaron eficientes para realizar análisis genéticos en esta especie. Los resultados muestran que algunos de los iniciadores empleados pueden ser utilizados para realizar análisis de paternidad. Además, uno de los *locus* variables parece amplificar una región del cromosoma sexual de las hembras, ya que muestra una banda intensa presente en las hembras y ausente en los machos, por lo que este iniciador pudiera ser útil para identificar el sexo de los individuos en la población. Esto es importante ya que *Sula nebouxii* es una especie en la que los adultos presentan dimorfismo sexual, pero las crías no. El determinar el sexo de las aves desde etapas tempranas de su desarrollo puede resultar conveniente, por ejemplo, para

proporción de sexos desde que las aves tienen unos cuantos días de vida, utilizando pequeñas cantidades de DNA. Por lo tanto, la técnica de AP-PCR puede ser utilizada para resolver diferentes preguntas conductuales y ecológicas en *Sula nebouxii*.

ANÁLISIS GENÉTICO EN EL AVE *Sula nebouxii* UTILIZANDO AP-PCR COMO MARCADOR MOLECULAR.

INTRODUCCION

En la parte introductoria de este trabajo, se mencionan algunas de las técnicas moleculares más empleadas para estudiar las relaciones genéticas entre individuos. Posteriormente, se hace referencia a diferentes estudios de paternidad realizados en aves y se justifica la importancia de hacer este tipo de análisis en el ave *Sula nebouxii*. En la última parte se ejemplifica la utilización de técnicas moleculares para determinar el sexo en aves y se señala la relevancia de contar con marcadores moleculares que permitan identificar el sexo en estas aves marinas. La información presentada en la introducción da un panorama general de los diferentes puntos y temas que se manejan en el trabajo.

I. PERFILES GENÉTICOS DE DNA.

A. Variabilidad Genética y Marcadores Moleculares.

El análisis de la diversidad genética y el parentesco dentro o entre especies, poblaciones e individuos es fundamental para los diferentes estudios ecológicos, conductuales, genéticos, evolutivos. Las diferencias genéticas entre individuos se pueden estudiar a nivel del DNA o de las proteínas de los individuos, mediante lo que se conoce como "marcadores moleculares" (Avice, 1994; Weising, *et al.*, 1995). Las moléculas de DNA son únicas para cada individuo, es por esto que la información en sus secuencias puede ser utilizada para estudios de diversidad genética y de parentesco (Gill *et al.*, 1985; Jeffreys *et al.*, 1985a,b; Burke y Bruford, 1987; Jeffreys y Morton, 1987; Nakamura *et al.*, 1987; Wetton *et al.*, 1987; Vassart *et al.*, 1987; Lynch, 1988). El análisis molecular de los individuos a nivel de DNA, mediante diferentes técnicas de biología

molecular se conoce como Perfiles Genéticos o como Huellas Digitales de DNA ("DNA Fingerprinting") (Jeffreys *et al.*, 1985a,b; Weising *et al.*, 1995).

Los marcadores moleculares usados para analizar la variación en el DNA deben reunir ciertas características. Por ejemplo, deben presentar un comportamiento polimórfico, de preferencia herencia codominante (con lo cual se pueda distinguir entre homo y heterocigotos en organismos diploides), estar distribuidos frecuentemente por todo el genoma, tener un comportamiento selectivamente neutral, ser de acceso fácil y altamente reproducibles. Aunque es difícil encontrar marcadores moleculares que reúnan todas estas características, dependiendo del tipo de estudio que se pretenda realizar, se determina cual es el sistema más conveniente (Weising *et al.*, 1995).

B. Huellas Digitales de DNA ("DNA Fingerprinting").

1. Generalidades.

La técnica de Huellas Digitales de DNA, permite analizar ciertas regiones hipervariables presentes en el genoma, formadas por secuencias repetidas en serie. Estas secuencias pueden ser de dos tipos: a) minisatélites: secuencias cortas (10-65 pares de bases (pb)) (Jeffreys *et al.*, 1985a); b) microsatélites: secuencias simples (di, tri, tetra nucleótidos) (Tautz, 1989; Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). Estas secuencias (tanto mini- como microsatélites) son también conocidas como VNTR ("variable number of tandem repeats" o repeticiones en serie de número variable) y algunas de ellas se encuentran como familias distribuidas por todo el genoma, representando un gran número de *loci* hipervariables. Algunas de estas familias de repeticiones contienen una secuencia central común, la cual está conservada en diferentes organismos.

Las secuencias de minisatélites fueron empleadas desde 1985 en estudios de perfiles genéticos de DNA, mediante el análisis de varios *loci* (análisis multilocus) (Jeffreys *et al.*, 1985a,b). El alto grado de polimorfismo observado en estos *loci*, representa la variación en el número de repeticiones entre los

diferentes alelos. Se ha sugerido que una gran parte de la variación alélica, pudiera ser generada por altas tasas de "entrecruzamiento desigual" entre las hebras de DNA ("unequal crossing-over"); posiblemente ocasionadas porque la unidad repetida pudiera actuar como puntos de alta recombinación ("hot-spots") (Lynch, 1988).

Para poder hacer los análisis genéticos, es necesario digerir el DNA con una endonucleasa que no corte en la unidad repetida; los fragmentos son separados de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa y transferidos a una membrana mediante la técnica de "Southern blot" (Southern, 1975). Las regiones hipervariables de DNA, pueden ser detectadas mediante diferentes sondas (formadas por la secuencia central común de las repeticiones) las cuales reconocen y se unen a las regiones complementarias. Lo anterior puede ser visualizado mediante una autoradiografía, en la cual se observa un patrón de bandas único y característico para cada individuo. La longitud de cada fragmento está en función del número de repeticiones en serie que contenga. Con base en los patrones de bandas, se determinan tanto la identidad, como las relaciones genéticas entre individuos. De ahí el nombre de "Huellas Digitales de DNA".

También se han desarrollado técnicas con las que se pueden estudiar regiones del genoma (VNTRs) que pertenecen a un sólo *locus* (análisis monolocus) (Wong *et al.*, 1986, 1987; Nakamura *et al.*, 1987; Jeffreys *et al.*, 1988). Para analizar la variación genética en estas regiones se utilizan sondas específicas o bien la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Así, se obtienen una o dos bandas, dependiendo si el individuo es homocigo ó heterocigo para el número de repeticiones. Los resultados obtenidos al analizar diferentes regiones monolocus hipervariables, son más fáciles de interpretar que los patrones obtenidos a partir de análisis multilocus, principalmente porque el número de bandas a analizar es mucho menor.

2. Aplicaciones de la técnica de Huellas Digitales de DNA.

Las secuencias VNTR (mono y multi-locus), pueden ser aplicadas a diferentes estudios. Con ellas es posible detectar un gran número de alelos, por lo tanto son marcadores muy prácticos para estudios de genética de poblaciones (plantas, animales y humanos) (Amos y Pemberton, 1992; Armour y Jeffreys, 1992; Berumen *et al.*, 1994; Scribner, *et al.*, 1994).

La técnica de Huellas Digitales de DNA ha permitido obtener avances importantes en áreas tan diversas como en ciencias forenses (Gill *et al.*, 1985), en ecología conductual (ie. Burke, 1989; Burke *et al.*, 1989; Birkhead *et al.*, 1990), en crianza de animales (Hanotte *et al.*, 1992) y como método de exclusión de paternidad. Esta técnica puede ser aplicada a otros mamíferos, aves y a un gran número de otros eucariotes (ej. Burke y Bruford, 1987; Jeffreys y Morton, 1987; Hoelzel y Amos, 1988; Vassart *et al.*, 1987, entre otros). Esto permite utilizarla en estudios de poblaciones naturales y en cautiverio, así como en estudios de especies que se encuentran en peligro de extinción (Signer *et al.*, 1994).

3. Limitaciones de la técnica de Huellas Digitales de DNA.

Existen algunos problemas técnicos, teóricos y estadísticos asociados a los análisis multilocus. En ocasiones se tienen problemas en la interpretación de resultados (Weatherhead y Montgomerie, 1991). Por ejemplo, puede resultar complicado determinar la migración relativa de los fragmentos en carriles no adyacentes, y es difícil hacer comparaciones de muestras que se encuentren en diferentes geles (Bruford *et al.*, 1992; Queller *et al.*, 1993). Aparentemente puede haber comigración de fragmentos no homólogos. Es importante establecer la independencia de las bandas detectadas, es decir, que los diferentes alelos de los minisatélites estén representados por bandas sencillas. Para ello, es necesario analizar el patrón de segregación de las bandas paternas y maternas en un gran número de descendientes (Bruford *et al.*, 1992; Signer *et al.*, 1994). Muchos de los alelos (docenas) pueden estar presentes en el mismo *loci*. Como los marcadores no pueden ser asociados a un *locus* específico, no se puede



los marcadores no pueden ser asociados a un *locus* específico, no se puede asegurar cuales individuos son homocigos o heterocigos. La forma de determinar similitud entre individuos, es utilizando la fracción de bandas compartidas, lo cual no será necesariamente equivalente a la fracción de genes compartidos.

Estos problemas pueden resolverse al realizar análisis monolocus. Con ellos se pueden identificar alelos y *loci* específicos de manera sencilla. Las sondas monolocus son altamente específicas y por lo tanto generan resultados fáciles de interpretar. Sin embargo, presentan el inconveniente de ser marcadores especie-específicos, por lo que no pueden ser aplicados de manera universal e inmediata a cualquier especie (Burke, 1994).

C. Perfiles Genéticos de DNA utilizando la técnica PCR.

1. Generalidades.

Muchas de las regiones variables del DNA son ahora detectadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR. El método de PCR se basa en la amplificación de DNA *in vitro*. Para ello, se comienza con pequeñas cantidades de DNA (ej. nanogramos), y se generan millones de copias de uno o más fragmentos de DNA, los cuales pueden ser visualizados mediante electroforesis con alguna tinción o autoradiografía (Weising *et al.*, 1995). El DNA es amplificado mediante una serie de cambios de temperatura: el primer paso es la desnaturalización del DNA por un incremento de temperatura (90°C); posteriormente hay una disminución de temperatura (25-65°C), lo cual permite la unión o alineamiento de los iniciadores a secuencias complementarias en el DNA; y finalmente hay un incremento de temperatura (alrededor de 72°C), donde la polimerasa termoestable de DNA empieza a copiar la secuencia en la hebra complementaria (uniendo nucleótidos trifosfato), a partir de las regiones donde se encuentran los iniciadores (Weising *et al.*, 1995). Este esquema de cambios de temperatura se repite durante cierto número de ciclos lo que permite un incremento exponencial en el número de copias de moléculas de DNA han sido amplificadas en cada ciclo. Así, a partir de pequeñas cantidades

de DNA, se puede aumentar la concentración de ciertas regiones del genoma que pueden resultar informativas.

Los principios de la técnica de Huellas Digitales de DNA y la utilización de la PCR, han permitido el desarrollo de métodos convenientes para detectar gran cantidad de polimorfismos. El método de PCR puede utilizarse para detectar *loci* de microsatélites altamente polimórficos (Weber y May, 1989; Queller *et al.*, 1993). El método de microsatélites tiene la ventaja de proveer datos sobre la herencia mendeliana en un *loci* específico, ya que estas secuencias son marcadores codominantes, pero presentan la limitante de que tienen que ser adaptados para cada especie (Queller *et al.*, 1993).

Un método alternativo que permite detectar variabilidad genética utilizando la PCR, es la técnica conocida como "RAPDs" ("Random amplified polymorphic DNA" o DNA polimórfico amplificado al azar) ó "AP-PCR" ("Arbitrarily primed-polymerase chain reaction" o reacción en cadena de la polimerasa por iniciadores arbitrarios) (Welsh y McClelland 1990; Williams *et al.*, 1990). Ambas técnicas se basan en la amplificación de diferentes regiones de las moléculas de DNA, utilizando iniciadores escogidos de manera arbitraria. Así, es posible encontrar regiones polimórficas dentro cualquier genoma (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Lynch y Milligan, 1994). Las regiones variables encontradas, están definidas por la secuencia, longitud y contenido de GC de los diferentes iniciadores utilizados, así como por la longitud y características del DNA que se va a amplificar. Los polimorfismos pueden ser detectados porque el cambio de un sólo nucleótido puede alterar el sitio de unión del iniciador, o bien por la presencia de una inserción o deleción dentro de la región amplificada, las cuales pueden dar como resultado bandas de diferente longitud (Hormanza *et al.*, 1994). Los productos obtenidos de la amplificación de las moléculas de DNA son separados en geles de agarosa y/o acrilamida en los cuales se analiza la variación en la secuencia, en forma de una serie de bandas de diferentes

longitudes, que pueden ser características de la especie y/o de cultivos dentro de una especie (Hadrys *et al.*, 1992; Hormanza *et al.*, 1994; Mailer *et al.*, 1994).

2. Aplicaciones de la PCR y de RAPDs (AP-PCR).

1. PCR.

Las técnicas que utilizan la PCR para detectar polimorfismos representan una gran ventaja por la cantidad de DNA necesario para la realización de los experimentos (nanogramos, respecto a microgramos necesarios para hacer hibridaciones tipo Southern). Esto ha permitido que mediante amplificación y secuenciación de DNA se estudie la gran diversidad microbiana presente en el agua de mar (Giovannoni *et al.*, 1990, en Burke 1994). También se ha amplificado el DNA de material de museos o arqueológico y de esta manera se ha utilizado para comparar poblaciones contemporáneas con antiguas (Thomas *et al.*, 1990, Wayne *et al.*, 1991, en Burke 1994). Ahora es posible realizar estudios de sistemas de apareamiento y genética de poblaciones, en aquellos organismos donde era difícil obtener suficiente tejido (debido a su reducido tamaño) para hacer los análisis. El método de muestreo empleado para utilizar PCR es más sencillo y menos destructivo, lo que permite realizar estudios de conservación en especies en peligro de extinción (Kohn *et al.*, 1995). El uso de la PCR permite realizar análisis genéticos en aves, utilizando el DNA obtenido de una sola pluma (Taberlet y Bouvet, 1991). Se puede obtener información a partir de una raíz de cabello, para identificar por ejemplo el sexo de un individuo (Taberlet *et al.*, 1993, en Burke, 1994) o bien hacer estudios de microsatélites.

Los microsatélites son muy utilizados en proyectos de mapeo genético, y esto ha permitido construir mapas genómicos completos para diferentes especies (ej. Weissenbach *et al.*, 1992, en Primmer *et al.*, 1995). Recientemente se ha comenzado a emplear esta técnica en estudios ecológicos (Primmer *et al.*, 1995; Bruford y Wayne, 1993; Ellegren *et al.*, 1995). Parece ser un método conveniente para analizar el éxito reproductivo de los individuos, niveles de parentesco, endogamia, flujo génico, tamaños efectivos de poblaciones (Morin *et al.*, 1993, en

Morin *et al.*, 1994). Sin embargo, su aplicación es laboriosa, pues se tienen que desarrollar los marcadores para cada especie (Queller *et al.*, 1993; Primmer *et al.*, 1995).

II. RAPDs (AP-PCR).

Utilizando RAPDs (AP-PCR) se han logrado detectar polimorfismos en el DNA en diferentes especies de plantas, hongos, animales y bacterias (Welsh and McClelland 1990; Welsh *et al.*, 1991; Williams *et al.* 1990; Lanfranco *et al.*, 1995.). Los polimorfismos obtenidos por esta técnica pueden ser utilizados como marcadores genéticos dominantes para determinar las relaciones genéticas entre individuos (Hadrys *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1993), para estudios de mapeo genético en plantas y animales (Welsh *et al.*, 1991; Rafaski y Tinger, 1993) y para monitorear *loci* durante procesos de introgresión o programas de selección (Welsh *et al.*, 1991). Ha sido utilizada para reconocimiento de diferentes cepas bacterianas en estudios de epidemiología (Welsh *et al.*, 1992, en Borowsky *et al.*, 1995) y para realizar clasificaciones taxonómicas en animales y plantas. Asimismo, se ha propuesto como método de estudio de las relaciones evolutivas en organismos superiores, para realizar análisis filogenéticos a nivel de poblaciones y especies (Borowsky *et al.*, 1995). Utilizar RAPDs ha resultado útil en estudios de conservación, puesto que con frecuencia hay poco material disponible y poca variabilidad en los organismos (Haigh *et al.*, 1994; Rossetto *et al.*, 1995). La técnica de RAPDs ha permitido obtener resultados en estudios en los que no se había encontrado suficiente variación con alozimas (Brauner *et al.*, 1992, Meijer *et al.*, 1994, en Stiller y Denton, 1995). Así, se han logrado estudiar diferencias genéticas entre poblaciones de aves, en donde las alozimas no habían mostrado suficiente variación (Bowditch *et al.*, 1993, en Haigh *et al.*, 1994). El uso de RAPDs en estudios de paternidad ha sido cuestionado (Riedy *et al.*, 1992; Tegelström y Höggren, 1994). Sin embargo, se ha reportado que puede ser un método eficiente para realizar análisis de paternidad (Hadrys *et al.*, 1991, en Hadrys *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1992, en Stiller y Denton, 1995). La técnica de RAPDs ha sido empleada para obtener

perfiles genéticos de DNA, en estudios en los que no se cuenta con información genética previa de la especie (Welsh y McClelland 1990; Williams et al. 1991; Welsh et al., 1991). Esto es importante, ya que en ocasiones, la aplicación de los análisis moleculares a problemas ecológicos se ha visto limitada por la falta de información previa de la secuencia genética de una gran cantidad de organismos.

3. Limitaciones de AP-PCR o RAPDs.

El método de RAPD (AP-PCR) se puede aplicar fácilmente a diferentes organismos, pero los datos son difíciles de interpretar. El que sean marcadores dominantes representa una desventaja, ya que es difícil detectar heterocigotos (Welsh et al. 1991b; Williams et al., 1990; Lewis y Snow 1992). Para cada *locus* únicamente hay dos alelos: presente o ausente, los cuales son interpretados como ausencia o presencia del fragmento. En este caso se pierde mucha de la información genética que puede ser obtenida a partir de los marcadores codominantes. Al utilizar RAPDs (AP-PCR) es posible que los productos de diferentes *loci* tengan pesos moleculares similares y por lo tanto no puedan ser distinguidos en los geles, por comigración de fragmentos no homólogos (Karl y Avise, 1993; Lynch y Milligan, 1994; Weising et al., 1995). La técnica de RAPDs ha sido criticada porque se ha observado que puede haber contaminación de los reactivos dando bandas que son consideradas como falsos-positivos o artefactos de amplificación. Ha sido criticada también porque a veces es inconsistente y difícil de reproducir (Yu y Pauls, 1992, Schierwater y Ender, 1993, en Rossetto et al., 1995). Esto genera problemas en el momento de analizar los resultados (Devos y Gale, 1992, en Talbert et al., 1994; Wright y Wynford-Thomas, 1990 en Silva y Batt, 1995). Sin embargo, se ha discutido que esto puede solucionarse si se toman las debidas precauciones al realizar los experimentos (Hadrys et al., 1992; Jones et al., 1994).

Por lo tanto, a pesar de las limitantes de esta técnica, ésta tiene ventajas importantes (como disponibilidad), lo que la hace un buen método para resolver preguntas ecológicas en diferentes organismos.

II. ESTUDIOS DE PATERNIDAD.

A. Análisis de paternidad.

En los estudios de sistemas de apareamiento es importante poder identificar a los descendientes de los individuos (Hamilton, 1964; Hill, 1987; Burke, 1989; Ellegren, 1991). Al correlacionar las observaciones conductuales con los estudios genéticos, se ha corroborado que las relaciones genéticas no siempre concuerdan con las relaciones sociales observadas. Por ejemplo, en muchas aves y mamíferos, se sabe que hay cópulas fuera de la pareja social y que éstas pueden resultar en hijos extra-pareja. Al copular con otra pareja los individuos pueden incrementar el número de descendientes, aumentando así, su éxito reproductivo. En algunos casos resulta complicado el poder correlacionar la conducta con el éxito reproductivo, como es el caso de especies en las que las hembras pueden guardar espermias viables por periodos largos de tiempo (algunos reptiles, aves, mamíferos) (Birkhead y Moller 1992; Boellstorff *et al.*, 1994). Esto dificulta la identificación del padre genético de las crías, pues no se sabe con cual de los machos con los que la hembra copuló es el padre. Sin embargo, mediante perfiles genéticos de DNA, se ha podido asignar la paternidad, aún en especies con sistemas sociales complejos. Además de proveer información sobre la frecuencia de paternidad extra-pareja, estas herramientas moleculares permiten evaluar las diferentes estrategias de apareamiento dentro de una población (Lifjeld, *et al.*, 1993).

B. Análisis de paternidad en aves.

Desde 1968 Lack sugirió que el sistema de apareamiento predominante en aves (90% de las especies) era la monogamia. En este sistema, ambos padres pueden incrementar el número de descendientes compartiendo el cuidado de los hijos. En la mayoría de las especies monógamas, los individuos adoptan estrategias reproductivas mixtas, en las cuales maximizan su éxito reproductivo buscando oportunidades alternativas de apareamiento además de criar hijos

propios (Trivers, 1972). En aves, las estrategias alternativas son: 1) cópulas extra-pareja (Birkhead *et al.*, 1987) y 2) parasitismo intraespecífico de nidadas, en el que las hembras dejan huevos en nidos diferentes al suyo para que sean criados por otras hembras o por otra pareja (Yom-Tov, 1989, MacWhirter, 1989, en Hartley *et al.*, 1993). Al copular extra-pareja, los machos compiten por la fertilización de los huevos de las hembras durante un ciclo reproductivo. Con análisis de DNA se ha revelado que mediante las cópulas extra-pareja (CEP) los huevos pueden ser fertilizados y por lo tanto dar lugar a paternidades extra-pareja (Burke 1989; Westneat 1990; Burke *et al.*, 1991; Birkhead *et al.*, 1988; 1990; Hunter *et al.*, 1992; Birkhead y Moller, 1992). Las CEP se han considerado como una fuente importante de varianza en el éxito reproductivo del macho en las especies monógamas, dando como resultado una selección sexual más intensa que la esperada con base en las observaciones sociales de los sistemas de apareamiento. Así, las estrategias alternativas de apareamiento, pueden dar lugar a que algunos de los que se consideran hijos no estén relacionados genéticamente con los padres que están en el nido. Es por esto que el término monogamia puede describir el cuidado paternal compartido por ambos padres, pero no necesariamente su contribución genética a las siguientes generaciones (Mock 1983; Gowaty, 1985).

Se ha reportado que el parasitismo intraespecífico de nidadas es mucho menos frecuente que la paternidad extra-pareja entre diferentes especies (Hartley *et al.*, 1993). En especies en las que hay nidadas con paternidad múltiple, la frecuencia de la paternidad extra-pareja puede presentar valores muy bajos (10% de los hijos pueden ser de padres extra-pareja), o bien sumamente elevados (hasta más del 85% de los hijos) (Gowaty, 1995). En algunas aves, la frecuencia de paternidad extra-pareja es mucho mayor que la esperada a partir de observaciones de apareamientos extra-pareja (Birkhead y Moller 1992; Lifjeld *et al.*, 1993). Las discrepancias entre las CPE observadas y la paternidad extra-pareja, pueden ser explicadas en algunos casos: 1) por dificultad de observar todas las CEP,

FALTA

PAGINA

14

precedencia del último esperma) (Birkhead y Moller, 1992). En el fulmar nortero (*Fulmarus glacialis*), a pesar de que se observaron CEP, no hubo casos de paternidad múltiple (Hunter et al., 1992). En esta ave marina y colonial, los machos pudieran asegurar su paternidad mediante un mecanismo de precedencia espermática, ya que fueron los últimos en copular con su hembra antes de la puesta (Hunter et al., 1992). Westneat (1990) predijo que para los machos de poblaciones con reproducción sincrónica debiera resultar difícil combinar las cópulas extra-pareja, la protección a su pareja y el cuidado parental. Mediante análisis de paternidad se ha demostrado que en algunas especies de golondrinas (*Delichon urbica*, *Riparia riparia*, *Hirundo rustica* y *Progne subis*), hay casos de paternidad extra-pareja a pesar de que haya cuidado de pareja por parte de los machos (Beecher y Beecher, 1979; Moller 1985, 1987; Morton 1987; Riley, 1992; Alves, 1993; todos en Riley et al., 1995).

Cuando hay incertidumbre de paternidad el macho puede disminuir su inversión paterna (Moller, 1988); esto puede variar en diferentes especies. En las golondrinas (*Hirundo rustica*) el macho proporcionó más cuidado parental a las crías si habían copulado frecuentemente con su pareja (Moller, 1988). En la golondrina martín azul (*Progne subis*) no se observó ninguna correlación entre la intensidad de cuidado de pareja y su esfuerzo parental para alimentar a las crías (Morton, 1987). En el ave paserina *Prunella modularis*, los machos utilizan el acceso para copular con su hembra como medida indirecta de paternidad. Los machos que se aparean con una hembra, alimentan a sus crías, aún en los casos donde ellos no son los padres (Burke et al., 1989).

La paternidad extra-pareja puede estar relacionada con diferentes características de los individuos. Por ejemplo, en *Progne subis* los machos de mayor edad obtienen más paternidades extra-pareja, que los más jóvenes. En estas aves las fertilizaciones extra-pareja pudieran estar sesgadas de acuerdo con la edad de los individuos (Morton et al., 1990). Por otra parte, en el carbonero azul (*Parus*

caeruleus), los machos considerados "atractivos" (aquellos muy visitados por hembras vecinas) tuvieron menos hijos extra-pareja en sus nidos, que aquellos considerados como "no atractivos" (Kempnaers *et al.*, 1992). Estos machos ("atractivos") eran mayores y sobrevivieron mejor. Las hembras pudieran copular extra-pareja para obtener mejor calidad genética (Kempnaers *et al.*, 1992).

Para entender el significado adaptativo de las cópulas extra pareja, se tienen que considerar los costos-beneficios de los patrones de comportamiento para cada sexo, suponiendo que la selección natural determina su evolución. Se ha sugerido que los machos pudieran realizar cópulas extra-pareja para incrementar su adecuación (mayor número de descendientes) (Birkhead y Moller, 1992). Sin embargo, al copular extra-pareja pueden exponerse a tener una disminución en el número de espermatozoides, a ser "engañados" o agredidos por otros machos, así como a contraer parásitos o enfermedades (Birkhead y Moller, 1992; Riley *et al.*, 1995). Por otra parte, las hembras pueden presentar CEP para promover la competencia espermática, asegurar la fertilización de los huevos u obtener beneficios materiales (nutrientes, cuidado paterno) o genéticos (diversidad, calidad genética). Al presentar CEP pudieran también intentar evitar el infanticidio o el rechazo de otros machos. El costo para las hembras de realizar CEP pudiera ser la disminución en la inversión paterna de su pareja en la crianza de sus hijos (Trivers, 1972; Moller, 1988), riesgo de ser lastimadas o agredidas, acosamiento de los machos con los que CEP, riesgo a contraer enfermedades y parásitos (Westneat *et al.* 1990; Birkhead y Moller 1992; Wagner 1992, en Riley *et al.*, 1995). Por lo tanto, el éxito de las CEP, probablemente está relacionado con los costos y beneficios en el cuidado paterno y en la intensidad de selección sexual.

C. Métodos para determinar paternidad.

Se han desarrollado diferentes métodos para identificar los patrones poblacionales de paternidad cuando se conoce la identidad de la madre. En las técnicas de simple exclusión (Ellstrad 1984, Hamrick y Schnabel, 1985, en Devlin *et al.*, 1988) se hacen comparaciones entre el genotipo de la progenie con aquel de la madre, se subtrae la contribución materna, y se compara la contribución genética del padre con los genotipos de todos los posibles padres. Hay exclusión de paternidad cuando el genotipo del posible padre y del hijo no concuerdan. La probabilidad de exclusión incrementa con el número de *loci* utilizados como marcadores genéticos, con el número de alelos y las frecuencias alélicas presentes en cada *locus*. Es importante obtener la probabilidad de exclusión en una población para el *locus* o *loci* que se estén estudiando (Devlin *et al.*, 1988). Los valores van desde 0 hasta 1; uno si un macho (padre) seleccionado al azar es excluido de un par de madre-hijo seleccionado al azar y 0 en el caso contrario (Devlin *et al.*, 1988).

Las exclusiones de paternidad son evidentes y se realizan al analizar genotipos de padres e hijos. Sin embargo, la estimación de la probabilidad de paternidad para un individuo no excluido, es más complicada, pues se realiza mediante pruebas estadísticas (Pena y Chakraborty, 1994). Esto puede ser cuantificado al obtener la proporción entre la probabilidad de que el supuesto padre sea el padre verdadero (X) sobre la probabilidad de que un individuo considerado al azar (Y) sea el padre genético. Esta proporción se conoce como índice de paternidad y es la forma de determinar la paternidad de cierto individuo (Pena y Chakraborty, 1994).

D. ¿POR QUÉ *Sula nebouxi*?

El bobo de patas azules (*Sula nebouxi*) es un ave marina, colonial, del orden de los Pelecaniformes (Nelson 1978). Habita exclusivamente en islas del Pacífico, es de reproducción sincrónica, y los individuos son filopátricos, es decir, hay una dispersión limitada desde el sitio donde las aves eclosionaron al sitio donde regresan a anidar (Osorio-Beristain y Drummond, 1993). La colonia de reproducción de Isla Isabel en Nayarit incluye cerca de 400 parejas en dos subcolonias (Osorio-Beristain y Drummond, 1993). En la zonas de mayor densidad existen 0.4 nidos por m² y la distancia promedio entre nidos ahí es de 2.0 m (Castillo y Chavez-Peón 1983, Osorio-Beristain y Drummond, 1993). Las aves anidan en la tierra y existe mucha interacción social entre vecinos.

Cada pareja de bobo de patas azules defiende uno ó más territorios durante el cortejo y se establece en uno para la incubación y la crianza (Nelson 1978). En la colonia de reproducción de Isla Isabel, las aves tienen de una a tres crías, las cuales eclosionan con intervalos de alrededor de cuatro días (Drummond *et al.*, 1986). La crianza y el cuidado de los hijos se realiza por ambos padres, aunque la contribución de la hembra en la alimentación de las crías es mayor que la del macho (Guerra y Drummond, 1995). Las hembras dan mayor cantidad de pescado y alimentan a las crías con mayor frecuencia que los machos durante aproximadamente los primeros 35 y 60 días respectivamente (Guerra y Drummond, 1995).

Estas aves son aparentemente monógamas; los individuos presentan estrategias reproductivas mixtas con cópulas intra-pareja (CIP) y cópulas extra-pareja (CEP) (Osorio-Beristain, 1994). Al realizar observaciones conductuales, se encontró que el 54% del total de individuos muestreados (13 hembras y 13 machos) copularon extra-pareja. Todas las CEP ocurrieron antes de la primera puesta y se realizaron con individuos vecinos ya apareados (Osorio-Beristain, 1994).

Las hembras promiscuas realizaron algunas CEP en presencia del macho con el que estaban apareadas. Sin embargo, las tasas de CEP fueron menores cuando su pareja estaba presente, que cuando él estaba ausente. Durante los 5 días previos

a la puesta (probable período fértil), ninguna de las hembras promiscuas realizó CEP en presencia de su macho.

Cuando los machos (3 de 7 machos apareados con hembras promiscuas) estuvieron presentes durante algunas de las CEP de sus hembras, éstos no mostraron agresión, ni interfirieron. Estos machos presentaron CIP diarias similares a aquellas realizadas por machos con parejas no promiscuas (1.77 ± 0.70 CIP contra 1.70 ± 0.54 CIP) (Osorio-Beristain, 1994). Por lo que al parecer estos machos no presentaron cuidado de pareja incrementando la tasa de CIP o interfiriendo cuando sus hembras presentaban CEP.

Las CIP ocurrieron significativamente más cercanas a la puesta que las últimas CEP. Las últimas dos cópulas de cada una de las 7 hembras promiscuas fueron con su pareja. La última CIP ocurrió 11.1 ± 14.4 h antes de la primera puesta y la última CEP fue 78.0 ± 72.25 h antes de dicha puesta. Si se considera que los huevos son ovulados alrededor de 26 horas antes de la puesta, y que la fertilización ocurre en este lapso, el que los machos obtengan las últimas dos cópulas con su pareja pudiera ser un mecanismo para asegurar su paternidad.

El realizar análisis de paternidad en esta colonia del bobo de patas azules mediante técnicas moleculares, ayudará a entender las estrategias reproductivas presentadas por estas aves marinas. Por ejemplo, se podrá determinar la proporción de paternidad extra-pareja en la colonia y así correlacionar estos valores con la frecuencia de CEP observadas. Se podrán relacionar los casos de paternidad múltiple con la edad y experiencia reproductiva de los adultos. El realizar análisis de paternidad en estas aves permitirá determinar si los machos al obtener las últimas dos cópulas con su pareja antes de la puesta, son capaces de asegurar su paternidad. Dado que es posible que estas aves presenten túbulos para guardar espermatozoides viables de diferentes machos (com. pers. Osorio-Beristain, M.), mediante los análisis de paternidad se podrá determinar si la competencia espermática favorece al macho que esta en el nido, o bien si la ventaja de paternidad es para el macho con el que la hembra copuló extra-pareja. Sería interesante

analizar si hay variación en los patrones de paternidad en diferentes áreas de la colonia, es decir, se podrá analizar si los casos de paternidad extra-pareja varían en áreas con diferentes densidades de anidación.

III. DETERMINACION DE SEXO.

A. Importancia de la determinación de sexo en aves.

La identificación precisa del sexo en aves vivas es fundamental para diferentes estudios de estructura de poblaciones, de comportamiento, de estrategias alternativas de reproducción, de proporción de sexos y de conservación (Tiersch *et al.*, 1991). La identificación de sexo en aves puede resultar complicada cuando se utilizan especies sexualmente monomórficas ó en especies donde el monomorfismo sexual prevalece en etapas juveniles (Griffiths *et al.*, 1992). Esto puede representar dificultades en estudios de proporción de sexos, donde es necesario determinar el sexo de todas las crías en cada generación. Darwin propuso que en diferentes especies la proporción primaria de sexos es alrededor de 1:1 (macho:hembra) (Trivers, 1985). Según Fisher (1930) la proporción de sexos de la progenie debe estar sesgada hacia el sexo menos costoso, cuando el costo de criar hembras y machos es diferente

La proporción de sexos en la colonia de *Sula neboxii* de Isla Isabel, presenta un sesgo hacia machos, tanto en el momento en que los huevos eclosionan, como en la etapa de emplumado (Torres R. y Drummond, H. en prep). En esta especie, las hembras son 25% mayores que los machos, por lo que podrían resultar más costosas (por ejemplo en la cantidad de alimento que necesitan para crecer). El que la proporción de sexos este sesgada a los machos en el bobo de patas azules, pudiera permitir a los padres equilibrar su inversión en los dos sexos, en caso de que criar una hija resulte más costoso que criar un hijo (Drummond *et al.*, 1991). Para conocer la proporción de sexos es necesario contar con técnicas adecuadas que permitan identificar el sexo de las aves. Se ha demostrado que los marcadores moleculares ligados a genes determinantes del sexo, o bien a cromosomas sexuales pueden ser métodos efectivos para la identificación de sexo (Avise, 1994), por lo que sería interesante contar con estos marcadores como método para identificar machos y hembras en *Sula neboxii*.

B. Marcadores moleculares en la determinación de sexo.

La identificación de sexo en aves puede realizarse mediante diferentes técnicas. Por ejemplo, puede hacerse una examinación quirúrgica (laparoscopia), pero ésta requiere de anestesia, lo cual implica estrés y riesgo de infección post-operatorio (Quinn *et al.*, 1990). Se puede también hacer análisis cariotípico, esto es laborioso y en ocasiones resulta complicado identificar a los cromosomas sexuales con claridad (Prus y Schmutz, 1987). En diferentes especies de aves monomórficas se han utilizado también los niveles y tipos de esteroides excretados para predecir el sexo y el estado reproductivo del animal. Sin embargo, en ocasiones se ha encontrado ambigüedad en las determinaciones de sexo de los individuos. Las herramientas moleculares pueden resolver algunos de los problemas que se presentan al utilizar otros métodos de identificación de sexo.

Los marcadores de DNA son utilizados eficientemente para determinar el sexo en diferentes organismos (Griffiths y Tiwari, 1993; Avise 1994; Longmire *et al.*, 1993). Estos marcadores moleculares están presentes en el genoma cuando la determinación de sexo está controlada genéticamente. Esto ocurre en las aves, donde las hembras son heterogaméticas (cromosomas W y Z) y los machos son homogaméticos (cromosomas Z,Z). La técnica que permite localizar marcadores de DNA está bien establecida, es sencilla y precisa (Griffiths y Tiwari, 1993); además se requieren pequeñas cantidades de muestra de tejido o de sangre para los análisis. El mayor problema de este método consiste en la obtención de marcadores ligados al cromosoma W o Y (Griffiths, y Tiwari, 1993).

1. Sondas de DNA.

Para determinar el sexo en mamíferos se cuenta con una sonda correspondiente al gene SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y). Esta secuencia se encuentra conservada, por lo que puede ser utilizada de manera general en diferentes organismos (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990). Para los no mamíferos, la determinación de sexo se ha realizado con el

uso de secuencias de DNA altamente repetidas (Griffiths y Holland, 1993). Estas resultan adecuadas, aunque generalmente no están conservadas entre diferentes organismos, por lo que un marcador de sexo aislado de una especie, no necesariamente esta presente en otras especies (Griffiths y Tiwari, 1993).

Para detectar *loci* de los cromosomas sexuales en algunas aves, se han utilizado sondas de mini- y microsátélites (Miyaki *et al.*, 1992; Longmire *et al.*, 1993). En dos especies de pericos, pertenecientes al género *Aratinga* (Psittacidae, Psittaciformes), hubo hibridación cruzada de una sonda de minisátélites de humano a un par de bandas específicas para el cromosoma W de las hembras. Estas dos bandas pudieran pertenecer a uno ó dos *loci* específicos del cromosoma W. La mayoría de las especies del género *Aratinga* y *Ara* son especies en peligro de extinción, que no pueden ser sexadas a partir de su morfología externa. La detección de fragmentos específicos para la hembra en estas y otras especies relacionadas, puede ser de suma utilidad para el manejo de poblaciones tanto silvestres como en cautiverio (Miyaki *et al.*, 1992).

En otras aves se han aislado fragmentos específicos del cromosoma W. Por ejemplo, en el ganso de las nieves (*Chen caerulescens*) se aisló un fragmento de DNA homólogo al cromosoma W, y este fragmento fue utilizado como sonda (especie-específica) para determinar sexo en más de 150 aves, a partir de DNA obtenido de muestras de sangre (Quinn *et al.*, 1990). En la gaviota arenquera ó plateada (*Larus argentatus*), también se obtuvo una sonda de DNA específica para el cromosoma W (Griffiths y Holland, 1990). En el págalo café (*Catharacta lonnbergi*) se encontraron bandas específicas para el cromosoma W y estos marcadores genéticos se utilizaron para documentar diferencias significativas en las proporciones de sexos en aves adultas respecto a las crías. Sin embargo, no se ha encontrado ningún marcador del cromosoma W que pueda ser aplicado a todas las especies de aves. Los *loci* del cromosoma W analizados están restringidos a una o a unas cuantas especies relacionadas (Quinn *et al.*, 1990).

2. PCR.

Una técnica que se ha utilizado para aislar marcadores de los cromosomas W o Y, siguiendo protocolos relativamente sencillos, es el amplificar DNA mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (empleando diversos iniciadores). Se usan muestras de DNA de diferentes individuos en distintas especies de aves (Griffiths y Tiwari, 1993). Las características de los iniciadores y las condiciones de PCR deben ser ajustadas para cada una de las especies con las que se esté trabajando. Es importante considerar la temperatura de la PCR, y la longitud de los iniciadores, ya que conforme ésta disminuye, en teoría, debe haber un mayor número de sitios blanco disponibles y por lo tanto una mayor probabilidad de amplificar un *locus* sexo-específico (Griffiths y Tiwari, 1993). Con base en la presencia y ausencia de bandas en hembras y machos, se determina cuales son los iniciadores que pudieran ser utilizados como marcadores de sexo. Para cada una de las especies con las que se esté trabajando, se determina cuales son las bandas que aparecen únicamente en la hembra. Las bandas de interés puede ser aislada de los geles y utilizadas como sonda para generar bandas polimórficas sexo-específicas (Griffiths y Tiwari, 1993). El probar diferentes iniciadores, podría resultar útil para aislar un marcador sexo-específico de cualquier organismo, en especies donde uno de los sexos posee un cromosoma único (Griffiths y Tiwari, 1993).

En el estornino común (*Sturnus vulgaris*) se logró amplificar un *loci* sexo-específico al utilizar iniciadores diseñados para amplificar un *locus* particular. En estas aves es posible identificar el sexo de los adultos mediante diferentes características externas (longitud de las plumas, color del iris, base de la mandíbula inferior, etc). Sin embargo, estas características sexuales varían con la temporada y con la edad del individuo y por lo tanto pueden causar confusión. Además, no hay forma de identificar el sexo de los juveniles ni a las crías a partir de su morfología externa. Al utilizar la técnica de PCR para determinar el sexo, se evitan dichos problemas (Griffiths *et al.*, 1992).

C. Determinación de sexo en *Sula nebouxii*.

En el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) el dimorfismo sexual (en tamaño, voz y pupilas aparentes) se presenta en las aves adultas, pero no en las crías. Las aves jóvenes únicamente pueden sexarse por diferencias morfométricas cuando alcanzan el tamaño asintótico bimodal, en el que las medidas de la ulna no se sobrelapan entre machos y hembras (Drummond *et al.*, 1991). Para establecer este método de identificación de sexo, se obtuvo una función discriminante a partir de una muestra (obtenida al azar) de 8 machos y 8 hembras obtenidas fuera del área de estudio, estas aves fueron sacrificadas y se les determinó el sexo mediante un examen de gónadas (Holmgren M. y Drummond H. No publicados; en Drummond *et al.*, 1991). Este método se corroboró en diferentes crías, y ha permitido los machos y las hembras puedan ser identificadas (mediante la longitud de la ulna) cuando alcanzan los 70 días de edad. Asimismo, la morfología del tejido gonadal es utilizada para identificar el sexo de las crías que mueren antes de los 100 días de edad (Drummond *et al.*, 1991). Las gónadas extraídas, son preservadas y posteriormente analizadas en el microscopio. En los machos se observan los canales seminíferos y las células de Leydig; y las hembras presentan túbulos sexuales y/o folículos que contienen células germinales en etapa de profase de la primera división meiótica (Drummond *et al.*, 1991). En ocasiones, las gónadas se descomponen y son difíciles de identificar por éste método.

Otro método por el que se puede corroborar el sexo de las aves, es por la diferencia de sonidos que emiten, ya que cuando son adultos los machos silban y las hembras graznan (Nelson, 1978). Sin embargo, esto sólo puede hacerse una vez que las aves regresan a la colonia para reproducirse varios años después. Para las hembras la primera anidación se da entre el primer y el sexto año de vida, mientras que para los machos es entre los dos y los seis años (Osorio-Beristain y Drummond, 1993).

El desarrollar un método molecular para identificar el sexo en el pájaro bobo de patas azules, puede ser de utilidad para conocer el sexo de todos los individuos desde etapas tempranas de su desarrollo. Así se puede obtener información para estudios de proporción de sexos, con la posibilidad de analizar un gran número de individuos en poco tiempo. Esto puede evitar pérdidas de información en casos en los que las crías desaparezcan del nido antes de cumplir los 70 días o bien en los que las crías mueran y no puedan ser sexadas por examinación gonadal por descomposición de las mismas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la técnica de AP-PCR para realizar análisis genéticos en el ave *Sula nebouxii* de la colonia de reproducción de la Isla Isabel (Nayarit, México).

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Encontrar marcadores genéticos (*loci* variables) que permitan hacer estudios intraespecíficos en la colonia.
- b) Analizar la posibilidad de utilizar dichos marcadores genéticos para realizar análisis de paternidad en estas aves.
- c) Analizar si alguno de los marcadores puede ser utilizado para determinar el sexo de los individuos.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

1. Zonas de estudio e individuos muestreados.

Se obtuvieron muestras de sangre de 200 individuos en 50 familias de pájaros bobos de patas azules (*Sula nebouxi*) durante marzo y abril de 1994. Las muestras se colectaron en Isla Isabel, una pequeña isla (1.3 x 1.7 km) en el Pacífico Mexicano, a 28km de la costa del estado de Nayarit (21°52'N 105°54'W).

Se colectaron 100 µl de sangre de cada individuo utilizando una lanceta estéril y un capilar. La sangre obtenida de la vena branquial se depositó en 1 ml de buffer de lisis (4M UREA, 0.2M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5% n-laurylsarcosine, 10mM EGTA (Seutin *et al.*, 1990)), donde se conservó a 4°C hasta su procesamiento. En cada tubo se anotó el número e identidad del individuo sangrado.

Se muestrearon familias de dos crías localizadas en dos zonas de estudio: Costa Fragatas y Playa de las Monas. En estas zonas se realiza un programa de investigación por Drummond y colaboradores, el cual involucra la anillación de adultos y el seguimiento del crecimiento de las crías desde su eclosión. A cada nido se le pone una marca y a cada una de las crías se les pone un anillo de diferente color, para identificar el orden de eclosión. A la edad de emplumado (alrededor de los 70 días) las aves son marcadas con anillos de acero permanentes, los cuales presentan numeración individual.

Para este trabajo se tomaron muestras únicamente en nidos en los que se tenía el registro del día de la puesta de los huevos, para poder seguir el desarrollo de los integrantes de cada nido. En los censos periódicos que se realizaron en ambas zonas de estudio, se registró el número de anillación de cada individuo, la fecha, el orden de eclosión de los huevos y la sobrevivencia de las crías. Después de obtener las muestras de sangre, se verificó la identidad registrada al sangrar a cada individuo, con aquella presentada en los registros periódicos.

2. Identificación de sexo de las crías.

Los pájaros bobos de patas azules presentan dimorfismo sexual. A los 70 días de edad, las distribuciones de las medidas de ulna de machos y hembras no se superponen entre sí, por lo que es posible determinar con alto grado de certidumbre, el sexo de las crías (Drummond *et al.*, 1991). Los datos obtenidos durante 1989 se utilizaron para identificar el sexo de las crías con base en las medidas de ulna a los 70 días. El sexo de las crías fue comparado posteriormente con los resultados obtenidos a partir de análisis moleculares utilizando la técnica de AP-PCR como marcador molecular.

2. PURIFICACION DE DNA .

Cada una de las muestras se procesó para la extracción del DNA mediante el siguiente protocolo (Maniatis *et al.*, 1982, con algunas modificaciones):

Se agregaron 2.5 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 10mM pH8.0, EDTA 0.1M pH 8.0, SDS 0.5%) a cada ml de mezcla de sangre y buffer de lisis. Se homogenizaron alrededor de 10 segundos hasta que desaparecieron los coágulos. Se añadieron 20µg/ml de RNAsa pancreática y se incubaron por una hora a 37°C. Posteriormente se agregó un volumen de fenol saturado con Tris-HCl, pH 8.0 y se mantuvo en agitación alrededor de 15 minutos. Cada muestra se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm en un rotor SS34 a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió un volumen de fenol/cloroformo-isoamílico (25/24:1), después de mezclar por 10 minutos se centrifugó a 6000 rpm (rotor SS34), 4°C. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se le añadió un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), se agitó durante 5 minutos y se centrifugó a 6000rpm (rotor SS34) 10 min. A la fase acuosa se le agregaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10M y un volumen de isopropanol frío. Se mezcló y se observó la precipitación del DNA. Posteriormente se dejó precipitando 30 min a -20°C, ó bien 10 min a -70°C, y después se centrifugó a 6000 rpm (rotor SS34) durante 10 minutos a 4°C y se decantó. Se realizaron tres lavados con etanol al 70% y la

pastilla de DNA se dejó secar a temperatura ambiente ó a 37°C. Posteriormente se resuspendió el DNA en 500-1000 µl de TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Se adicionó TE hasta que la solución dejó de ser viscosa.

3. CUANTIFICACION DEL DNA.

La concentración de DNA obtenido de cada una de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm). Para ello se consideró que 50 µg/ml de una solución de DNA de doble cadena tiene una absorbancia (densidad óptica) de 1.0 a 260 nm (Maniatis *et al.*, 1982). La pureza del DNA se obtuvo mediante la relación de absorbancias de las muestras a 260 y 280 nm. Las muestras puras de DNA tienen una relación de absorbancias de 260/280 de 1.8; cuando hay contaminación con fenol o con proteínas la relación de absorbancias disminuye (Maniatis *et al.*, 1982; Bruford *et al.*, 1992). La concentración y calidad del DNA se analizaron también mediante geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

4. TECNICA DE AP-PCR.

1. Preparación del DNA.

La cuantificación precisa del DNA es esencial para obtener patrones reproducibles de AP-PCR. Después de determinar la concentración de las soluciones de DNA, éstas fueron diluídas para realizar las amplificaciones. Estas soluciones se analizaron en geles de agarosa contra estándares de DNA para rectificar que todas las muestras presentaran la misma concentración. Con base en las concentraciones presentadas en los geles teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), las diluciones fueron ajustadas y verificadas de manera cuantitativa en otro gel. En algunos casos fue necesario un nuevo reajuste, por lo que se realizó un tercer gel para corroborar que las concentraciones de DNA fueran las

adecuadas. De esta manera se logró que todas las muestras presentaran la misma concentración de DNA.

2. Reacciones de amplificación.

El volumen final de las amplificaciones fue de 10 μ l. Cada muestra se cubrió con 20 μ l de aceite mineral. Para las reacciones de amplificación se utilizó una mezcla (solución A), que contenía la Taq polimerasa, el buffer 10x y los nucleótidos. Esta mezcla se guardaba a 4°C y era utilizada para realizar varios experimentos. Para las amplificaciones se agregaron los reactivos en el siguiente orden: aceite, solución A, mezcla B (que contenía los iniciadores y el cloruro de magnesio), y por último la solución de DNA. Para los controles negativos se preparaba la mezcla de reacción sin el DNA. Las concentraciones finales de las amplificaciones fueron las siguientes:

- 0.25 unidades de Taq (Promega)
- 5mM $MgCl_2$ (Promega)
- 2 mM de cada dNTP
- 2 μ M de iniciador
- 1 - 10 ng DNA
- Buffer 1X (Promega):
- 50mM KCl
- 10mM Tris-HCl (pH 9 a 25°C)
- 0.1% Triton X-100

3. Programa de PCR utilizado para las amplificaciones.

95°C (2 min), 1 ciclo; 94°C (1:10min), 40°C (3 min), 72°C (3 min), 5 ciclos; 94°C (1:10 min), 50 °C (1 min), 72°C (1:30 min), 34 ciclos; 72°C (10 min), 1ciclo; 30°C, mantener a esta temperatura.

El aparato empleado para las amplificaciones fue un termociclador marca HYBAID, modelo 1.

4. Análisis de los productos de reacción.

Al término de las reacciones de PCR, los tubos se guardaron a 4°C. A cada tubo se le agregaron 2.5µl de marcador 6X (ficoll 400, azul de bromofenol en TE pH 8.0) y posteriormente se analizaron los productos de reacción en geles de agarosa 2.5% (15 x 10cm). Se realizaron las electroforésis a 100V (en buffer TBE 0.5 X) hasta que el colorante alcanzó el final del gel. Los geles se tiñeron con bromuro de etido a concentración final de 0.5 µg/ml y posteriormente se fotografiaron. En cada uno de los geles se puso un marcador de peso molecular: DNA del fago ØX174 digerido con *HaeIII* o bien un marcador de pesos moleculares comercial (USB), con los que se analizaron los tamaños de los productos de reacción. Las muestras con reacciones positivas, se utilizaron en electroforésis en geles de acrilamida 4% (16 x 40 cm).

5. PREPARACION DE GELES DE ACRILAMIDA 4%.

1. Preparación de la solución de acrilamida 30%.

- Acrilamida 29 g
- Bisacrilamida 1 g
- Disolver la acrilamida y bisacrilamida en agua desionizada a un volumen final de 100ml.

2. Preparación de los geles de acrilamida 4%

1. TBE 10 X.

- Tris base 108 g
- Ácido bórico 55 g
- EDTA pH8.0 40 ml
- Agua desionizada a 1 lt

2. Solución A.

- TBE 10X 13 ml
- Acrilamida 30% (29:1) 17.3 ml
- Mezclar



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

3. Solución B.

- Agua desionizada 98.9 ml
- Persulfato de amonio 0.1 g
- Mezclar

Después de preparar las soluciones A y B, se filtraron al vacío (primero la A y posteriormente la B), de tal manera que quedaran en el mismo recipiente. Se utilizó un filtro millipore de 0.45 micras. Después de mezclar suavemente, se añadieron 39 µl de TEMED a la nueva solución. Se agitó y se vertió la acrilamida a los vidrios previamente preparados. Fue importante el evitar la formación de burbujas. Posteriormente se colocó el peine en la parte superior y se dejó solidificar durante dos horas.

Notas:

1. Se utilizó agua desionizada tanto para preparar los geles, como para hacer la tinción con plata.
2. Los vidrios, espaciadores y peine se lavaron con agua y jabón y después con etanol al 70%. Siempre se utilizaron guantes.
3. Los espaciadores (1.5mm) se unieron con un poco de vaselina; fue importante eliminar el exceso y no ensuciar los vidrios.

3. Electroforesis en geles de Acrilamida 4%.

Para las electroforesis primero se colocó buffer TBE 1X en la cámara de geles. Se removió el espaciador de la parte inferior de los vidrios, se quitó el peine y se eliminó el exceso de líquido de la parte superior del gel. Se colocaron los vidrios en la cámara de geles, y se limpiaron los carriles utilizando una pipeta Pasteur. Se puso una placa de metal sobre los vidrios, para evitar que se calentaran en exceso y se llenó la parte superior de la cámara con TBE 1X. Cada gel se recorrió 1 hr a 300V, tiempo durante el cual se prepararon y ordenaron las muestras de DNA. Cada tubo se mezcló y se centrifugó durante algunos segundos. Después se agregaron 10 µl de marcador ϕ X174/HaeIII (5ng/µl) en el primer carril y se realizaron las electroforesis durante 12 horas a 300V (30mA). En cada experimento se anotó el tiempo de inicio y término de la corrida, así como voltaje y amperaje iniciales y finales.

6. TINCION CON PLATA DE LOS GELES DE ACRILAMIDA 4%.

1. Solución fijadora (1 lt).

- Metanol absoluto 500 ml
- Agua desionizada 350 ml
- Ácido acético glacial 100 ml
- Glicerol al 50% 50 ml

2. Solución Oxidadora 10X (500 ml).

- Acido nítrico 1.0 ml
- Permanganato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 5.0 g
- Agregar agua a 500 ml

3. Solución 1 (tinción-reactivo de plata).

- Nitrato de plata ($AgNO_3$) 1.0 g
- Formaldehído (40%) 1.5 ml

Nota: es importante el pesar el nitrato de plata, disolver en agua desionizada, llevar casi a 1 litro. El formaldehído debe agregarse alrededor de 5 minutos antes de utilizar la solución.

4. Solución 2 (revelador).

- Tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) 0.02 g
- Carbonato de sodio (anhidro) (Na_2CO_3) 50.0 g
- Formaldehído (40%) 1.5 ml

Nota: Es importante el agregar el carbonato de sodio muy lentamente, evitando que se formen precipitados en el fondo. El formaldehído debe agregarse alrededor de 5 minutos antes de utilizar la solución.

5. Ácido Acético 10%

- Ácido acético 100 ml
- Agua desionizada 900 ml

6. Acido Acético 5%

- Acido acético 25 ml
- Agua desionizada 475 ml

7. Proceso de tinción de los geles.

Al término de cada electroforesis, se preparó el recipiente (acrílico) en el que se iba a realizar la tinción. Este recipiente se enjuagó y se lavó varias veces con agua desionizada. Se agregó la solución fijadora en el recipiente de tinción y posteriormente se colocó el gel en dicha solución. Es importante no tocar el gel en ningún momento. Se agitó, a baja velocidad, durante 30-40 minutos; después se eliminó el fijador (el cual se filtró y se guardó) y se agregó 1 litro de oxidador 1X sobre el gel. Se agitó vigorosamente durante 30 minutos y posteriormente se realizaron 6 lavados con agua desionizada. Cada lavado fue de alrededor de 10 minutos, con agitación. Aquí fue importante observar el color del gel y del agua. Después de los lavados el gel tenía un aspecto transparente. Durante los lavados se prepararon las soluciones 1 y 2. Después del último lavado con agua, se agregó el formaldehído a la solución 1, y se mezcló. Posteriormente se eliminó el agua del contenedor y se agregó la solución 1. Se agitó lentamente de 30 a 40 minutos. En este tiempo se prepararon la solución 2 y el ácido acético 10% y 5%. Alrededor de 5 minutos antes de que finalizara el tiempo de tinción (solución 1), se agregó el formaldehído a la solución 2 y se mezcló. Posteriormente se eliminó la solución 1 del contenedor, se dieron 2 lavados rápidos con agua desionizada (alrededor de 1.5 lt) y se agregó la solución 2. Se dejó el gel en agitación lenta y se observó cuidadosamente la aparición de las bandas. Con base a la intensidad de las mismas, se determinó de manera visual el tiempo para detener la reacción (alrededor de 4 minutos). En ese momento se agregó la solución de ácido acético 10%, y se dejó en agitación durante 5 minutos, hasta que desaparecieron las burbujas. Posteriormente se eliminaron las soluciones anteriores del recipiente y se agregó el ácido acético al 5%. Se dejó en agitación durante algunas horas para que se eliminara el color oscuro del fondo del gel y fuera más fácil observar el patrón de bandas. Después se cortaron las partes del gel que no resultaron informativas y se guardó el gel en una bolsa de plástico, agregando un poco de ácido acético 5% en el interior. Se

sellaron bien los extremos (con calor) evitando la formación de burbujas. Los geles se guardaron a 4°C y se fotografiaron.

7. ANALISIS DE LOS GELES.

En cada gel se analizó el patrón de bandas generado por cada iniciador. Se identificaron los iniciadores que generaban bandas intensas, variables y consistentes entre experimentos. Posteriormente, se asignó el tamaño de las bandas polimórficas, con base a marcadores de pesos moleculares. Se registró la presencia (+) y ausencia (-) de bandas informativas en cada uno de los geles, para cada uno de los individuos. Dos personas analizaron los geles de manera independiente. Después de comparar los resultados, se repitieron las amplificaciones y geles de las muestras en las que había ambigüedad en el análisis. La determinación de las frecuencias alélicas se realizó considerando a la presencia de la banda como alelo dominante (p) y a la ausencia de la misma, como alelo recesivo (q). Se consideró que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. La proporción de individuos que no presentan bandas es R, por lo tanto $q^2=R$ y $p=1-q$ (Lewis y Snow, 1992; Lynch y Milligan, 1994).

Análisis de paternidad:

Exclusión de paternidad: Después de registrar la presencia - ausencia de bandas en cada uno de los *loci*, se observó si por lo menos para uno de los *loci*, el macho (M) y laembra (H) del nido, presentaban fenotipos recesivos (ausencia de banda -) y el hijo presentaba fenotipo positivo (+). Dado que se están utilizando marcadores dominantes, ésta es la única forma en que se puede excluir al padre del nido, como verdadero padre, sin ambigüedad (Lewis y Snow, 1992).

8. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS.

1. Obtención de sondas a partir de los geles.

Se prepararon geles de agarosa de bajo punto de fusión 3%, o bien geles de acrilamida 4%. Se utilizaron las mismas condiciones de electroforesis que para realizar los geles de AP-PCR. Para las tinciones con plata fue necesario eliminar el ácido acético de la solución fijadora y la solución oxidadora, para evitar que el ácido acético ocasionara daños al DNA (Weaver *et al.*, 1994; Calvert *et al.*, 1995). Después de realizar las electroforesis se localizaron las bandas de interés y dichas bandas fueron extraídas utilizando pipetas pasteur estériles (de plástico). Los fragmentos obtenidos se colocaron en 50-100 μ l de agua destilada estéril. Las bandas obtenidas de agarosa, se calentaron a 80°C antes de ser reamplificadas. Para las bandas obtenidas de acrilamida, se dejaron alrededor de 2 hrs en agua ésteril y esa es la solución que se utilizó para la reamplificación. Utilizando estas soluciones, se realizaron las amplificaciones siguiendo las mismas concentraciones de reactivos que los utilizados para hacer las reacciones de AP-PCR, a excepción de la concentración final de cloruro de magnesio, la cual fue de 4 mM. El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente: 94°C (2 min), 1 ciclo; 94°C (1.1 min), 53°C (2min), 72°C (3 min), 34 ciclo; 72°C (10 min), 1 ciclo; 30°C (1 min), 1 ciclo.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa 2.5%.

2. AP-PCR utilizando nucleótidos radiactivos (32 P):

Se siguió el mismo protocolo de amplificación de AP-PCR, pero se incluyó la marca radiactiva (32 P) en la mezcla de reacción (4.0 μ Ci [32 P] dCTP). Al término de los ciclos, se combinaron 2 μ l de reacción con 10 μ l de formamida 80%, 10mM de EDTA, 0.025 mg/ml de azul de bromofenol y xylén cianol como colorante marcador. Las muestras se colocaron a 68°C durante 15 minutos para desnaturalizar el DNA y se realizaron las electroforesis en geles de secuenciación de DNA (acrilamida 4%, 50% UREA). Al término de la electroforesis se envolvieron los geles con plástico delgado y se autoradiografiaron.

RESULTADOS

1. OBTENCION DE DNA.

El rendimiento de DNA obtenido a partir de 100 μ l de sangre de cada individuo fue de alrededor de 200 μ g. En el Anexo se presenta una relación de las familias muestreadas y la concentración de DNA obtenida para cada uno de los individuos.

El DNA obtenido fue material de alto peso molecular (mayor a 20 KDa); esto se verificó mediante geles de agarosa 0.8% (Figura 1). Como se observa en la figura, el DNA obtenido no está degradado. La pureza del DNA se obtuvo a partir de la relación entre las unidades de absorbancia a 260 y 280nm, obtenidas mediante espectrofotometría. La relación 260/280 en general, dio valores mayores a 1.8, lo cual indica que el material obtenido es de buena calidad (Material y Métodos).

2. APLICACION DE LA TECNICA AP-PCR.

1. Visualización de los productos de PCR.

Al aplicar la técnica de AP-PCR para amplificar el DNA de *Sula nebouxii*, se buscaron las condiciones que permitieran una buena visualización de los productos obtenidos mediante PCR. Los iniciadores utilizados se seleccionaron de manera arbitraria. Estos habían sido diseñados para otros fines y se utilizaron en este trabajo como método para obtener información genética de la especie *Sula nebouxii* de Isla Isabel. En la Figura 2 se puede observar la diferencia entre los patrones de bandas obtenidos al analizar los productos de amplificación en geles de agarosa (teñidos con bromuro de etidio) y aquellos obtenidos en geles de acrilamida (teñidos con plata) (Material y Métodos). Con los geles de plata se obtuvo un mayor número de bandas, una mejor resolución y visualización de los fragmentos polimórficos. Los geles de agarosa no son adecuados para analizar variabilidad genética en esta población, por lo menos con los iniciadores y las condiciones de amplificación utilizadas.

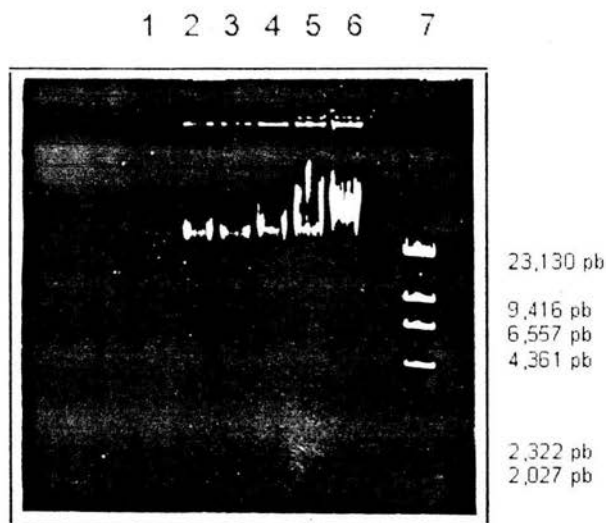
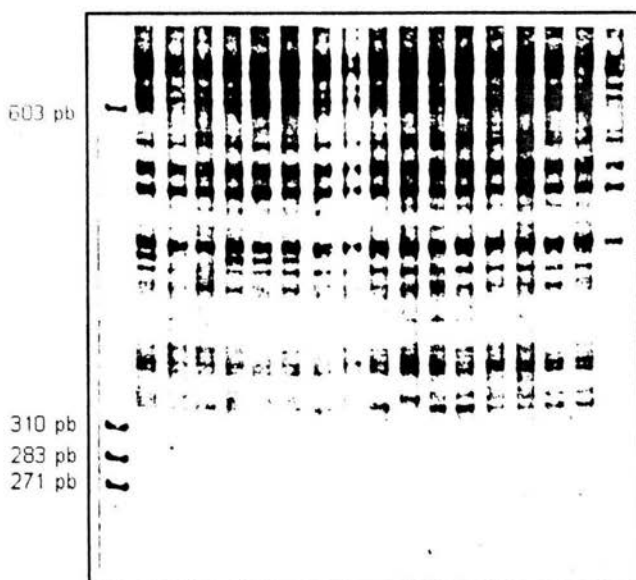


Figura 1. DNA de *Sula nebouxii*. Se muestra el DNA del pájaro bobo de patas azules obtenido a partir de las muestras de sangre colectadas en el campo. El material es de alto peso molecular y no está degradado. En los carriles 1-6 se presentan diferentes diluciones de DNA de un solo individuo. En el carril 7 se muestra el marcador de peso molecular (DNA del fago lambda digerido con *Hind*III). Se indican las pares de bases (pb) del marcador.

A) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



B) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

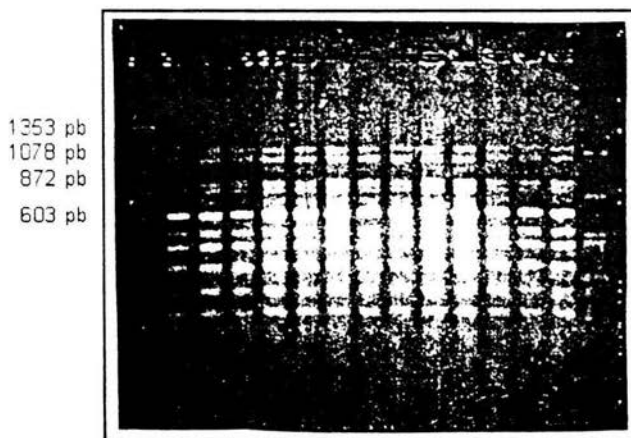


Figura 2. Diferencias entre geles de agarosa y acrilamida.

Comparación de los patrones de bandas obtenidos al amplificar el DNA utilizando el iniciador MEY7. A) Gel de acrilamida 4% (teñido con plata); B) Gel de agarosa 2.5% (teñido con bromuro de etidio). El marcador de peso molecular (M) es DNA del fago ØX174/Hae III. En cada carril hay DNA de diferentes individuos.

2. Análisis de los productos de PCR.

Se determinó cuales eran los iniciadores informativos al analizar los productos de las amplificaciones de DNA de 16 individuos adultos. Para corroborar si había bandas cuya variabilidad dependía de la concentración de DNA empleada en la amplificación, se utilizaron dos concentraciones diferentes de DNA para cada individuo (Figura 3). Al comparar los patrones de bandas obtenidos con los 18 iniciadores, se observó que en algunos casos (ej 3140, M13, CP1) todos los individuos presentaban un patrón de bandas muy similar, no había ninguna banda intensa y que pudiera ser utilizada como marcador genético. Con otros iniciadores (ej., MEY 1, MEY9, OP1, VarMX) el patrón de bandas obtenido fue difuso, únicamente se observó un barrido de bandas, no bien definidas. De los 18 iniciadores utilizados en las amplificaciones de DNA, 4 fueron informativos* (Tabla1). Fue muy importante conocer bien el patrón de bandas esperado para cada iniciador informativo antes de proseguir con los análisis.

Nota: Se consideraron **iniciadores informativos*** aquellos que mostraron por lo menos una banda variable, reproducible, consistente, de fácil localización, después de realizar varios experimentos. En algunos casos se observaba una banda variable y al repetir los geles dicha banda desaparecía, éstas bandas no fueron consideradas.

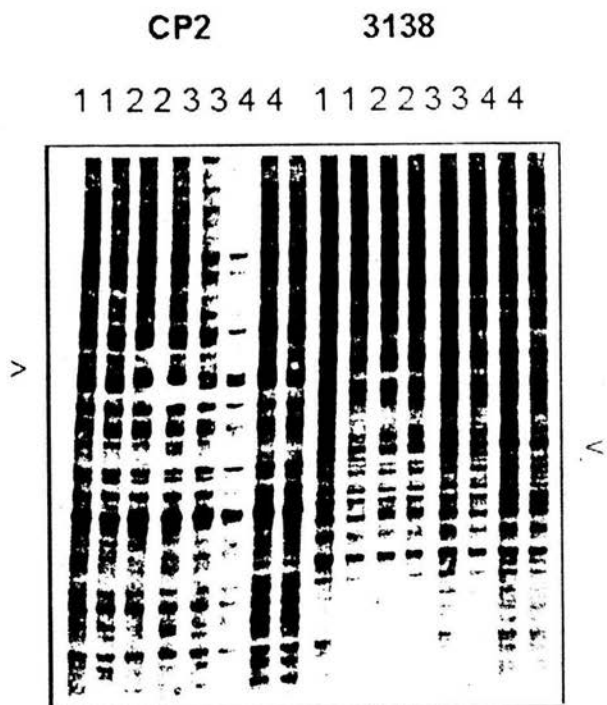


Figura 3. AP-PCR en *Sula nebouxi*. Patrón de bandas obtenido después de amplificar el DNA de cuatro individuos diferentes utilizando los iniciadores CP2 y 3138. Se utilizaron dos concentraciones de DNA para cada individuo, las cuales se colocaron en carriles adyacentes. La numeración de los carriles representa los cuatro individuos. Se indican las bandas polimórficas (<.>).

Tabla 2. Secuencia, longitud y contenido de GC de los diferentes iniciadores empleados en el estudio.

INICIADOR	SECUENCIA	%GC	LONG.
3137*	GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG	64.28	28 b
3138*	GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCTTGC	58.62	29 b
3140	GTCCTCAGGATCAAAGTATGTAC	41.66	24 b
MEY1	GTGTGACGGTTTGGGAGTTGATG	52.17	23 b
MEY4	TTATAGTAGGGTCAGGTGGG	50.00	20 b
MEY5B	ATGAACTACCTGGAAGAGCGCCA	52.17	23 b
MEY7*	GGAGTAGGGGATATGATCGATGGA	50.00	24 b
MEY8	CAGCAAACAGAAACCAGTCAG	47.61	21 b
MEY9	CTGACTGGTTTCTGTTTGCTG	47.61	21 b
CP1	GATGAGTTCGTGTCGGTACAACCTGG	52.00	25 b
CP2*	GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC	56.00	25 b
OP1	ATGGAGCAGCAGTCTGACCTG	57.10	21 b
OP4	CAGGTCAGACTGCTGCTCC	63.15	19 b
SCH1	ATGGAGTTTCTGCGCGGAGG	60.00	20 b
SCH2	CTTTCTGTCCGGGTCTGTGC	60.00	20 b
PROM3	AATGACTGGGCAGTGCTAAGG	52.38	21 b
VARMX1	GAAACTGGAGCAGAATGACGGGTCAGA	51.85	27 b
M13	GTA AACGACGGCCAGT	52.94	17 b

Nota: La longitud de los iniciadores se indica en número de bases; b=bases. * El asterisco indica cuales son los iniciadores informativos.

3. ANALISIS DE LOS INICIADORES INFORMATIVOS.

Los iniciadores considerados como informativos (dado el patrón de bandas polimórficas y su reproducibilidad) fueron los siguientes: CP2, 3137, 3138, MEY 7. Estos iniciadores tienen una longitud de entre 24 y 29 bases y su contenido de GC varía entre un 50 y un 64.28% (Tabla 1). Otros iniciadores con características similares no presentaron un patrón variable (ejemplo, CP1, VarMX).

En esta primera etapa del estudio, se utilizaron dos de los cuatro iniciadores informativos, para el análisis de DNA de 20 familias. El patrón de bandas obtenido para cada uno de los iniciadores informativos fue el esperado a partir de los experimentos preliminares.

4. ANALISIS CON EL INICIADOR CP2.

El iniciador CP2 está formado por 25 bases y presenta la siguiente secuencia 5'GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC 3'. Con este iniciador, los productos de amplificación fueron de alrededor de 31 bandas en cada individuo. La variabilidad de los fragmentos polimórficos encontrados en diferentes geles, fue de dos bandas polimórficas, localizadas muy cerca una de la otra alrededor de las 800 pb (Figura 4). Las bandas fueron denominadas A (banda superior) y B (banda inferior), *locus* CP2A y CP2B respectivamente.

Al analizar el patrón de bandas obtenido para los diferentes individuos se determinó la presencia (+) o ausencia (-) de las bandas polimórficas en cada uno de los loci para cada individuo (Tabla 2).

4.1 ANALISIS DEL LOCUS CP2A.

El total de individuos analizados para este *locus* fue de 40. Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran que la banda CP2A esta presente en 32 individuos y ausente en 8 individuos. Si consideramos que $q^2 = R$ y que $p = 1 - q$ podemos calcular la frecuencia de la banda CP2A en esta muestra. Por lo tanto q (alelo ausente: recesivo) = 0.447 y p (alelo presente: dominante) = 0.553.

4.2 ANALISIS DEL LOCUS CP2B.

De los 40 individuos analizados para este *locus*, se observa (Tabla 3) que en 11 individuos la banda estuvo ausente (q), y presente (p) en 29 individuos. En este caso la frecuencia génica para CP2B fue de $q=0.524$ y $p=0.476$.

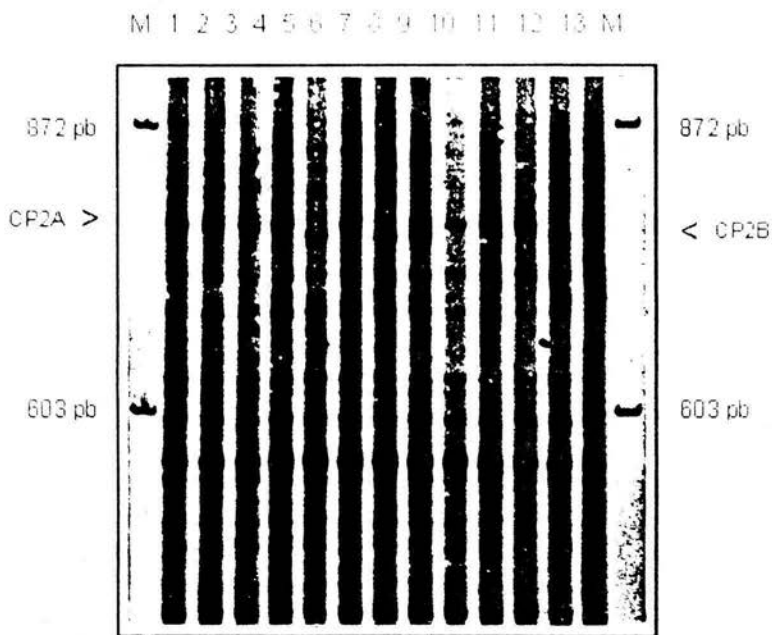


Figura 4. Bandas polimórficas de los loci CP2A y CP2B. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador CP2. Las muestras se analizaron en geles de acrilamida 4% teñidos con plata. Cada carril contiene DNA de un individuo diferente. Las bandas variables CP2A y CP2B y los pares de bases (pb) del marcador de peso molecular (fago ØX174/*Hae*III) se indican a los lados.

Tabla 2. Análisis del locus CP2A. Se amplificó el DNA de 80 individuos (20 familias) con el iniciador CP2. Los productos de amplificación se analizaron en geles de acrilamida 4% teñidos con plata. Se registró la presencia (+) o ausencia (-) de bandas polimórficas en cada uno de los individuos.

FAMILIA*	MACHO	HEMBRA	CRIA 1	CRIA 2
258/II	+	+	+	+
891/61	+	+	+	+
868/67	+	+	+	-
906/60	+	+	+	+
819/66	+	+	+	+
276/I	+	+	+	+
774/62	+	+	+	+
728/63	+	-	+	+
255/I	-	+	+	+
236/I	+	+	-	+
677/VI	-	+	+	+
695/VII	+	-	-	-
874/60	+	+	+	+
376/IV	+	-	+	+
510/47	+	+	+	+
926/51	+	-	-	+
518/49	+	-	+	+
625/49	+	+	+	+
758/60	+	+	+	+
771/62	-	+	+	+

* Notas: Cada familia corresponde a un nido. La nomenclatura indica el número de nido y el cuadrante o zona de estudio donde se localizaba ese nido.

Tabla 3. Análisis del locus CP2B. Se amplificó el DNA de 80 individuos (20 familias) con el iniciador CP2. Los productos de amplificación se analizaron en geles de acrilamida 4% teñidos con plata. Se registró la presencia (+) o ausencia (-) de bandas polimórficas en cada uno de los individuos.

FAMILIA*	MACHO	HEMBRA	CRIA 1	CRIA 2
258/II	+	-	+	-
891/61	+	+	+	-
868/67	+	+	+	+
906/60	+	+	+	+
819/66	+	+	+	+
276/I	-	-	-	-
774/62	+	+	-	+
728/63	+	+	+	+
255/I	+	-	+	+
236/I	+	+	+	+
677/VI	+	-	+	+
695/VII	+	+	+	+
874/60	+	+	-	+
376/IV	-	+	+	+
510/47	-	+	-	+
926/51	+	+	+	+
518/49	+	+	+	+
625/49	-	-	-	-
758/60	-	+	-	+
771/62	+	-	+	+

* Notas: Cada familia corresponde a un nido. La nomenclatura indica el número de nido y el cuadrante o zona de estudio donde se localizaba ese nido.

4.3. ANALISIS DE PATERNIDAD.

La presencia-ausencia de bandas obtenidas para cada uno de los *loci* analizados con el iniciador CP2 (*loci* CP2A y CP2B), indican que no hubo ninguna exclusión de paternidad (Tablas 2 y 3). Es decir, en ningún caso la banda estuvo ausente en la madre y el padre, pero presente en el hijo (Materiales y Métodos). Estos resultados representan muy poca información para poder determinar paternidad de manera precisa en la colonia. Es por ello necesario, aumentar el número de iniciadores informativos para poder hacer análisis poblacionales de paternidad en *Sula nebouxii* (Discusión).

5. EJEMPLO DE EXCLUSION DE MATERNIDAD UTILIZANDO LA TECNICA DE AP- PCR.

En el conjunto de muestras analizadas para los *loci* CP2A y CP2B, no se obtuvieron casos de exclusión de paternidad. Sin embargo, en una de las familias estudiadas (258/II), se presentó un caso interesante: había dos hembras al cuidado de un sólo nido. En este caso se puede ejemplificar la utilización de la técnica de AP-PCR para determinar, cual de las dos hembras era la madre de las crías. Se amplificó el DNA de los 5 individuos (macho, hembra A, cría 1, cría 2, hembra B), utilizando los 4 iniciadores informativos.

Tabla 4. Ejemplo de exclusión de maternidad. Se utilizaron 4 iniciadores informativos para analizar la maternidad en un nido en el que había dos hembras (Hembra A y Hembra B).

Locus	M	HA	C1	C2	HB
CP2 A	+	+	+	+	+
CP2B	+	-	+	-	+
3137	-	+	-	+	+
3138	-	-	+	-	+
MEY7	-	-	+	+	+

* M= macho; HA= Hembra A; C1= Cría 1;

C2= Cría 2; HB= Hembra B.

Los productos de amplificación analizados en electroforesis de acrilamida indican la ausencia de la banda polimórfica en los padres (M,HA), para el *locus* 3138, y la presencia de dicha banda en la cría 1 (C1) y en la hembra B (HB). Por lo tanto, hay una exclusión de maternidad para una de las crías (Tabla 4, Figura 5). Asimismo, para el iniciador MEY 7 también se observa la ausencia de la banda polimórfica en la hembra A (HA) y en el padre (M), y la presencia en ambas crías (C1, C2). La madre B presentó también dicha banda, por lo tanto, utilizando este conjunto de iniciadores se podría asumir que esta hembra (HB) es la verdadera madre de las crías 1 y 2.

6. MARCADOR DE SEXO.

6.1. ANALISIS DEL *LOCUS* 3137.

El iniciador 3137 presenta la siguiente secuencia: - 5'GAAACTGGCCTCCA-AACACTGCCCGCCG-3', y una longitud de 28 bases. Al analizar el patrón de bandas obtenido al utilizar el iniciador 3137, se observó la presencia de una banda intensa, variable entre individuos, localizada en la región cercana a las 400 - 500 pares de bases (Figura 6). La banda estuvo presente en todas las hembras adultas y ausente en todos los machos adultos, a excepción de uno (Tabla 4). El sexo de las crías determinado de acuerdo con las diferencias morfométricas entre machos y hembras (Drummond et al., 1991), correspondió en todos los casos con aquel predicho mediante la ausencia o presencia de la banda polimórfica. Sin embargo, el sexo de las crías 2 de las familias 868, 819 y 510 no pudo ser verificado mediante el tamaño de la ulna, ya que éstas murieron antes de cumplir los 70 días de edad. Por lo tanto, la presencia/ausencia de bandas correspondió con el sexo de hembras/machos en 76 individuos, de los 80 analizados mediante AP-PCR.

Los resultados obtenidos en este *locus*, no pudieron ser utilizados para análisis de paternidad, pero sí como marcador de sexo para diferenciar mediante muestras de DNA a hembras y machos de la población, independientemente de su edad. En el macho adulto del nido 255 fue el único caso donde un macho

haya amplificado una banda que migre a la misma distancia de la banda polimórfica obtenida al amplificar con este iniciador. La manera de identificar el sexo de los individuos y evitar que se puedan presentar este tipo de problemas, es clonando la banda variable y utilizándola como sonda.

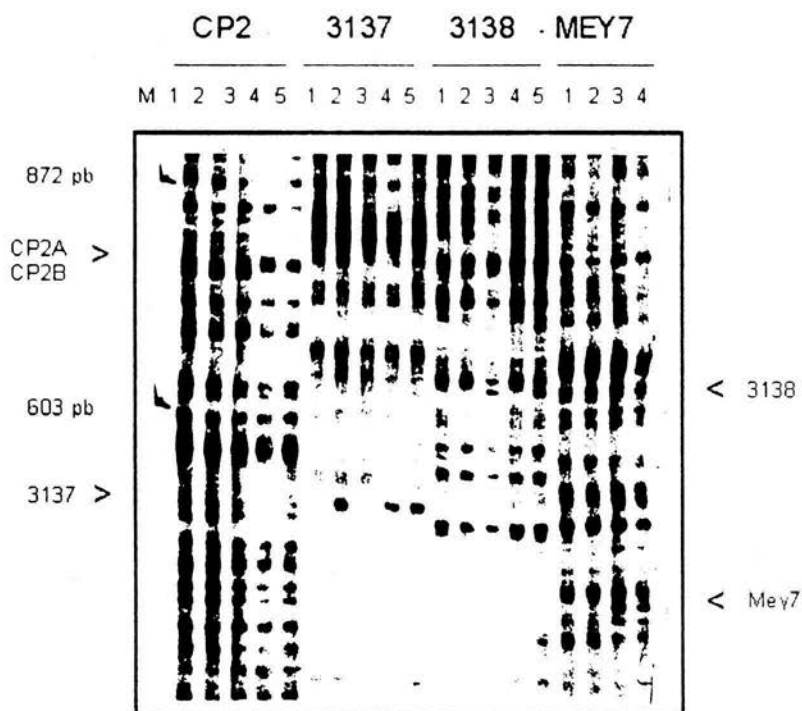


Figura 5. Ejemplo de exclusión de maternidad. AP-PCR de las muestras de DNA de la familia 258, en la que había dos posibles madres. Los productos de amplificación obtenidos con los cuatro iniciadores informativos (CP2, 3137, 3138, MEY7) fueron analizados en gels de acrilamida 4% teñidos con plata. La numeración corresponde a cada uno de los individuos: 1= macho, 2= hembra A, 3= cría 1, 4= cría 2, 5= hembra B. Se indica la región de las bandas polimórficas para cada iniciador (<math><<,>></math>), y los pares de bases (pb) del marcador $\varnothing X174/HaeIII$.

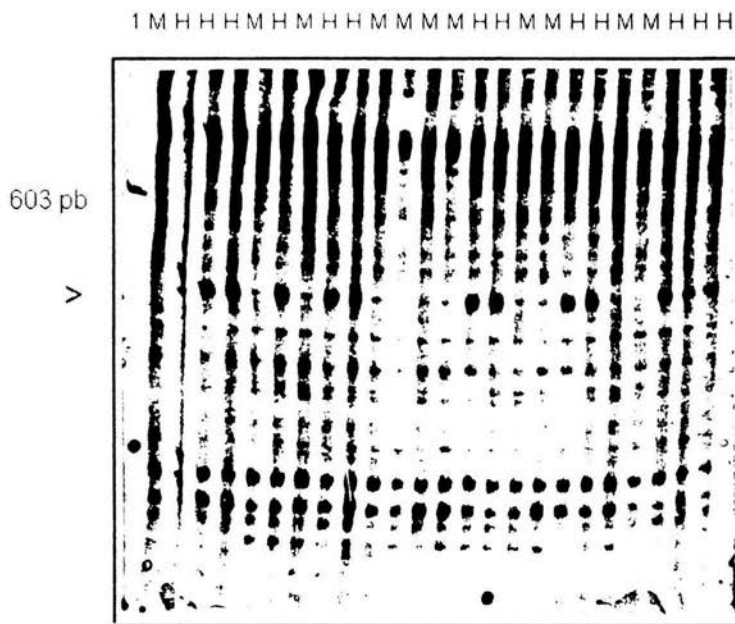


Figura 6. Marcador de sexo. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador 3137 y analizados en geles de acrilamida 4% teñidos con plata. La banda polimórfica está presente en las muestras correspondientes a hembras (H) y ausente en machos (M). Se indica la región de la banda polimórfica (<, >) y los pares de bases (pb) del marcador de peso molecular (\emptyset X174/HaeIII).

Tabla 5. Análisis del locus 3137. Se amplificó el DNA de 80 individuos (20 familias) utilizando el iniciador 3137. Los productos de amplificación se analizaron en geles de acrilamida 4% teñidos con plata. Se registró la presencia (+) y ausencia (-) de la banda polimórfica en cada uno de los individuos analizados.

FAMILIA*	MACHO	HEMBRA	CRÍA 1	CRÍA 2
258/II	-	+	-	+
891/61	-	+	+	+
868/67	-	+	+	-
906/60	-	+	+	-
819/66	-	+	-	-
276/I	-	+	+	+
774/62	-	+	-	-
728/63	-	+	+	-
236/I	-	+	+	+
677/VI	-	+	-	+
695/VII	-	+	-	-
874/60	-	+	+	-
376/IV	-	+	+	-
510/47	-	+	+	+
926/51	-	+	+	-
518/49	-	+	-	+
625/49	-	+	-	+
758/60	-	+	-	-
771/62	-	+	-	-
255/I	+	+	+	+

* Notas: Cada familia corresponde a un nido. La nomenclatura indica el número de nido y el cuadrante o zona de estudio donde se localizaba ese nido.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

7. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS.

Al realizar el análisis preliminar de la variabilidad genética obtenida con los diferentes iniciadores, se presentaron algunos problemas técnicos, principalmente con el método de tinción con plata y con la resolución de los geles. Por lo tanto, se utilizaron técnicas alternativas para intentar evitar dichos problemas.

7.1 AP-PCR utilizando nucleótidos radiactivos (^{32}P).

Se realizaron ampliaciones de DNA mediante AP-PCR, utilizando nucleótidos radiactivos (^{32}P). Los productos marcados radiactivamente fueron corridos directamente en electroforesis de secuenciación (acrilamida 4%, UREA 50%) y analizados mediante autoradiografía. Los primeros experimentos no produjeron resultados positivos; para continuar con estos experimentos es necesario realizar diversas modificaciones y ajustes y así poder obtener resultados reproducibles y de alta calidad. Los resultados preliminares sugieren que puede ser un camino alternativo para realizar estudios poblacionales en el bobo de patas azules.

7.2 Obtención de fragmentos polimórficos.

Otra estrategia alternativa fue el intentar obtener marcadores específicos (mono-locus) para esta especie. Es decir, se trató de extraer una banda particular (polimórfica) obtenida mediante AP-PCR, para reamplificarla y posteriormente tener una sonda especie-específica. Se realizaron varias pruebas utilizando tanto geles de agarosa de bajo punto de fusión como geles de acrilamida. El obtener bandas de los geles de acrilamida teñidos con plata resulta complicado, debido al parecer el ácido acético daña el DNA. Sin embargo, después de realizar modificaciones al método de tinción con plata y a las condiciones de PCR (Material y Métodos) se logró obtener la amplificación de algunas de las bandas polimórficas (Figura 7). Las bandas de interés se purificaron varias veces (Material y Métodos). Fue importante mantener reducida la concentración de

MgCl₂ en las reacciones de PCR, para evitar que se generen bandas inespecíficas.

Una vez reamplificada la banda, se realizaron experimentos de "dot-blot". Para corroborar si las bandas obtenidas eran las esperadas, se utilizaron productos de PCR en los que la banda había estado presente y en los que la banda había estado ausente. Desafortunadamente, en todos los casos hubo hibridación de la sonda (banda purificada y marcada) con el DNA de todos los individuos. Esto se debe a que probablemente los fragmentos polimórficos obtenidos contenían bandas no visibles las cuales fueron reamplificadas durante la purificación del fragmento.

Si bien no se obtuvieron los resultados esperados al utilizar estas estrategias alternativas, estas sí representan un camino a seguir para obtener mayor información al realizar este tipo de estudios.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

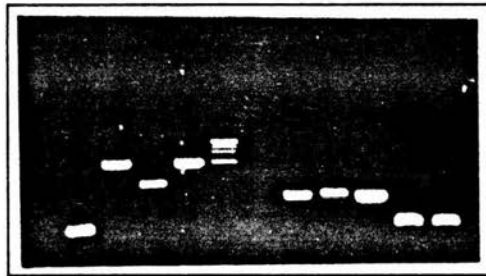


Figura 7. Obtención de bandas polimórficas. En los carriles 1-11 se presentan algunas bandas que fueron obtenidas de geles de acrilamida 4% y posteriormente reamplificadas y analizadas en geles de agarosa 3%. El marcador de peso molecular (M) se uso como referencia para determinar el peso de los fragmentos.

DISCUSION

A. APLICACION DE LA TECNICA DE AP-PCR:

En este estudio se demuestra la aplicación de la técnica de AP-PCR a estudios genéticos en *Sula nebouxii*. Este es el primer estudio, a nivel molecular, que se realiza en la población de pájaros bobos de patas azules de la Isla Isabel, Nayarit, México. Se utilizó la técnica de AP-PCR por las ventajas que ésta representa (costo, tiempo) para realizar estudios preliminares en especies en las que no se cuenta con información previa de la secuencia de DNA de los organismos (Welsh y McClelland, 1990).

Al utilizar RAPDs (AP-PCR) es conveniente emplear DNA de alto peso molecular, que no esté degradado (Hadrys *et al.*, 1992). El DNA de *Sula nebouxii* obtenido a partir de las muestras de sangre, presentó estas características. A pesar de que las purificaciones se realizaron varios meses después de la colecta, el material no estaba degradado, lo cual indica que la sangre puede permanecer en el amortiguador de lisis durante varios meses, sin que se altere la calidad del material genético que se va a extraer (Seutin *et al.*, 1990). La cantidad de recuperación del DNA fue de alrededor de 200 µg de DNA a partir de 100 µl de sangre (Anexo). Esto es suficiente para realizar múltiples experimentos, puesto que para cada reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se requieren unos cuantos nanogramos (ej. 1-10ng por reacción).

La mayoría de los estudios con RAPDs han mostrado un nivel significativo de polimorfismos entre individuos dentro de una población (Hardys *et al.*, 1992). Al amplificar el DNA de *Sula nebouxii* se obtuvieron productos de reacción con los 18 iniciadores utilizados. Sin embargo, los patrones de bandas generados por cada iniciador resultaron muy similares entre los individuos analizados, es decir, se detectó poca variabilidad entre las aves estudiadas. Esto pudiera estar relacionado con diferentes parámetros: tamaño de los iniciadores, contenido de GC, temperatura de alineamiento, concentración de magnesio, métodos de

separación y detección de polimorfismos, características del genoma que se está estudiando, entre otros.

El tamaño del iniciador determina el grado de especificidad del mismo al genoma que se está investigando. Se ha sugerido que incrementos en el tamaño del iniciador pueden incrementar la unión no específica y por lo tanto aumentar la probabilidad de tener patrones de amplificación no reproducibles (Hadrys *et al.*, 1992). Sin embargo, al amplificar DNA mediante iniciadores arbitrarios se ha demostrado la obtención de resultados reproducibles utilizando iniciadores de tamaños diversos, desde 5 hasta 30 bases (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Weising *et al.*, 1995). Los iniciadores con los que se obtuvieron bandas polimórficas (consistentes y reproducibles), en el bobo de patas azules, presentaron una longitud de 24 a 29 bases; mientras que aquellos de menor tamaño 17 y 19 bases no presentaron bandas variables. Por lo que no se encontró asociación entre el tamaño del iniciador y la producción de bandas polimórficas. Con la finalidad de detectar un mayor número de bandas variables entre individuos de la población, sería interesante monitorear más iniciadores, probar algunos de menor tamaño y por último intentar combinaciones de dos iniciadores diferentes. Esto último ha resultado un método eficiente para incrementar el número de bandas polimórficas observadas (Welsh y McClelland, 1991; Stiller y Denton, 1995).

Los iniciadores empleados para monitorear el DNA de *Sula nebouxii*, fueron diseñados para otros fines, lo cual es una característica de la técnica de AP-PCR, ya que ésta no requiere de un conjunto específico de iniciadores y estos son empleados sin importar la secuencia del genoma al cual se van a unir (Welsh y McClelland, 1990). Estos iniciadores presentaron entre un 41.66 y 64.28% de GC. Se ha reportado que el alto contenido en GC de los iniciadores puede ser un factor importante para obtener una elevada discriminación entre bandas (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Fritsch *et al.*, 1993, en Rossetto *et al.*, 1995). En este trabajo, a pesar del alto contenido en GC de los iniciadores, no hubo una elevada producción de bandas polimórficas. Es recomendable utilizar oligos que

presenten un contenido de GC similar al del genoma que se está estudiando, ya que así se maximiza la frecuencia de los sitios de unión y por lo tanto la obtención de productos de amplificación (Hadrys *et al.*, 1992). El contenido de GC en aves es similar al de mamíferos, es decir, de 40 a 44% (Sibley y Ahlquist, 1990). En este trabajo no se observó que los iniciadores con valores de GC similares al contenido de GC en el genoma de las aves, presentaran diferencias respecto a los de mayor contenido de GC.

La concentración de magnesio empleada en las amplificaciones, debe ser ajustada para cada especie en estudio. Al parecer una elevada concentración de magnesio favorece las interacciones entre el iniciador y el DNA (Welsh y McClelland, 1990). En este trabajo la concentración de magnesio empleada, fue elevada (5mM) y esto pudiera estar relacionado con la producción de patrones de amplificación con todos los iniciadores probados.

Es importante considerar también la severidad de la PCR (en relación a la temperatura). Primero, se utilizaron pocos ciclos donde la temperatura fue baja (40°C) y posteriormente hubo varios ciclos a mayor temperatura (50°C). Durante los ciclos poco severos los iniciadores se unen a muchas secuencias con la posibilidad de malos apareamientos (Welsh y McClelland, 1990). El grado de amplificación de dichas secuencias va a depender de la eficiencia de la unión iniciador/DNA y de la eficiencia de la extensión (Welsh y McClelland, 1990). En las primeras etapas predominan aquellos que se unen mejor al DNA y en las últimas predominan los que se amplifiquen con mayor eficiencia (Welsh y McClelland, 1990). Al parecer, al incrementar la temperatura de alineamiento se puede disminuir el número de productos amplificados (Caetano-Anollés *et al.*, 1991). En futuros experimentos, sería conveniente variar la temperatura de alineamiento, y determinar de manera precisa cual es la temperatura a que se obtienen los patrones de bandas más informativos.

Las condiciones experimentales empleadas al utilizar AP-PCR (RAPDs) deben maximizar la eficiencia en la separación y detección de los fragmentos de DNA, ya que si éstos no son los adecuados puede haber pérdida de información

(Caetano-Anollés *et al.*, 1991; en Jones *et al.*, 1994). En los experimentos realizados en *Sula nebouxii*, se utilizaron geles de agarosa para verificar que hubiera productos de reacción en las amplificaciones; sin embargo, el análisis de los fragmentos se realizó a partir de geles de acrilamida teñidos con plata, ya que con ello se obtuvo una mejor separación y resolución de las bandas de menor peso molecular. En la primera etapa del desarrollo experimental se determinó el tiempo necesario para obtener la mejor separación en los patrones de bandas obtenidos (fragmentos de 1300 a 400 pb) al realizar las electroforesis.

Un problema evidente fue el de la tinción con plata, ya que el grado de tinción de los geles y la calidad de los mismos fue variable entre experimentos. Fue difícil estandarizar las condiciones de tinción para lograr homogeneidad entre geles, por lo que únicamente se consideraron como informativas, aquellas bandas intensas, fácilmente distinguibles, que se encontraban en una zona fácil de analizar.

Las condiciones de amplificación y detección del DNA de *Sula nebouxii*, si bien generaron patrones de bandas con los diferentes iniciadores, algunos de estos fueron difusos y, por lo tanto, difíciles de interpretar. Esto es usual al emplear AP-PCR, pues después de monitorear un gran número de iniciadores, se deben seleccionar aquellos con los que se obtengan resultados consistentes; los que generen bandas que sean variables entre experimentos deben ser ignorados (Fukatsu e Ishikawa, 1994). De los 18 iniciadores diferentes que se probaron en este trabajo, únicamente 4 generaron bandas polimórficas, intensas, reproducibles, que resultaron útiles para realizar análisis genéticos en el bobo de patas azules.

La técnica de AP-PCR (RAPD) ha sido criticada, en ocasiones, por la dificultad de generar resultados reproducibles y confiables. Cuando las amplificaciones son realizadas en condiciones poco severas, puede haber una baja especificidad en la amplificación (Fukatsu y Ishikawa, 1994). Esto genera patrones de bandas que pueden ser fácilmente afectados por ligeros cambios en la composición de la mezcla de AP-PCR (cantidad de DNA, MgCl₂, la Taq

polimerasa, el iniciador), el perfil de temperatura, etc (Hadrys *et al.*, 1992, Williams *et al.*, 1993; Fukatsu y Ishikawa, 1994). Se ha señalado también que el número e intensidad de los productos de amplificación puede variar según los métodos empleados para teñir el gel (Hadrys *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993)

Los experimentos aquí presentados fueron realizados bajo las mismas condiciones de amplificación, utilizando los mismos reactivos. En los experimentos preliminares se ajustaron las condiciones de reacción, y para realizar los análisis sólo se emplearon aquellos oligos que generaban patrones de bandas consistentes. En cada experimento, se analizó que el patrón de bandas (para ese iniciador) correspondiera al obtenido en los experimentos preliminares, que las bandas informativas migraran a la distancia esperada (en relación a los marcadores de pesos moleculares) y que estas bandas no fueran dependientes de la concentración de DNA empleada (Fig. 3). Con ello se lograron obtener resultados reproducibles. Una vez estandarizadas las condiciones para emplear AP-PCR en el bobo de patas azules, se requiere de un análisis más amplio para buscar mayor número de marcadores polimórficos.

En este estudio preliminar se emplearon dos de los cuatro iniciadores informativos (CP2 y 3137), para ejemplificar la utilización de ésta técnica en estudios genéticos en *Sula nebouxii* (Figs. 4,5 6). Los resultados obtenidos con ambos iniciadores demuestran el tipo de preguntas que se pueden resolver. Por una parte, se sugiere la posibilidad de utilizar AP-PCR para realizar análisis de paternidad, y por otra se hace referencia a la obtención de un marcador molecular de sexo utilizando iniciadores arbitrarios en esta especie.

PATERNIDAD:

El iniciador CP2 generó dos bandas polimórficas en el DNA de las aves analizadas, estas bandas fueron consideradas como los *loci* CP2A y CP2B. Al registrar la presencia-ausencia de dichos fragmentos, no hubo ninguna exclusión de paternidad (Materiales y Métodos). En este estudio, únicamente se ejemplifica la aplicación de esta técnica para realizar análisis de paternidad, utilizando la información obtenida en sólo 2 *loci* (Fig. 4; Tablas 2 y 3). Al trabajar con marcadores dominantes, la información que se puede obtener es limitada, en comparación a la que se obtiene al utilizar marcadores codominantes. Se ha sugerido que para poder asignar paternidad de manera precisa utilizando AP-PCR, se requiere del análisis de alrededor de 50 *loci* (Snow y Lewis, 1992). Esto complica los análisis y es por ello necesario contar con los marcadores adecuados, para realizar un estudio completo en la población de *Sula nebouxii*.

Una forma de obtener más *loci* polimórficos, es realizando un análisis más amplio utilizando un mayor número de iniciadores. Es necesario encontrar aquellos que se generen patrones polimórficos y evitar los que produzcan patrones de amplificación monomórficos (Hadrys *et al.*, 1992). Una vez determinados los iniciadores que generen patrones polimórficos, es posible obtener mayor información si se utilizan aquellos marcadores en los que alelo recesivo (ausencia de banda) tenga las frecuencias alélicas altas (>0.7) (Snow y Lewis, 1992). A pesar del alto número de *loci* que se necesita analizar para realizar estudios de paternidad, en muchas ocasiones se puede obtener más de un *locus* variable con cada iniciador.

Una vez encontrados los marcadores adecuados (número de *loci* y características específicas de dichos *loci*), se podrá realizar un análisis de paternidad completo en la colonia, es decir, se podrá determinar la probabilidad de paternidad del supuesto padre (padre que está en el nido), respecto a la probabilidad que otros machos en la colonia sean los verdaderos padres. Será posible analizar también los niveles de variación genética existentes en la

población. Dado que los individuos en la colonia de pájaros bobos de Isla Isabel, son altamente filopátricos (Osorio-Beristain y Drummond, 1993), sería interesante analizar mediante estas técnicas moleculares si hay endogamia entre dichos individuos.

MARCADOR DE SEXO:

El otro iniciador empleado (3137) generó resultados interesantes: una banda variable, intensa, presente en hembras adultas, pero ausente en machos adultos. El iniciador 3137 al parecer es capaz de amplificar una región particular del cromosoma sexual de las hembras (cromosoma W) (Fig.6).

En las aves el sexo está determinado por las hembras, y en algunos estudios se ha demostrado la aplicación de la técnica de amplificación de DNA por iniciadores arbitrarios para determinar el sexo en diferentes especies de aves (Griffiths *et al.*, 1992; Griffiths y Tiwari, 1993). El contar con un iniciador capaz de amplificar esta región del DNA de las hembras en *Sula nebouxii*, permitirá utilizar esta técnica como método para identificar el sexo de los individuos, desde etapas tempranas de su desarrollo; inclusive permitirá determinar el sexo de los embriones en los casos en los que los huevos no lleguen a eclosionar. De esta manera, utilizando AP-PCR, no será necesario que las crías alcancen los 70 días de edad para que machos y hembras puedan ser identificados mediante características morfológicas (Drummond *et al.*, 1991). Además, se corre el riesgo de que en este tiempo algunos individuos desaparezcan o mueran y por lo tanto se pierda esta información. Esto ocurrió en las segundas crías de los nidos 868, 819, 510, analizadas en este trabajo. Estas crías desaparecieron de los nidos antes de los 70 días y por lo tanto no se pudo corroborar el sexo obtenido mediante AP-PCR, con aquel predicho por tamaño.

Para corroborar que esta banda obtenida en las hembras efectivamente corresponde a un fragmento del cromosoma W de *Sula nebouxii*, es conveniente aislar este fragmento y clonarlo, de tal manera que se pueda utilizar como sonda. Esto permitirá determinar el sexo de una gran cantidad de individuos en un

período de tiempo corto, mediante dot-blot (Griffiths, 1992, Griffiths y Twari, 1993). Además, al clonar la banda se evitará que pueda haber comigración de fragmentos no homólogos que se encuentren a la misma distancia en el gel, por tener el mismo tamaño (Hadrys *et al.*, 1992, Lynch y Milligan, 1994, Weising, *et al.*, 1995).

Se ha reportado que los iniciadores empleados para determinar el sexo en algunas especies pudieran ser utilizados en especies relacionadas (Griffiths y Twari, 1993). Por ello, sería interesante probar si el iniciador 3137, puede ser empleado para identificar el sexo en especies relacionadas, tanto el bobo café (*Sula leucogaster*) como otros Pelecaniformes que también habitan en Isla Isabel. Sería interesante utilizar esta técnica para hacer estudios filogenéticos en estas especies.

La aplicación de la técnica de AP-PCR a estudios en *Sula neboxii*, permitirá desarrollar nuevos marcadores moleculares tanto en esta especie, como en otras aves marinas. Esto incrementa el tipo de estudios y experimentos que se pueden realizar, a corto y largo plazo.

PERSPECTIVAS:

Los posibles experimentos a realizar a futuro, siguiendo esta línea de investigación, son innumerables. Es importante desarrollar marcadores moleculares que permitan analizar con más detalle la variación genética entre los individuos de la población. Esto puede realizarse mediante diferentes estrategias experimentales:

A) AP-PCR. Para continuar con los experimentos de AP-PCR, es necesario monitorear un mayor número de iniciadores para localizar más *loci* variables. Sería conveniente utilizar iniciadores de diferente tamaño, hacer variaciones en la temperatura de alineamiento, e intentar hacer amplificaciones combinando algunos de los iniciadores.

B) AP-PCR con DNA pos o pre-digerido. Una forma de obtener mayor número de polimorfismos es al digerir el DNA con enzimas de restricción antes o después de realizar la amplificación. Esto puede resultar en patrones de bandas menos complejos y por lo tanto más fáciles de interpretar o en la generación de polimorfismos entre muestras que antes eran indistinguibles (Ceatano-Anollés *et al.*, 1993; Grattapaglia *et al.*, 1992, en Weising *et al.*, 1995). Así se puede incrementar el número de marcadores disponibles, o bien se pueden generar marcadores codominantes (Fritsch y Rieseberg, 1992, Ceatano-Anollés *et al.*, 1993, en Weising *et al.*, 1995).

B) AP-PCR utilizando ^{32}P . Al amplificar el DNA mediante iniciadores arbitrarios utilizando nucleótidos radiactivos, se puede obtener mayor resolución de las bandas, y por lo tanto más precisión en los análisis (Fukatsu e Ishikawa, 1994). Este método permite analizar un gran número de muestras de manera simultánea (hasta 100 muestras por gel). Esto facilita los análisis y la comparación de patrones de bandas entre un gran número de individuos

utilizando diferentes iniciadores, eliminando así, las posibles diferencias existentes entre geles al realizar tinciones con plata.

C) Utilizar fragmentos de DNA como sondas A partir de los fragmentos obtenidos mediante AP-PCR, es posible generar sondas que puedan ser utilizadas para realizar hibridaciones tipo Southern, lo cual puede generar resultados más precisos. Se evita la posibilidad de comigración de las bandas, y se pueden generar sondas mono-locus especie-específicas. Es importante, a corto plazo, aislar y clonar el fragmento correspondiente al marcador de sexo en estas aves, por las aplicaciones inmediatas que esto representa.

D) Desarrollar la técnica de microsatélites Esta técnica permite realizar análisis precisos, mediante la obtención de marcadores codominantes, mono-locus, especie-específicos, donde además se tiene la ventaja de utilizar PCR para obtener los resultados. Sería interesante, a largo plazo, desarrollar la técnica de microsatélites para hacer análisis genéticos en *Sula neboxii*, lo cual permitiría realizar estudios precisos y altamente informativos. Se podrían analizar individuos cuya historia y parentesco (aproximado) es conocido y cuya conducta sexual es altamente visible. Además estos estudios permitirían obtener datos sobre la variabilidad genética de la población, para determinar si hay endogamia entre los individuos.

CONCLUSIONES

- 1) La técnica de AP-PCR resultó un método adecuado para buscar marcadores moleculares en el DNA de *Sula nebouxii*.
- 2) Se detectaron pocos *loci* polimórficos entre los individuos analizados, bajo las condiciones experimentales empleadas.
- 3) Se encontró un *locus* informativo que fue variable entre hembras y machos, por lo que éste podría ser utilizado como marcador molecular para determinar el sexo en el bobo de patas azules.
- 4) Se establecieron las bases preliminares para la realización de análisis de paternidad en la colonia de *Sula nebouxii* de Isla Isabel.

BIBLIOGRAFIA

- Amos, B. and Pemberton, J. 1992. DNA Fingerprinting in non-human populations. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2:857-860.
- Armour, J. A.L. and Jeffreys, A. J. 1992. Biology and applications of human minisatellite loci. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2:850-856.
- Avise, C. John. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. USA.
- Berumen, J., Casas, L., Hernández, A., Segura, E., Medina, R., Larriva, J. 1994. Diversidad genética de tres sondas de DNA en la huella digital de DNA de una población mexicana. *Revista de Investigación Clínica*, 46: 457-464.
- Birkhead, T.R., Atkin, L. and Moller A.P. 1987. Copulation behaviour of birds. *Behaviour*, 101:101-138.
- Birkhead, T.R., Pellatt, J. and Hunter, F.M. 1988. Extra-pair copulation and sperm competition in the zebra finch. *Nature*, 344:60-62.
- Birkhead, T.R. and Hunter, F.M. 1990. Mechanisms of sperm competition. *Trends in Ecology and Evolution*, 5, 48-52.
- Birkhead, T.R., Burke, T., Zann, R., Hunter, F.M., and Krupa, A.P. 1990. Extrapair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches *Taeniopygia guttata*, revealed by DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27:315-324.
- Birkhead, T.R. and Moller, A.P. 1992. *Sperm competition in Birds. Evolutionary causes and consequences*. Academic Press. Pp. 219-247.
- Boellstorff, D., Owings, D.H. and Penedo, M.C.T. 1994. Reproductive behavior and multiple paternity of California ground squirrels. *Animal Behavior*, 47:1057-1064.
- Borowsky, R.L., McClelland, M., Cheng, R. and Welsh, J. 1995. Arbitrarily primed DNA Fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: The *Xiphophorus Model*. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 6:1022-1032
- Burke, T. and Bruford, M.W. 1987. DNA Fingerprinting in birds. *Nature*, 327:149-152.

Burke, T., Davies, N.B., Bruford, M.W. and Hatchwell, B.J. 1989. Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA Fingerprinting. *Nature*, 338:249-251.

Burke, T. 1989. DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. *Trends in Ecology and Evolution*, 4:139-144.

Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J. and Wolff, R. 1991. *DNA Fingerprinting. Approaches and Applications*. Ed. Birkhauser Germany.

Burke, T. 1994. Spots before the eyes: molecular ecology. *Trends in Molecular Ecology and Evolution*, 9:355-357.

Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.K., Burke, T. 1992. *Single-locus and multilocus DNA fingerprinting*. Chapter 8. In *Molecular Genetic Analysis of Population. A practical approach*. Ed. Hoelzel, A.R. Oxford University Press. Pp. 226-267

Bruford, M.W. and Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, 939-943.

Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. DNA Amplification Fingerprinting: A strategy for Genome Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 4:294-307.

Calvert, R. J., Weghorst, C.M. and Buzard, G.S. 1995. PCR amplification of silver-stained SSCP bands from cold SSCP gels. *Biotechniques*, 18,5: 782-786.

Castillo, A.C. and Chavez-Peon, M.C. 1983. Ecología reproductiva e influencia del comportamiento en el control de número de crías en el bobo de patas azules *Sula nebouxii* en la Isla Isabel, Nayarit. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Devlin, B., Roeder, K. and Ellstrand, C. 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 369-380.

Drummond, H., Gonzalez, E. and Osorno, J.L. 1986. Parent-offspring cooperation in Blue-footed Booby (*Sula nebouxii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19:365-372.

Drummond, H., Osorno, J.L., Torres, R., García-Chavelas, C. and Merchant Larios, H. 1991. Sexual size dimorphism and sibling competition: implications for avian sex ratios. *The American Naturalist*, 138, 3:623-641.

- Ellegren, H. 1991. Fingerprinting birds' DNA with synthetic polynucleotide probe (TG). *The Auk*, 108:956-958.
- Ellegren, H., Lifjeld, J.T., Slagsvold, T. and Primmer, C.R. 1995. Handicapped males and extrapair paternity in pied flycatchers: a study using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 1995, 4:739-744.
- Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fukatsu, T. and Ishikawa, H. 1994. Differentiation of aphid clones by arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 3, 187-192.
- Gibbs, H.L., Weatherhead, P.J., Boag, P.T., Bradley, N.W., Tabak, L.M. and Hoysak, D.J. 1990. Realized reproductive success of polygynous red-winged blackbirds revealed by DNA markers. *Science*, 250:1394-1397.
- Gill, P., Jeffreys, A. and Werret, D.J. 1985. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318: 577-579.
- Gowaty, P.A. and Karlin, A.A. 1984. Multiple maternity and paternity in single broods of apparently monogamous eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 15:91-95.
- Gowaty, P. 1985. Multiple parentage and apparent monogamy in birds. *Ornithology Monography*, 37:11-21.
- Gowaty, P.A. and Bridges, W.C. 1991. Behavioral, demographic, and environmental correlates of extra-pair fertilizations in eastern blue birds (*Sialia sialis*). *Behavioral Ecology*, 2:339-350.
- Gowaty, P. A. 1995. *Field studies of parental care in birds: new data focus questions on variation among females*. *Avances in Study of Behavior*. Eds. C.T. Snowdon and J.S. Rosenblatt.
- Griffiths, R. and Holland, P. 1990. A novel avian W chromosome DNA repeat sequence in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Chromosoma*, 99:243-250.
- Griffiths, R., Tiwari, B. and Becher, S.A. 1992. **The identification of sex in the starling *Sturnus vulgaris* using a molecular DNA technique.** *Molecular Ecology*, 1:191-194.

- Griffiths, R., Tiwari, B. and Becher, S.A. 1992. The identification of sex in the starling *Sturnus vulgaris* using a molecular DNA technique. *Molecular Ecology*, 1:191-194.
- Griffiths, R. and Tiwari, B. 1993. The isolation of molecular genetic markers for identification of sex. *Proceedings of National Academic Society, USA*, 90:8324-8326.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245-250.
- Guerra, M. and Drummond, H. 1995. Reversed sexual size dimorphism and parental care: minimal division of labour in the blue-footed booby. *Behaviour*, 132:479-496.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1:55-63.
- Haig, S.M., Rhymer, J.M. and Heckel, D.G. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Molecular Ecology*, 3:581-595.
- Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology*, 7:1-52.
- Hanotte, O., Bruford, M.W. and Burke, T. 1992. Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. *Heredity*, 68:481-494.
- Harada, T., Matsukawa, K., Sato, T., Ishikawa, R., Niizeki, M. and Saito, K. 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica*, 65:87-91.
- Hartley, I.R., Shepherd, M., Robson, T. and Burke, T. 1993. Reproductive success of polygynous male corn buntings (*Miliaria calandra*) as confirmed by DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology*, 4: 310-317.
- Hartley, I.R., Davies, N.B., Hatchwell, B.J., Desrochers, A., Nebel, D. and Burke, T. 1995. The polygynandrous mating system of the alpine accentor, *Prunella collaris*. II. Multiple paternity and parental effort. *Animal Behaviour*, 49:789-803.
- Hill, G., William. 1987. DNA Fingerprints applied to animal populations. *Nature*, 327: 98-99.

- Hormaza, J.I., Dollo, L., and Polito, V.S. 1994. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* (Pistachio, Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Economic Botany*, 48,4 349-358
- Hunter, F.M., Burke, T. and Watts. 1992. Frequent copulation as a method of paternity assurance in the northern fulmar. *Animal Behaviour*, 44 149-156
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985a. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.
- Jeffreys, A.J., and Morton, D.B. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics*, 18:1-15.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neuman, R. and Keyte, J. 1988. Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, 16:10953-10971.
- Jones, C.S., Okamura, B. and Noble, L.R. 1994. Parent and larval RAPD fingerprints reveal outcrossing in freshwater bryozoans. *Molecular Ecology*, 3:193-199.
- Kempnaers, B., Verheyen, G.R., VandenBroeck, M., Burke, T., Bandroeckhoven, C. and Dhondt, A.D. 1992. Extra-pair paternity results from female preference for high quality males in the blue tit. *Nature*, 357:494-496.
- Kohn, M., Knauer, F., Stoffella, A., Schroder, W. and Paabo, S. 1995. Conservation genetics of the european brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*, 4:95-103.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C. and Bonfante, P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology*, 4:61-68.
- Lack, D. 1968. *Ecological adaptations for breeding in birds*. Methuen and Co., London.
- Lewis, O. and Snow, A.A. 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 1:155-160.
- Lifjeld, J.T. and Robertson, R.J. 1992. Female control of extra-pair fertilizations in Tree Swallows. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 31:89-96.

- Lifjeld, J.T, Dunn, P.O, Robertson, R. J. and Boag, P.T. 1993. Extra-pair paternity in monogamous tree swallows. *Behavioral Ecology*, 45:213-229.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable Microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44:397-401.
- Longmire, J.L., Maltbie, M., Pavelka, R.W., Smith, L.M., Witte, S.M., Ryder, O.A., Ellsworth, D. and Baker, R.J. 1993. Gender Identification in birds using microsatellite DNA Fingerprinting analysis. *The Auk*, 110, 2: 378-381.
- Lynch, M. 1988. Estimation of relatedness by DNA Fingerprinting. *Molecular Ecology and Evolution*, 5, 5:584-599.
- Lynch, M. and Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3:91-99.
- Mailer, R.j., Scarth, R. and Fristensky, B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus L.*) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical Applied Genetics*, 87:697-704.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miyaki, C.Y., Hannotte, O., Wajntal, A. and Burke, T. 1992. Sex typing of *Aratinga* parrots using the human minisatellite probe 33.15. *Nucleic Acids Research*, Vol.20, 19: 5235-5236.
- Mock, D.W. 1983. *On the study of avian mating systems*. In: Perspectives in Ornithology, Brush A.H. and Clark G.A. (eds.), Cambridge University Press, London. Pp. 55-84
- Moller, A.P. 1988. Paternity and parental care in the swallow, *Hirundo rustica*. *Animal Behaviour*, 36:996-1005.
- Moller, A.P. 1991. Density-dependant extra-pair copulations in the swallow *Hirundo rustica*. *Ethology*, 87:316-329.
- Morin, P.A., Wallis, J., Moore, J.J. and Woodruff, D.S. 1994. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Molecular Ecology*, 3, 469-478.
- Morton, E.S., Forman, L. and Braun, M. 1990. Extrapair fertilizations and the evolution of colonial breeding in purple martins. *The Auk*, 107:275-283.

- Morton, E.S. 1987. Variation in mate guarding intensity by male purple martins. *Behaviour*, 101:211-224.
- Nakamura, Y., Leppert, P., O'Connell, R., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, M., Hoff, M., Kuhlman, E. and White, R. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235:1616-1622.
- Nelson, J.B. 1978. *The Sulidae: gannets and boobies*. Oxford University Press, London.
- Oring, L.W., Fleischer, R.C., Reed, J.M. and Marsden, K.E. 1992. Cockoldry through stored sperm in the sequential polyandrous spotted sandpiper. *Nature*, 359:631-633.
- Osorio-Berinstain, M. and Drummond, H. 1993. Natal dispersal and deferred breeding in the blue-footed booby. *The Auk*, 110, 2:234-239.
- Osorio-Berinstain, M. 1994. Sistema de apareamiento en el pajarito bobo de patas azules (*Sula nebouxi*). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Parker, G.A. 1984. *Sperm competition and the evolution of mating strategies*. En Smith RL, Ed. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, London, pp:1-60.
- Pena, S.D.J. and Chackraborty, R. 1994. Paternity testing in DNA era. *Trends in Genetics*, 10, 6: 204-209
- Primmer, C.R., Moller, A.P. and Ellegren, H. 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4, 493-498.
- Prus, S.E. and Schmutz, S.C. 1987. Comparative efficiency and accuracy of surgical and cytogenetic sexing in Psittacines. *Avian Diseases*, 31:420-424.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trend in Ecology and Evolution*, 8, 8:285-288.
- Quinn, T.W., Cooke, F. and White, B.N. 1990. Molecular sexing of geese using a cloned Z chromosomal sequence with homology to the W chromosome. *The Auk*, 107:199-202.
- Rafaski, A. J. and Tinger, S.T. 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9, 8:275-280.

Riedy, M.F., Hamilton III, W.J. and Aquadro, C.F. 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD-PCR. *Nucleic Acids Research*, 20, 4:918.

Riley, H.T., Bryant, D.M., Carter, R.E. and Parkin, D.T. 1995. Extra-pair fertilizations and paternity defence in house martins, *Delichon urbica*. *Animal Behaviour*, 49:495-509.

Rossetto, M., Weaver, P.K. and Dixon, K.W. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Molecular Ecology*, 4:321-329.

Scribner, K.T., Arntzen, J.W. and Burke, T. 1994. Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo-bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite and multilocus minisatellite data. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 5:737-748.

Seutin, G., White, B.N. and Boag, P.T. 1990. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 82-90.

Sibley G.C. and Ahlquist J.E. 1990. *Phylogeny and classification of birds*. Yale University Press. New Haven, London. Pp. 62-64.

Signer, E.N., Schmidt, C.R. and Jeffreys, A.J. 1994. DNA variability and parentage testing in captive Waldrapp ibises. *Molecular Ecology*, 3:291-300.

Silva, M.C. and Batt, C.A. 1995. Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency. *Molecular Ecology*, 4:11-16.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503.

Stiller, J.W. and Denton. 1995. One hundred years of *Spartina alterniflora* (Poaceae) in Willapa Bay, Washington: random amplified polymorphic analysis of invasive population. *Molecular Ecology*, 4:355-363.

Taberlet, P. and Bouvet J. 1991. A single plucked Feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk*, 108:959-960.

- Talbert, L.E., Blake, N.K., Chee, P.W., Blake, T.K. and Maygyar, G.M. 1994. Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 87:789-794.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 16:6463-6471.
- Tegelström, H. and Höggren, M. 1994. Paternity Determination in the Adder (*Vipera berus*) - DNA fingerprinting or random amplified polymorphic DNA? *Biochemical Genetics*, 32, 718:249-256.
- Tiersch, T., Mumme, R., Chandler, R. and Nakamura, D. 1991. The use of flow cytometry for rapid identification of sex in birds. *The Auk*, 108:206-207.
- Trivers, R.L. 1972. *Parental investment and sexual selection*. In "Sexual selection and the descent of man." Ed. B.G. Campbell. Aldine Chicago. Pp. 136-179.
- Trivers, R.L. 1985. *The primary sex ratio*. Chapter 11. In "Social Evolution" (Trivers R.L.). Benjamin Cummings: Menlo Park, Ca. Pp. 271-299.
- Vassart, G., Carter, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre A.S. and Christophe, D. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 235:683-684.
- Weatherhead, P.J. and Montgomerie, R.D. 1991. Good news and bad news about DNA Fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 6:173-174
- Weaver, K., Caetana-Anolles, G., Gresshoff, P. and Callahan, L. 1994. Isolation and cloning of DNA amplification products from silver stained polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 16:226-227.
- Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44:388-396.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Meyer W. 1995. *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press. USA
- Welsh, J. and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 24: 7213-7218.
- Welsh, J., Honeycutt, R.J., Mc Clelland, M. and Sorbal, B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical Applied Genetics*, 82:473-476.

Welsh, J., Honeycutt, R.J., McClelland, M. and Sorbal, B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical Applied Genetics*, 82:473-476.

Westneat, D. 1990. Genetic parentage in indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27:67-76.

Wetton, J.H., Carter, R.E., Parkin, D.T. and Walters, D. 1987. Demographic study of wild house sparrow population by DNA Fingerprinting. *Nature*, 327:147-149.

Williams, J.G.K, Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.

Wong, Z., Wilson, V., Jeffreys, A.J. and Thein, S.L. 1986. Cloning a selected fragment from a human DNA fingerprint: Isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acids Research*, 14:4605-4616.

Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S. and Jeffreys, A.J. 1987. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals of Human Genetics*, 51:269-288.

ANEXO

GISTRO DE DNA DE CADA UNO DE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS

Muestra	Individuo	DNA (ug/ml)
1	274/I Macho	200.0
2	274/I Hembra	302.5
3	274/I Cría 1	152.5
4	274/I Cría 2	247.5
5	276/I Macho	260.0
6	276/I Hembra	335.0
7	276/I Cría 1	245.0
8	276/I Cría 2	335.0
9	255/I Macho	270.0
10	255/I Hembra	290.0
11	255/I Cría 1	265.0
12	255/I Cría 2	220.0
13	236/I Macho	335.0
14	236/I Hembra	110.0
15	236/I Cría 1	295.0
16	236/I Cría 2	200.0
17	1062/I Macho	162.5
18	1062/I Hembra	297.5
19	1062/I Cría 1	312.5
20	1062/I Cría 2	200.0
21	221/II Macho	155.0
22	221/II Hembra	160.0
23	221/II Cría 1	155.0
24	221/II Cría 2	130.0
25	302/II Macho	175.0
26	302/II Hembra	140.0
27	302/II Cría 1	225.0
28	302/II Cría 2	220.0
29	258/II Macho	302.5
30	258/II Hembra A (S/A)	282.5
31	258/II Cría 1	182.5
32	258/II Cría 2	220.0
33	258/II Hembra B (B648)	202.5
34	299/II Macho	305.0
35	299/II Hembra	360.0
36	299/II Cría 1	247.5
37	299/II Cría 2	312.5
38	410/IV Macho	255.0

39	410/IV Hembra	475.0
40	410/IV Cría 1	260.0
41	410/IV Cría 2	245.0
42	405/IV Macho	90.0
43	405/IV Hembra	75.0
44	405/IV Cría 1	212.5
45	405/IV Cría 2	150.0
46	427/IV Macho	360.0
47	427/IV Hembra	340.0
48	427/IV Cría 1	262.5
49	427/IV Cría 2	205.0
50	376/IV Macho	197.5
51	376/IV Hembra	250.0
52	376/IV Cría 1	117.5
53	376/IV Cría 2	130.0
54	291/IV Macho	380.0
55	291/IV Cría 1	465.0
56	663/IV Macho	205.0
57	663/IV Hembra	167.5
58	663/IV Cría 1	220.0
59	663/IV Cría 2	147.0
60	692/IV Macho	317.5
61	692/IV Hembra	420.0
62	692/IV Cría 1	595.0
63	692/IV Cría 2	375.0
64	677/VI Macho	165.0
65	677/VI Hembra	197.5
66	677/VI Cría 1	247.5
67	677/VI Cría 2	187.5
68	695/VI Macho	167.5
69	695/VI Hembra	142.5
70	695/VI Cría 1	227.5
71	695/VI Cría 2	215.0
72	353/14 Macho	220.0
73	353/14 Hembra	245.0
74	353/14 Cría 1	342.5
75	353/14 Cría 2	362.5
76	538/47 Macho	185.0
77	538/47 Hembra	102.0
78	538/47 Cría 1	95.0
79	538/47 Cría 2	105.5
80	510/47 Macho	325.0
81	510/47 Hembra	197.5
82	510/47 Cría 1	207.5

83	510/47 Cria 2	275.0
84	512/49 Macho	230.0
85	512/49 Hembra	165.0
86	512/49 Cria 1	165.0
87	512/49 Cria 2	000.0
88	518/49 Macho	202.2
89	518/49 Hembra	242.5
90	518/49 Cria 1	380.0
91	518/49 Cria 2	247.5
92	625/49 Macho	322.5
93	625/49 Hembra	310.0
94	625/49 Cria 1	235.0
95	625/49 Cria 2	200.0
96	926/51 Macho	362.5
97	926/51 Hembra	307.5
98	926/51 Cria 1	172.5
99	926/41 Cria 2	162.5
100	923/52 Macho	240.0
101	923/52 Hembra	105.0
102	923/52 Cria 1	95.0
103	923/52 Cria 2	335.0
104	938/52 Hembra	95.0
105	299/53 Macho	305.0
106	299/53 Hembra	360.0
107	299/53 Cria 1	247.5
108	299/53 Cria 2	312.5
109	612/55 Macho	230.0
110	612/55 Hembra	452.5
111	612/55 Cria 1	285.0
112	612/55 Cria 2	225.0
113	874/60 Macho	230.0
114	874/60 Hembra	182.5
115	874/60 Cria 1	107.5
116	874/60 Cria 2	122.5
117	906/60 Macho	177.5
118	906/60 Hembra	137.5
119	906/60 Cria 1	225.0
120	906/60 Cria 2	190.0
121	900/60 Macho	360.0
122	900/60 Hembra	327.5
123	900/60 Cria 1	55.0
124	900/60 Cria 2	280.0
125	758/60 Macho	422.5
126	758/60 Hembra	480.0

127	758/60 Cria 1	215 0
128	758/60 Cria 2	222 5
129	874/60 Macho	230 0
130	874/60 Hembra	182 5
131	874/60 Cria 1	107 5
132	874/60 Cria 2	122 5
133	891/61 Macho	210 0
134	891/61 Hembra	265 0
135	891/61 Cria 1	250 0
136	891/61 Cria 2	240 0
137	774/62 Macho	160 0
138	774/62 Hembra	00 0
139	774/62 Cria 1	105 0
140	774/62 Cria 2	105 0
141	771/62 Macho	642 5
142	771/62 Hembra	455 0
143	771/62 Cria 1	227 0
144	771/62 Cria 2	310 0
145	864/62 Macho	240 0
146	862/62 Hembra	187 5
147	862/62 Cria 1	265 0
148	862/62 Cria 2	177 5
149	728/63 Macho	325 0
150	728/63 Hembra	105 0
151	728/63 Cria 1	530 0
152	728/63 Cria 2	295 0
153	769/63 Macho	245 0
154	769/63 Hembra	275 0
155	769/63 Cria 1	180 0
156	769/63 Cria 2	255 0
157	706/63 Macho	70 0
158	706/63 Hembra	167 5
159	706/63 Cria 1	127 5
160	706/63 Cria 2	215 0
161	759/63 Macho	72 5
162	759/63 Hembra	165 0
163	759/63 Cria 1	180 0
164	759/63 Cria 2	247 0
165	702/63 Macho	130 0
166	702/63 Hembra	87 5
167	702/63 Cria 1	92 5
168	702/63 Cria 2	195 0
169	724/64 Macho	82 5
170	724/64 Hembra	57 5

171	724/64 Cria 1	10.0
172	724/64 Cria 2	42.5
173	797/64 Hembra	320.0
174	735/65 Macho	130.0
175	735/65 Hembra	212.5
176	735/65 Cria 1	267.5
177	735/65 Cria 2	142.5
178	819/66 Macho	247.0
179	819/66 Hembra	160.0
180	819/66 Cria 1	150.0
181	819/66 Cria 2	245.0
182	884/67 Macho	60.0
183	884/67 Hembra	335.0
184	884/67 Cria 1	70.0
185	884/68 Cria 2	145.0
186	868/67 Macho	202.2
187	868/67 Hembra	200.0
188	868/67 Cria 1	125.0
189	868/67 Cria 2	240.0
190	471/68 Macho	75.0
191	471/68 Hembra	285.0
192	471/68 Cria 1	152.0
193	471/68 Cria 2	390.0
194	470/68 Macho	220.0
195	470/68 Hembra	175.0
196	470/68 Cria 1	165.0
197	470/68 Cria 2	202.5
198	42A Macho	500.0
199	42A Hembra	400.0
200	42A Cria 1	100.0

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugh Drummond, muchas gracias por la confianza y por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Dr. Hugh Drummond, Dra. Carmen Gómez, Dra. Rocio Vargas, Dra. Elena Alvarez-Buylla, Dr. Jesús Aguirre y Dr. Luis Eguiarte por las revisiones y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Jaime Berumen y a la Escuela Militar de Graduados de Sanidad por todo el apoyo y por la constructiva estancia de investigación que realicé durante varios meses en el laboratorio multidisciplinario de investigación. Al Dr. Richard Borowsky y a la Universidad de Nueva York (NYU) por todas las facilidades y apoyo para el desarrollo experimental de este proyecto. A Fundación UNAM por la beca de apoyo que me permitió realizar la estancia de investigación en la ciudad de Nueva York. A la National Geographic Society (# 4535-91), a DGAPA-UNAM (proyecto IN211491) y al Centro de Ecología de la UNAM, por el financiamiento para la realización de esta investigación. A SEDESOL por el permiso para trabajar en Isla Isabel. A la Armada de México y a los pescadores de San Blas por todo el apoyo logístico durante la estancia en Isla Isabel. A Arturo Hernandez, Leonora Casas, Pilar Figueroa y Luis Espinasa por todo el apoyo técnico en el laboratorio.

Muchas gracias a todas las personas que me han apoyado y a todos los que siempre han estado ahí. A mi abuela Emilia, tios y primos gracias por todo su cariño y apoyo. A Jason Kimball por tantos momentos inolvidables. A Eduardo del Corral por lo importante que es pensar.... muchas gracias por todo. A Rocio Gomez por una amistad tan especial. A Yolanda, Beatriz, Cristina, Tere y Adriana por muchas horas de alegre compañía, por todo su apoyo y amistad. A Alexis y Daniel por estar ahí en todo momento. A Lucia, Carla, Gino, Norma, Alejandra, Gaby y Mario por todo lo que hemos aprendido estos años. A Carmen Gómez, Jesús, Don Mike, Rafael, Fernando y Juan, muchas gracias por todas sus porras y constante apoyo emocional y académico. Al Dr. Jorge Armando Barriguete, por toda la paciencia y profesionalismo. A la Dra. Rocio Vargas, por tanta confianza y apoyo desde el inicio del proyecto. A Kuei-chiu y Tswakai, por hacer más divertido el trabajo en el laboratorio y por una buena amistad. A Alejandra Nuñez por toda la ayuda en la colecta de las muestras de sangre en Isla Isabel. A Cristina, Marcela, Roxana y al Dr. Constantino Macías por su constante apoyo. A Helene Albrechtsen por la ayuda en la corrección de estilo del manuscrito. A todos los que hicieron de mi estancia en NY una experiencia única, muchas gracias.