

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Instituto de Biología

COMPARACIÓN GENÉTICA ENTRE
POBLACIONES AISLADAS DEL CONEJO
ZACATUCHE *Romerolagus diazi* (MAMMALIA:
LAGOMORPHA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

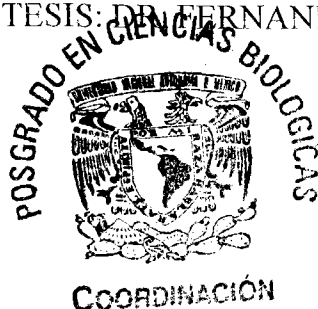
P R E S E N T A

ANGÉLICA PATRICIA CAMPOS CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2005





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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Angélica Patricia Campos Chávez

FECHA: 11/Nov/05

FIRMA: P.A. Moisés M-ZV.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) del(a) alumno(a) **CAMPOS CHÁVEZ ANGÉLICA PATRICIA** con número de cuenta **89315370** con la tesis titulada: **Comparación Genética entre poblaciones aisladas del conejo zacatuche Romerolagus diazi (Mammalia: Lagomorpha)**, bajo la dirección del(a) **Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza**.

Presidente:	Dr. Juan Núñez Farfán
Vocal:	Dra. Virginia León Regagnon
Secretario:	Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza
Suplente:	Dr. Joaquín Arroyo Cabrales
Suplente:	Dr. Adrián Nieto Montes de Oca

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de septiembre del 2005


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado mediante la beca crédito con número de registro 158347.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), por el apoyo otorgado mediante una beca complementaria.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Fernando A. Cervantes, Dr. Juan Núñez Farfán y Dr. Adrián Nieto Montes de Oca, por las valiosas contribuciones durante el desarrollo del proyecto y en las revisiones del manuscrito final.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los comentarios del la Dra. Virginia León Regagnon, del Dr. Joaquín Arroyo Cabrales, del Dr. Fernando A. Cervantes, del Dr. Adrián Nieto Montes de Oca y del Dr. Juan Núñez Farfán, quienes fueron miembros del jurado y cuyas sugerencias enriquecieron de manera significativa este documento.

A la Dra. Enedina Jiménez y a todas las personas que me apoyaron con material y asesoría durante mi estancia en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

A mis compañeros del Laboratorio de Mastozoología del Instituto de Biología, especialmente a Ernestina, Martha, Marcela, Adriana, Julieta, Yolanda, Irelia y Jesús, con lo cuales he convivido durante mi trabajo en el laboratorio.

A la M. en C. Laura Márquez por su apoyo, asesoría, consejos y amistad que me ha brindado.

Al Dr. Fernando Cervantes por darme la oportunidad de incursionar en el campo de la Mastozoología, y brindarme su asesoría y confianza.

A todas las personas que desinteresadamente me han ayudado a cumplir esta meta.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis queridos abuelitos Tomás y Matilde y de mi tío Leonardo. Porque aunque se hayan ido, su recuerdo sigue siempre conmigo.

A mi pequeño Leonardo, la luz de mi vida y la razón de que cada día trate de superarme para darle lo mejor.

A mi querido esposo Moisés que me ha brindado su amor, apoyo y ayuda. Te doy la gracias por todo lo que haces por mí. Porque sigamos juntos adelante con nuestro hijo en las buenas y en las malas.

A mi mamá que sin todo su apoyo, amor y comprensión no hubiera podido culminar esta meta. Gracias por ser mamá y abuelita.

A mi papá a quien quiero mucho. Por ti me gustó esta carrera y ahora doy otro paso más en ella, gracias por todo. Para ti y mi mamá este pequeño homenaje.

A mis hermanos Susana, Guadalupe y Héctor, gracias por sus consejos y ayuda cuando los necesito.

A mis sobrinos: Montserrat, Valentina, Vanessa, Adrián, al más pequeño miembro de la familia, Jesús Antonio, “Chuchito”, además a Isaí, Yael, Mayté y Evelyn.

A mis suegros y cuñados por ser parte de mi familia.

A Dios porque aunque ha habido momentos difíciles siempre me ha brindado una solución.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Romerolagus diazi</i>	2
La importancia del mantenimiento de la variación genética.....	3
Pérdida de variación genética	4
Los microsatélites y la determinación de la variación genética.....	7
Aislamiento geográfico del conejo zacatuche.....	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Colecta de muestras	13
Extracción de ADN.....	14
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
Electroforesis en geles de acrilamida.....	15
Obtención de los datos	15
Análisis de resultados.....	15
RESULTADOS	18
Desequilibrio de ligamiento.....	18
Polimorfismo.....	18
<i>Volcán Popocatepetl</i>	19
<i>Volcán Pelado</i>	19

<i>Volcán Chingueretería</i>	20
<i>Zoológico de Chapultepec</i>	20
<i>Yecahuazac</i>	21
Heterocigosidad	21
Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).....	22
Niveles de endogamia	22
Estructura y diferenciación genética	23
Análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica	24
Estimación del número de migrantes (Nm)	24
DISCUSIÓN.....	25
Variación de los microsatélites	25
Variación genética por población	26
Variación genética entre poblaciones	31
Relación entre distancia genética, distancia geográfica y número de migrantes	32
CONCLUSIÓN	35
IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DEL CONEJO ZACATUCHE	36
LITERATURA CITADA.....	38
FIGURAS.....	46
CUADROS.....	56
APÉNDICE I.....	67
APÉNDICE II.....	71
APÉNDICE III	75
APÉNDICE IV	78
APÉNDICE V	80

RESUMEN

El conejo zacatuche *Romerolagus diazi* es considerado una especie endémica de México y en peligro de extinción; sus poblaciones se han fragmentado desde el Pleistoceno y actualmente las actividades humanas han aumentado su aislamiento, por lo que la integridad genética de esta especie está siendo amenazada. Con la finalidad de cuantificar el grado de variación genética de poblaciones aisladas de *Romerolagus diazi* y determinar el efecto genético de su aislamiento se realizó un estudio con la técnica de microsatélites de ADN de cinco poblaciones: del Volcán Popocatepetl, Volcán Pelado, Volcán Chingueretería y Yecahuazac, además de la población cautiva del Zoológico de Chapultepec. La hipótesis de este trabajo es que las poblaciones pequeñas y aisladas se diferencian debido al aislamiento geográfico y las actividades humanas. Los resultados indican un alto polimorfismo de las poblaciones (promedio de alelos = 10.3). La heterocigosidad observada fue menor (34.8 %) que la esperada (67.3%). La población del Zoológico de Chapultepec fue la que presentó los valores más bajos de polimorfismo y heterocigosidad. Se presentó en su mayoría deficiencia de heterocigotos. Los valores de diferenciación genética entre poblaciones muestran que las poblaciones del Volcán Pelado-Zoológico de Chapultepec, Yecahuazac-Zoológico de Chapultepec y Volcán Popocatepetl-Zoológico de Chapultepec presentan un grado de diferenciación significativo. Los resultados confirman las hipótesis de que (1) Las poblaciones silvestres de *Romerolagus diazi* se encuentran en proceso de diferenciación genética, y (2) que estas diferencias pueden ser debidas al aislamiento geográfico en el que se encuentran.



INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con mayor diversidad biológica (Rzedowsky, 1991; Toledo, 1988), en el cual existen 15 especies de conejos y liebres. Esto representa la diversidad máxima por país del Continente Americano y lo sitúa como uno de los países que aloja más especies de conejos y liebres en el mundo. En su territorio alberga diez especies de conejos, nueve del género *Sylvilagus*, una de *Romerolagus* y cinco especies de liebres del género *Lepus*. Además la República Mexicana cuenta con el mayor número de especies endémicas de lagomorfos (cinco especies de conejos y tres de liebres), es decir 57% (Cervantes y González, 1996).

Las principales amenazas contra las poblaciones de lagomorfos mexicanos son la desaparición de su hábitat y la cacería furtiva. La falta de planeación y el abuso en el manejo de los ecosistemas mexicanos han propiciado que la tala, los incendios, el pastoreo y la apertura continua de más áreas de cultivo hayan eliminado o cambiado directa o indirectamente las características de los hábitats adecuados para el ciclo de vida de los conejos y liebres (Cervantes y González, 1996). La conservación y el manejo de las poblaciones de lagomorfos en el mundo considera fundamental la preservación de su hábitat, programas de introducción y regulación de sus poblaciones y las medidas para su protección (Chapman y Flux, 1990). En foros internacionales se ha coincidido que cinco géneros de lagomorfos en el mundo presentan poblaciones tan pequeñas o hábitats tan restringidos que se recomienda su completa protección. Para México se incluye dentro de este grupo al conejo de las Islas Mariás (*Sylvilagus graysoni*), al conejo de Omiltemi (*S. insonus*), a la liebre de Tehuantepec (*Lepus flavigularis*) y al conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).



Romerolagus diazi

Romerolagus diazi es conocido como zacatuche, teporingo, conejo de los volcanes, *volcano rabbit* (Fig. 1; Cervantes-Reza, 1980; Granados, 1981; Rojas, 1951). Es el lagomorfo de menor talla en nuestro país y se caracteriza por su color pardo oscuro homogéneo, sus pequeñas orejas redondas, patas cortas y cola no visible. Este mamífero habita la región más densamente poblada de México: el centro del Eje Neovolcánico Transversal, en bosques abiertos de pino con densas coberturas de gramíneas amacolladas (Hoth et al., 1987).

El conejo zacatuche ha sido considerado una especie rara y en peligro de extinción (NOM-59, Angermann et al., 1990; Barrera, 1966; Hoth et al., 1987; Tornback y Jenkins, 1984). El hábitat del zacatuche se ha fragmentado históricamente desde el Pleistoceno, cuando los últimos episodios volcánicos ocurridos en el Eje Neovolcánico dieron como resultado la formación de la Sierra del Chichinautzin. Añadiendo esta causa natural a las causas antropogénicas, el hábitat del zacatuche se ha fragmentado en 16 zonas en un periodo relativamente corto (Velázquez et al., 1996) (Figs. 2 y 3). Este proceso de fragmentación está estrechamente relacionado con el crecimiento de la Ciudad de México (Velázquez, 1988) y puede tener efectos negativos en la estructura genética de las poblaciones del conejo zacatuche. A pesar de que se han dedicado esfuerzos para su estudio, manejo y reproducción en cautiverio (Cervantes et al., 1990; Fa y Bell, 1990; Hoth y Granados, 1987; Matsuzaki et al., 1982), estos no han sido suficientes y las disposiciones legales para su protección en estado silvestre no han tenido éxito.



Para promover la conservación del zacatuche en cautiverio se procedió al establecimiento de colonias de reproducción como la del Zoológico de Jersey, Inglaterra (Durrell y Mallison, 1968; Lindsay, 1982), la del Zoológico de Amberes, Bélgica (De Poorter y Van der Loo, 1981) y la del Zoológico de Chapultepec (Hoth y Granados, 1987), que es la única que actualmente existe.

La problemática de conservación del zacatuche es el caso típico en el cual la conservación de la diversidad genética es una de las principales metas en el mantenimiento de las poblaciones aisladas o en cautiverio, pues la diversidad genética, representa el potencial adaptativo de las poblaciones cautivas y de las poblaciones reintroducidas derivadas de ellas (Lacy, 1993).

La importancia del mantenimiento de la variación genética

La variación genética es la materia prima para los cambios evolutivos; es el material básico del cual depende la adaptación y la especiación (Amos y Harwood, 1998) y permite a las poblaciones evolucionar en respuesta a los cambios ambientales, enfermedades, parásitos, depredadores y competidores (Allendorf y Leary, 1986; Amos y Harwood, 1998). El patrón de variación genética entre las poblaciones está determinado por la mutación, la deriva génica, la migración (flujo génico) y la selección natural (Chesser et al., 1980; Smith et al., 1978). Niveles de variación genética bajos limitan la habilidad de los organismos para responder a las amenazas en periodos de tiempo cortos y prolongados. La pérdida de la variabilidad genética y del potencial evolutivo que esto puede representar pone en peligro la continuidad de una población si los individuos son incapaces de adaptarse a los cambios ambientales (Frankel y



Soulé, 1981). El mantenimiento de la variación genética incrementa la calidad de los individuos en una población y esto es especialmente importante en lo que concierne al manejo de las especies (Rhodes y Smith, 1992; Smith y Rhodes, 1993). Por esto, el mantenimiento de la variabilidad genética en las poblaciones naturales es un componente esencial de los esfuerzos en la conservación que aseguran la persistencia de las poblaciones de vida silvestre, principalmente de las poblaciones aisladas (Frankham, 1995) como es el caso del conejo zacatucho.

Pérdida de variación genética

Muchas poblaciones naturales se encuentran en peligro no solo por la reducción dramática de su hábitat con respecto al área original que ocupaban (Harris, 1984, Segesser, 1999), sino también por el aumento en la fragmentación de este hábitat. El resultado es un gran número de especies en peligro de extinción en pequeñas subpoblaciones aisladas, lo cual influye en su estructura genética, ya que las distancias geográficas y las barreras físicas impiden la migración (Mossman y Waser, 2001). El aislamiento del hábitat afecta el flujo genético entre las poblaciones dando como resultado variación genética intrapoblacional. La distancia geográfica entre las poblaciones también influye en la diferenciación genética interpoblacional (Mossman y Waser, 2001). Las poblaciones del zacatucho se encuentran, desafortunadamente, altamente fragmentadas y distanciadas.

La dinámica de los genes en las subpoblaciones que existen en los fragmentos, puede caracterizarse usando algunos parámetros, entre los que se encuentran la tasa de apareamiento entre parientes (endogamia), la cual genera una alta tasa de consanguinidad. La consanguinidad



(Eguiarte y Piñero, 1999) incrementa la homocigosidad (reduciendo la heterocigosidad) debido a la mayor probabilidad de que los individuos portadores de alelos sean idénticos por descendencia. La depresión por endogamia es una disminución en la adecuación (el crecimiento, la supervivencia o la fertilidad) que generalmente se observa después del apareamiento constante entre organismos genéticamente relacionados. Este fenómeno es de especial interés en biología de la conservación debido a que los individuos de poblaciones pequeñas probablemente son endogámicos; por lo tanto es importante determinar el grado de consanguinidad que presentan las diferentes poblaciones de zacatuche.

Otro parámetro importante en la pérdida de variación genética es el tamaño de las subpoblaciones, ya que en la medida que se tenga un menor tamaño poblacional, habrá mayor pérdida de la heterocigosis de la población (Crawford, 1984). Si se tiene un número muy alto de subpoblaciones, la frecuencia alélica de la población total no cambiará, pero la existencia de un número finito de subpoblaciones genera a nivel global una pérdida continua de alelos, además de la pérdida de heterocigosis dentro de cada una de las subpoblaciones. Durante este proceso las subpoblaciones se diferenciarán unas de las otras (Hedrick, 1983). La población de zacatuche en cautiverio del Zoológico de Chapultepec es un claro ejemplo de tamaño de población pequeño.

Otro factor que conduce a la pérdida de variación genética es la deriva génica. Ésta se produce cuando las poblaciones naturales son limitadas. Cuanto más pequeñas, más importante será la deriva. Esto es debido a que al haber pocos individuos en las poblaciones se presentan los llamados errores de muestreo. Entre más chica sea la población, mayores pueden ser tales



errores y con mayor rapidez cambian las frecuencias alélicas. La deriva, entonces tiene dos efectos: 1) cambios en las frecuencias alélicas al azar, y 2) que eventualmente se fije alguno de los alelos (Eguiarte, 1999).

La endogamia y la reducción de la variación genética pueden ocurrir como resultado de que una población atraviese un “cuello de botella”, que es un evento en el cual la población sufre una pérdida y puede temporalmente reducirse a muy bajos números (Amos, 1998). Esto puede conducir a un "efecto fundador" en el cual unos pocos individuos forman una nueva población, la cual solamente cuenta con un subconjunto de la variación genética total presente en la población original (Ashley, 1999). El efecto fundador posiblemente pudo haber ocurrido en la población de zacatuche del Zoológico de Chapultepec debido al reducido número de individuos con que se inició la colonia (12 ejemplares; Hoth y Granados, 1987). Ésta, junto con las otras causas de pérdida de variación genética, pueden llegar a poner en riesgo la integridad y la continuidad de las poblaciones aisladas de conejo zacatuche.

Para medir los niveles de variación genética de las poblaciones naturales, se han utilizado marcadores genéticos como son las aloenzimas, las secuencias de ADN mitocondrial y, recientemente, los microsatélites. La variabilidad genética puede ser evaluada tanto por cambios en la heterocigosidad, como en el número de alelos (Frankel y Soulé, 1981, Leberg, 1992). Debido a que los microsatélites presentan gran variación alélica, son herramientas potencialmente muy sensibles para la detección de pérdida de variación genética tanto en poblaciones silvestres como en cautiverio (Taylor y Cooper, 1999).



Los microsatélites y la determinación de la variación genética

Los microsatélites son secuencias cortas simples repetidas de DNA, de una a seis pares de bases de largo, tales como (CA/GT) n o (AGT/TCG) n . Como marcadores moleculares tienen las características de presentar adecuada resolución (Cherly, 1999); fácil aislamiento y alta tasa de mutación (del orden de 10^{-6} a 10^{-2} , Epplen y Lubjuhn, 1999); presentan codominancia, es decir, es posible determinar para cada locus si un individuo es homocigoto o heterocigoto (Bauloux et al., 2000). Estas secuencias son altamente variables, con gran polimorfismo debido a los cambios en el número de unidades repetidas (Weber, 1990; Beckman y Weber, 1992), el cual puede cambiar como resultado de una mutación; así que para muchos loci de microsatélite, algunos individuos pueden ser heterocigotos (tienen diferentes versiones de los mismos genes) y pueden tener una docena o más de alelos diferentes (formas de un gen) en una población de ese locus.

El estudio de los microsatélites ha sido utilizado para la conservación y el mantenimiento de la diversidad genética de especies en peligro de extinción. Las poblaciones de especies en peligro, por definición, pueden experimentar cuellos de botella, como resultado puede haber una pérdida de variación indetectable en los loci de aloenzimas; pero se puede mantener suficiente polimorfismo de microsatélites a través de tales cuellos de botella para aplicar un manejo adecuado de los individuos que quedan en la población (Ashley y Dow, 1994).

Los microsatélites han sido empleados para definir la estructura de la población en varias especies, principalmente en el caso de las especies amenazadas. En el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) se han establecido las relaciones genéticas entre los individuos de varias



poblaciones mantenidas en cautiverio. Se encontraron alelos exclusivos para algunas poblaciones, diferencias en las frecuencias alélicas y valores de distancias genéticas significativamente distintos (García-Moreno, 1996). Si el aislamiento está afectando las poblaciones de zacatuche tanto silvestres como en cautiverio, posiblemente se podrán detectar variaciones entre las diferentes poblaciones tanto en forma de alelos exclusivos como en variaciones alélicas. Por ejemplo, estudiando la variación genética del wallabi de Bennett (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) en Nueva Zelanda, se documentó un cuello de botella debido a la reintroducción con bajo número de fundadores y se encontró que esta población exhibe sólo el 40% de la diversidad alélica y el 75% de la heterocigosidad observada al ser comparada con una población de Tasmania. Los microsatélites indicaron claramente una pérdida de variación genética (Le Page et al., 2000).

Asimismo, se han efectuado diversas evaluaciones del efecto de la fragmentación del hábitat en la estructura genética de las poblaciones silvestres utilizando microsatélites. Examinando la diferenciación genética dentro y entre poblaciones aisladas de macacos Barbary de Argelia (*Macaca sylvanus*), se encontró alto polimorfismo y que cada subpoblación es genéticamente distinta (Segesser et al., 1999). Por otro lado, se reconoció que en poblaciones fragmentadas del ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), existe variación genética significativa dentro de las poblaciones, pero no diferencia en el número de alelos o heterocigosidad entre las poblaciones (Mossman y Waser 2001). Este efecto también podría ser encontrado en el conejo zacatuche.



Aislamiento geográfico del conejo zacatuche

Es poco el registro fósil que existe del zacatuche (Valsequillo, Puebla; Cruz Muñoz V., com. pers. 2005); sin embargo el zacatuche ha sido considerado un lepórido primitivo por sus características craneales y dentales, cromosómicas, las relaciones con sus parásitos (algunos de los cuales son específicos) y por su distribución actual. El zacatuche pudo haber evolucionado de algún linaje del género *Alilepus* (Hibbard, 1963), fósil del Mioceno tardío o Plioceno temprano de Norteamérica. La distribución geográfica de los paleoláginos parece haber sido restringida en el Pleistoceno por los vigorosos *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus* y *Lepus* (Hibbard, 1963). Después de análisis dentales adicionales, se concluyó que el zacatuche pudo haberse diferenciado a partir de *Nekrolagus* (fósil del Pleistoceno tardío de Norteamérica), al igual que los lepóridos actuales (Hibbard, 1963; Dawson, 1967). Por medio de otro tipo de estudios se ha considerado que existe un parentesco filogenético más estrecho entre el zacatuche y *Lepus* (Robinson et al., 1981). Probablemente el zacatuche se diferenció en la meseta desértica americana (Rojas, 1951; Uribe Alcocer, 1977), permaneció como relictó cuando terminaron las glaciaciones y se estableció en las altas montañas del sur del Valle de México, hábitat que no pudo abandonar y en donde se ha conservado sin un aparente cambio evolutivo (Barrera, 1953; Rojas, 1951).

Debido a que las poblaciones del conejo zacatuche se encuentran fragmentadas en mayor o en menor grado, seguramente el flujo genético entre ellas ha disminuido en el mismo grado. Si el proceso se inició con efectos fundadores y cuellos de botella, es probable que haya habido un efecto negativo de la deriva génica y la endogamia y, por efecto de la selección natural, ello posiblemente conduciría a una diferenciación genética entre poblaciones, lo cual



traería como consecuencia que pudieran llegar a separarse reproductivamente. Por lo tanto, es importante realizar estudios genéticos para determinar si hay diferencias en el perfil genético entre poblaciones de *Romerolagus*, esto como consecuencia del aislamiento de sus poblaciones silvestres tanto por las causas naturales (eventos geológicos, glaciaciones, cambio climático y de vegetación) como por causa de las actividades humanas (Figs. 2 y 3). Por ejemplo, colonias en cautiverio como las de los zoológicos, representan una condición artificial que conduce al aislamiento y a la interrupción del flujo génico, aumentando la endogamia. Un estudio por el método de RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico) con ejemplares de zacatuche del Zoológico de Chapultepec, encontró evidencia de que la población cautiva del Zoológico de Chapultepec ha perdido alelos que permanecen en la población silvestre (Salomón, 2000). Por lo tanto, es necesario examinar poblaciones silvestres aisladas para poder determinar el grado de diferenciación genética dentro y entre sus poblaciones.

La distribución actual de las poblaciones de zacatuche en el Eje Neovolcánico Transversal puede explicarse por la historia geológica del área, que corresponde a la era Cuaternaria. Mientras que la formación del Eje comenzó en el Mioceno tardío (Cebull y Shurbet, 1987; Nixon et al., 1987), el origen del vulcanismo en la región comenzó durante el Plioceno (Demant, 1978; 1982; Nixon et al., 1987). El hábitat del zacatuche se ha fragmentado de manera natural debido a los cambios climáticos del Periodo Cuaternario durante el Pleistoceno (Hibbart, 1955). Debido a los eventos glaciares, las poblaciones quedaron confinadas a las partes altas de las sierras y montañas del sur del Valle de México, restringiéndolas geográficamente, principalmente en las Sierra Ajusco, Chichinautzin y Sierra Nevada. Esta última presenta mayor superficie y tiempo de aislamiento que las otras dos.



aproximadamente de 5000 años. Aunado a este proceso natural, se han sumado las causas humanas. En 1987 se estimó que el área de distribución total del zacatuche era de 280 km² (Hoth et al., 1987), debido principalmente a la expansión de las ciudades de Toluca, México y Puebla. Este proceso ha provocado directa e indirectamente la disminución del número de poblaciones y la fragmentación del hábitat de esta especie formando barreras entre ellas (Velázquez, 1988). El área de distribución del conejo zacatuche se ha reducido dramáticamente en pocos años, como lo demuestran diversos reportes (Hall, 1981; Hoth et al., 1987; Velázquez et al., 1996; Figs. 2 y 3) en donde se muestra que las poblaciones continuas se han ido fragmentado en pequeños parches. La conclusión general es que la superficie total de distribución del zacatuche se encuentra dividida en 16 unidades aisladas (12 periféricas y cuatro núcleo; Velázquez, 1996). Se ha determinado que la presencia de autopistas, caminos, zonas de cultivo permanente y establecimientos humanos, son considerados barreras que pueden aislar a los individuos tanto geográfica como genéticamente, impidiendo el flujo de individuos entre ellas y provocando diferencias genéticas intra e interpoblacionales, lo que puede incrementar la posibilidad de extinción de la especie.



HIPÓTESIS

De acuerdo con este escenario geográfico, se puede proponer como hipótesis nula que estas poblaciones aisladas no presentan importante diferenciación genética entre ellas; sin embargo, la hipótesis alternativa es que las diferentes poblaciones presentan diferencias genéticas importantes, lo que puede llegar a producir que las poblaciones se diferencien. Para corroborar o refutar la hipótesis nula, se proponen los siguientes

OBJETIVOS

- Cuantificar el nivel de variación genética por medio del análisis de microsatélites de ADN de poblaciones aisladas del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*).

- Relacionar el efecto del aislamiento con la variabilidad genética de poblaciones aisladas del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*).



MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron cuatro poblaciones silvestres aisladas: Volcán Popocatepetl, en su porción del estado de México (catorce individuos); Volcán Pelado en la Delegación Tlalpan (diez ejemplares); Volcán Chinguerería en la Delegación Milpa Alta (diez individuos) y la localidad de Yecahuazac en Milpa Alta (doce individuos; Fig. 4), también se estudió la población del Zoológico de Chapultepec (once individuos), ya que es una población que lleva cerca de 20 años en cautiverio (Hoth y Granados, 1987). El tamaño de muestra total fue de 57 individuos.

Colecta de muestras

Para la población del Volcán Pelado se utilizaron muestras de hígado almacenadas en la Colección de Tejidos Congelados de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM; de la población del Zoológico de Chapultepec se utilizaron muestras de pelo las cuales fueron colectadas con pinzas (directamente del ejemplar) y se guardaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml rotulados. Para las poblaciones de Popocatepetl, Chinguerería y Yecahuazac, se extrajo el ADN a partir de excrementos de zacatuche frescos colectados en el campo; en este caso se buscaron letrinas de zacatuche que estuvieran a considerable distancia una de otra (aproximadamente 400 metros) para asegurar que no se tomaran muestras de un mismo ejemplar y se guardaron en bolsas de papel pequeñas. Una vez en el laboratorio, se dejaron secar en la estufa a 37° C durante tres días para evitar el crecimiento de hongos y posteriormente se realizó la extracción de ADN. Para dos individuos de Chinguerería se utilizó tejido de oreja, el cual se tomó de la piel de estos ejemplares y que se encuentran albergados en la CNMA.



Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de las diferentes muestras se utilizó una técnica distinta de acuerdo con cada caso. Para excremento se utilizó un kit comercial especial para este tipo de muestra (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Marca Qiagen). En el caso de muestras de pelo, hígado y oreja se realizó la extracción por medio de la técnica de fenol-cloroformo de acuerdo al método de Philippa (2001), con algunas modificaciones para optimizarla (Apéndice I y II). Para algunas muestras de pelo e hígado se utilizó un kit comercial para extracción de ADN (DNeasy Tissue Kit, marca Qiagen).

Las concentraciones del ADN se determinaron por espectrofotometría (260 nm) y su pureza se obtuvo mediante la relación 260nm/280 nm; las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro marca Biomate. Para determinar la presencia de ADN, se corrieron 5 µl de extracción en gel de agarosa al 1%, a 100 volts durante 30 min (Sambrook et al., 1989, Apéndice III). El ADN se visualizó con bromuro de etidio por medio de luz UV y posteriormente se tomó una fotografía con cámara Polaroid instantánea (Fig. 5).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la técnica de PCR se utilizaron iniciadores específicos para la amplificación de cuatro microsatélites diseñados originalmente para el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus* (Cuadro 1): *Sol 08*, *Sol 30* (Rico et al., 1994), *Sat 03* y *Sat 05* (Mougel et al., 1997); los dos primeros ya habían sido probados y amplificados por Surridge et al., (1997) en un ejemplar de *R. diazi* que resultó ser homocigoto para ambos microsatélites. Los otros dos no habían sido utilizados anteriormente para el zacatuche pero sí en algunos otros lagomorfos, reportándose



también como polimórficos (Andersson et al., 1999, Burton, 2002). La reacción para la amplificación de los microsatélites (Cuadro 2) fue realizada en un termociclador marca Thermo Hybaid, PCR Sprint Temperature Cycling System, y cada programa utilizado se basó en las características de los microsatélites (Cuadro 3).

Electroforesis en geles de acrilamida

Los productos de PCR fueron separados por medio de geles de acrilamida-bis-acrilamida no desnaturalizada al 10% (Sambrook et al., 1989, con modificaciones, Apéndice IV) y se corrieron a 110 volts durante 2 a 4 horas, dependiendo del tamaño del microsatélite (Cuadro 1); posteriormente, se tiñeron con plata (Apéndice V) y se guardaron para su posterior interpretación (Fig. 6).

Obtención de los datos

La lectura de los microsatélites se llevó a cabo directamente sobre los geles de acrilamida y los alelos encontrados para cada locus se distinguieron por su peso molecular, comparándolos con los pesos moleculares comerciales (Figura 6). Los tamaños de los fragmentos se establecieron con el peso molecular de la banda más intensa y de mayor tamaño. Se descartaron las bandas tenues y las de diferente tamaño de los intervalos mencionados en la literatura. El registro de las bandas que aparecen en los geles proporcionó una matriz en donde se identificó cada individuo junto con las bandas de los pesos moleculares que genera el PCR para cada uno de los microsatélites.

Análisis de resultados

Los datos de los alelos fueron analizados con el programa GENEPOP, versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995). Se estimó el número de alelos por locus y para todos los loci, al

igual que las frecuencias alélicas. Para cada una de las poblaciones se calculó la heterocigosidad esperada (H_e) y la observada (H_o). Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para cada locus fueron computados para cada población utilizando pruebas exactas (Rousset y Raymond 1995). Las desviaciones del equilibrio de H-W para todos los loci en conjunto se evaluaron en cada población usando el método de Fisher.

Se realizó la estimación de estadísticos de F (Wright, 1965) y R (Slatkin, 1995) para cuantificar la magnitud de la diferenciación de las poblaciones en frecuencias de alelos. Por identidad de alelos se determinaron los estadísticos de F : F_{is} (coeficiente de endogamia), F_{st} (proporción de variación genética debido a la diferenciación entre las subpoblaciones) y F_{it} (desviaciones de las proporciones de H-W a nivel de población total), los cuales fueron calculados de acuerdo con Weir y Cockerham (1984). Estos estadísticos se basan en el modelo de mutación de alelos infinitos (Wright 1949; Kimura y Crow 1964). Por correlación con el tamaño de los alelos, se estimaron los estadísticos de R (R_{st} , R_{it} y R_{is} ; Michalakis y Excoffier, 1996), que se basan en el modelo de mutación paso a paso (Ohta y Kimura, 1973).

La diferenciación genética se estimó usando tanto el método de Fisher como la prueba exacta (log-likelihood). Se realizó un análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica y para determinar su asociación se realizó una Prueba de Mantel, que compara directamente dos matrices de distancia y evalúa si dichas matrices presentan correlación o no. La prueba se realizó por medio del paquete estadístico Mantel versión 1.15 (Cavalcanti 2001). Se realizó la estimación del número de migrantes (Nm) por medio de la estimación multilocus del número efectivo de migrantes de acuerdo a Slatkin (1985), basada en la utilización de



alelos únicos y usando la estimación que utiliza los valores de F_{st} (Wright 1951): $Nm = (1 - F_{st}) / 4 F_{st}$. La prueba de desequilibrio de ligamiento se realizó por la estimación de la independencia de genotipos por cada par de loci dentro de cada población, utilizando una aproximación del método de “Cadena de Markov ” (Raymond y Rousset 1995).

RESULTADOS

Desequilibrio de ligamiento

Se realizó una prueba para evaluar la probabilidad de ligamiento entre pares de microsatélites. Este procedimiento se recomienda debido al desconocimiento de la distribución cromosómica de los microsatélites utilizados; ya que si los microsatélites estuvieran ligados, se produciría un desequilibrio genotípico. Esta prueba exacta para obtener el desequilibrio dio valores no significativos entre las comparaciones realizadas ($P > 0.05$; Cuadro 4), por lo cual se determinó que ninguno de los cuatro microsatélites analizados presentó desequilibrio genotípico de ligamiento. Entonces, éstos resultaron ser adecuados para el estudio ya que cada uno de ellos proporciona información independiente, no ligada.

Polimorfismo

Se analizó un total de 57 individuos repartidos entre las cinco poblaciones. Todos los microsatélites analizados en este estudio fueron polimórficos, presentando entre nueve y trece alelos por locus. El número promedio de alelos por locus en estas poblaciones fue de 10.25 ± 0.82 y se tuvo una frecuencia media de alelos únicos de 0.173 (Cuadro 5). Las frecuencias de los alelos generalmente muestran distribuciones bimodales con dos alelos comunes y un intervalo de otros alelos en menores frecuencias.

Por microsatélite

En general el microsatélite *SOL 08* fue el más pequeño de todos los microsatélites analizados; presentó nueve alelos (Fig. 7) con tamaños que fueron desde 105 hasta los 155 pares de bases (pb), mostrando tres alelos exclusivos para algunas poblaciones. El microsatélite



SOL 30 fue el que presentó la mayor cantidad de alelos (trece), su longitud fue de 125 a 180 pb contando con un solo alelo exclusivo (180; Fig. 8). Los *primers* para los microsatélites *SAT 03* y *SAT 05*, que originalmente fueron diseñados para su amplificación en ADN del conejo europeo *Oryctolagus cuniculus* y los cuales no habían sido probados anteriormente en *Romerolagus diazi*, mostraron amplificación y detectaron alto grado de polimorfismo; el *SAT 03* presentó diez alelos (con cuatro alelos exclusivos; Fig. 9) con longitud de 140-178 pb, y el *SAT 05* nueve alelos (con tres alelos exclusivos; Fig. 10) con tamaños de 195 a 230 pb.

Por población

Volcán Popocatepetl

La población del Volcán Popocatepetl presentó la mayor cantidad de alelos del microsatélite *SOL 08* (7; Fig. 7) con respecto a las otras poblaciones; el alelo principal fue el de 125 pb y tuvo un alelo exclusivo de 140 pb. Para el microsatélite *SOL 30*, además de ser la población con mayor número de alelos (once), fue la única que presentó un alelo exclusivo para este microsatélite (180 pb). Los alelos del microsatélite *SOL 30* con mayor frecuencia para esta población fueron el 162 y luego el 165. Con el microsatélite *SAT 03* fue la población más polimórfica (Fig. 9); mostró ocho alelos con un intervalo de 140 a 175 pb y contó con tres alelos exclusivos (155, 170 y 175). El alelo 162 fue ligeramente el más común. Finalmente para el microsatélite *SAT 05* la población del Volcán Popocatepetl presentó cinco alelos, siendo el más frecuente el de 222 pb. Mostró dos alelos exclusivos (215 y 218).

Volcán Pelado

La población del Volcán Pelado presentó cinco alelos para el microsatélite *SOL 08*, el intervalo de tamaños fue de 115 a 130 pb y el alelo más frecuente fue 125 pb. Para el



microsatélite *SOL 30*, esta población contó con seis alelos abarcando de 145 a 178 pb (Fig. 8). El alelo más frecuente fue el de 162 siguiéndole el de 155. Con respecto al microsatélite *SAT 03* solamente presentó dos alelos, el más frecuente de 158 pb y el segundo de 160. Por último el microsatélite *SAT 05* también contó con sólo dos alelos 122 y 126, siendo este último el más frecuente (Fig. 10).

Volcán Chingueretería

Esta población para el microsatélite *SOL 08* (Fig 7) mostró tres alelos, con intervalo de tamaño de 105 a 122 pb, el alelo principal fue de 115 pb. Presentó un alelo exclusivo de 105 pb. El *SOL 30* contó con siete alelos que abarcaron de 125 a 178 pb, presentó el alelo más común de 162 pb y el segundo de 170 pb (Fig. 8). Con el microsatélite *SAT 03* (Fig. 9) se presentaron sólo dos alelos, siendo el alelo de mayor frecuencia el de 158 pb y el de menor frecuencia el de 160 pb. Con respecto al microsatélite *SAT 05* se tuvieron tres alelos en esta población: 222, 230 y 226, este último fue el más común (Fig. 10).

Zoológico de Chapultepec

Para el *SOL 08* en el Zoológico de Chapultepec se presentaron tres alelos, el intervalo de tamaños comprendió de 115 a 155 pb y el alelo más frecuente fue el 115 (Fig. 7). Para el microsatélite *SOL 30* se detectaron seis alelos que comprendieron desde 155 hasta 168 pb, los más comunes fueron en primer lugar el 168 y luego el 160 (Fig. 8). el *SAT 03* presentó tres alelos: 150, 158 (el de mayor frecuencia) y 160 (Fig. 9). En el microsatélite *SAT 05* se visualizaron cinco alelos (de 200 a 230 pb), donde el alelo más común fue de 200 pb (Fig. 10). Para ningún microsatélite se presentaron alelos exclusivos en esta población.



Yecahuazac

Con el microsatélite *SOL 08* se presentaron cuatro alelos, siendo los dos principales 122 y 155 pb, el alelo 150 sólo se presentó en esta población. Con respecto al microsatélite *SOL 30*, abarcó desde 125 hasta 170 pb con siete alelos, siendo el principal el de 162 pb. Para el *SAT 03* se detectaron seis alelos, los cuales abarcaron el intervalo de 140 a 165 pb, siendo los de mayor frecuencia los alelos de 158 y 160 pb (este último es el alelo principal). Finalmente, el microsatélite *SAT 05* presentó seis alelos con un intervalo de 195 a 230 pb, el alelo 195 es un alelo exclusivo y también el alelo más frecuente de esta población.

De manera global la población del Volcán Popocatepetl es la que exhibe mayor polimorfismo promedio por microsatélite analizado (7.8 ± 1.1 ; Cuadro 5); en cuanto a alelos exclusivos también es la que cuenta con un mayor número (siete alelos en total). En contraposición, la población del Volcán Chinguerería presenta la menor cantidad de alelos (3.8 ± 1.0) y solamente presenta un alelo exclusivo. La única población que no presentó alelos exclusivos para algún microsatélite fue la población del Zoológico de Chapultepec.

Heterocigosidad

Las frecuencias alélicas y las heterocigosidades, tanto esperadas como observadas para cada microsatélite y cada población, se muestran en el Cuadro 6. La heterocigosidad promedio esperada para todas las poblaciones fue de 0.67 ± 0.05 , mientras que la heterocigosidad observada fue menor (0.35 ± 0.05). En ambos casos, la población del Zoológico de Chapultepec fue la que presentó los valores más bajos ($H_e = 0.57$ y $H_o = 0.21$). La población del Volcán Pelado fue la que mostró mayor valor de heterocigosidad observada promedio



(0.50). Los valores de heterocigosidad intrapoblacional por microsatélite fueron en su mayoría bajos, en comparación con la heterocigosidad interpoblacional la cual fue alta, exceptuando en el *SAT 03* en el cual no hay diferencia significativa entre ambos valores (Cuadro 6).

Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

En el análisis para detectar si las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W (Cuadro 6), se obtuvo que para el microsatélite *SOL 08* todas las poblaciones muestran desviaciones estadísticamente significativas en la forma de déficit del número de heterocigotos. Para el *SOL 30*, las poblaciones del Volcán Chingueretería, el Zoológico de Chapultepec y Yecahuazac muestran deficiencia significativa. En el *SAT 03* solamente la población del Volcán Popocatepetl es significativa; por último en el *SAT 05* todas las poblaciones exceptuando, la del Volcán Pelado, muestran deficiencia significativa de heterocigotos.

Niveles de endogamia

Para medir el déficit de heterocigotos causado por alelos nulos, endogamia o subestructuración poblacional, f , se determinaron los valores de F_{is} y R_{is} tanto por poblaciones (Cuadro 7) como por microsatélite (Cuadro 8). La población del Volcán Pelado es la población que cuenta con los valores más bajos ($F_{is} = 0.0690$ y $R_{is} = -0.00085$), mientras que la del Zoológico de Chapultepec cuenta con los valores promedio más altos ($F_{is} = 0.5218$ y $R_{is} = 0.6720$). En cuanto a los valores de los estadísticos de F_{is} y R_{is} globales mostraron desviación significativa de cero ($F_{is} = 0.5051$ y $R_{is} = 0.7306$). Estos valores positivos indican deficiencia significativa de heterocigotos.



Estructura y diferenciación genética

La estimación de la estructura y la diferenciación genética de las poblaciones fue determinada por medio de la *Fst*. Los valores de este parámetro para los datos combinados fueron significativamente más grandes que cero ($Fst = 0.1222$; Cuadro 8). Al realizar las comparaciones por cada microsatélite de las divergencias entre pares de poblaciones, se obtuvo que con el microsatélite *SOL 08* solamente las poblaciones Volcán Pelado-Volcán Popocatepetl y Chingueretería-Zoológico de Chapultepec presentaron índices bajos de divergencia (-0.0443 y 0.0803, respectivamente; Cuadro 9). Las poblaciones más altamente diferenciadas fueron Zoológico de Chapultepec-Yecahuazac ($Fst = 0.3567$). Para el *SOL 30*, sólo las poblaciones Volcán Pelado-Zoológico de Chapultepec presentaron diferencias significativas (0.1635) y en menor grado las poblaciones de Zoológico de Chapultepec-Yecahuazac. Las poblaciones Volcán Pelado-Zoológico de Chapultepec (0.171), Volcán Popocatepetl- Volcán Chingueretería (0.168), Volcán Popocatepetl-Zoológico de Chapultepec (0.292) y Zoológico de Chapultepec-Yecahuazac (0.324) presentaron valores de diferenciación elevados para el microsatélite *SAT 03*, mientras que en el resto de las poblaciones los valores fueron bajos. Finalmente para el microsatélite *SAT 05*, las poblaciones que mostraron valores altos de divergencia fueron Volcán Pelado- Volcán Popocatepetl (0.187), Volcán Pelado-Zoológico de Chapultepec (0.31), Volcán Pelado-Yecahuazac (0.282).

Al realizar la estimación de los valores de *Fst* para todos los microsatélites entre los pares de poblaciones (Cuadro 9), se pudo observar que las poblaciones del Volcán Pelado-Zoológico de Chapultepec (0.209) y Zoológico de Chapultepec-Yecahuazac (0.207) presentaron mayor grado de divergencia poblacional, mientras que las poblaciones del Volcán

Popocatepetl-Zoológico de Chapultepec mostraron un valor ligeramente menor (0.1540) con respecto a las anteriores, aunque significativo en comparación con el resto de las poblaciones.

Para generar una medida de diferenciación poblacional incorporando el modelo de mutación paso a paso se calcularon los valores de Rst . Los valores de Rst globales resultaron ser más elevados que los de Fst (Cuadro 8), exceptuando en el microsatélite *SAT 03*, cuyo valor de Rst es mucho más bajo ($Rst = 0.0697$ y $Fst = 0.1538$).

Análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica

La matriz de datos de los estimadores de Fst ($Fst/1-Fst$) de las poblaciones del conejo zacatuche estudiadas mostró una correlación negativa no significativa con la matriz de distancia geográfica (prueba de Mantel, 10 000 permutaciones; $r = -0.3928$; $P = 0.1730$; Cuadro 10; Figura 11 y 12). Los valores más altos de distancia genética los presentaron las poblaciones Zoológico de Chapultepec-Pelado (0.2647) y Zoológico de Chapultepec - Yecahuazac (0.2636), mientras que el valor más bajo lo presentaron las poblaciones Popocatepetl-Yecahuazac (0.0677).

Estimación del número de migrantes (Nm)

Se estimó el número de migrantes por generación entre los pares de poblaciones utilizando los valores de Fst . Nm se calculó por el método de Wright (1951; Cuadro 11). Los valores más altos de número de migrantes entre poblaciones fueron entre Pelado-Chinguerería (3.549) y Popocatepetl-Pelado (3.549); en tanto que los valores más bajos de migrantes se presentaron entre Pelado-Zoológico de Chapultepec (0.944) y Zoológico de Chapultepec -Yecahuazac (0.948).



DISCUSIÓN

El ADN del conejo zacatuche utilizado para este estudio fue extraído de diferentes fuentes (pelo, hígado, oreja y excrementos) obteniéndose buenos resultados. Cabe mencionar que, aunque se han reportado análisis de ADN extraído de excrementos de otros organismos, como por ejemplo, de osos y orangutanes, no existen informes conocidos de ADN extraído de excrementos de conejos. Aunque el ADN que se logró extraer de los excrementos del zacatuche no fue de tan buena calidad como el que se extrajo de los tejidos, sí se logró obtener una adecuada cantidad de ADN para la amplificación de los diferentes microsátélites. Por esta razón, los excrementos de los conejos sí pueden ser utilizados como una fuente para extracción de ADN para análisis genéticos utilizando microsátélites. Los tamaños de los fragmentos que se extrajeron correspondieron a los reportados en la literatura (SurrIDGE et al., 1997; Mougei et al., 1997; SurrIDGE y Hewitt, 1998). Esta implicación es importante para la genética de la conservación debido a que la extracción de ADN tanto de pelo como de excrementos es una técnica no invasiva, por lo cual es muy viable su utilización cuando se trata de especies en peligro de extinción como es el caso del conejo zacatuche, ya que no siempre se puede tener acceso a los individuos.

Variación de los microsátélites

El microsátélite *SOL 30*, desarrollado para el conejo europeo y probado con un ejemplar de *R. diazi* por SurrIDGE et al., (1997), fue el microsátélite que mostró la mayor cantidad de alelos amplificados. Este microsátélite ha sido ampliamente utilizado para el estudio genético en otros lagomorfos donde también mostró alto polimorfismo. Por ejemplo, en *Lepus europaeus* y *L. timidus* (Andersson et al., 1999), donde se registraron diez y seis alelos, respectivamente. En el presente estudio el alelo 162 es el único que se presenta en las cinco



poblaciones y además es el alelo principal en cuatro de ellas, mientras que en la población del Zoológico de Chapultepec el alelo principal es el 168. El alelo 160 se presentó con baja frecuencia. También se utilizaron dos microsatélites diseñados y utilizados originalmente para *Oryctolagus cuniculus* (*SAT 03* y *SAT 05*; Mougél, 1997) y que no habían sido probados en *R. diazi*. En nuestro estudio se logró su amplificación, resultando además, ser ampliamente polimórficos al compararlos con otros análisis. En el conejo europeo, por ejemplo, para el microsatélite *SAT 03* se presentaron nueve alelos y para el *SAT 5*, siete alelos (Queney et al., 2000); para el microsatélite *SAT 05* en *Lepus europaeus* y *L. timidus* (Andersson et al., 1999), se encontraron cuatro y siete alelos, respectivamente, mientras que en *O. cuniculus* se encontraron nueve alelos (Mougél et al., 1997). Los alelos de estos microsatélites pudieron ser fácilmente distinguidos, por lo cual se recomienda su uso en otros estudios genéticos con el zacatuche.

Variación genética por población

Volcán Popocatepetl. La población del Popocatepetl es la que mayor polimorfismo presenta en promedio en todos los microsatélites analizados y también es la que cuenta con mayor número de alelos únicos. Estos resultados pueden ser atribuidos a que la población del Volcán Popocatepetl se separó geográficamente del resto de las poblaciones debido a la actividad volcánica del eje neovolcánico y durante las glaciaciones del Pleistoceno, por lo tanto, tiene mayor tiempo de aislamiento geográfico con respecto a las otras poblaciones estudiadas, lo cual pudo haber aumentado la acción de la deriva genética o las posibilidades de mutaciones que originan alelos nuevos y diferentes a los del resto de las poblaciones. Una alta tasa de endogamia puede reflejarse en baja heterocigosidad. Es importante mencionar que el



estado actual de actividad volcánica del Popocatepetl, ha restringido el acceso de los visitantes a la zona, por lo cual las poblaciones de esta localidad se han recuperado notablemente, aumentando el número de sus individuos.

Volcán Pelado. La población de Volcán Pelado es la que cuenta con el menor número promedio de todas las poblaciones estudiadas. Aunque esta población no presenta mucha variabilidad genética, un gran número de individuos son heterocigotos, por lo cual no hay diferencia importante entre las heterocigosidades observada y esperada ni desviaciones en el equilibrio de H-W. Asimismo, presenta el mayor grado de heterocigosidad (0.5027), en contraste con el resto de las poblaciones. Este valor de heterocigosidad tan alto se ve reflejado en los estimadores de endogamia poblacional, los cuales son muy cercanos a cero, lo cual nos indica que no hay desviación significativa de las proporciones de H-W y que no se presentan niveles importantes de endogamia dentro de esta población.

Zoológico de Chapultepec. Se esperaba que la población del Zoológico de Chapultepec presentara baja variabilidad genética, pero en realidad esta fue altamente polimórfica, aunque en algunos de los microsatélites, es de las poblaciones que muestra menor número de alelos. En general en todos los microsatélites, esta población presenta diferentes frecuencias alélicas con respecto a las otras poblaciones y no presenta alelos exclusivos para algún microsatélite. La presencia de pocos alelos y las diferentes frecuencias alélicas posiblemente se deban al efecto de la deriva génica que está actuando sobre esta población cautiva por el aislamiento de 28 años desde que se fundó la colonia. La ausencia de alelos únicos para esta población puede indicar que el tiempo de aislamiento al cual ha estado sometida, no ha sido suficiente para que



surjan o se fijen nuevos alelos. En la población del Zoológico de Chapultepec se presentan desviaciones en el equilibrio de H-W en forma de déficit de heterocigotos, lo cual puede provocar un alto nivel de endogamia, como se corroboró por el índice correspondiente. Esto es atribuible al número pequeño de fundadores y al escaso o nulo manejo reproductivo, lo cual podría haber conducido a un alto grado de endogamia y deriva génica; esto podría reflejarse en pérdida de la viabilidad, por lo que los individuos serían más susceptibles a enfermedades y, a largo plazo, a disminuir su reproducción (Frankham et al., 2002).

La heterocigosidad promedio observada en el Zoológico de Chapultepec fue de 21%; este valor resultó más alto que el reportado en un estudio realizado en esta misma población, pero mediante la técnica de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPDS), en donde se obtuvo una heterocigosidad observada de 15 % (Salomón, 2000). En el mismo estudio se determinó que la heterocigosidad observada promedio para la población del Volcán Pelado fue de 17.18%, mientras que el presente estudio determinó que la heterocigosidad observada fue de 50.27%. Con la técnica de microsatélites aumentó considerablemente la heterocigosidad observada de ambas poblaciones; pero en ambos estudios se concluye que la población del Zoológico de Chapultepec es menos variable que la población del Volcán Pelado.

Se esperaba que las poblaciones del Zoológico de Chapultepec y Volcán Pelado tuvieran mayor semejanza en sus alelos debido a que la población del Zoológico de Chapultepec se inició con ejemplares del Volcán Pelado, pero ambas poblaciones se



diferencian tanto en el tipo de alelos que presentan (hay algunos que se han perdido en el cautiverio y hay otros que se han adquirido), así como en las frecuencias de los mismos.

La diferenciación genética de ambas poblaciones, evaluada por medio de los valores de F_{st} para los cuatro microsatélites combinados, determinó que presentan el mayor grado de diferenciación genética entre todas las poblaciones estudiadas ($F_{st}= 0.2093$). Los resultados se deben a que la población en cautiverio del Zoológico de Chapultepec está sufriendo las consecuencias del efecto fundador (debido al reducido número con que fue fundada), los efectos de la deriva génica y la selección natural que ha provocado el aislamiento geográfico en el que se encuentra desde hace 28 años.

El hecho de que las diferentes poblaciones del conejo zacatuche presenten frecuencias alélicas distintas puede explicarse, además de por la posible influencia de la deriva génica, posiblemente porque las condiciones ambientales difieren de una localidad a otra y de una estación a otra. Así, la intensidad y la dirección de la selección natural puede variar con respecto al lugar y el tiempo y las diferencias observadas podrían ser atribuibles a la variación por la presión de la selección natural (Falconer, 1993; Jiménez et al., 1994; Fowler y Withlock, 1999). Otro tipo de presión a la que posiblemente se someten las diferentes poblaciones son con respecto a la cercanía y el crecimiento de las ciudades, ya que en algunas se presenta mayor presencia humana como senderos, carreteras, zonas de cultivo y tala de árboles, entre otras, lo que aumenta las posibilidades de fragmentación, aislando a las poblaciones, impidiendo el flujo entre ellas y, por consiguiente, que se lleguen a diferenciar genéticamente una de otra.



Yecahuazac. Otra de las poblaciones que se encuentra altamente diferenciada de la del Zoológico de Chapultepec es la población de Yecahuazac. Esta es la segunda con mayor número de alelos promedio después de la del Popocatepetl y cuenta con dos alelos únicos. Presenta déficit de heterocigotos lo que se refleja en altos valores de endogamia. Esta población es interesante debido a que es de las más cercanas geográficamente a la población del Volcán Pelado, pero es la que más se diferencia de ésta.

Chingueretería. La población de Chingueretería presentó déficit de heterocigotos. La heterocigosidad observada de esta población fue un poco más elevada que la del Zoológico de Chapultepec (0.264), pero aún así fue más baja que la esperada. Lo mismo que las otras poblaciones (exceptuando a la población del Pelado), ésta presenta altos índices de endogamia. Sus niveles de diferenciación genética con las otras poblaciones son bajos; con la que menos se diferencia es con la población del Pelado y aún con la población del Zoológico de Chapultepec el nivel de diferenciación es muy bajo. Estos valores de diferenciación se ven reflejados en el valor de número de migrantes, ya que entre las poblaciones Pelado-Chingueretería y Zoológico de Chapultepec-Chingueretería se presenta elevado número de migrantes.

La heterocigosidad intrapoblacional en general resultó baja en las diferentes poblaciones, lo que puede estar indicando un alto grado de endogamia dentro de las poblaciones. Esto se corroboraría con los datos obtenidos con los valores de *F_{is}* y *R_{is}*, los cuales se encuentran muy alejados de cero, excepto para el microsatélite *SAT 03*. Entre más cercanos a uno, mayor grado de endogamia se presentará en las poblaciones, pues los valores positivos significan una deficiencia en el número de heterocigotos (Frankham et al., 2002).



Otra explicación que puede atribuirse a los valores de heterocigosidad obtenidos puede ser el tamaño de la muestra de cada población, números muy bajos de tamaño de muestra pueden no representar a la población total e indicar déficit de heterocigotos. En este trabajo, se trató de incluir un número representativo de individuos para minimizar esta posibilidad.

Variación genética entre poblaciones

Las poblaciones de zacatuche estudiadas presentaron una heterocigosidad esperada promedio de 67 %; este valor es similar a los obtenidos en otros estudios de lagomorfos. Por ejemplo, en diferentes poblaciones de *L. americanus* la heterocigosidad esperada promedio fue de 67% (Burton et al., 2002), para *O. cuniculus* varió de 61 a 66%; para *L. timidus* el promedio fue de 54% y para *L. europaeus*, el promedio fue de 70% (Andersson et al., 1999). En comparación la heterocigosidad observada en este estudio fue aproximadamente la mitad de la esperada (35%), similar a la encontrada en *L. timidus* de 42% y en *L. europaeus*, de 57% (Andersson et al., 1999).

La heterocigosidad interpoblacional es alta comparada con la intrapoblacional, esto es debido a que cada una de las poblaciones presenta alelos y frecuencias diferentes y que al combinarse todas las poblaciones la diversidad genética se eleva. Mientras que la fragmentación de las poblaciones se espera baje la variabilidad genética dentro de las poblaciones, algunos autores han sugerido que la variación genética total puede mantenerse debido a la diferenciación genética entre las poblaciones, lo que trae como consecuencia el mantenimiento de diferentes alelos en las poblaciones aisladas (por ejemplo Harrison y Hastings, 1996; Mossman y Waser, 2001). Esto es importante para la conservación del conejo



ya que si se planean adecuadas reintroducciones de ejemplares de diferentes poblaciones y fundando colonias nuevas con ejemplares de varias localidades, se podría rescatar la amplia variación genética con que se cuenta por separado.

El déficit de heterocigotos que se observa en los microsatélites de algunas de las poblaciones puede deberse a la endogamia de las poblaciones o también puede atribuirse a la presencia de alelos nulos (alelos que no amplifican debido a cambios en la secuencia del sitio de alineamiento de los iniciadores). Los datos presentados en este trabajo se basan en muestras de poblaciones; el muestreo de grupos sociales genéticamente aislados puede resultar en el efecto Wahlund. Este efecto se manifiesta en un déficit del número de heterocigotos observado; esto puede ser también una explicación del déficit de heterocigotos que se obtuvo en los resultados (SurrIDGE et al., 1998). Sin duda, la variación que se detectó podría permitir a las poblaciones aisladas del conejo zacatuche estar alcanzando diversos niveles de diferenciación genética.

Relación entre distancia genética, distancia geográfica y número de migrantes

Algunas poblaciones del conejo doméstico en estado silvestre, proporcionan datos para apoyar un modelo de aislamiento por distancia para las distintas poblaciones, esto es, que se presente una correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética (entre pares de poblaciones). En el presente estudio, la prueba de Mantel nos indicó que no existe correlación entre estas dos variables, por lo cual para este estudio se puede proponer que el alto grado de diferenciación poblacional observado entre algunas de las poblaciones podría estar indicando un posible aislamiento reproductivo, pero no está relacionado con la distancia geográfica; estas diferencias podrían ser explicadas debido a otras causas como pueden ser,



diferencias en la ecología y la demografía. Se encontró que hay una relación negativa entre estos dos aspectos (Figura 11). En otros estudios no se detectó aislamiento por distancia en el conejo europeo (Fuller et al., 1996, 1997; SurrIDGE et al., 1999), en el leming de collar (Ehrich et al., 2001) o en el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*, Mossman y Waser, 2001).

Estos resultados nos permiten determinar que la diferenciación genética que muestran las diferentes poblaciones, posiblemente no son producto de la distancia geográfica que las separa, sino de otras causas como pueden ser las barreras geográficas, la diferenciación adaptativa, la deriva génica, la selección natural y los efectos de la endogamia. La población del Zoológico de Chapultepec es la que presenta mayor índice de endogamia de entre todas las poblaciones y la del Volcán Pelado es la que muestra menor índice; posiblemente es por esto que al comparar ambas poblaciones sean las que mayor valor de divergencia genética muestran. Los valores elevados de endogamia generalmente están ligados a tasas bajas de flujo genético.

Las bajas tasas de flujo genético pueden conducir a diferenciación entre poblaciones. Las poblaciones que cuentan con mayor distancia genética (valores más altos de F_{st}) son las que presentan menor flujo genético (menor número de migrantes), mientras que las que tienen los valores más bajos de F_{st} , presentan valores más elevados flujo genético. Nuevamente estos datos nos indican que no hay relación entre la distancia y la diferenciación genética ya que aún las poblaciones más alejadas, como son el Volcán Popocatepetl-Yecahuazac, presentan el número de migrantes elevado (3.7; los más altos de todos los pares de poblaciones; Figura 12), valor semejante a poblaciones más cercanas geográficamente como Pelado-Chingueretería



(3.4). En cuanto al Zoológico de Chapultepec, comparado con las poblaciones silvestres, el número de migrantes que se obtiene es muy bajo, principalmente Pelado-Zoológico de Chapultepec (0.944; el más bajo obtenido en el estudio).

En general para todas las poblaciones las tasas de flujo génico son muy bajas, lo cual puede conducir a diferenciación de las poblaciones debido a deriva génica (valores muy bajos de número de migrantes pueden reflejar deriva génica) o a diferencias en la ecología y la demografía (SurrIDGE et al., 1999). Es importante mencionar que el número de migrantes toma varios cientos de años para equilibrarse desde que el flujo genético se ha interrumpido (Slatkin y Barton, 1989), lo cual puede significar que posiblemente el tiempo que las poblaciones han estado separadas geográficamente (de manera natural desde el Pleistoceno y más recientemente causada por las actividades humanas), no es la causa directa de la diferenciación genética que está siendo detectada; la deriva génica y la selección natural posiblemente están actuando de manera similar en las poblaciones silvestres, mientras que en la población del Zoológico de Chapultepec están actuando con mayor intensidad sobre los individuos.



CONCLUSIÓN

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados, las poblaciones silvestres de *Romerolagus diazi* se encuentran en proceso de diferenciación genética, particularmente la población del Zoológico de Chapultepec, lo cual apoya la hipótesis alternativa de este estudio.



IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DEL CONEJO ZACATUCHE

Debido a su importancia biológica, el zacatuche es una especie prioritaria para la conservación y uno de los enfoques primordiales para preservarla a largo plazo es el genético, ya que para mantener viables a sus poblaciones se necesita de variabilidad genética adecuada, de lo contrario pueden llegar a desaparecer. Por ejemplo, en el presente estudio se determinó que algunas de las poblaciones no presentan alta variabilidad lo cual puede poner en riesgo su sobrevivencia. Para la conservación de las poblaciones del conejo zacatuche, se deben aumentar los estudios de tipo genético sobre esta especie, tanto en las poblaciones silvestres como en las cautivas.

Con respecto a las poblaciones silvestres, es importante realizar un monitoreo permanente sobre cuántas poblaciones quedan, en qué lugares se encuentran y el número de los individuos que las componen y tratar de conectar las más cercanas por medio de corredores para que exista flujo de individuos entre ellas; como por ejemplo entre las poblaciones de Parres con las poblaciones de Yecahuazac y Chingueretería. De esta manera, proponer que las zonas donde se encuentran las principales poblaciones sean decretadas zonas de conservación y de monitoreo. Es aquí donde los estudios genéticos toman su importancia en la conservación ya que conociendo la variabilidad genética de cada población, podría realizarse intercambio de individuos entre las distintas poblaciones estudiadas con la finalidad de enriquecer su componente genético, disminuyendo el riesgo de extinción por esta causa.

Muchas especies amenazadas o en peligro de extinción debido a la reducción de sus poblaciones, como es el caso del conejo zacatuche, han sido reproducidas en cautiverio para



asegurar su supervivencia y posiblemente una futura reintroducción a las poblaciones silvestres. Aunque, se ha demostrado que en algunos casos el mantener en cautiverio a los individuos durante muchos años disminuye la variabilidad genética de éstos. Es por ello, que con la ayuda de los estudios genéticos, como el aquí reportado, se planeen estrategias adecuadas y planificadas para la reproducción de los individuos. En el caso de la población del Zoológico de Chapultepec, es recomendable un adecuado control de la reproducción de los individuos por medio de cruas seleccionadas para tratar de reducir la endogamia de la población y los efectos dañinos de ésta a largo plazo. De igual manera, sería adecuado, que cada determinado tiempo se incorporaran a las poblaciones cautivas individuos de origen silvestre con la finalidad de incorporar alelos que puedan estarse perdiendo debido al encierro. El conejo zacatuche es una especie única y su conservación debe ser un reto para los mexicanos, debido a esto se considera un emblema de la conservación para México.



LITERATURA CITADA

- Allendorf, F. W. y R. F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. Pp. 57-76. *in* Conservation biology: the science of scarcity and diversity (Soulé, M. E. ed.) Sunderland, MA: Sinauer. 584 pp.
- Amos, W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353 (1366): 177-86.
- Andersson, A., C.G.Thulin y H. Tegelstorm. 1999. Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridization between an introduced and a native hare species. *Hereditas* 130: 309-315
- Angermann, R., J.E.C. Flux, J. A. Chapman y A. T. Smith. 1990. Lagomorph classification. Pp. 7-13, *in* Rabbits, hares, and pikas. Status survey and conservation action plan (J. A. Chapman y J.E.C. Flux comps.). IUCN-The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Suiza, 168 pp.
- Ashley, M.V. 1999. Molecular conservation genetics. Tools for assaying the structure of DNA prove valuable in protecting endangered species. *American Scientist*, 87: 28-35.
- Ashley, M.V. y D.B. Dow. 1994. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. Pp.185-201. *in* Molecular Ecology and evolution approaches and applications. (B. Schierwater, B. Streit, G.P. Wagner y R. Desalle, eds.). Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
- Balloux, F.; Lugon-Moulin N. and Hausser J., 2000. Estimating gene flow across hybrid zone: how reliable are microsatellites?., *Acta Theriologica* 45, suppl. 1: 93–101.
- Barrera, A. 1953. Sinopsis de los sifonápteros de la Cuenca de México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 7: 155-245.
- Barrera, A. 1966. Redefinición de *Cediopsylla* Jordan y *Hoplopsyllus*. Nuevas especies, comentarios sobre el concepto de relicto y un caso de evolución convergente. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 27: 67-83.
- Barrera, A. 1968. Distribución cliserial de los sifonápteros de la Cuenca de México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 7: 155-245.
- Beckman, J.S. y J.L.Weber. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627-631.
- Burton, C. 2002. Microsatellite analysis for multiple paternity and male reproductive success in the promiscuous snowshoe hare. *Can. J. Zool.* 80: 1948-1956.



- Burton, C., C.J. Krebs, y E.B. Taylor. 2002. Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. *Mol. Ecol.* 11: 1689-1701.
- Cavalcanti, M.J. 2001. Test for association between two symmetric distances matrices with permutations iterations, version 1.14. Departamento de Geologia e Paleontologia: Museu Nacional do Rio de Janeiro, Brasil.
- Cebull, S. E. y D. H. Shurbet. 1987. Mexican Volcanic Belt: an interplate transform?. *Geofs. Int. Spec. vol. on Mexican Volcanic Belt—Pt. 3A* (S. P. Verma, ed.), vol. 26: 1–13. *Zool.* 38: 1–10.
- Cervantes-Reza, F. A. y F. X. González. 1996. Los conejos y liebres silvestres de México. Pp. 17-25. *in* *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F. J. Romero y J. López-Paniagua, comps.). Ediciones Científicas Universitarias, Texto Científico Universitario, Fondo de Cultura Económica, México.
- Cervantes-Reza, F.A. 1980. Principales características biológicas del conejo de los volcanes *Romerolagus diazi*, Ferrari Pérez 1893 (Mammalia Lagomorpha). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 137 pp.
- Cervantes-Reza, F.A., C. Lorenzo y R. S. Hoffmann. 1990. *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species*, 360: 1-7.
- Chapman, J. A. y J. E. C. Flux. 1990. Introduction and overview of the lagomorphs. Pp.1-6. *in* *Rabbits, hares, and pikas. Status survey and conservation action plan* (J. A. Chapman y J.E.C. Flux comps.). IUCN-The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Suiza, 168 pp.
- Cherly, A. Schmidt. 1999. Variation and congruence of microsatellite markers for *Peromyscus leucopus*. *Journal of Mammalogy*, Baltimore. May, Vol. 80, N° 2, 522-529
- Chesser, R. K., M. H. Smith y I. L. Brisbin, Jr. 1980. Management and maintenance of genetic variability in endangered species. *International Zoo Yearbook*, 20: 146-154.
- Crawford, T.J. 1984. What is population? *in* *Evolutionary Ecology*. (B. Shorrocks, ed.) Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- Dawson, M.R. 1967. Lagomorph history and stratigraphic record. *Essays in Paleontology and Stratigraphy*, Raymond C. Moore Commemorative volume. Universidad de Kansas.
- De Poorter, M. y W. Van der Loo. 1981. Observations on the paleolaginae species *Romerolagus diazi* in captivity. Pp 12-16, *in* *World Lagomorph Conference* (K. Myers y C. D. MacInnes, comps.). Universidad de Guelph, Guelph, Ontario, 983 pp.



- Demant, A. 1978. Características del Eje Neovolcánico Transmexicano y sus problemas de interpretación. Univ. Nac. Autón. México. Inst. Geol. Rev. 2: 172-187.
- Demant, A. 1982. Interpretación geodinámica del volcanismo en el Eje Neovolcánico Transmexicano. Ibid. 5: 217-222
- Durrel, G. y J. Mallison. 1968. The volcano rabbit *Romerolagus diazi*, in the wild and at Jersey Zoo. International Zoo Yearbook, 10: 118-122.
- Eguiarte, L.E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. Pp. 35-50. (Nuñez, F.J. y L.E. Eguiarte, comps) Ciencias, UNAM. México.
- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. Pp. 371-398. *in* La evolución biológica (Nuñez, F.J. y L.E. Eguiarte, comps) Ciencias, UNAM. México.
- Ehrich, D., P.E. Jorde y C.J. Krebs. 2001. Spatial structure of lemming populations (*Dicrostonyx groenlandicus*) fluctuating in density. Molecular Ecology, 10, 481-495.
- Epplen, J. T. y T. Lubjuhn. 1999. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. DNA Profiling and DNA Fingerprinting. Edit Bir Khäuser. Berlin. 252 Pag
- Fa, J.E. y D. J. Bell. 1990. The volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). Pp. 61-94, in Rabbits, hares, and pikas. Status survey and conservation action plan (J. A. Chapman y J.E.C. Flux comps.). IUCN-The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Suiza, 168 pp.
- Falconer, D.S. 1989. Introduction to quantitative genetics. 3rd edn. Longman, London.
- Fowler, K. y M.C. Whitlock. 1999. The variance in inbreeding depression and the recovery of fitness in bottlenecked populations. Proc. R. Soc. Lond. B. 266 : 2061-2066.
- Frankel, O. H. y M. E. Soulé. 1981. Conservation and evolution. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 327 pp.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. Annual review of genetics, 29: 305-327.
- Frankham, R., J.D. Ballou & D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press
- Fuller, S.J., J.C. Wilson y P.B. Mather. 1997. Patterns of differentiation among wild rabbit populations *Oryctolagus cuniculus* L. in arid and semiarid ecosystems of north-eastern Australia. Molecular Ecology, 6, 145-153.



- Fuller, S.J., P.B. Mather y J.C. Wilson. 1996. Limited genetic differentiation among wild *Oryctolagus cuniculus* L. (rabbit) populations in arid eastern Australia. *Heredity*, 77, 138-145.
- García-Moreno, J., M. Matoq, M. S. Roy, E Geffen, y R. K Wayne. 1996. Relationships and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conservation Biology*, 10(2): 376-389.
- Granados, H. 1981. Some basic information on the volcano rabbit. *in* World Lagomorph Conference (K. Myers y C. D. MacInnes, comps.). Universidad de Guelph, Guelph, Ontario, 983 pp.
- Hall, E.R. 1981. The mammals of North America. Segunda Edición, John Wiley and Sons, Nueva York, 1: 1-600 + 90 ilustraciones.
- Harris, L.D. 1984. The fragmented forest: Island biogeography theory and the preservation of biotic diversity. University of Chicago Press. Chicago.
- Harrison, S. y A. Hastings. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 180-183.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of populations. Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- Hibbard, C. W. 1955. Pleistocene vertebrates from the Upper Becerra (Becerra Superior) Formation, Valley of Tequisquic, Mexico, with notes on other Pleistocen forms. *Contrib. Mus. Paleontol. Univ. Michigan*. 12: 47-96.
- Hibbard, C.W. 1963. The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *Journal of Mammalogy*, 44: 1-15.
- Hoth, A. Velázquez, F. J. Romero, L. León, M. Aranda y D. J. Bell. 1987. The volcano rabbit: a shrinking distribution and a threatened habitat. *Oryx*, 21: 85-91.
- Hoth, J. y H. Granados. 1987. A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, México City. *International Zoo Yearbook*. 26: 261-265.
- Jimenez, J.A., K.A. Hudhes, G. Alask, L. Graham y R.C. Lacy. 1994. An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266: 271-273.
- Kimura, M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*, 49, 725-738.
- Lacy, R.C. 1993. Impacts of inbreeding in natural and captive populations of vertebrates: implications for conservation. *Perspectives in Biology and Medicine*, 36: 480-496.



- Le Page, S.L., R.A. Livermore, D.W. Cooper y A.C. Taylor. 2000. Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Molecular Ecology*, 9: 753-763.
- Leberg, P.L. 1992. Effects of population bottlenecks on genetics diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 46: 477-494.
- Lindsay, N.B.D. 1982. A second report on the management and breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Jersey Wildlife Preservation Trust. *Dodo, J. Jersey Wildl. Preserv. Trust*, 19:46-51.
- Matsuzaki, T., M. Saito y M. Kamiya. 1982. Breeding and rearing of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) in captivity. *Exp. Anim.*, 31-185-188. (En japonés).
- Michalakis, Y. y L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics*, 142, 1061-1064.
- Mossaman, A. Catherin and Peter M. Waser. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus Leucopus*). *Canadian journal of Zoology.*, 79: 285-295
- Mougel, F., J.C. Mounolou y M. Monnerot. 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* 28, 58-71.
- Mougel, F., P. Fontinillas, G. Queney, J. C. Mounolou y M. Monnerot. 1997. Analysis of three wild populations of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) using microsatellite loci., *Gibier Fuane Sauvage, Game Wildlife*, Vol. 14 (3) Sep. 451-462
- Nixon, G. T., A. Demant, R. L. Armstrong, y J.E. Harakal. 1987. K-Ar and geologic data bearing on the age and evolution of the Transmexican Volcanic Belt. *In* S. P. Verma (ed.), *Geofs. Int. Spec. vol. on Mexican Volcanic Belt—Pt. 3*, vol. 26: 109-158. 43: 17-30.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental. Especies Nativas de México, *Diario Oficial*, Lunes 6 de Marzo de 2002, p. 2-60.
- Otha, T. y M. Kimura. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 82, 201-204.
- Philippa, D. 2001. *Basic Molecular Biology Essential Techniques*. John Wiley & Sons New York., 1-25 pp



- Queney, G., N. Ferrand, S. Marchandeauss, M. Azevedo, F. Mougel, M. Branco y M. Monnerot. 2000. Absence of a genetic bottleneck in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) population exposed to severe viral epizootic. *Molecular Ecology* 9, 1253-1264.
- Raymond, M y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49 : 1280-1283.
- Rhodes, O.E. Jr. y M. H. Smith. 1992. Genetics perspective in wildlife management: the case of large herbivores. Pp. 985-996. *in* *Wildlife 2001* (D. McCullough y R. Barret eds.). Elsevier Science Publishers Ltd., New York.
- Rico, C., I. Rico, N. Webb, S. Smith, D. Bell y G. Heweitt. 1994. Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, 25, 367.
- Robinson, T. J., G. Elder y W. López-Forment. 1981. Banding studies in the volcano rabbit, *Romerolagus diazi* and Crawshay's hare, *Lepus crawshai*: evidence of the leporid ancestral karyotype. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, 23: 469-474.
- Rojas, P. M. 1951. Estudio biológico del conejo de los volcanes (género *Romerolagus*) (Mammalia Lagomorpha). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 71 pp.
- Rzedowsky, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, México, 14: 3-21.
- Salomón, S.V.M. 2000. Estimación de la variabilidad genética del zacatuche (*Romerolagus diazi*), por el método de RAPD en ejemplares de dos poblaciones. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. UAM, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Sambrook, J., Fritsch F. E. and Maniatis T. 1989., *Molecular Cloning a laboratory manual*, second edition, ColdSpring Harbor laboratory Press. Vol 3 A.1-R.4
- Segesser Von F. , N. Menard, B. Gaci y R.D. Martin. 1999. Genetic differentiation within and between isolated Algerian subpopulations of Barbary macaques (*Macaca sylvanus*): evidence from microsatellites.
- Slatkin, M y N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43, 1349-1368.
- Slatkin, M. 1995 A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, 139: 457-462.



- Smith, M. H. y O.E. Jr. Rhodes. 1993. Genetic applications in wildlife management: and introduction. *Proceedings of the International Union of Game Biologists* 1: 110-112.
- Smith, M. H., M. N. Manlove y J. Joule. 1978. Genetic organization in space and time. Pp. 99-113. *in* *Populations of small mammals under natural conditions* (D. P. Snyder ed.). Pymatuning Laboratory of Ecology, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.
- SurrIDGE, A. K., K. M. Ibrahim, D. J. Bell, N. J. Webb, C. Rico y G. M. Hewitt. 1999. Fine-scale genetic structuring in a natural population of european wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Molecular Ecology* (8):299-307.
- SurrIDGE, A.K., D.J. Bell y G.M. Hewitt. 1998. Using molecular tools to study biogeography of the european wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Britain. *Gibier Faune Sauvage, Game Wildl*, 15 (1): 65-74.
- Surriedge, K. A., D. J. Bell., C. Rico y G. M. Hewitt. 1997. Polymorphic microsatellite loci in thee European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics* 28, 302-305.
- Taylon, A. C. and D. W. Cooper. 1999. Microsatellite identify introduced New Zealand tammar wallabies (*Macropus eugenii*) as an "extinct" taxon. *Animal Conservation* 2, 41-49
- Tornback, J. y M. Jenkins. 1984. *The IUCN Mammal Red Data Book. Tomo 1, International Union of the Conservation of Nature, Gland, Suiza.*
- Uribe-Alcocer, M. 1977. Estudios citogenéticos en algunas especies de roedores y lagomorfos de México. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 169 pp.
- Velázquez, A. 1988. Especies y hábitats en peligro de extinción; el caso del conejo de los volcanes. *Información Científica y Tecnológica, CONACYT, México, D.F.*, 10 (147): 45-49.
- Velázquez, A. 1996. Síntesis de estudios sobre el zacatuche y su hábitat. Pp.133-144. *in* *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F. J. Romero y J. López-Paniagua, comps.). Ediciones Científicas Universitarias, Texto Científico Universitario, Fondo de Cultura Económica, México.
- Velázquez, A., F. J. Romero y León, L. 1996. Fragmentación del hábitat del conejo zacatuche. Pp.73-86. *in* *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F. J. Romero y J. López-Paniagua, comps.). Ediciones Científicas Universitarias, Texto Científico Universitario, Fondo de Cultura Económica, México.



- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n-dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 7: 524-530.
- Wright, S. 1949. Adaptation and selection. In: Jepson G, Simpson G, Mayr E (eds) *Genetics, palaeontology and evolution*. Princeton University Press, Princeton, pp 365-389
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395-420.

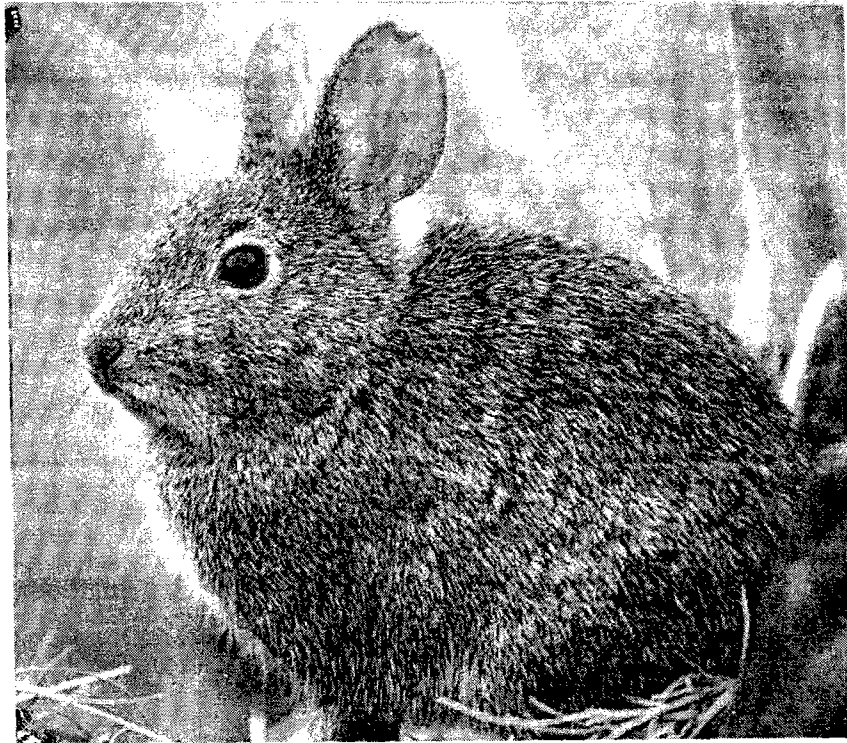


Figura 1. El conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

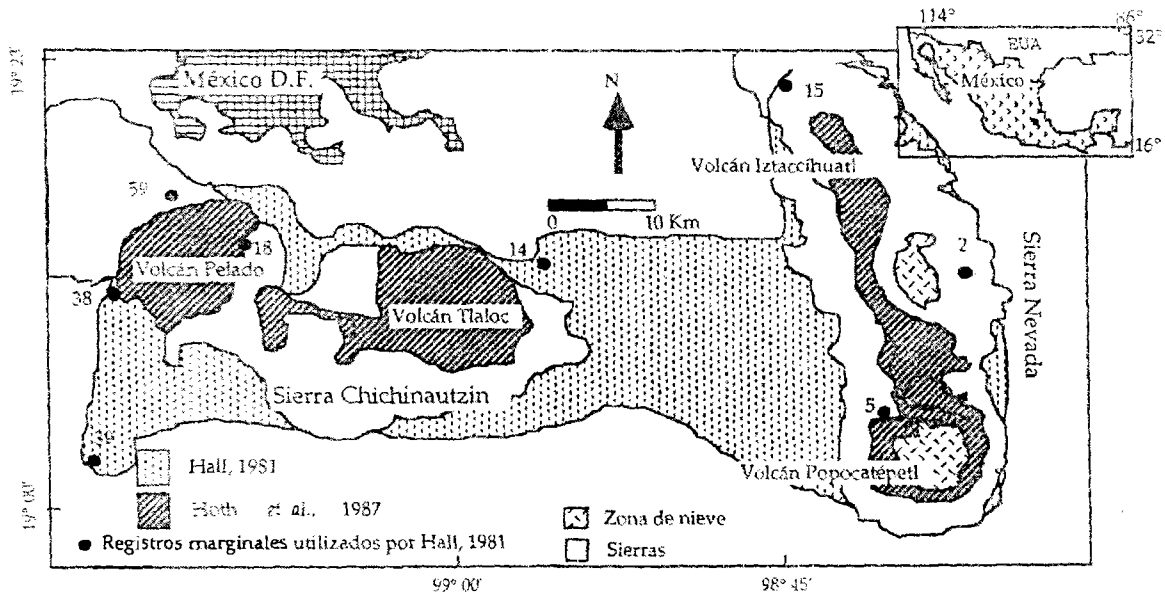


Figura 2. Mapa donde se ilustran las áreas de distribución del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*; Hoth et al., 1987) en el pasado.

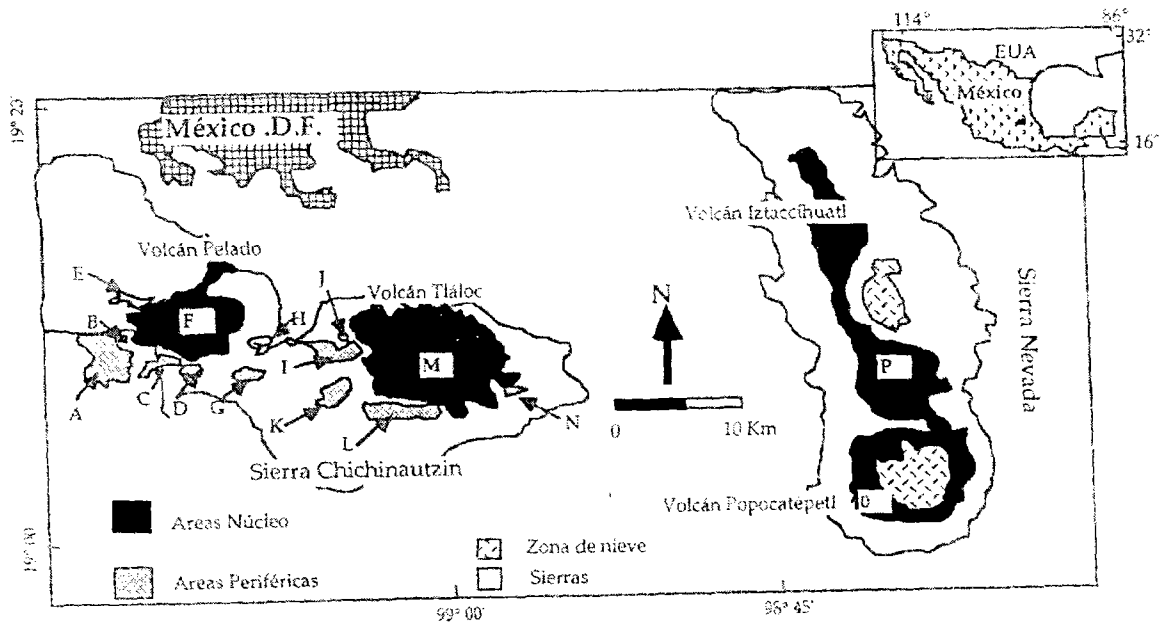


Figura 3. Mapa donde se ilustra el área de distribución reciente del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*; Velázquez et al., 1996). El área está fragmentada en 16 unidades: cuatro núcleo y 12 periféricas.

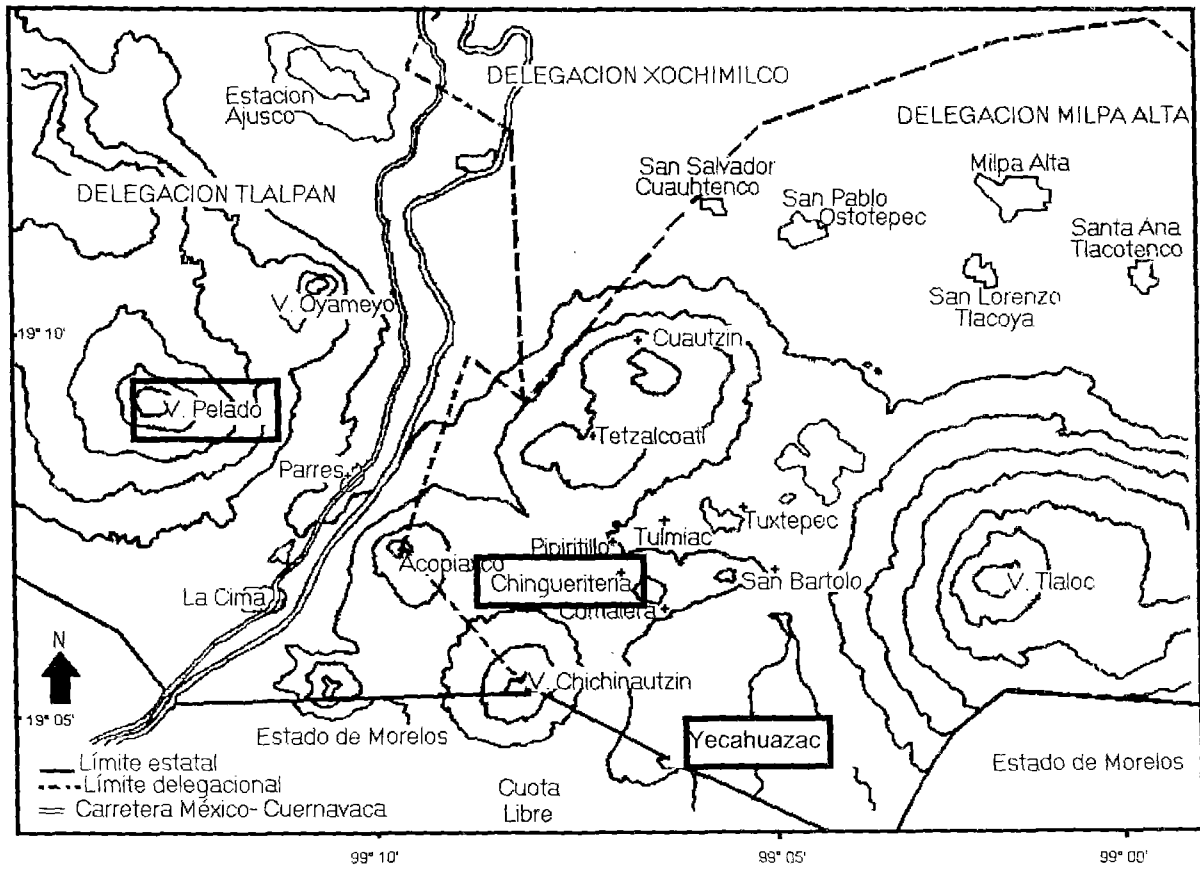


Figura 4. Localidades (rectángulos) en las Delegaciones de Milpa Alta y Tlalpan donde fueron colectadas las muestras del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

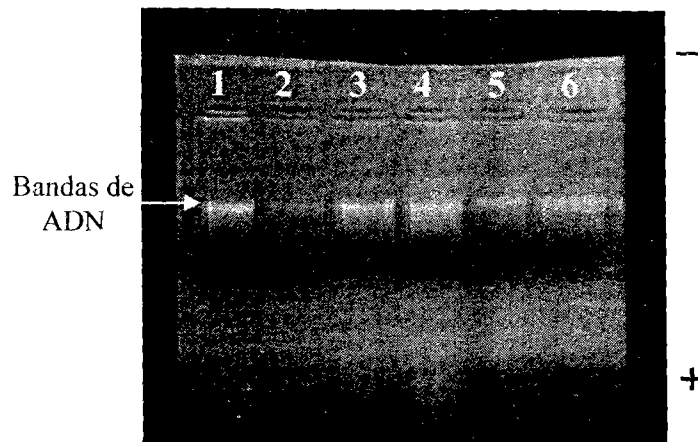


Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa en donde se determinó la presencia del ADN extraído de muestras de pelo de seis individuos del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) del Zoológico de Chapultepec.

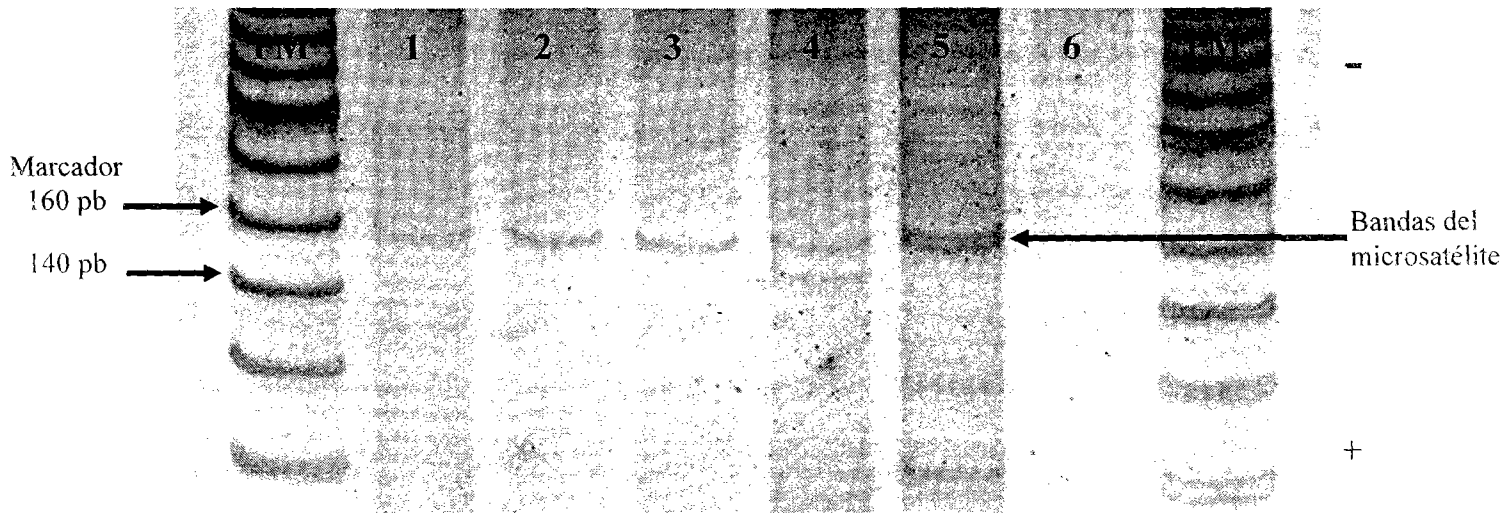


Figura 6. Fotografía de un gel de acrilamida teñido con plata donde se muestran las bandas de amplificación de un microsatélite de ADN del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) obtenido por la técnica de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR); cada carril indica un individuo diferente. Los carriles 1, 2, 3 representan individuos homocigotos (presencia de una sola banda); los carriles 4 y 5 individuos heterocigotos (presencia de dos bandas), el carril 6 está vacío. PM = es el marcador de peso molecular.

Figura 7. Alelos encontrados para el microsatélite *SOL 08* para cada población estudiada del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

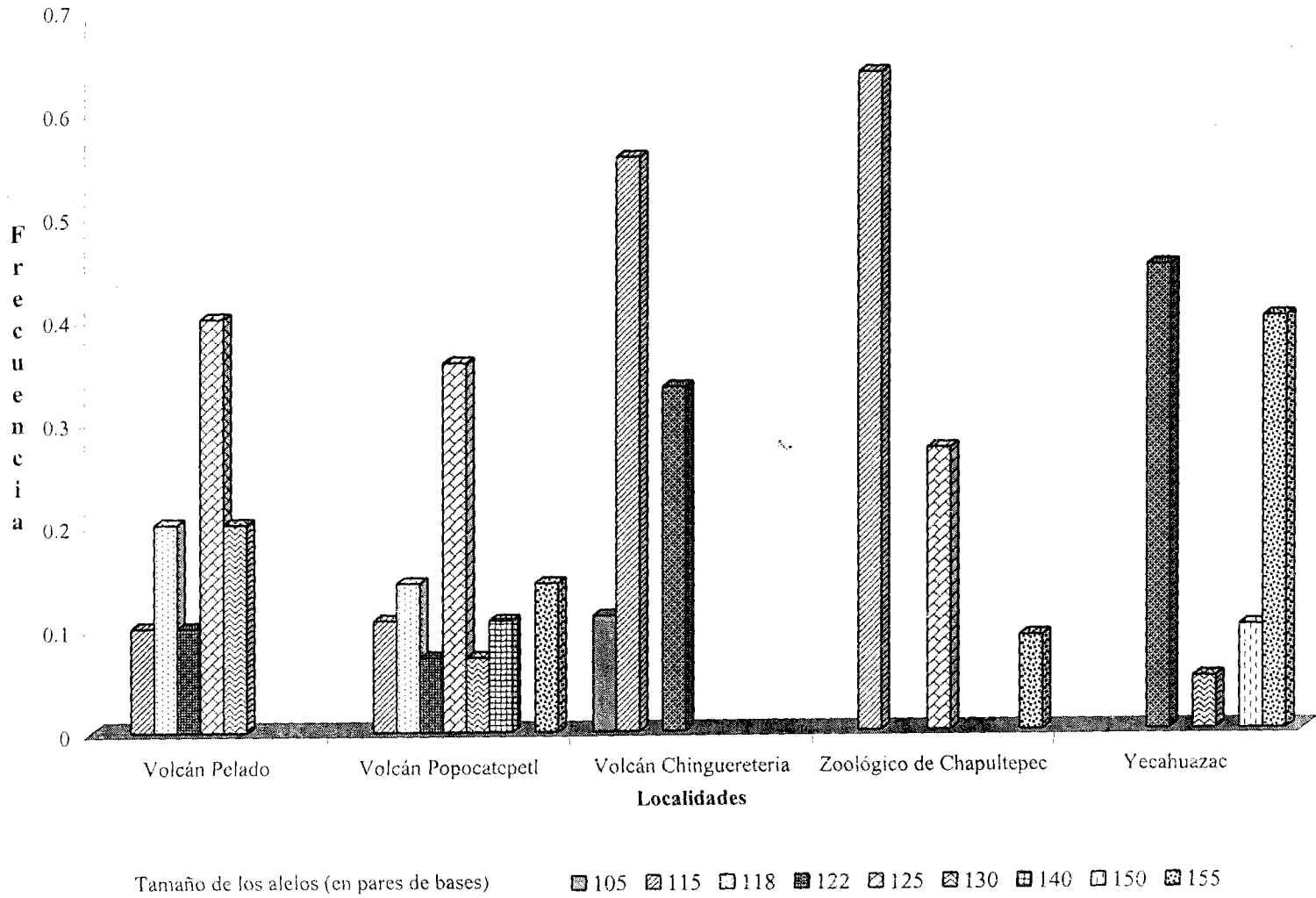


Figura 8. Alelos encontrados para el microsatélite *SOL 30* para cada población estudiada del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

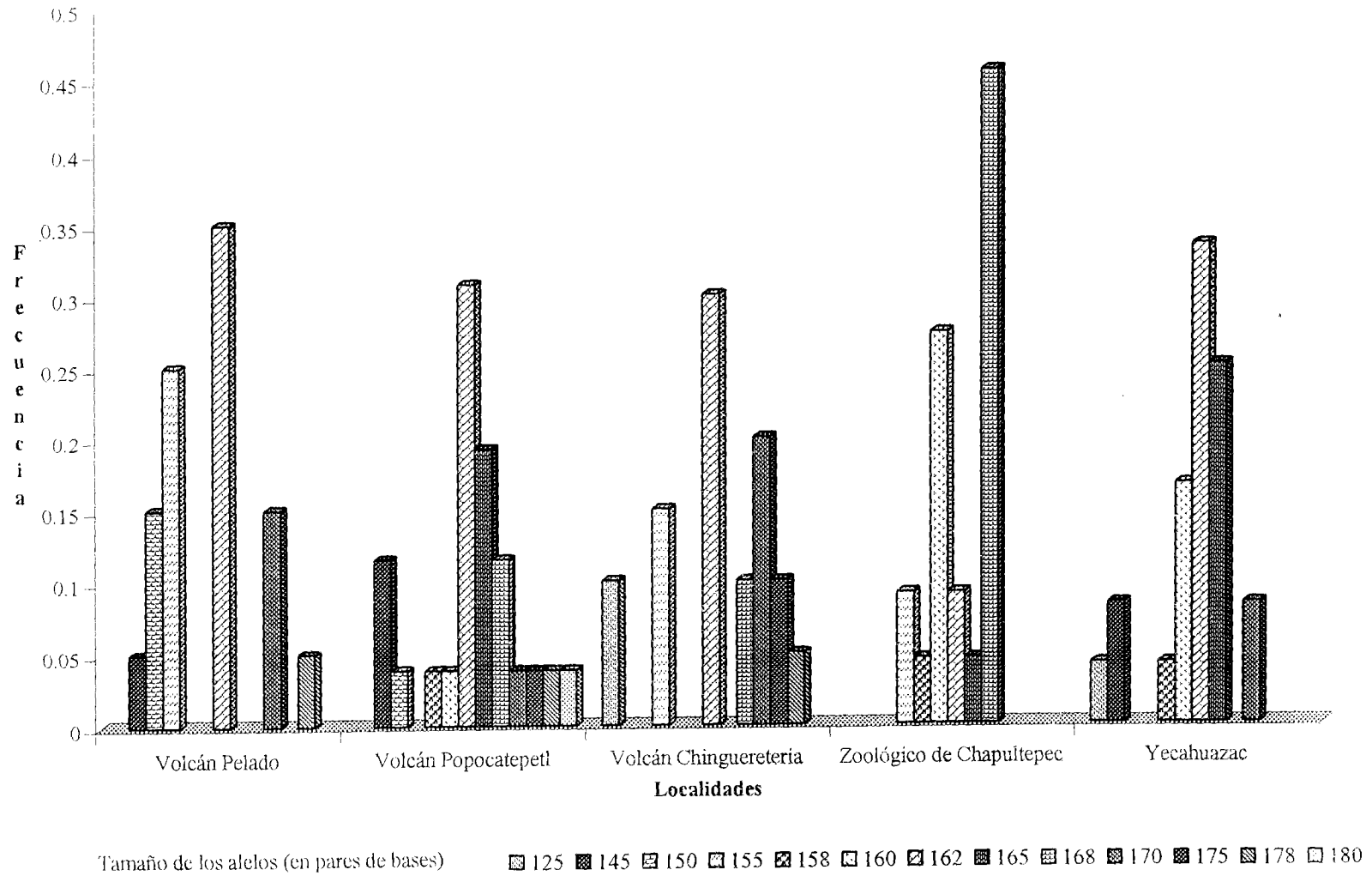


Figura 9. Alelos encontrados para el microsatélite SAT 03 para cada población estudiada del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

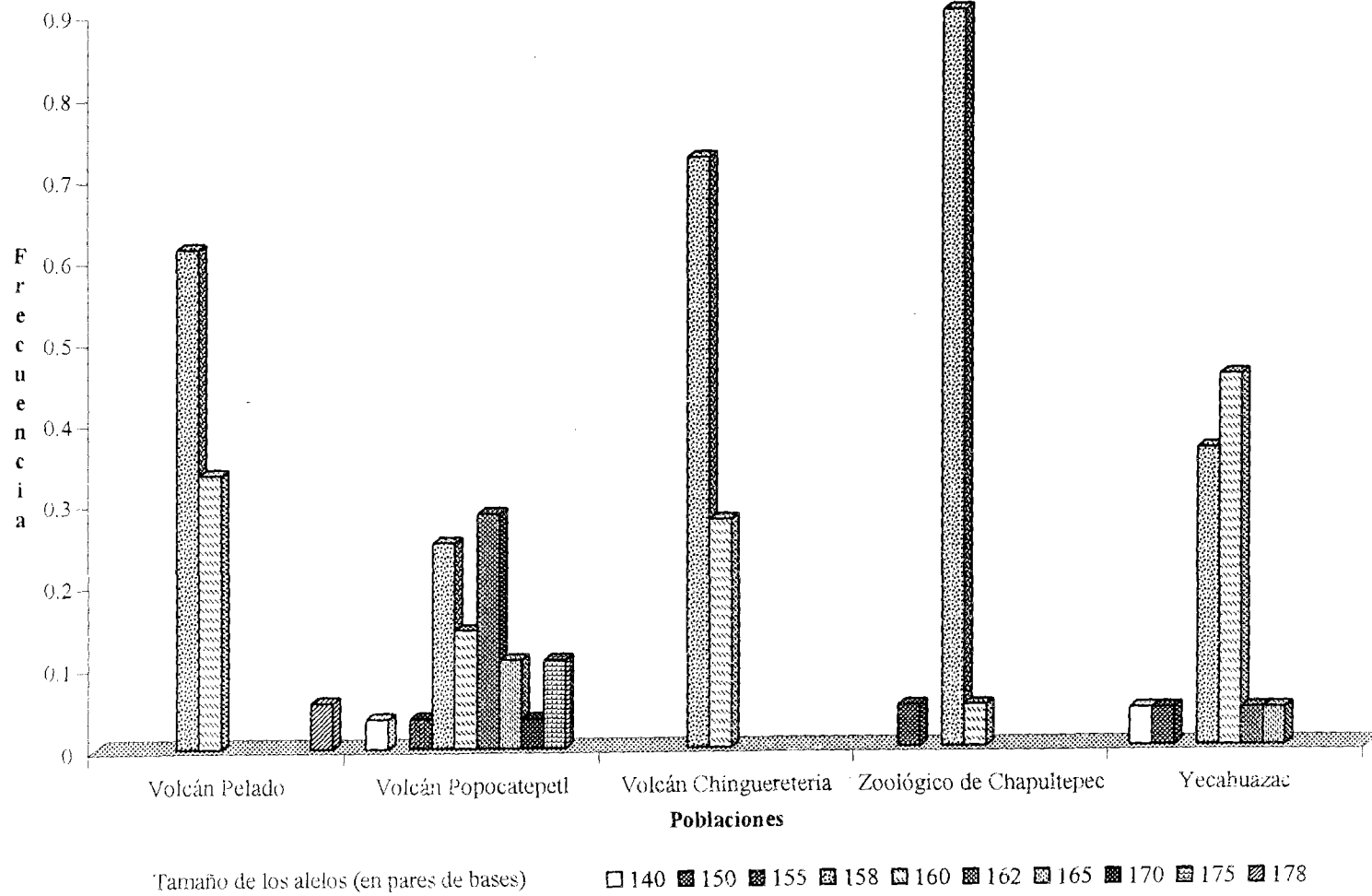


Figura 10. Alelos encontrados para el locus *SAT 05* para cada población estudiada del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*)

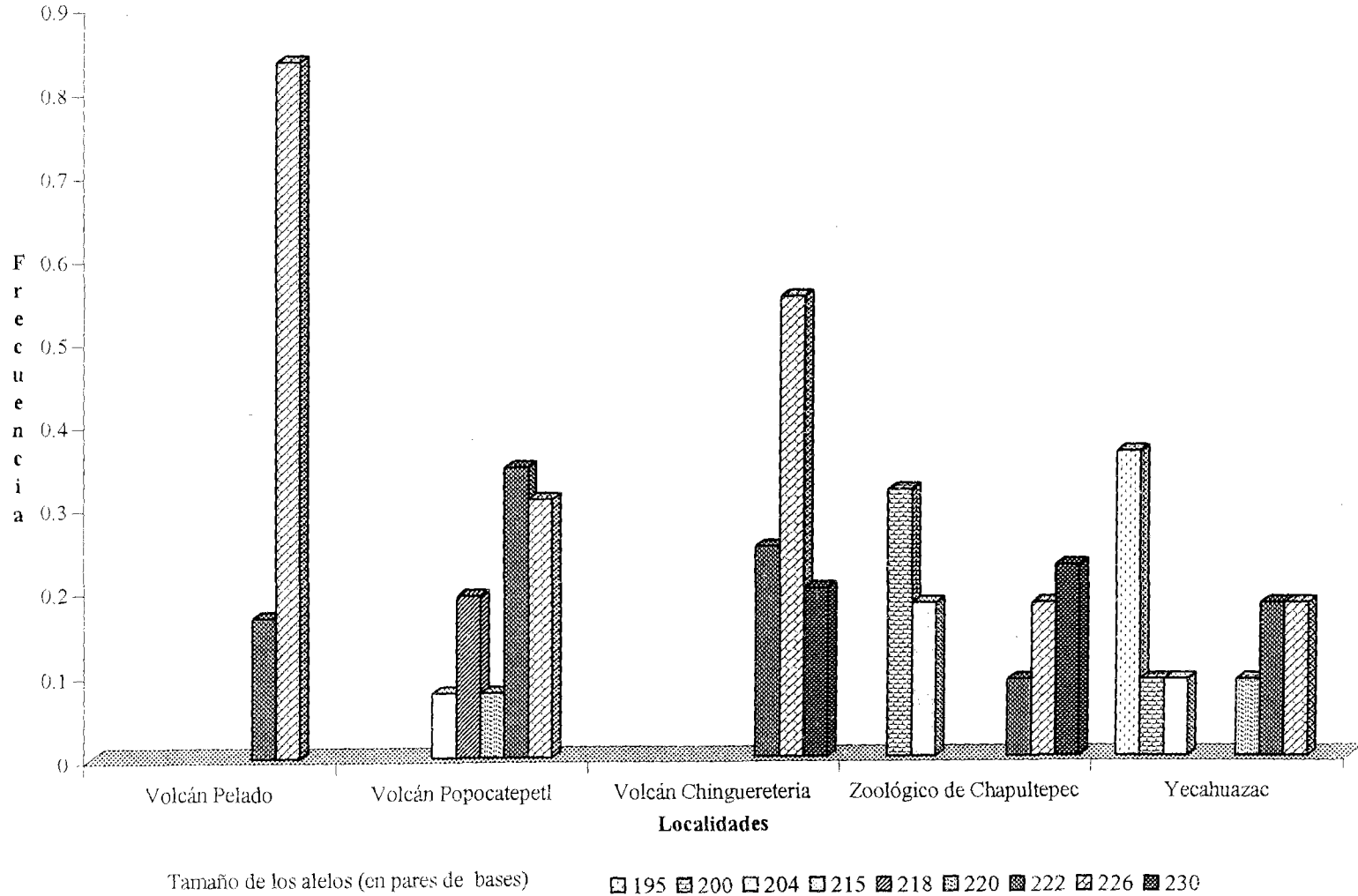
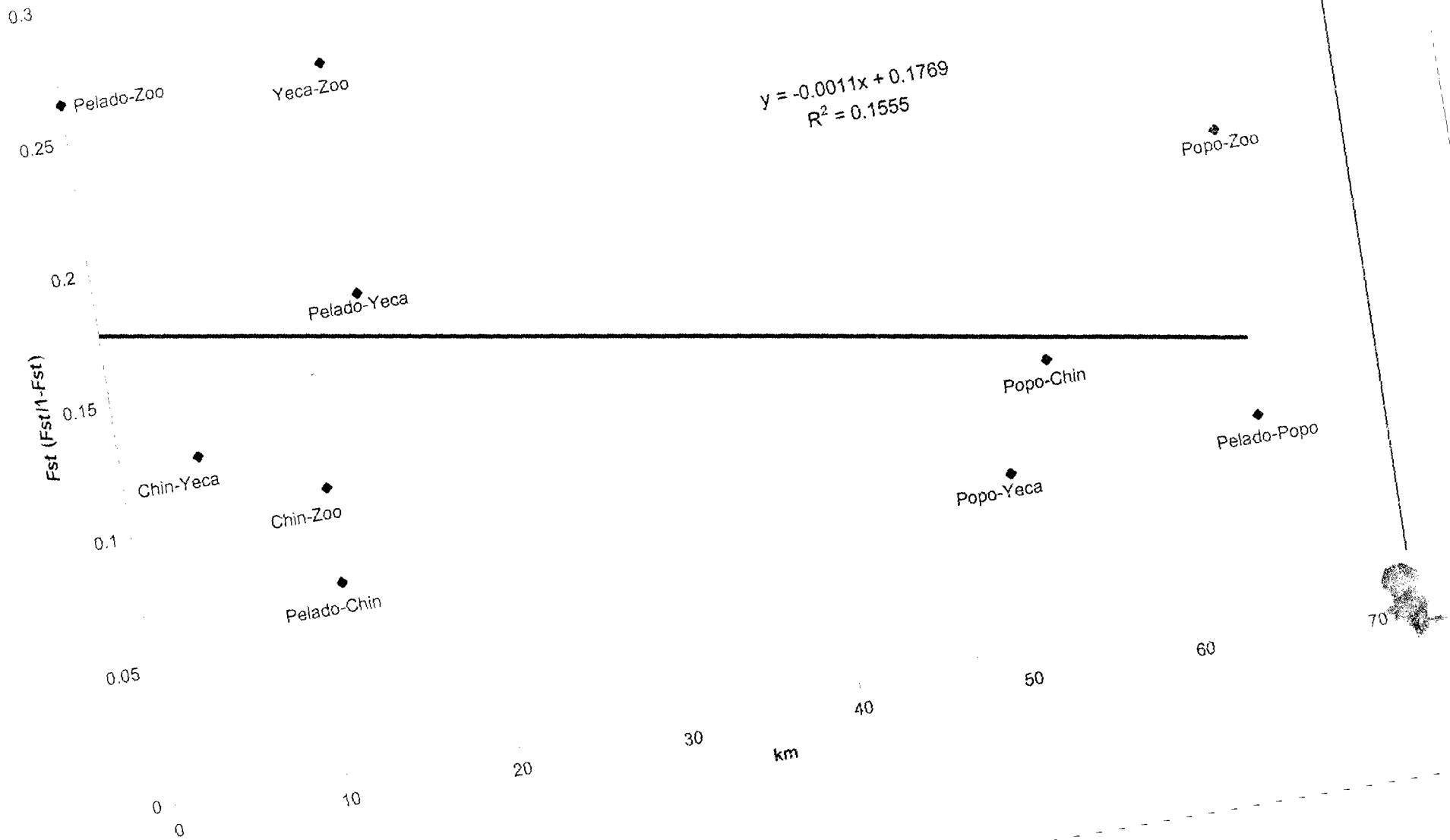


Figura 11. Distancia genética F_{st} ($F_{st}/1-F_{st}$) contra distancia geográfica (km)



Campos-Chávez, A.P.

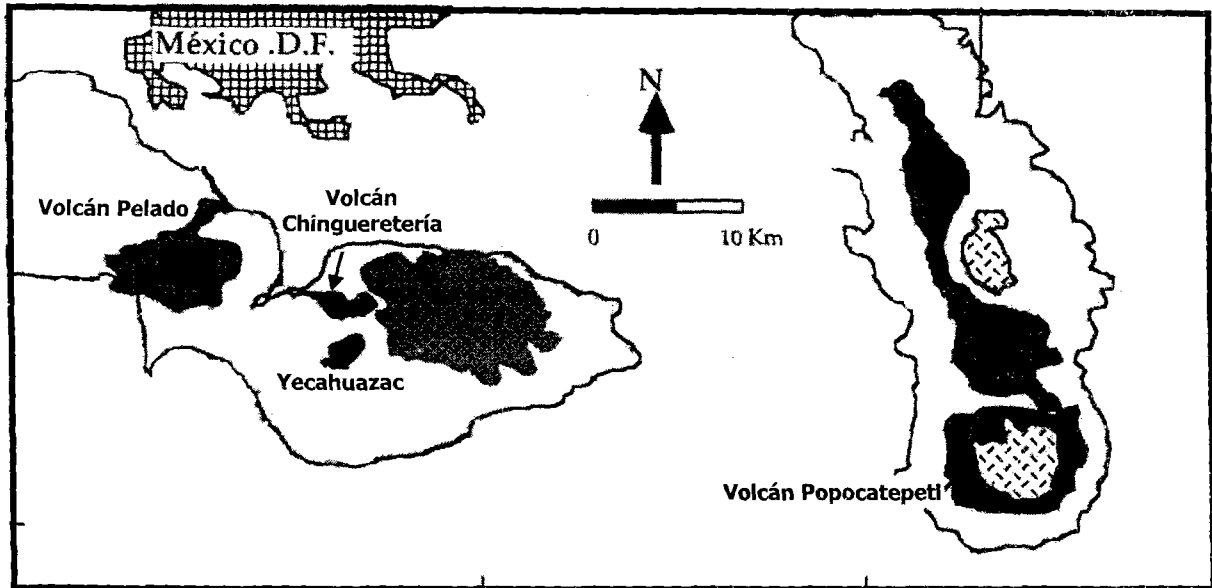


Figura 12. Mapa donde se ilustran las localidades estudiadas del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*; modificado de Velázquez et al., 1996). Las distancias geográficas entre ellas son:

- Volcán Pelado - Volcán Popocatepetl ----- 65.5 Km
- Volcán Pelado - Volcán Chingueretería ----- 11.5 Km
- Volcán Pelado - Yecahuazac ----- 15.0 Km
- Volcán Popocatepetl - Volcán Chingueretería --- 53.5 Km
- Volcán Popocatepetl - Yecahuazac ----- 50.5 Km
- Volcán Chingueretería - Yecahuazac ----- 4.5 Km

Cuadro 1. Microsatélites y secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de los microsatélites de ADN del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*), número de acceso en la página de internet GenBank, la secuencia repetida que compone al microsatélite y el intervalo del tamaño de los alelos en pares de bases.

Microsatélite	Secuencia de los Iniciadores	Código de GenBank	Secuencia	Intervalo del tamaño de los alelos
<i>Sol 08</i>	F 5'GGATTGGGCCCTTTGCTCACACTTG3' R 5'ATCGCAGCCATATCTGAGAGAAGCTC3'	X79217	(TG) ₁₉ (N) ₁₅ (TG) ₅	104-122 (SurrIDGE y Hewitt, 1998)
<i>Sol 30</i>	F 5'CCCGAGCCCCAGATATTGTTAGGA3' R 5'TGCAGCACTTCATAGTCTCAGGTC3'	X79215	(TC) ₁₄ A(T) ₄ (TC) ₅	139-187 (SurrIDGE et al., 1997)
<i>Sat 03</i>	F 5'GCTCTCCTTTGGCATACTCC3' R 5'GCTTTGGATAGGCCAGATC3'	M77195	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀	144-162 (Mougel et al., 1997)
<i>Sat 05</i>	F 5'GCTTCTGGCTTCAACCTGAC3' R 5'CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG3'	X99887	(TC) ₂₃ TTT(CT) ₅	200-236 (Mougel et al., 1997)



Cuadro 2. Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para la amplificación de los microsátélites del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; modificado de Rico et al., 1994; Mougel et al., 1997).

Reactivo	Concentración original	Volumen a tomar	Concentración final en la reacción
Buffer para PCR	10 X	2.5 μ l	1X
*MgCl ₂	25 mM	1.5 μ l	1.5 mM
DNTPs	100 mM	2.0 μ l	200 μ M
Primer F	20 μ M	0.5 μ l	0.4 μ M
Primer R	20 μ M	0.5 μ l	0.4 μ M
Taq polimerasa	5 U/ μ l	0.2 μ l	1 U/ μ l
DNA		El necesario para obtener 100 ng	100 ng/25 μ l
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 μ l.	



Cuadro 3. Programa para el termociclador para la amplificación de los microsátélites del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). TA = Temperatura de alineación (modificado de Rico et al., 1994; Mougel et al., 1997).

Microsátélites SOL 08 y SOL 30			
Evento	Temperatura	Tiempo	No ciclos
Desnaturalización	94° C	5 minutos	1
Desnaturalización	94° C	1 minutos	30
Alineación	Sol 08 (TA = 58°C) Sol 30 (TA = 64°C)	2 minutos	
Extensión	72° C	4 minutos	
Extensión	72° C	5 minutos	1
Microsátélites SAT 03 y SAT 05			
Evento	Temperatura	Tiempo	No ciclos
Desnaturalización	94° C	5 minutos	1
Desnaturalización	94° C	30 segundos	30
Alineación	60° C	30 segundos	
Extensión	72° C	30 segundos	
Extensión	72° C	10 minutos	1

Cuadro 4. Probabilidad de ligamiento entre pares de microsatélites en diversas poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

Localidad	Microsatélite 1	Microsatélite 2	Probabilidad	Desviación estandard
Volcán Pelado	SOL 08	SOL 30	1.00000	0.00000
Volcán Pelado	SOL 08	SAT 03	0.24106	0.00917
Volcán Pelado	SOL30	SAT 03	0.36779	0.00848
Volcán Pelado	SOL 08	SAT 05	0.63905	0.00515
Volcán Pelado	SOL 30	SAT 05	0.47479	0.00459
Volcán Pelado	SAT 03	SAT 05	0.40479	0.00321
Volcán Popocatepetl	SOL 08	SOL 30	1.00000	0.00000
Volcán Popocatepetl	SOL 08	SAT 03	0.24646	0.02561
Volcán Popocatepetl	SOL 30	SAT 03	1.00000	0.00000
Volcán Popocatepetl	SOL 08	SAT 05	1.00000	0.00000
Volcán Popocatepetl	SOL 30	SAT 05	1.00000	0.00000
Volcán Popocatepetl	SAT 03	SAT 05	0.32023	0.01945
Volcán Chingueretería	SOL 08	SOL 30	1.00000	0.00000
Volcán Chingueretería	SOL 08	SAT 03	1.00000	0.00000
Volcán Chingueretería	SOL 30	SAT 03	No información	
Volcán Chingueretería	SOL 08	SAT 05	0.90821	0.00338
Volcán Chingueretería	SOL 30	SAT 05	1.00000	0.00000
Volcán Chingueretería	SAT 03	SAT 05	1.00000	0.00000
Zoológico de Chapultepec	SOL 08	SOL 30	0.00505	0.00141
Zoológico de Chapultepec	SOL 08	SAT 03	0.38742	0.00741
Zoológico de Chapultepec	SOL 30	SAT 03	0.76242	0.00696
Zoológico de Chapultepec	SOL 08	SAT 05	0.03256	0.00415
Zoológico de Chapultepec	SOL 30	SAT 05	0.28175	0.01374
Zoológico de Chapultepec	SAT 03	SAT 05	0.23172	0.00935
Yecahuazac	SOL 08	SOL 30	0.61282	0.01119
Yecahuazac	SOL 08	SAT 03	0.59118	0.01021
Yecahuazac	SOL 30	SAT 03	0.08735	0.00934
Yecahuazac	SOL 08	SAT 05	0.96356	0.00263
Yecahuazac	SOL 30	SAT 05	0.58361	0.01746
Yecahuazac	SAT 03	SAT 05	0.86650	0.00995

Continuación del Cuadro 4. Determinación de desequilibrio de ligamiento (Método de Fisher) entre cada par de microsátélites analizados en las poblaciones del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*).

Par de microsátélites	Valor de Chi²	Grados de libertad	Valor de la Probabilidad
SOL 08 & SOL 30	11.846	10	0.29547
SOL 08 & SAT 03	9.077	10	0.52478
SOL 30 & SAT 03	7.604	8	0.47309
SOL 08 & SAT 05	7.792	10	0.64919
SOL 30 & SAT 05	5.023	10	0.88965



Cuadro 5. Número de alelos por microsatélite encontrados en diversas poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). El número de alelos exclusivos se indica en paréntesis.

Localidad	No. de individuo	Microsatélite				Promedio de número de alelos
		SOL 08	SOL 30	SAT 03	SAT 05	
Volcán Pelado	10	5	6	3 (1)	2	4
Volcán Popocatepetl	14	7 (1)	11 (1)	8 (3)	5 (2)	7.8
Volcán Chinguerería	10	3 (1)	7	2	3	3.8
Zoológico de Chapultepec	11	3	6	3	5	4.3
Yecahuazac	12	4 (1)	7	6	6 (1)	5.8
Total	57	9 (3)	13 (1)	10 (4)	9 (3)	10.3

Cuadro 6. Heterocigosidad (número de individuos heterocigotos en la población) observada (H_o) y esperada (H_e) por microsatélite por población del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). n = número de individuos, NA = número de alelos, P = probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Sol 08					
Localidad	n	NA	He	Ho	P
Volcán Pelado	20	5	7.8	3	0.0049
Volcán Popocatepetl	28	7	11.6	2	0.0000
Volcán Chingueretería	18	3	5.4	0	0.0004
Zoológico de Chapultepec	22	3	5.9	2	0.0093
Yecahuazac	20	4	6.6	1	0.0002
Sol 30					
Volcán Pelado	20	6	8.0	6	0.0542
Volcán Popocatepetl	26	11	11.2	9	0.0225
Volcán Chingueretería	20	7	8.6	4	0.0073
Zoológico de Chapultepec	22	6	8.0	1	0.0000
Yecahuazac	24	7	9.8	5	0.0029
Sat 03					
Volcán Pelado	18	3	4.9	7	0.4570
Volcán Popocatepetl	28	8	11.7	8	0.0000
Volcán Chingueretería	18	2	3.8	5	1.0
Zoológico de Chapultepec	20	3	2	2	1.0
Yecahuazac	22	6	7.5	10	0.0403
Sat 05					
Volcán Pelado	18	2	2.7	3	1.0
Volcán Popocatepetl	26	5	10	3	0.0003
Volcán Chingueretería	20	3	6.3	1	0.0007
Zoológico de Chapultepec	22	5	8.9	4	0.0010
Yecahuazac	22	6	9	0	0.0000
Heterocigosidad		SOL 08	SOL 30	SAT 03	SAT 05
Intrapoblacional		0.14815	0.44643	0.60377	0.20370
Interpoblacional		0.71848	0.83428	0.56388	0.70537



Cuadro 7. Coeficientes de endogamia para cada población del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) utilizando las frecuencias alélicas (estadístico de *F*: *Fis*) y los tamaños de los alelos (estadístico de *Rho*: *Ris*)

Localidad	Valores de <i>Fis</i>				Promedio
	<i>Sol 08</i>	<i>Sol 30</i>	<i>Sat 03</i>	<i>Sat 05</i>	
Volcán Pelado	0.6276	0.2653	-0.4737	-0.1429	0.0690
Volcán Popocatepetl	0.8328	0.2059	0.3269	0.7073	0.5185
Volcán Chingueretería	1.0	0.5472	-0.3333	0.8475	0.5153
Zoológico de Chapultepec	0.6721	0.8810	-0.0286	0.5628	0.5218
Yecahuazac	0.8548	0.5000	-0.3514	1.0	0.5008
Localidad	Valores de <i>Ris</i>				Promedio
	<i>Sol 08</i>	<i>Sol 30</i>	<i>Sat 03</i>	<i>Sat 05</i>	
Volcán Pelado	0.2820	-0.0455	-0.0970	-0.1429	-0.00085
Volcán Popocatepetl	0.9312	-0.2173	0.4543	0.8574	0.5064
Volcán Chingueretería	1.0	0.9271	-0.3333	0.8989	0.6231
Zoológico de Chapultepec	0.9373	0.9022	0.0255	0.8231	0.6720
Yecahuazac	0.9884	0.1322	-0.0117	1.0	0.5272



Cuadro 8. Correlación intra-clase para cada microsatélite del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) utilizando las frecuencias alélicas (estadísticos de F : Fis = coeficiente de endogamia; Fit = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg y Fst = variación genética debido a diferenciación entre poblaciones) y utilizando los tamaños de los alelos (estadísticos de Rho : Ris , Rit y Rst).

Microsatélite	Estadísticos de F		
	Fis	Fst	Fit
<i>Sol 08</i>	0.7938	0.1653	0.8279
<i>Sol 30</i>	0.4649	0.0539	0.4937
<i>Sat 03</i>	-0.0708	0.1538	0.0939
<i>Sat 05</i>	0.7112	0.1285	0.7483
Total	0.5051	0.1222	0.5656
Microsatélite	Estadísticos de Rho		
	Ris	Rst	Rit
<i>Sol 08</i>	0.9352	0.22863	0.9538
<i>Sol 30</i>	0.3998	-0.0323	0.3804
<i>Sat 03</i>	0.2473	0.0697	0.2998
<i>Sat 05</i>	0.9059	0.3533	0.9392
Total	0.7306	0.2263	0.7916



Cuadro 9. Valores de F_{st} (diferenciación genética entre las poblaciones) por cada uno de los microsatélites y la estimación total de los microsatélites entre pares de poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). 1 = Volcán Pelado; 2 = Volcán Popocatepetl; 3 = Volcán Chingueretería; 4 = Zoológico de Chapultepec; 5 = Yecahuazac.

SOL 08:

Pop	1	2	3	4
2	-0.0443			
3	0.2062	0.1780		
4	0.1803	0.1357	0.0803	
5	0.2093	0.1450	0.2186	0.3567

SOL 30:

Pop	1	2	3	4
2	0.0328			
3	-0.0303	0.0080		
4	0.1635	0.0911	0.0988	
5	0.0470	-0.0286	0.0243	0.1237

SAT 03:

Pop	1	2	3	4
2	0.1234			
3	-0.0132	0.1680		
4	0.1707	0.2921	0.0933	
5	0.0397	0.0724	0.1052	0.3241

SAT 05:

Pop	1	2	3	4
2	0.1873			
3	0.0464	0.0284		
4	0.3101	0.1123	0.1052	
5	0.2816	0.0619	0.1145	0.0683

Los cuatro microsatélites combinados:

Pop	1	2	3	4
2	0.0688			
3	0.0658	0.0970		
4	0.2093	0.1540	0.0959	
5	0.1498	0.0634	0.1120	0.2086

Cuadro 10. Matriz de distancias de Mahalanobis calculadas con los datos de la distancia genética ($F_{st}/1-F_{st}$, bajo la diagonal) y de distancia geográfica (en Km, sobre la diagonal) existentes entre las poblaciones estudiadas del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*).

	Pelado	Popo	Ching	Zool	Yeca
Pelado	-----	65.5	11.5	0.0	15.0
Popo	0.0739	-----	53.5	65.0	50.5
Ching	0.0704	0.1074	-----	11.5	4.5
Zool	0.2647	0.1820	0.1061	-----	15.0
Yeca	0.1762	0.0677	0.1261	0.2636	-----

Cuadro 11. Comparación del número de migrantes por generación en cada par de poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*). Las estimaciones fueron realizadas con los valores de distancia genética (F_{st} ; Wright, 1951).

	Pelado	Popo	Ching	Zool	Yeca
Pelado	-----				
Popo	3.383	-----			
Ching	3.549	2.327	-----		
Zool	0.944	1.373	2.356	-----	
Yeca	1.419	3.693	1.982	0.948	-----



APÉNDICE I

Método de fenol-cloroformo para la extracción de ADN

- Las soluciones deben ser preparadas con agua destilada desionizada y reactivos de alto grado de calidad, y se deben almacenar en botellas ámbar con fecha de elaboración.
- Los disolventes orgánicos como el fenol son muy irritantes, por lo que se debe evitar el contacto directo con la piel y los ojos.
- Usar bata y guantes.
- Para la extracción de ADN se debe trabajar siempre en frío con los reactivos en hielo.
- No usar material de vidrio para la extracción ya que el ADN se adhiere fácilmente a este.

Día 1

- ✓ Las muestras se parten en trozos pequeños o se pulverizan con nitrógeno líquido y se colocan en tubos Eppendorff de 1.5 ml.
- ✓ A cada una de las muestras se les agrega solución de lisis:
300 μ l de EDTA (0.1 M) + NaCl (0.15 M)
17 μ l de SDS
- ✓ Se mezclan en el vortex, y posteriormente se les agregan 30 μ l de Proteínasa K.
- ✓ Se homogenizan los tubos en el vortex (cuidando de no agitar muy fuerte para no dañar al ADN).
- ✓ Los tubos se colocan en baño maría a 60° C y se dejan incubar durante 24 hrs.



Día 2

- ✓ A cada tubo de muestra se le agrega un volumen de fenol (estabilizado a pH = 8) precalentado durante 10 segundos en el horno de microondas.
- ✓ Se homogeniza en el vortex y se centrifuga durante 10 minutos a 12,000 revoluciones por minuto (rpm).
- ✓ Se recoge el sobrenadante o fase acuosa, se coloca en un tubo nuevo y se mezcla con un volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (ésta se agita perfectamente para que se incorporen los componentes). Se homogeniza con el vortex y se centrifuga durante 10 min. a 12,000 rpm.
- ✓ Al sobrenadante se le agrega un volumen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (proporción 24:1), se homogeniza y se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm.
- ✓ El sobrenadante se mezcla con un volumen de éter etílico. Se homogeniza y se centrifuga durante 3 min.
- ✓ Se desecha el sobrenadante, que en este caso es el éter, lo que queda abajo es la muestra.
- ✓ Extraído el éter se mantienen abiertos los tubos y se colocan en baño maría 3-5 min. para que el éter restante se evapore.
- ✓ A la muestra libre de éter, se le añade 0.1 volúmenes de NaCl (3M) y 2.5 volúmenes de alcohol etílico absoluto frío. El alcohol se debe resbalar lentamente por las paredes del tubo para observar cómo se va formando la madeja de ácidos nucleicos. Se mezcla suavemente volteando el tubo hasta que se homogeniza.
- ✓ Las muestras se ponen en el congelador a -20°C durante 12 horas para que los ácidos nucleicos se precipiten.



Día 3

- ✓ Se centrifugan los tubos durante 20 min. a 12,000 rpm.
- ✓ Se extrae el alcohol para dejar solamente el botón de ácidos nucleicos.
- ✓ Se añaden cuidadosamente 100 µl de alcohol etílico al 80 % para lavar la pastilla de ácidos nucleicos y se centrifuga durante 5 min.
- ✓ Se extrae el alcohol con la pipeta. Para secar completamente el alcohol, los tubos se colocan en el concentrador (DNA Speed Vac) durante 3 min. máximo para evitar que las muestras se calienten.
- ✓ Se añaden 100 µl de TE y se resuspende el botón completamente golpeando el tubo con los dedos. Para bajar las gotitas de las paredes se colocan los tubos en la microfuga y se enciende durante unos segundos.
- ✓ Se añaden 11.1 µl de RNAsa (a una concentración de 200 µg/ml). Los tubos se incuban a 37° C durante 60 min.
- ✓ A la muestra se le añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeniza y se centrifuga durante 5 min.
- ✓ Se coloca el sobrenadante en un tubo limpio y se le agrega 0.1 volúmenes de acetato de sodio más 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcla suavemente y se observa la madeja de ADN que se forma.
- ✓ Se pone el tubo en el congelador a -20°C durante 12 hrs para que precipite el ADN.



Día 4

- ✓ La muestra se centrifuga durante 20 min. a 12,000 rpm.
- ✓ Se quita el alcohol, se le agregan 100µl de etanol al 80 % y se centrifuga 5 min. a 12,000 rpm.
- ✓ Se le elimina el alcohol, se centrifugan en vacío 3 min. para secar completamente la muestra.
- ✓ Se le agrega 50 µl de H₂O de ampolleta y se resuspende el botón de ADN cuidadosamente.
- ✓ Las muestras extraídas por este método se almacenan en congelación a -20°C.



APÉNDICE II

Preparación de buffers y soluciones stock para extracción de ADN

➤ **EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 M (pH 8.0)**

Disolver 186.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 700 ml de agua

Ajustar a pH 8.0 con 10 M NaOH (~50 ml)

Aforar con agua a 1000 ml.

El EDTA no se disolverá completamente en el agua hasta que adquiera el pH de 8.0.

➤ **HCl, 1 M**

Agregar 86.2 ml de HCl concentrado a 913.8 ml de agua.

➤ **NaOH, 10 M**

Disolver 400 g de NaOH en 450 ml de agua

Aforar con agua a 1000 ml.

➤ **Amortiguador de lisis: EDTA 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH = 8.**

EDTA 0.1 M = 37.224 g en 1000 ml. Peso molecular del EDTA disódico = 372.24 g/mol

NaCl 0.15 M = 8.766 g en 1000 ml. Peso molecular del NaCl = 58.44 g/mol

➤ **SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 10 %**

Se pesan 10 gr de SDS y se afora con agua a 100 ml

Es recomendable filtrar la mezcla en una membrana de 0.2 μm .



➤ **Proteinasa K (de *Tritirachium album*).**

Disolver la enzima con agua inyectable en una concentración final de 1 mg/ml.

*Almacenar en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

➤ **Fenol estabilizado a pH 8**

Fundir el fenol en baño maría a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez líquido añadir 8-hidroxiquinoleína (PM 108.1 g/mol) hasta una concentración final de 0.1 % (0.1 g por cada 100 ml); añadir un volumen de Tris-HCl 1 M pH = 8 y agitar constantemente hasta que el fenol alcance un pH 8. Cuando se haya equilibrado, retirar la fase acuosa y añadir un volumen de Tris-HCl 0.1 M hasta que el fenol esté a pH = 8.

* Se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una capa acuosa de Tris-HCl 0.1 M, pH = 8.

➤ **Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico.**

Fenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	25 ml
Cloroformo CHCl_3	24 ml
Alcohol Isoamílico $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$	1ml

*Almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

➤ **Cloroformo-Alcohol Isoamílico**

Cloroformo CHCl_3	24 ml
Alcohol Isoamílico $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$	1ml

*Almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



➤ **Acetato de Sodio 3M.**

Peso molecular del acetato de sodio = 82.03 g/mol

Pesar 246.09 g y aforar con agua a 1000 ml.

➤ **ARNasa A 200 µg/ml (ARNasa A de páncreas de bovino)**

Cálculos para la solución stock:

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tris base 1M pH 7.5	100 µl	10 mM
NaCl 5 M	30 µl	15 mM
ARNasa	0.002 g	200 µg/ml
Agua necesaria para un volumen de 10 ml		

Hervir la solución 10 minutos.

Procedimiento para conocer el volumen de ARNasa que se va a adicionar:

$$(200 \mu\text{g/ml}) (X) = (100 + X) (20 \mu\text{g/ml})$$

$$200 X = 2000 + 20X$$

$$200 X - 20X = 2000$$

$$180X = 2000$$

$$X = \frac{2000}{180}$$

$$180$$

X = 11.1 µl de ARNasa de 200 µg/ml para una concentración final de 20 µg/ml

*Almacenar en alícuotas a -20 °C.



➤ **Amortiguador TE (Tris/EDTA)**

10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 7.5, u 8.0 (u otro pH; según se requiera)

1 mM EDTA, pH 8.0

➤ **Tris-HCl 1M pH = 8**

Disolver 121 g de Tris base en 800 ml de agua

Ajustar al pH deseado con HCl concentrado (aproximadamente 42 ml para una solución a pH 8.0.)

Mezclar y aforar con agua a 1000 ml.

➤ **NaCl 5 M**

Pesar 292 g de NaCl y aforar con agua a 1000 ml.



APÉNDICE III

Electroforesis de ADN

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

La separación de los fragmentos de ADN de doble cadena se realiza por electroforesis en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida. En ambos casos, el gel se prepara con distintas concentraciones dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN que se requiere separar. Las moléculas de ADN compuestas hasta por 2 000 nucleótidos por lo general se separan en gel de poliacrilamida y las de 500 nucleótidos y hasta 20 kb se separan en gel de agarosa. Modificando las concentraciones de los geles se puede obtener mejor resolución de los fragmentos separados.

Preparación de geles de agarosa para visualizar ADN

- ✓ Pesar la agarosa conforme a la concentración deseada (1% para visualizar el ADN obtenido en la extracción de ADN y 2 % para visualizar los fragmentos de ADN producidos mediante la técnica de PCR).



Cantidad de reactivos para preparar geles de agarosa al 1% y al 2%

Gel de agarosa al 1%			
Volumen de gel a preparar	Gramos de Agarosa	Volumen de Buffer (ml)	Cantidad de Bromuro de Etidio (μ l)
25 ml	0.25	25	0.78
40 ml	0.40	40	1.25
Gel de agarosa al 2%			
20 ml	0.40	20	0.63
25 ml	0.50	25	0.78
30 ml	0.60	30	0.94
40 ml	0.80	40	1.25

- ✓ Agregar el buffer (TAE o TBE 1X).
- ✓ Calentar en el horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente.
- ✓ Agregar el bromuro de etidio (dejar enfriar un poco la mezcla antes de agregar el bromuro de etidio para evitar inhalar los vapores).
- ✓ Agregar la mezcla en el molde de electroforesis y acomodar el peine
- ✓ Dejar solidificar el gel durante aproximadamente 30 minutos.
- ✓ Colocar el gel en la cámara de electroforesis y llenarla con buffer hasta cubrirlo.
- ✓ Colocar las muestras mezcladas con buffer de carga (jugo azul) en cada pozo del gel.
- ✓ Conectar los cables a la cámara y a la fuente de poder.
- ✓ Ajustar el voltaje deseado.
- ✓ Dejar correr de 20 a 30 minutos.



Preparación de reactivos para geles de agarosa

➤ TAE (Tris/acetate/EDTA)

Solución stock 50 X:

242 g de Tris base

57.1 ml de ácido acético glacial

37.2 g de Na₂EDTA 2H₂O (sólido)

o 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8)

Aforar con agua a 1000 ml.

➤ Amortiguador de carga 10X

Para preparar 10 ml se requiere 5 ml de glicerol para una concentración final de 50 %, EDTA 0.003733 g quedando a una concentración final de 1mM, azul de bromofenol 0.0025 g a una concentración final de 0.25% y xilencianol 0.0025 g hasta 0.25 %, ajustar el pH final a 8.

➤ Bromuro de etidio 10 mg/ml

Se debe agregar 1 µl de bromuro de etidio por cada 10 ml del amortiguador con agarosa para que la concentración final sea de 0.1 µg/ml.



APÉNDICE IV

Preparación de geles de acrilamida para visualizar ADN

Cantidades necesarias para preparar geles de acrilamida para corrimiento de ADN. * El TEMED se agrega al final ya que es el principal polimerizante del gel.

Reactivo	Volúmenes		
	15 ml	10 ml	5 ml
Agua destilada	9.36 ml	6.24 ml	3.12 ml
TBE 10X	1.5 ml	1 ml	0.5 ml
Stock Acrilamida/bis-acrilamida 40%	3.75 ml	2.5 ml	1.25 ml
APS 10%	300 μ l	200 μ l	100 μ l
*TEMED	15 μ l	10 μ l	5 μ l

Nota: Todas las soluciones deben ser preparadas con agua bidestilada y desionizada.

➤ **Solución stock de acrilamida/bis-acrilamida 40% proporción 19:1**

* Acrilamida 38 gr

* Bis-acrilamida 2 gr

Agregar agua destilada a 100 ml

Almacenar a 4° C en frasco oscuro.

➤ **Persulfato de amonio (APS) al 10%**

* Persulfato de amonio 0.1 g

* aforar con agua destilada a 1 ml

Se prepara al momento, máximo puede durar una semana en refrigeración, después desechar y preparar solución nueva.



➤ **TBE (Tris/borate/EDTA)**

solución stock 10 X, 1 litro:

108 g de Tris base (890 mM)

55 g de ácido bórico (890 mM)

40 ml 0.5 M de EDTA, pH 8.0

Aforar con agua a 1000 ml.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



APÉNDICE V

Tinción de plata para geles de acrilamida

Nota: Los reactivos se deben guardar en frasco ámbar los cuales no deben tener rayones por dentro, ya que allí se acumula la plata y se forman cristales los cuales se adhieren al gel y lo manchan.

1.- Etapa de fijación

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

Reactivos y volúmenes necesarios para la elaboración de la solución fijadora

Reactivos	Volumen (ml)
Metanol	50
Acido acético	10
Reactivo kit Fixative Enhancer Concentrate	10
Agua bidestilada	30

2.- Lavado (20 minutos)

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

3. Tinción (20 minutos).

Preparar la solución antes de usarla.

Los reactivos deben estar a temperatura ambiente para mejores resultados.



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

Reactivos necesarios para elaborar la solución para tinción.

Reactivos	Volumen (ml)
Agua bidestilada	8.7
Silver Complex Solution	1.25
Reduction Moderator Solution	1.25
Image Development RX	1.25
Development Accelerator Solution (Pesar 5 g y aforar a 100 ml)	12.5

Agregar la mezcla sobre el gel y agitar suavemente hasta que las bandas se tiñan adecuadamente.

4.- Paso de paro (15 min)

Eliminar la solución de tinción y agregar al gel una solución de ácido acético al 5% (5 ml de ácido acético y aforar a 100 ml) durante 15 minutos; posteriormente reemplazarla con agua destilada.