



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL SEXO
EN MUSARAÑAS (MAMMALIA,
SORICOMORPHA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

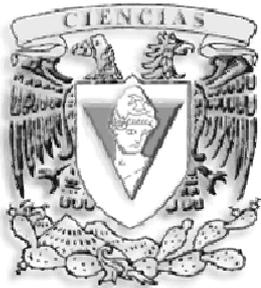
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Arcangeli
Álvarez
Jésica
56 77 35 21
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098046984

2. Datos del tutor

Dr
Fernando Alfredo
Cervantes
Reza

3. Datos del sinodal 1

Dr
Rogelio Alejandro
Alonso
Morales

4. Datos del sinodal 2

Dra
María Elena
Calderón
Segura

5. Datos del sinodal 3

Dra
Dulce María
Brousset
Hernández Jauregui

6. Datos del sinodal 4

M en C
María de los Ángeles
Aguilar
Santamaría

7. Datos del trabajo escrito

Determinación molecular del sexo en musarañas (Mammalia, Soricomorpha).
54 p.
2007

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Teresa y Adolfo por toda la paciencia que tuvieron durante la espera de este momento, por el apoyo incondicional, comprensión y amor que me dan, por cuidarme y querer siempre lo mejor para mi.

A mi hermana Erika por todo su cariño y por todas las noches que me acompaño hasta que terminará la tarea.

A Yeyito por estar conmigo y compartir este momento, por todo su apoyo, amor, comprensión y energía que me ha dado para llegar a la meta.

A Dios por la vida y la familia que me dio, por acompañarme en todo momento, por permitirme llegar hasta aquí y cumplir este sueño.

A mis amigos de la prepa Thalía, Alejandro, Shendel, Arianna, Iván, Gaby, Lupita, Crystal, Rodrigo, Israel, Alejandra, Selene, Elizabeth, Jonathan y César por acompañarme durante estos 10 años y ser mis cómplices en tantas aventuras. A Eduardo por enseñarme a enfrentar mis miedos y a Bety por ser mi amiga incondicional y estar conmigo siempre que la he necesitado.

A mis amigos de la facultad Estebán, Roberto, Nancy, Inan, Leslie, Lino, Alejandra, Jaime, Ásael, Lizeth, Sinúe, Erika, Christían, Viridiana, Mauricio, Miriam, Ileana y Joaquín por compartir conmigo la maravillosa experiencia de estudiar Biología.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo financiero otorgado al proyecto "Identificación Molecular del Sexo en Mamíferos" del cual forma parte este trabajo.

Al Dr. Fernando Cervantes por permitirme ser su alumna, por despertarme el interés en la biología molecular y por ser el director de mi tesis.

A la M. en C. Julieta Vargas y a la M. en C. Yolanda Hortelano por su valiosa cooperación en el trabajo de campo y laboratorio.

Al Dr. Moisés Martínez por toda la paciencia que me tuvo, por compartir conmigo su experiencia y sus conocimientos. Por ser mí maestro y amigo.

A la M. en C. Laura Márquez por facilitarme reactivos y material de laboratorio, y por el servicio de secuenciación.

Al Dr. Carlos Balderas por la donación de dos ratones de laboratorio. Por abrirme las puertas de su laboratorio y mostrarme el maravilloso mundo de los reptiles.

A Lázaro Guevara y Ana Montiel por el material fotográfico y de colección que aportaron.

A Nahú Ramírez, Luis Juárez, Beatriz Silveros, Aldo Sánchez y Cecilia Rodríguez por su valiosa contribución en el trabajo de campo para colecta de musarañas en Colima.

A los miembros del Jurado Dr. Rogelio Alonso, Dra. María Elena Calderón, Dra. Dulce Brousset y a la M. en C. María de los Ángeles Aguilar por el tiempo invertido en la corrección y enriquecimiento de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Mastozoología Lázaro, Cecilia, Nahú, Oscar, Beatriz, Omar, Aída, Xóchitl, Ana, Luis, Jesús, Marta, Luis, Salvador, Sandra, Helxine, Alfredo, Adriana, Irelia, Imelda, Elizabeth, Joel y Maribel por todos los momentos que siempre recordare como de este grupo. A Karina y Jonathan por ser mis amigos y por todo el apoyo que me han dado en las buenas y en las malas.

A todas las personas que han ayudado a mi formación académica y personal. Gracias por ayudarme a llegar hasta donde aquí.

CONTENIDO

Agradecimientos.....	I
Contenido.....	III
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Cuadros.....	V
Resumen.....	1
Introducción.....	2
• Determinación del sexo con marcadores moleculares.....	3
• Gen <i>sry</i> 3.....	4
• Musarañas.....	5
• <i>Cryptotis mexicana</i> (Coues, 1877).....	6
• <i>Cryptotis nelsoni</i> (Merriam, 1895).....	8
• <i>Sorex saussurei</i> Merriam, 1892.....	9
• <i>Megasorex gigas</i> (Merriam, 1897).....	11
• Determinación sexual en musarañas.....	12
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	14
Materiales y métodos.....	14
• Colecta de muestras.....	14
• Extracción de ADN.....	15
• Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	15
Resultados.....	22
• Amplificación del fragmento de ADN del gen <i>sry</i>	22
• Género <i>Cryptotis</i>	22
• Género <i>Sorex</i>	25
• Género <i>Megasorex</i>	26
• Comparación con secuencias de nucleótidos de Gene Bank.....	27
• Comparación con secuencias de aminoácidos de Gene Bank.....	28
Discusión.....	34
• Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	36
• Alineamiento de primers con secuencia blanco.....	37

• Análisis de la secuencia de nucleótidos	38
• Análisis de la secuencia de aminoácidos	40
• Conservación del ADN del cromosoma Y en mamíferos.....	41
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	43
Literatura citada.....	43
Apéndice 1	49
Apéndice 2	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del gen <i>sry</i> dentro de la región de ADN exclusiva al cromosoma Y.....	4
Figura 2. Musaraña de la especie <i>Cryptotis mexicana</i>	7
Figura 3. Distribución geográfica de la musaraña <i>Cryptotis mexicana</i>	7
Figura 4. Musaraña de la especie <i>Cryptotis nelsoni</i>	8
Figura 5. Distribución geográfica de la musaraña <i>Cryptotis nelsoni</i>	9
Figura 6. Macho de la especie <i>Sorex saussurei</i>	10
Figura 7. Distribución geográfica de la musaraña <i>Sorex saussurei</i>	10
Figura 8. Hembra de la especie <i>Megasorex gigas</i> capturada	11
Figura 9. Distribución geográfica de la musaraña <i>Megasorex gigas</i>	12
Figura 10. Ejemplares de ambos sexos de <i>Sorex saussurei</i> mostrando características reproductivas.....	13
Figura 11. Amplificación de un fragmento de 202 pb del gen <i>sry</i> en individuos masculinos de la especie <i>Cryptotis mexicana</i>	23
Figura 12. Amplificación de un fragmento de 202 pb del gen <i>sry</i> en individuos masculinos de la especie <i>Cryptotis nelsoni</i>	24

Figura 13. Amplificación de un fragmento de 155 pb del gen <i>sry</i> en individuos masculinos de la especie <i>Sorex saussurei</i>	25
Figura. 14. Amplificación de un fragmento de 189 pb del gen <i>sry</i> en individuos masculinos de la especie <i>Megasorex gigas</i>	26
Figura 15. Alineamiento de la secuencia de 155 nucleótidos que corresponde a un fragmento del gen <i>sry</i> del cromosoma sexual Y en las musarañas <i>Cryptotis mexicana</i> y <i>C. nelsoni</i> de Veracruz, <i>Megasorex gigas</i> y <i>Sorex saussurei</i> de Colima, <i>S. unguiculatus</i> y el ratón común <i>Mus musculus</i>	29
Fig. 16. Alineamiento de la secuencia de 51 aminoácidos que corresponden a un fragmento de 155 nucleótidos del gen <i>sry</i> del cromosoma sexual Y en las musarañas <i>Cryptotis mexicana</i> y <i>C. nelsoni</i> , <i>Megasorex gigas</i> y <i>Sorex saussurei</i> , <i>S. unguiculatus</i> y el ratón común <i>Mus musculus</i>	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados en la amplificación de un fragmento del gen <i>sry</i> en tres géneros de musarañas.	16
Cuadro 2. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>sry</i> en el género de musaraña <i>Cryptotis</i>	18
Cuadro 3. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>sry</i> en los géneros de musarañas <i>Megasorex</i> y <i>Sorex</i>	19
Cuadro 4. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento del gen <i>citocromo b</i> en los géneros de musarañas <i>Cryptotis</i> , <i>Megasorex</i> y <i>Sorex</i>	20
Cuadro 5. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento del gen <i>sry</i> en los géneros de musarañas <i>Cryptotis</i> , <i>Sorex</i> y <i>Megasorex</i>	21
Cuadro 6. Programa para el termociclador para la amplificación de un fragmento del gen <i>citocromo b</i> en los géneros de musarañas <i>Cryptotis</i> , <i>Megasorex</i> y <i>Sorex</i>	22

Cuadro 7. Número de pares de bases no compartidas y su porcentaje entre secuencias de 155 nucleótidos del gen *sry* del cromosoma sexual Y en musarañas mexicanas (Mammalia: Soricomorpha), *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*. 31

Cuadro 8. Número de aminoácidos no compartidos y su porcentaje entre secuencias de 51 aminoácidos que corresponden a un fragmento del gen *sry* del cromosoma sexual Y en musarañas (Mammalia: Soricomorpha) mexicanas, *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*. 33

RESUMEN

En algunos mamíferos como las musarañas es difícil determinar el sexo a simple vista. Aún cuando se examine un ejemplar cuidadosamente, si éste no está en plena actividad reproductiva se cometen errores para decidir si el individuo es hembra o macho. Una alternativa moderna y confiable proviene de herramientas moleculares y genéticas. Se trata de aprovechar el sistema de determinación sexual genético XX y XY, característico de mamíferos, en donde se amplifican fragmentos específicos de ADN de los cromosomas sexuales con lo que se puede identificar fácilmente el sexo de los individuos. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el sexo en musarañas mediante la amplificación de un fragmento del gen *sry* en individuos de sexo masculino en tres géneros *Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex*. Se utilizaron muestras de hígado almacenadas en la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Se ocuparon 6 individuos de sexo conocido (3 machos y 3 hembras) por especie. La extracción de ADN se hizo utilizando un kit comercial. La concentración del ADN se midió por espectrofotometría y su integridad se evaluó por electroforesis en geles de agarosa. La amplificación del marcador molecular *sry* se realizó a través de PCR empleando iniciadores específicos para el ratón común y musarañas del género *Sorex* previamente descritos. Se utilizó como control positivo la amplificación de un fragmento del gen *citocromo b*. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa convencional. El ADN del fragmento esperado se purificó con un kit comercial y se envió a un secuenciador automático. Las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas para el ratón común y otra musaraña. Se encontró que, como se esperaba, en *Cryptotis* se amplificó un fragmento de 202 pares de bases, en *Megasorex* se amplificó un fragmento de 189 pb y en *Sorex* se amplificó un fragmento de 155 pb en ejemplares de sexo masculino. Al mismo tiempo se amplificó un fragmento de 500 pares de bases del gen *citocromo b* tanto en hembras como en machos. Los resultados confirmaron de manera positiva el sexo de los machos de las musarañas en los tres géneros, por lo tanto, el método fue exitoso.

Palabras clave: cromosoma Y, *Cryptotis*, determinación del sexo, *Megasorex*, musarañas, *sry*, *Sorex*

INTRODUCCIÓN

La correcta determinación del sexo en mamíferos silvestres es un componente básico en estudios de ecología y conservación (Bradley *et al.* 2001). Conocer el sexo de un individuo es primordial para el adecuado conocimiento biológico de los atributos de su género. Además, es necesario para entender la dinámica de la población, la estructura poblacional, el uso de hábitat, el comportamiento, los sistemas de apareamiento y para la toma de decisiones en su manejo, aprovechamiento y conservación (Shaw *et al.* 2003).

Los métodos tradicionales de determinación del sexo se basan en la observación de las diferencias morfológicas y conductuales que existen entre hembras y machos (Griffiths, 2000). En muchos mamíferos el dimorfismo sexual está asociado con la talla y el color de los animales, generalmente los machos son grandes y de colores oscuros mientras que las hembras son más pequeñas y de colores más claros (Shaw *et al.* 2003). En otros casos, se pueden observar estructuras accesorias en los machos, como las astas en los cérvidos durante la temporada reproductiva (Villa y Cervantes, 2003), mientras que en otros, el dimorfismo sexual se manifiesta por los patrones de asociación y comportamiento que asume uno de los sexos; generalmente los machos son solitarios mientras que las hembras permanecen con las crías durante las primeras etapas de vida (Shaw *et al.* 2003).

En la mayoría de los casos es necesario observar más de un animal para poder comparar estas características, de lo contrario es difícil determinar el sexo a simple vista. Como alternativa es necesaria la inmovilización del animal con anestesia o sujetadores para examinar los genitales externos, lo que les provoca una situación de estrés (Kühn *et al.* 2002). Si aún esto no fuera suficiente, se deben entonces examinar las estructuras reproductoras internas (Matsubara *et al.* 2001). Por lo tanto, se requieren métodos efectivos para la determinación del sexo de animales silvestres.

Actualmente el uso de los marcadores moleculares es una alternativa confiable para la identificación del sexo del individuo (Maldonado, 2006). Esta técnica puede emplear métodos no invasivos para la obtención de ADN del animal de interés (Dallas, 2000) como son la colecta de muestras de pelo, excremento, orina, o incluso restos óseos contenidos en regurgitaciones de aves rapaces (Taberlet *et al.* 1999), por lo que se evita la captura, la manipulación y la generación de estrés en el animal (Kühn *et al.* 2002) de interés.

Determinación del sexo con marcadores moleculares

La determinación del sexo con marcadores moleculares toma como base el sistema de determinación sexual genético típico de los mamíferos, formado por una pareja de cromosomas sexuales (Griffiths, 2000). En este sistema las hembras poseen dos copias del cromosoma X por lo que son genéticamente XX y los machos poseen una copia del cromosoma X y una del cromosoma Y por lo que son genéticamente XY (Calzada *et al.* 2000). Además, también toma en cuenta la información genética contenida en estos cromosomas. Esta información puede ser de tres tipos: la primera corresponde a regiones pseudoautosómicas ó PARS, por sus siglas en inglés, que contienen ADN compartido entre los cromosomas X y Y; la segunda, consiste de secuencias de ADN altamente repetitivo exclusivo del cromosoma Y; y la tercera, está constituida por material genético exclusivo de cada cromosoma (Haqq y Donahoe, 1998).

Con base en lo anterior se han creado diversas técnicas para la determinación genética del sexo en mamíferos (Bryja y Konecný, 2003). Una de las más utilizadas es la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de fragmentos específicos de ADN de los cromosomas X y Y, como son los genes pseudoautosómicos *amg* (amelogenina), *zf* (dedos de zinc) y el gen *sry* (región determinante del sexo; Matsubara *et al.* 2001).

Gen *sry*

La prueba más común para determinar el sexo genético en mamíferos amplifica e identifica la presencia del gen *sry* en individuos de sexo masculino (Pilgrim *et al.* 2004). Este gen comúnmente se encuentra como una copia única localizada fuera de la región pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma Y (Calzada *et al.* 2000) en la mayoría de los mamíferos placentados y marsupiales (Bullejos *et al.* 2000; Fig. 1).

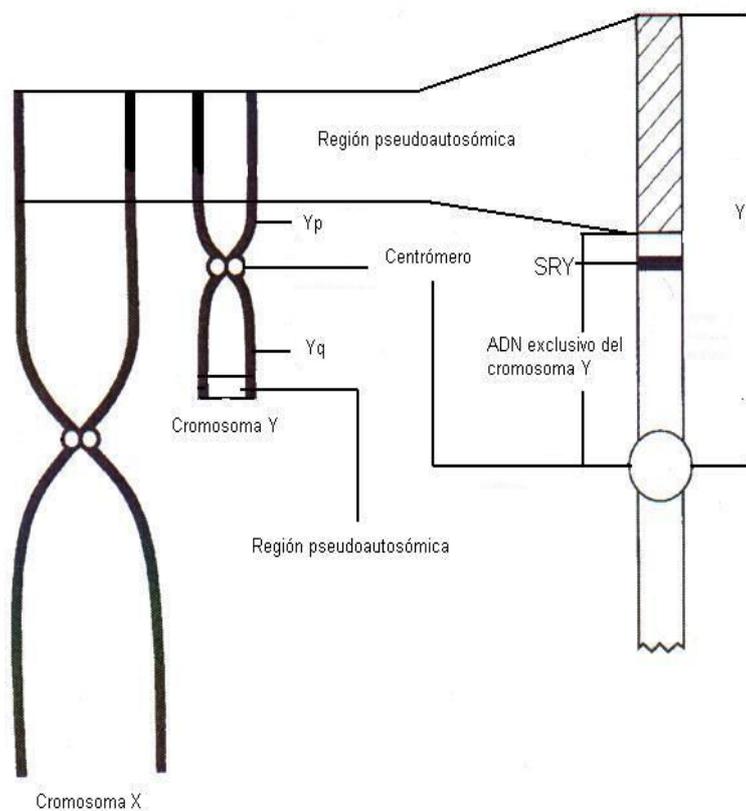


Figura 1. Cromosomas sexuales X y Y. Localización del gen *sry* dentro de la región de ADN exclusiva del cromosoma Y (modificada de Haqq y Donahoe, 1998). Yp = Brazo p del cromosoma Y, Yq = Brazo q del cromosoma Y.

El gen *sry* codifica para una proteína que tiene en su parte central una caja HMG de alta movilidad, constituida por 79 aminoácidos que corresponden a su dominio funcional (Bullejos *et al.* 2000), y es la única región del gen conservada a lo largo de todas las especies de mamíferos. Esta proteína tiene la habilidad de

reconocer y doblar el ADN en la secuencia AACAAT para inducir un giro de 90° en la hélice (Hacker *et al.* 1995), formando un complejo que controla la expresión de otros genes vía activación o represión (Marshall, 2002), proceso con el que inicia la diferenciación de las gónadas embrionarias totipotenciales hacia testículos en la mayoría de los mamíferos (Calzada *et al.* 2000).

La amplificación de fragmentos del gen *sry* para la determinar del sexo en animales silvestres ha sido probada con éxito en quirópteros (Bullejos *et al.* 2000), roedores (Kühn *et al.* 2002; Bryja y Konecný, 2003), carnívoros (Taberlet *et al.* 1997; Dallas *et al.* 2000), erinaceomorfos (Sánchez *et al.* 1996), primates (Pomp *et al.* 1995) y cetáceos (Gowans *et al.* 2000). Un grupo de mamíferos donde también ha sido utilizada esta prueba aunque en mínima escala son las musarañas (Soricomorpha: Soricidae; Matsubara *et al.* 2001; Sánchez *et al.* 1996) que son mamíferos relativamente comunes en México cuya biología ha sido escasamente estudiada.

Musarañas

Las musarañas son los mamíferos más pequeños y representan casi el 7 % de los mamíferos del mundo. Su distribución abarca todos los continentes; están ausentes en la región Australiana, la mayor parte de Sudamérica y las regiones polares (Vaughan *et al.* 2000). Están representadas en México por 4 géneros (*Cryptotis*, *Megasorex*, *Notiosorex* y *Sorex*) y 30 especies (Ramírez-Pulido *et al.* 2005) y ocupan el cuarto lugar en riqueza de especies después de los roedores, quirópteros y carnívoros.

Parecidas a los ratones, las musarañas presentan un hocico largo y puntiagudo; sus ojos son pequeños y a menudo están cubiertos por el pelaje (Ceballos y Miranda, 2000); sus orejas pueden estar muy reducidas o estar bien desarrolladas (Villa y Cervantes, 2003). Su pelaje es grueso y aterciopelado, de color negruzco o café grisáceo. Sus 4 patas presentan 5 dedos con garras (Reid, 1997) y su locomoción es plantígrada (Ceballos y Miranda, 2000). Su cráneo es

largo y estrecho, sin arco cigomático ni bula auditiva sino anillo timpánico. Su dentición consiste de 26 a 32 dientes que suelen estar pigmentados en la subfamilia Soricinae (Villa y Cervantes, 2003). Los incisivos superiores son largos y ganchudos (Vaughan *et al.* 2000). Le siguen una serie de dientes pequeños llamados unicúspides o intermedios (Villa y Cervantes, 2003). Los premolares son largos y crestados, mientras que los molares tienen forma de W (Vaughan *et al.* 2000).

La mayoría son de hábitos terrestres pero existen especies subterráneas y semiacuáticas. Las musarañas están asociadas a zonas templadas siendo muy pocas las que habitan en zonas tropicales o desérticas (Churchfield, 1990; Ceballos y Miranda, 2000). Se pueden encontrar en lugares húmedos bajo hojarasca y troncos podridos (Villa y Cervantes, 2003). Pueden estar activas tanto en el día como en la noche (Reid, 1997). Debido a su tamaño pequeño y a su elevado metabolismo necesitan alimentarse continuamente para sobrevivir, llegando a consumir en un solo día casi el doble de su peso (Vaughan *et al.* 2000). Su dieta consiste de anélidos, artrópodos, crías de ratón o ave, semillas y hongos (Reid, 1997; Villa y Cervantes, 2003). Son un grupo de importancia económica debido a que consumen un gran número de insectos, muchos considerados como plagas (Ceballos y Miranda, 2000).

Entre las musarañas mexicanas que destacan por sus características biológicas, ecológicas y evolutivas se encuentran:

Cryptotis mexicana (Coues, 1877)

Es una musaraña de talla mediana; su cola es corta (33 – 42 % de la longitud de la cabeza y el cuerpo); sus orejas están ocultas debajo del pelaje (Choate, 1970) y las puntas de sus dientes son de color rojo (Villa y Cervantes, 2003). El color y la textura del pelaje varía según la época del año (Castro-Arellano y Ceballos, 2005); el dorso es gris ó café oscuro y el vientre es ligeramente más pálido (Villa y Cervantes, 2003; Fig. 2). Esta musaraña es

endémica de México, habita principalmente en bosques húmedos de pino-encino y bosques mesófilos a lo largo de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal (Choate, 1973; Castro-Arellano y Ceballos, 2005; Fig. 3).



Figura 2. Musaraña de la especie *Cryptotis mexicana* capturada en un bosque de encino del Municipio de Acultzingo, Veracruz, México. (Fotografía: Lázaro Guevara).

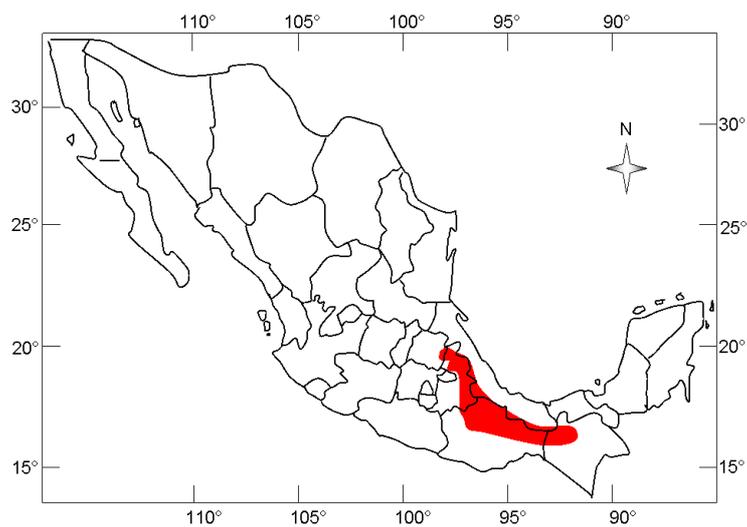


Figura 3. Distribución geográfica de la musaraña *Cryptotis mexicana* (modificada de Choate, 1973; Hall, 1981).

Cryptotis nelsoni (Merriam, 1895)

Es una musaraña de talla mediana; su cola es corta (30 % de la longitud de la cabeza y cuerpo; Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2005). El pelaje varía de gris claro a gris oscuro; sus orejas están ocultas debajo del pelaje (Choate, 1970; Fig. 4); y las puntas de sus dientes son de color rojo (Villa y Cervantes, 2003). Es una especie endémica de la región de los Tuxtlas, en el estado de Veracruz (Woodman y Timm, 2000; Fig. 5). Habita en el bosque tropical perennifolio donde existen gruesas capas de arena y ceniza volcánica (Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2005; Villa y Cervantes, 2003). Se encuentra bajo protección especial debido a lo restringido de su distribución (SEMARNAT, 2002).



Figura 4. Musaraña de la especie *Cryptotis nelsoni* capturada en un bosque mesófilo de montaña del Volcán San Martín Tuxtla, Municipio de San Andrés Tuxtla, Veracruz, México. (Fotografía: Lázaro Guevara).

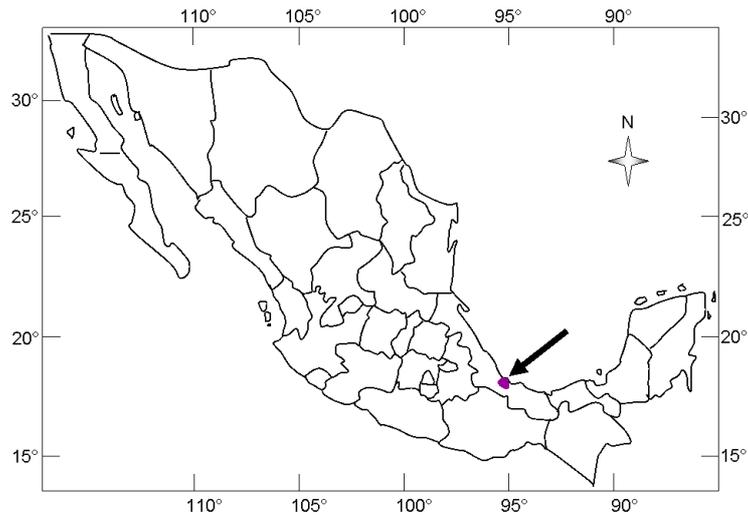


Figura 5. Distribución geográfica de la musaraña *Cryptotis nelsoni* (modificada de Choate, 1973; Hall, 1981).

Sorex saussurei Merriam, 1892

Su tamaño varía de mediano a grande; tiene una coloración café oscura en el dorso y un poco más pálida en el vientre (Ceballos y Galindo, 1984); la cola es larga (>50 % de la longitud de la cabeza y el cuerpo) y ligeramente bicolor; las orejas se pueden ver a simple vista (Fig. 6). Los dientes presentan pigmentación en la punta con excepción del quinto unicúspide (Montiel, 2006). Habita en bosques de coníferas y bosques de encino desde 1 800 hasta 3, 300 msnm (Ceballos y Galindo, 1984; Castro-Arellano, 2005). Esta musaraña es quasiendémica de México y se distribuye desde el sur de Coahuila a Durango, hasta la parte central de México y localidades aisladas de Oaxaca, Chiapas y Guatemala (Fig. 7; Villa y Cervantes, 2003).



Figura 6. Macho de la especie *Sorex saussurei* capturado en un bosque de pino de El Terrero, Municipio de Minatitlán, Colima, México. (Fotografía: Ana Montiel).

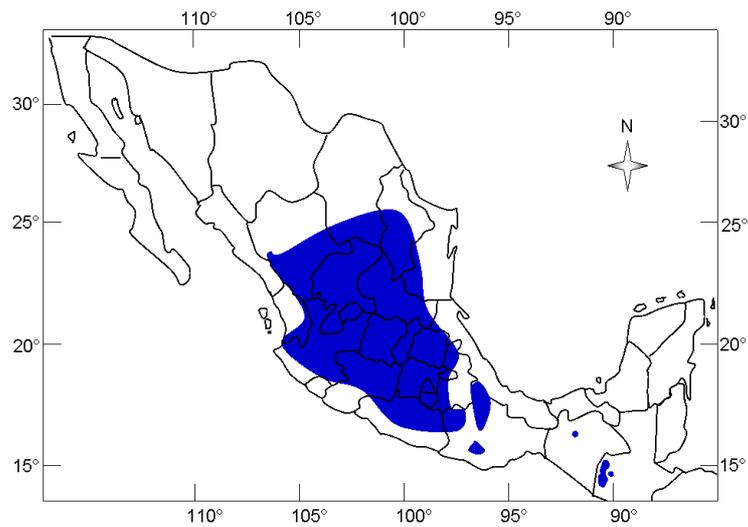


Figura 7. Distribución geográfica de la musaraña *Sorex saussurei* (modificada de Hall, 1981).

Megasorex gigas (Merriam 1897)

Esta musaraña pertenece a un género monotípico y endémico de México (Armstrong y Jones, 1972). Es de talla grande, su cola mide menos de un tercio de la longitud del cuerpo y la cabeza (Villa y Cervantes, 2003). Sus orejas están bien desarrolladas (Mendoza y Ceballos, 2005). Su pelaje es corto y de color gris, ligeramente más oscuro en el dorso (Fig. 8; Merriam, 1897). Sus dientes no están pigmentados. Se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca (Fig. 9). Habita en selvas bajas y medianas, matorrales, bosques de pino-encino, bosques mesófilos (Mendoza y Ceballos, 2005). Se considera como una especie amenazada debido a su rareza ya que existen pocos registros de su presencia a lo largo de su distribución (SEMARNAT, 2002).



Figura 8. Hembra de la especie *Megasorex gigas* capturada en un bosque mesófilo de Rancho La Mora, Municipio de Cómala, Colima, México. (Fotografía: Ana Montiel).

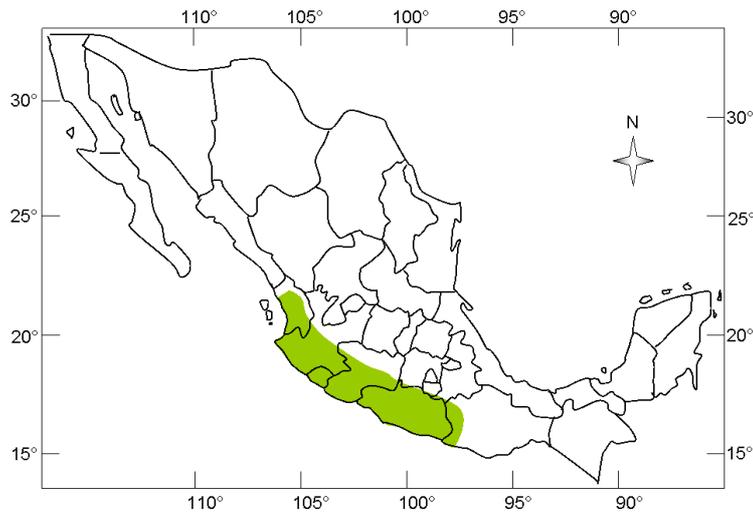


Figura 9. Distribución geográfica de la musaraña *Megasorex gigas* (modificada de Ceballos y Miranda, 2000).

Identificación sexual en musarañas

En musarañas es difícil identificar el sexo a simple vista, particularmente en individuos jóvenes debido a que el tamaño del cuerpo y los genitales externos de las hembras y machos tienen apariencia semejante (Matsubara *et al.* 2001). Se requiere tener suerte para atrapar un individuo completamente adulto y en plena condición reproductiva para que sus genitales externos puedan revelar si es hembra o macho (Fig. 10). Además, no es recomendable capturar y recapturar musarañas pues mueren rápidamente después de su manipulación y liberación. En ausencia de testículos descendidos que se aprecien externamente como protuberancias en forma de óvalo sin pelo a cada lado del ano ó de glándulas mamarias evidentes, es necesario aplicar presión a los costados de la abertura urogenital para provocar la eversión parcial del pene para diferenciar entre hembras y machos (Pucek, 1960; Crowcroft, 1964; Churchfield, 1990).



Figura 10. Ejemplares de ambos sexos de *Sorex saussurei* mostrando características sexuales secundarias o genitales externos. A la izquierda macho adulto con testículos descendidos (CNMA 43103) y una hembra joven (CNMA 43118). A la derecha hembra lactante (CNMA 43109; Fotografías: Ana Montiel).

Si lo anterior no fuera suficiente para identificar el sexo de la musaraña es necesario examinar los órganos reproductores internos (Matsubara *et al.* 2001), sin embargo, esto tampoco es fácil ya que tanto los testículos en los machos como los ovarios, útero y oviductos en las hembras son muy pequeños, midiendo tan sólo algunos milímetros, lo que dificulta encontrarlos dentro del ejemplar (Pucek, 1960; Crowcroft, 1968).

La desventaja de examinar los genitales externos y los órganos reproductores internos para la determinación del sexo en musarañas es que no puede ser aplicable en animales muertos. Sobre todo cuando los cuerpos se encuentran en un estado avanzado de descomposición o están dañados e incompletos (Matsubara *et al.* 2001). En ocasiones, cuando se captura más de una musaraña por trampa puede ocurrir canibalismo y sólo quedan restos de piel, hueso u órganos internos que hacen imposible determinar el sexo del ejemplar (Guevara, 2005).

Como alternativa a estos problemas se han desarrollado técnicas que utilizan la amplificación de un fragmento de la caja HMG del gen *sry* en ejemplares de

sexo masculino, lo que se hace a partir de ADN extraído de muestras obtenidas por medio de métodos no invasivos. Esta técnica ha sido probada con éxito para diferenciar entre hembras y machos en tres géneros de musarañas *Crocidura*, *Neomys* (Sánchez *et al.* 1996) y *Sorex* (Matsubara *et al.* 2001), en los que los machos amplificaron fragmentos de ADN de 155 y 202 pares de bases y las hembras no.

HIPÓTESIS

De acuerdo con lo anterior, se propone que a partir de tejido fresco de musaraña y con iniciadores específicos para el gen *sry* se podrían obtener amplificaciones positivas en ejemplares de sexo masculino, mientras que en ejemplares de sexo femenino no se debería obtener ninguna amplificación. La repetición de este procedimiento experimental deberá producir el mismo resultado y permitirá concluir si éste es favorable. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es:

OBJETIVO

Identificar el sexo en musarañas mediante la amplificación de un fragmento del gen *sry* en individuos de sexo conocido a partir de sus tejidos en tres géneros de musarañas *Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex*.

MATERIALES Y METODOS

Colecta de Muestras

Se utilizaron muestras de hígado de individuos de las especies *Cryptotis mexicana*, *Cryptotis nelsoni*, *Sorex saussurei* y *Megasorex gigas* con fecha de colecta a partir del 2003 y hasta el 2006. Las muestras provienen de la Colección de Tejidos Congelados de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM. Se ocuparon 6 individuos (3 hembras y 3 machos) de sexo conocido y evidencia de actividad reproductora por especie (Apéndice 1).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo utilizando un kit comercial (DNeasy Tissue Kit, Qiagen Cat^{MR} No. 69504). Para determinar la presencia y la integridad del ADN extraído se corrieron 3 µl de cada extracción mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sanbrook y Rusell, 2001; Apéndice 2) a 100 volts durante 75 minutos. El ADN se visualizó con bromuro de etidio en un transiluminador de rayos ultra violeta (marca Hoefer) y posteriormente se tomó una fotografía con una cámara digital marca Kodak. Las concentraciones de ADN y su pureza se cuantificaron por espectrofotometría y están expresadas en µg/ µl; las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro (marca Biomate).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la técnica de PCR se utilizaron tres juegos iniciadores específicos para amplificar un fragmento de la región de la caja HMG del gen *sry* en ejemplares del sexo masculino (Cuadro 1). Para el género *Cryptotis* se utilizó un juego de iniciadores diseñados para el ratón común *Mus musculus* y que habían sido probados exitosamente en dos géneros de musarañas (*Crocidura* y *Neomys*; Sánchez *et al.* 1996). Este juego de primers no produjo amplificación en

musarañas de los géneros *Sorex* y *Megasorex*. Para el género *Sorex* se ocupó un juego de iniciadores diseñado para *Sorex unguiculatus* y probado en otras especies del mismo género (Matsubara *et al.* 2001). Este juego de primers produjo amplificaciones de mala calidad en musarañas de los géneros *Megasorex* y *Cryptotis*. Finalmente, para el género *Megasorex* se modificó el juego de iniciadores de Sánchez *et al.* (1996) con el software Primer 3.0 (frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Se utilizó la secuencia del ratón común *M. musculus* reportada por Hacker *et al.* 1995 para un fragmento de 202 nucleótidos de la caja HMG del gen *sry*. El software recorrió trece nucleótidos hacia el interior de la secuencia el sitio de reconocimiento del primer F' para evitar la formación de dímeros. Este juego de iniciadores produjo amplificaciones inespecíficas en musarañas de los géneros *Sorex* y *Cryptotis*.

Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados en la amplificación de un fragmento del gen *sry* en tres géneros de musarañas (*Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex*).

Género	Secuencia de nucleótidos	Fragmento amplificado (pares de bases)	Referencia
<i>Cryptotis</i>	F 5'-GTCAAGCGCCCCATGAATGCAT -3' R 5'-AGTTTGGGTATTTCTCTCTGTG -3'	202	Sánchez <i>et al.</i> 1996
<i>Sorex</i>	F 5'-CATGGTGTGGGCTCGCAATC-3' R 5'-CTGCCTGTAGTCTCTGTGCC-3'	155	Matsubara <i>et al.</i> 2001
<i>Megasorex</i>	F 5'-TGAATGCATTTATGGTGTGG -3' R 5'-AGTTTGGGTATTTCTCTCTGTG -3'	189	Modificado en este estudio de Sánchez <i>et al.</i> 1996

Para validar el método se utilizó como control positivo la amplificación de un fragmento de 450 pares de bases del gen *citocromo b* y como control negativo reacciones sin ADN. Los iniciadores específicos para la amplificación del gen *citocromo b* son MVZ5 5'-GCAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3' y MVZ04 5'-GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCT-3' (Smith y Patton, 1993). Las reacciones de amplificación para los genes *sry* y *citocromo b* se hicieron por separado.

Las reacciones de amplificación (Cuadros 2, 3 y 4) fueron realizadas en un termociclador marca Thermo Hybaid; el programa se ajustó a las características de cada juego de iniciadores (Cuadros 5 y 6).

Las bandas de ADN producto de PCR fueron separadas por medio de geles de agarosa al 1.5 % utilizando 5 µl de reacción (Sanbrook y Rusell, 2001), los cuales se corrieron a 80 volts durante 90 minutos (Apéndice 2). La lectura de los resultados se llevó a cabo de manera directa sobre las bandas de ADN amplificado en los geles de agarosa.

Para comprobar que las bandas de ADN producto de PCR que coincidían con el tamaño esperado fueran las correctas se realizó la purificación de la banda obtenida con un Kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit Qiagen Cat^{MR} No. 28104 y QIAquick Gel Extraction Kit Cat^{MR} No. 28704) y se envió a un secuenciador automático. Los fragmentos de ADN se secuenciaron en ambas direcciones utilizando el juego de iniciadores específicos empleado para la amplificación del fragmento en cada género. La edición y en análisis de las secuencias fueron realizados con el software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.0.0. Posteriormente se realizó una búsqueda (Blast) en Gene Bank para conocer si las secuencias obtenidas eran semejantes a las reportadas para el mismo fragmento en otros mamíferos.

Debido a que la secuencia nucleótidos del fragmento de ADN del gen *sry* amplificado en este estudio era desconocida hasta el momento para las especies de musarañas utilizadas, las secuencias obtenidas se depositaron en el Banco de

genes (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el software Bankit (91628, 893194, 891169, 893662). Finalmente las secuencias problema se compararon con la secuencia de la musaraña *Sorex unguiculatus* y el ratón *Mus musculus*. Considerando que en el código genético existen varios tripletes que codifican para un mismo aminoácido y con el fin de observar la relevancia de los cambios en la secuencia de nucleótidos, las secuencias obtenidas se tradujeron a aminoácidos junto con las de *S. unguiculatus* y *M. musculus* con el software JustBio 2002 y se compararon.

Cuadro 2. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento de ADN del gen *sry* en individuos del género de musaraña *Cryptotis* para la identificación del sexo por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; modificado de Bryja y Konecný, 2003).

Reactivo	Concentración original	Volumen agregado	Concentración final en la reacción
Buffer para PCR (Marca R y L)	10x	2.5	1X
MgCl ₂ (Marca R y L)	25 mM	2.5 µl	2.5 µM
DNTP's	100 mM	0.5 µl	200 µM
Primer F	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Primer R	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Taq Polimerasa (Marca R y L)	5 U/µl	0.2 µl	1 U
Glicerol		1.25 µl	5%
ADN		El necesario para obtener 100 ng	100/25µl
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl	

Cuadro 3. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento de ADN del gen *sry* en individuos de los géneros de musarañas *Sorex* y *Megasorex* para la identificación del sexo por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; modificado de Matsubara *et al.* 2001).

Reactivo	Concentración original	Volumen agregado	Concentración final en la reacción
Buffer para PCR (Marca Invitrogen)	10x	2.5 µl	1X
MgCl ₂ (Marca Invitrogen)	50 mM	1.5 µl	3.0 µM
DNTP's	100 mM	0.5 µl	200 µM
Primer F	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Primer R	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Taq Polimerasa (Marca Invitrogen)	5 U/µl	0.2 µl	1 U
ADN		El necesario para obtener 100 ng	100/25µl
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl	

Cuadro 4. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación de un fragmento de ADN del gen *citocromo b* en individuos de los géneros de musarañas *Cryptotis*, *Megasorex* y *Sorex* por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; modificado de Smith y Patton. 1993).

Reactivo	Concentración original	Volumen a tomar	Concentración final en la reacción
Buffer para PCR (Marca Invitrogen ó R y L)	10x	2.5	1X
MgCl ₂ (Marca Invitrogen ó R y L)	25 mM ó 50 mM	1.5 µl ó 2.5 µl	3.0 µM ó 2.5 µM
DNTP's	100 mM	0.5 µl	200 µM
Primer F	40 µM	0.25 µl	0.4 µM
Primer R	40 µM	0.25 µl	0.4 µM
Taq Polimerasa (Marca Invitrogen ó R y L)	5 U/µl	0.2 µl	1 U
ADN		El necesario para obtener 100 ng	100/25µl
H ₂ O		La necesaria para completar un volumen de reacción de 25 µl	

Cuadro 5. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento del gen *sry* en los géneros de musarañas *Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex* por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

<i>Cryptotis</i> (modificado de Bryja y Honecný, 2003)			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización	93	5	1
Desnaturalización	93	1	35
Alineación	50	1	
Extensión	72	1	
Extensión Final	73	5	1
<i>Sorex</i> (modificado de Marsubara <i>et al.</i> 2001)			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Número de ciclos
Desnaturalización	93	120	1
Desnaturalización	93	15	30
Alineación	68	20	
Extensión	72	20	
<i>Megasorex</i> (modificado de Bryja y Honecný, 2003)			
Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización	93	5	1
Desnaturalización	93	1	30
Alineación	60	1	
Extensión	72	1	
Extensión Final	73	5	1

Cuadro 6. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento de ADN del gen *citocromo b* en individuos de los géneros de musarañas *Cryptotis*, *Megasorex* y *Sorex* por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; modificado de Smith y Patton, 1993).

Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineación	50	1	
Extensión	72	1	
Extensión Final	73	5	1

RESULTADOS

Amplificación del fragmento de ADN del gen *sry*

Género *Cryptotis*

De la especie *Cryptotis mexicana* se logró amplificar un fragmento de ADN de 202 pares de bases que corresponde a un fragmento del gen *sry*, el cual sólo se observa en ejemplares de sexo masculino. Esto permitió la determinación correcta del sexo de seis ejemplares (3 machos y 3 hembras; Fig. 11). Al mismo tiempo se logró amplificar como control positivo un fragmento de 450 pares de bases tanto de ejemplares de sexo masculino como de ejemplares de sexo femenino, que corresponde a un segmento del gen mitocondrial *citocromo b*. En el control negativo no hubo amplificación. Lo anterior sirvió para validar el método en ejemplares de sexo femenino.

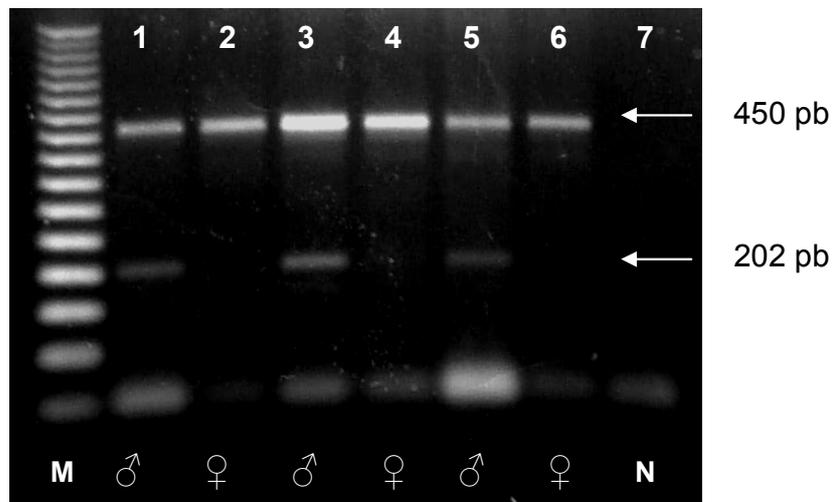


Figura 11. Gel de agarosa con bandas de ADN que muestra la amplificación de un fragmento de 202 pares de bases (pb) del gen *sry* en individuos de sexo masculino (carriles 1, 3 y 5) de la especie *Cryptotis mexicana*. En las hembras (carriles 2, 4 y 6) no hubo amplificación. El gel también contiene bandas que muestran la amplificación de un fragmento de 450 pb del gen *citocromo b* utilizado como control positivo de amplificación. El carril 7 muestra el control negativo (N). M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 50 pb; ♀ = Hembra; ♂ = Macho.

Los fragmentos amplificados de los tres machos se purificaron y se secuenciaron. Se obtuvo una secuencia idéntica de 202 nucleótidos en los tres individuos:

```
5' GTCAAGCGCCCCATGAATGCATTCATGGTATGGTCTCGCAGTCAAAGACA
TAAGATTGCTCTAGAAAATCCCCAAATGCAAAACTCAGAGATCAGTAAACAAC
TGGGATACAAGTGGAATGCTTACGGAAGCTGAAAAATGGCCATTCTTTCAG
GAGGCACAGAGGCTACAGGCAGTGCACAGAGAGAAATACCCAAACT 3'.
```

Similarmente, de la especie *Cryptotis nelsoni* se amplificó un fragmento de 202 pares de bases sólo en ejemplares de sexo masculino que coincide un fragmento de ADN del el gen *sry*. Así mismo, para validar el método en ejemplares hembras se amplificó un fragmento de 450 pares de bases del gen *citocromo b* como control positivo de amplificación en ejemplares de ambos sexos; se utilizó un control negativo donde no se obtuvo amplificación. Lo anterior permitió determinar fácilmente el sexo de 6 ejemplares (3 machos y 3 hembras; Fig. 12).

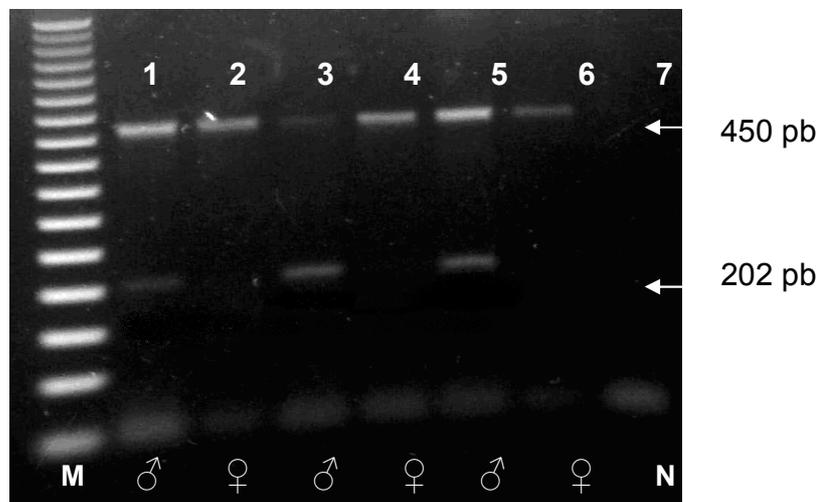


Figura 12. Gel de agarosa con bandas de ADN que muestra la amplificación de un fragmento de 202 pares de bases (pb) del gen *sry* en individuos de sexo masculino (carriles 1, 3 y 5) de la especie *Cryptotis nelsoni*. En las hembras (carriles 2, 4 y 6) no hubo amplificación. El gel también contiene bandas que muestran la amplificación de un fragmento de 450 pb del gen *citocromo b* como control positivo. El carril 7 muestra el control negativo (N). M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 50 pb; ♀ = Hembra; ♂ = Macho.

Los fragmentos amplificados de los tres machos se purificaron y se secuenciaron. Se obtuvo una secuencia idéntica de 202 nucleótidos en los tres individuos:

```
5'GTCAAGCGCCCCATGAATGCATTCATCGTATGGTCTCGGCGTCAAAGACA
TAAAATTGCTCTAGAAAATCCCCAAATGCAAACTCAGAGATCAGTAAACAACT
GGGATACAAGTGGAAAATGCTTACGGAAGCTGAAAAATGGCCATTCTTTCAGG
AGGCACAGAGGCTACAGGCAGTGACAGAGAGAAATACCCAACT 3'.
```

Género *Sorex*

De la especie *Sorex saussurei* también se obtuvo una amplificación positiva del gen *sry* en los ejemplares de sexo masculino, obteniendo un fragmento de 155 pares de bases, mientras que en las hembras no amplificó, con lo cual se corroboró el sexo de 6 ejemplares (3 machos y 3 hembras; Fig. 13). Con el fin de validar el método en ejemplares de sexo femenino, se obtuvo la amplificación de un control positivo, un fragmento de 450 pares de bases del gen citocromo b, en ejemplares hembras y machos y se obtuvo un control negativo sin bandas de ADN.

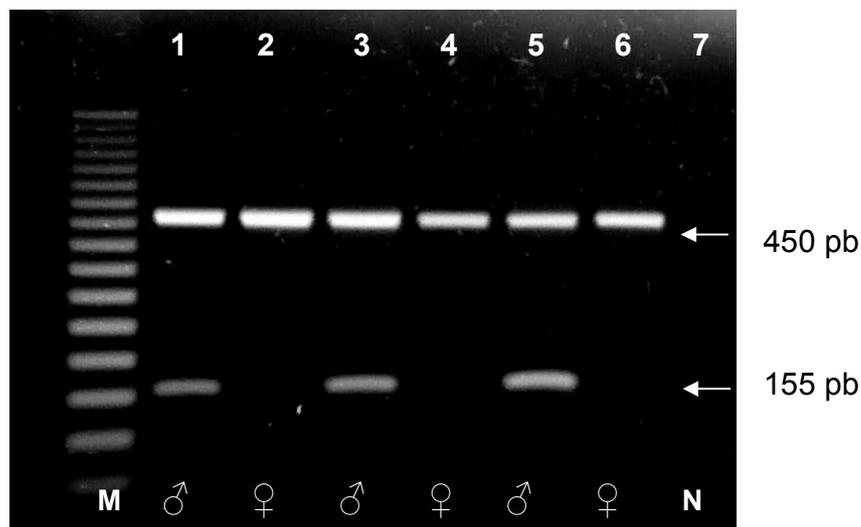


Figura 13. Gel de agarosa con bandas de ADN que muestra la amplificación de un fragmento de 155 pares de bases (pb) del gen *sry* en individuos de sexo masculino (carriles 1, 3 y 5) de la especie *Sorex saussurei*. En las hembras

(carriles 2, 4 y 6) no hubo amplificación. El gel también contiene bandas que muestran la amplificación del control positivo, un fragmento de 450 pb del gen *citocromo b*. El carril 7 muestra el control negativo (N). M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 50 pb; ♀ = Hembra; ♂ = Macho.

Los fragmentos amplificados de los tres machos se purificaron y se secuenciaron. Se obtuvo una secuencia idéntica de 155 nucleótidos en los tres individuos:

```
5'CATGGTGTGGGCTCGCAATCAGAGACGTAAGATAGCTATAGAAAATCCTAA
AATACAAAACCTCAGAGATTAGCAAACAGCTGGGATACCAGTGGAAAATGCTTA
CAGAAGATGAAAATTGCCGTTCTTTCTGGAGGCACAGAGACTACAGGCAG3'.
```

Género *Megasorex*

De la especie *Megasorex gigas* se amplificó un fragmento del *sry* de 189 pares de bases en ejemplares de sexo masculino, mientras que los ejemplares de sexo femenino no amplificaron, lo que confirmó la identidad sexual de 6 ejemplares (3 machos y 3 hembras; Fig. 14). Además, se amplificó un fragmento de 450 pares del gen *citocromo b* como control positivo en ejemplares de ambos sexos; y se utilizó un control negativo en el cual no se obtuvo ninguna amplificación, con lo que se validó el método para ejemplares de sexo femenino.

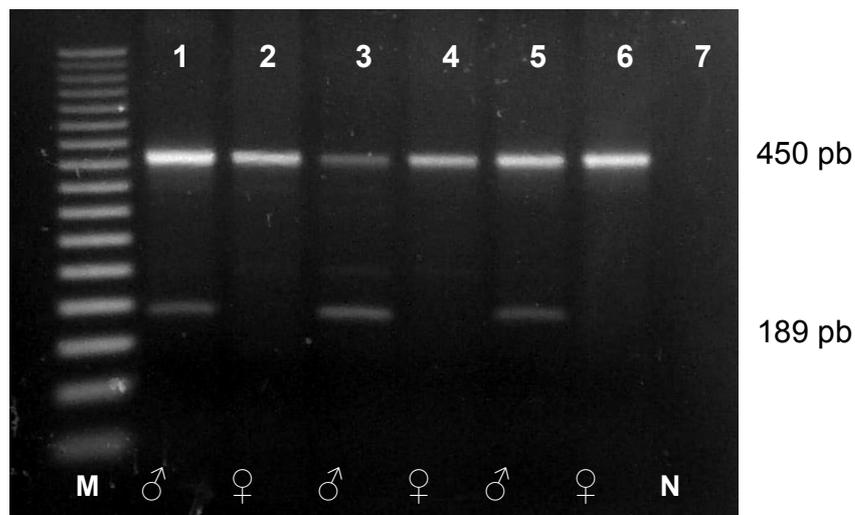


Figura. 14. Gel de agarosa con bandas de ADN que muestra la amplificación de un fragmento de 189 pares de bases (pb) del gen *sry* en individuos de sexo masculino (carriles 1, 3 y 5) de la especie *Megasorex gigas*. En las hembras (carriles 2, 4 y 6) no hubo amplificación. El gel también contiene bandas que muestran la amplificación del control positivo, un fragmento de 450 pb del gen *citocromo b*. El carril 7 muestra el control negativo (N). M = Marcador de referencia de tamaño en incrementos de 50 pb; ♀ = Hembra; ♂ = Macho.

Los fragmentos amplificados de los tres machos se purificaron y se secuenciaron para obtener una secuencia de 189 nucleótidos en los tres individuos:

```
5' TGAATGCATTTATGGTGTGGTCTCGTGATCAAAGACATAAGATAGCTCTAG
AAAATCCACAGATGAAAAATTCAGAGATCAGCAAACAGCTAGGATTCCGGTGG
AAAATGCTTACAGAAGATGAAAAATGGCCATTCTTTCAAGAGGCACAGAGACT
ACAGGCAGTGCACAGAGAGAAATACCCAAACT 3'.
```

Comparación con secuencias de nucleótidos de Gene Bank

El resultado del Blast muestra que las secuencias de nucleótidos obtenidas son parecidas a las reportadas para el mismo fragmento de ADN en otras musarañas (*Crocidura suaveolens*, *C. leucodon*, *Neomys anomalus* y *Sorex unguiculatus*), roedores (*Mus musculus* y *Rattus norvegicus*), primates (*Homo sapiens*), carnívoros (*Canis familiaris*, *Ursus arctos*, *U. americanus*, *Ailuropoda melanoleuca*, *Enhydra lutris*, *Lutra lutra*, *Phoca vitulina* y *Zalophus californicus*), cetáceos (*Tursiops truncatus*, *Stenella longirostris*, *Orcinus orca*, *Megaptera novaeangliae* y *Balaenoptera musculus*) y artiodáctilos (*Cervus nippon*), con lo que se confirma la amplificación del fragmento de interés.

Las secuencias obtenidas se enviaron al GeneBank los días 6 y 7 de marzo de 2007 obteniendo los códigos de acceso: *Cryptotis mexicana* EF473298, *C. nelsoni* EF473299, *Sorex saussurei* EF473296 y *Megasorex gigas* EF473297. Finalmente, se compararon con las secuencias de las especies *S. unguiculatus*

(AB055219 de Gene Bank; Matsubara *et al.* 2001) y *M. musculus* (X55491 de Gene Bank; Gubbay *et al.* 1990; Fig. 15; Cuadro 7).

No se observó variabilidad intraespecífica y se encontró una secuencia única para cada especie. Entre especies del mismo género encontramos que había muy pocas diferencias en la secuencia de nucleótidos. Entre *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* se encontró una diferencia del 2.5 %. Similarmente, entre *Sorex saussurei* y *S. unguiculatus* la diferencia fue del 3.9 %.

A nivel de especies de distinto género la mayor diferencia se encontró entre *S. saussurei* y *C. nelsoni* entre las que existe una diferencia de 14.8 %. La menor diferencia se encontró entre *S. unguiculatus* y *Megasorex gigas* con diferencia del 8.4 %. Entre *M. gigas* y las musarañas del género *Cryptotis* las diferencias son 12.3% con *C. mexicana* y 13.6% con *C. nelsoni*. En comparación con las musarañas del género *Sorex*, *M. gigas* tiene una diferencia del 13.6 % con *S. saussurei* y 8.4 % con *S. unguiculatus*. Con respecto a las musarañas del género *Sorex* y las musarañas del género *Cryptotis* encontramos que entre *S. unguiculatus* y *C. mexicana* hay una diferencia del 9.0 % mientras que entre *S. saussurei* y *C. mexicana* la diferencia es del 11.0 %. *C. nelsoni* presenta una diferencia del 10. % con *S. unguiculatus* y 14.8 % con *S. saussurei*.

En comparación con el ratón común *Mus musculus*, la musaraña que presenta mayor número de cambios en la secuencia de nucleótidos es *C. nelsoni* con la diferencia del 27.7 %. El resto de las musarañas presentan un número de cambios muy similar. *M. gigas* y *S. saussurei* presentan una diferencia del 25 %, mientras que en *C. mexicana* y *S. unguiculatus* la diferencia es del 26.5 %.

En la comparación entre *C. mexicana* y *C. nelsoni* no se encontró diferencia en el número bases púricas (A, G) y pirimídicas (T, C) que cambian en la secuencia de nucleótidos. En el resto de las comparaciones encontramos que la mayor parte de las bases que no se comparten en la secuencia de nucleótidos son bases púricas.

Comparación con secuencias de aminoácidos de Gene Bank

El resultado del Blast muestra que las secuencias de aminoácidos obtenidas son semejantes a las reportadas para el mismo fragmento de ADN en musarañas (*Crocidura suaveolens*, y *C. leucodon*), quirópteros (*Myotis myotis* y *Rousettus aegyptiacus*), roedores (*Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, *R. rattus*), primates (*Homo sapiens*, *Gorilla gorilla*), carnívoros (*Canis familiaris*, *Ursus arctos*, *Enhydra lutris*, *Lutra lutra*, *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Mirounga angustirostris*, *Phoca vitulina* y *Zalophus californicus*), cetáceos (*Tursiops truncatus*, *Megaptera novaeangliae* y *Balaenoptera musculus*) y artiodáctilos (*Equus caballus*), con lo que se confirma la amplificación del fragmento de interés.

Las secuencias de nucleótidos de *C. mexicana*, *C. nelsoni*, *S. saussurei*, *S. unguiculatus*, *M. gigas* y *M. musculus* se tradujeron a aminoácidos y se compararon (Fig. 16; Cuadro 8). Entre especies del mismo género encontramos que existen muy pocas diferencias en la secuencia de aminoácidos. Entre *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* se encontró una diferencia del 1.9 % y similarmente, entre *Sorex saussurei* y *S. unguiculatus* la diferencia fue del 5.9 %. A nivel de especies de distinto género la mayor diferencia fue entre *S. saussurei* y *C. mexicana* con 21.6 %. La menor diferencia fue entre *C. nelsoni* y *M. gigas* con 9.8 %.

Entre *M. gigas* y las musarañas del género *Sorex* las diferencias son 17.6% con *S. unguiculatus* y 19.6% con *S. saussurei*. En comparación con las musarañas del género *Cryptotis*, *M. gigas* tiene una diferencia del 9.8 % con *C. nelsoni* y 11.8 % con *C. mexicana*. Con respecto a musarañas del género *Sorex* y las musarañas del género *Cryptotis* encontramos que entre *S. unguiculatus* y *C. mexicana* hay una diferencia del 17.6 % mientras que entre *S. saussurei* y *C. mexicana* la diferencia es del 21.6 %. *C. nelsoni* presenta una diferencia del 15.7 % con *S. unguiculatus* y 17.6 % con *S. saussurei*.

En comparación con el ratón común *Mus musculus*, la musaraña que presenta mayor número de cambios en la secuencia de aminoácidos es *S. saussurei* con la diferencia del 31.4 %. *C. nelsoni*. Presenta la menor diferencia con 25. 5%. *C. mexicana*, *M. gigas* y *S. unguiculatus* presentan una diferencia del 29.4 %.

		10	20	30	40	50	60
<i>M. gigas</i>	~~~~~	~TGAATGC	ATTTATGGTG	TGGTCTCGTG	ATCAAAGACA	TAAGATAGCT	
<i>S. saussurei</i>	~~~~~	~~~~~	~CATGGTG	TGGGCTCGCA	ATCAGAGACG	TAAGATAGCT	
<i>S. unguiculatus</i>	~~~~~	~~~~~	~CATGGTG	TGGGCTCGCA	ATCAAAGACG	TAAGATAGCT	
<i>C. mexicana</i>	<u>GTCAAGCGCC</u>	<u>CCATGAATGC</u>	ATT <u>CATGGTA</u>	TGGTCTCGCA	GTCAAAGACA	TAAGATTGCT	
<i>C. nelsoni</i>	<u>GTCAAGCGCC</u>	<u>CCATGAATGC</u>	ATT <u>CATCGTA</u>	TGGTCTCGGC	GTCAAAGACA	TAAATTGCT	
<i>M. musculus</i>	<u>GTCAAGCGCC</u>	<u>CCATGAATGC</u>	ATT <u>TATGGTG</u>	TGGTCCCGTG	GTGAGAGGCA	CAAGTTGGCC	

		70	80	90	100	110	120
<i>M. gigas</i>	CTAGAAAATC	CACAGATGAA	AAATTGAGAG	ATCAGCAAAC	AGCTAGGATT	CCGGTGGAAA	
<i>S. saussurei</i>	ATAGAAAATC	CTAAAATACA	AAACTCAGAG	ATTAGCAAAC	AGCTGGGATA	CCAGTGGAAA	
<i>S. unguiculatus</i>	CTAGAAAATC	CTAAAATGCA	AAACTCAGAG	ATCAGCAAAC	AGCTGGGATA	CCAGTGGAAA	
<i>C. mexicana</i>	CTAGAAAATC	CCCAAATGCA	AAACTCAGAG	ATCAGTAAAC	AACTGGGATA	CAAGTGGAAA	
<i>C. nelsoni</i>	CTAGAAAATC	CCCAAATGCA	AAACTCAGAG	ATCAGTAAAC	AACTGGGATA	CAAGTGGAAA	
<i>M. musculus</i>	CAGCAGAATC	CCAGCATGCA	AAATAAGAG	ATCAGCAAAG	AGCTGGGATG	CAGGTGGAAA	

		130	140	150	160	170	180
<i>M. gigas</i>	ATGCTTACAG	AAGATGAAAA	ATGGCCATTTC	TTTCAAGAGG	CACAGAGACT	ACAGGCAGTG	
<i>S. saussurei</i>	ATGCTTACAG	AAGATGAAAA	ATTGCCGTTTC	TTTCTGGAGG	CACAGAGACT	ACAGGCAG..	
<i>S. unguiculatus</i>	ATGCTTACAG	AAGATGAAAA	ATTGCCATTTC	TTTCAGGAGG	CACAGAGACT	ACAGGCAG..	
<i>C. mexicana</i>	ATGCTTACGG	AAGCTGAAAA	ATGGCCATTTC	TTTCAGGAGG	CACAGAGGCT	ACAGGCAGTG	
<i>C. nelsoni</i>	ATGCTTACGG	AAGCTGAAAA	ATGGCCATTTC	TTTCAGGAGG	CACAGAGGCT	ACAGGCAGTG	
<i>M. musculus</i>	AGCCTTACAG	AAGCCGAAAA	AAGGCCCTTT	TTCCAGGAGG	CACAGAGATT	GAAGATCCTA	

```

      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . .
                190           200
M.  gigas      CACAGAGAGA AATACCCAAA CT
S.  saussurei  .....
S.  unguiculatus .....
C.  mexicana  CACAGAGAGA AATACCCAAA CT
C.  nelsoni   CACAGAGAGA AATACCCAAA CT
M.  musculus  CACAGAGAGA AATACCCAAA CT

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de 155 nucleótidos que corresponde a un fragmento del gen *sry* del cromosoma sexual Y en las musarañas *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* de Veracruz, *Megasorex gigas* y *Sorex saussurei* de Colima, *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*. Las bases diferentes están marcadas con rectángulos. En *M. gigas* el oligo F' (forward) está del nucleótido 13 al 23, en *S. saussurei* y *S. unguiculatus* del nucleótido 23 al 43 y en *C. mexicana*, *C. nelsoni* y *M. musculus* del nucleótido 1 al 22. En *M. gigas*, *C. mexicana*, *C. nelsoni* y *M. musculus* el oligo R' (reverse) está del nucleótido 180 al 202 y en *S. saussurei* y *S. unguiculatus* del nucleótido 158 al 178.

```

M.  gigas      -----NAFMVWSRDQRHKIALENPOMKNSEISKQLGFRWKMLTEDEKWPFFQEAQRLQAVHREKYPNX
C.  mexicana  VKRPMNAFIVWSRRQRHKIALENPOMQNSEISKQLGYKWKMLTEAEKWPFFQEAQRLQAVHREKYPNX
C.  nelsoni   VKRPMNAFMVWSRSQRHKIALENPOMQNSEISKQLGYKWKMLTEAEKWPFFQEAQRLQAVHREKYPNX
S.  unguiculatus -----MVWARNQRRKIALENPKMQNSEISKQLGYQWKMLTEDEKLPFF--EAQRLQAX-----
S.  saussurei -----MVWARNQRRKIAIENPKIQNSEISKQLGYQWKMLTEDEKLPFFLEAQRLQAX-----
M.  musculus  VKRPMNAFMVWSRGERHKLAAQQNPQMNTTEISKQLGCRWKSLEAEKRPFQEAQRLKILHREKYPNX

```

Fig. 16. Alineamiento de la secuencia de 51 aminoácidos que corresponde a un fragmento de 155 nucleótidos del gen *sry* del cromosoma sexual Y en las musarañas *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* de Veracruz, *Megasorex gigas* y *Sorex saussurei* de Colima, *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*. Los aminoácidos diferentes están marcados con rectángulos.

Cuadro 7. Número (#) de pares de bases no compartidas (Pu = bases púricas: A, G; Pi = bases pirimídicas: T, C) y su porcentaje (%) entre secuencias de 155 nucleótidos del gen *sry* del cromosoma sexual Y en musarañas (Mammalia: Soricomorpha) mexicanas, *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*.

	<i>Cryptotis mexicana</i>				<i>Cryptotis nelsoni</i>				<i>Megasorex gigas</i>				<i>Sorex saussurei</i>				<i>Sorex unguiculatus</i>				<i>Mus musculus</i>			
	#	%	Pu	Pi	#	%	Pu	Pi	#	%	Pu	Pi	#	%	Pu	Pi	#	%	Pu	Pi	#	%	Pu	Pi
<i>Cryptotis mexicana</i>	-	-	-	-																				
<i>Cryptotis nelsoni</i>	4	2.5	2	2	-	-	-	-																
<i>Megasorex gigas</i>	19	12.3	13	6	21	13.6	14	7	-	-	-	-												
<i>Sorex saussurei</i>	17	11.0	12	5	23	14.8	15	8	21	13.6	13	8	21	-	-	-								
<i>Sorex unguiculatus</i>	14	9.0	8	6	16	10.3	9	7	13	8.4	8	5	13	3.9	5	1	-	-	-	-				
<i>Mus musculus</i>	41	26.5	22	19	43	27.7	23	20	40	25	23	17	40	25	23	17	41	26.5	21	20	-	-	-	-

Cuadro 8. Número (#) de aminoácidos no compartidos y su porcentaje (%) entre secuencias de 51 aminoácidos que corresponden a un fragmento de 155 nucleótidos del gen *sry* del cromosoma sexual Y en musarañas (Mammalia: Soricomorpha) mexicanas, *S. unguiculatus* y el ratón común *Mus musculus*.

	<i>Cryptotis mexicana</i>		<i>Cryptotis nelsoni</i>		<i>Megasorex gigas</i>		<i>Sorex saussurei</i>		<i>Sorex unguiculatus</i>		<i>Mus musculus</i>	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
<i>Cryptotis mexicana</i>	-	-										
<i>Cryptotis nelsoni</i>	1	1.9	-	-								
<i>Megasorex gigas</i>	6	11.8	5	9.8	-	-						
<i>Sorex saussurei</i>	11	21.6	9	17.6	10	19.6	-	-				
<i>Sorex unguiculatus</i>	9	17.6	8	15.7	9	17.6	3	5.9	-	-		
<i>Mus musculus</i>	15	29.4	13	25.5	15	29.4	16	31.4	15	29.4	-	-

DISCUSION

La identificación del sexo genético en mamíferos utilizando marcadores moleculares es una técnica que puede utilizar métodos no invasivos para la obtención de ADN del animal de interés (Dallas, 2000; Maldonado, 2006). Estos métodos incluyen la colecta de muestras de piel, pelo, excremento, orina ó hueso (Taberlet *et al.* 1999) sin tener la necesidad de observar, capturar ó manipular al ejemplar (Kühn *et al.* 2002). La literatura internacional muestra un incremento en el número de estudios realizados bajo está línea de investigación en los últimos años por lo que ha tenido una gran aceptación en la comunidad científica y se ha convertido en el fundamento del estudio y manejo de las poblaciones de animales silvestres a nivel mundial. Desgraciadamente en México este tipo de trabajos son escasos debido principalmente a las limitaciones económicas y a la falta de interés en la biología molecular y sus aplicaciones en el estudio de la fauna silvestre de Este trabajo representa uno de los primeros en su tipo en México por lo que es importante su difusión.

En las musarañas *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* se logró la amplificación de un fragmento de 202 pares de bases en ejemplares de sexo masculino. Esto coincide con lo encontrado para musarañas (*Crocidura suaveolens* y *Neomys anomalus*), topos (*Talpa occidentalis*, *T. romana*), erizos (*Erinaceus algirus*), murciélagos (*Rousettus aegyptiacus*, *Pteropus poliocephalus*, *P. alecto*, *P. scapulatus*, *Myotis myotis*, *Miniopterus schreibersi*, *Eptesicus fuscus*, *E. serotus*) y roedores (*Myocastor coypus*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis*, *M. tatricus*, *M. subterraneus*, *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. microps*, *Mus musculus* y *Mus domesticus* (Sánchez *et al.* 1996; Bullejos *et al.* 2000; García-Meunier *et al.* 2001; Bryja y Konecný, 2003).

Para la musaraña *Sorex saussurei* se amplificó un fragmento de 155 pares de bases en machos. Esto es similar a lo encontrado para seis especies del mismo género *S. caecutiens*, *S. gracillimus*, *S. hosonoi*, *S. unguiculatus*, *S. isodon* y *S. minutissimus* (Matsubara *et al.* 2001). Finalmente, en la musaraña

Megasorex gigas se obtuvo un fragmento de 189 pares de bases en ejemplares machos. En la literatura no se encontró un resultado similar debido a que el juego de primers de Sánchez *et al.* 1996 fue modificado en este trabajo a partir de la secuencia del gen *sry* del ratón común con el fin de obtener una amplificación de mejor calidad.

Además, lo anterior coincide con la identificación del sexo en el campo de todos los ejemplares utilizados (Guevara, 2005; Montiel, 2006). En los organismos con evidencia de testículos descendidos hubo amplificación del fragmento de ADN esperado, mientras que en los ejemplares donde hubo presencia de embriones, o mamas evidentes no se obtuvo la amplificación. Sin embargo, la ausencia de banda puede ser interpretada como un falso negativo en el que el PCR no haya funcionado en un ejemplar macho y se confunda con una hembra. La alternativa a este problema es realizar un PCR que incluya un control positivo que produzca bandas en todos los individuos, adicionalmente los machos tienen una banda que indica su sexo (Griffiths, 2000).

Los controles externos funcionaron adecuadamente (Maldonado, 2006). El control negativo consistió en reacciones sin ADN para corroborar que no se introdujo contaminación durante la extracción de ADN, o bien en la preparación del PCR. El control positivo consistió en la amplificación de un fragmento del gen *citocromo b* tanto en hembras como en machos. Sin embargo, no se encontraron las condiciones óptimas para amplificación del gen *sry* y el gen *citocromo b* en una sola reacción ya que en la temperatura de alineación de los iniciadores existían más de 10 °C de diferencia, y por lo tanto se llevaron a cabo por separado. A pesar de lo anterior, se cumplió la meta propuesta de identificar molecularmente el sexo de las musarañas. Sin embargo, los ajustes efectuados al protocolo original de PCR para obtener las condiciones óptimas de reacción fueron determinantes para la obtención de los resultados aquí reportados.

Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para el género *Cryptotis* fue complicado estandarizar la amplificación de un fragmento del gen *sry* en ejemplares de sexo masculino debido a que se obtenían amplificaciones inespecíficas, o bien las amplificaciones que coincidían con el tamaño esperado eran de mala calidad. Para mejorar la calidad del fragmento amplificado fue necesario realizar cambios al protocolo original de PCR (Bryja y Konecný, 2003), se disminuyó la concentración final de $MgCl_2$ de 3.0 μM a 2.5 μM y se aumentó el número de ciclos de 30 a 35. Al realizar estas modificaciones se logró la amplificación del fragmento esperado, sin embargo, presentó un barrido a la altura de ~50 pb tanto en hembras como en machos y en el control negativo. Esto se puede observar en otros trabajos en los que también se ha utilizado el mismo juego de iniciadores específicos (Sánchez *et al.* 1996; Bullejos *et al.* 2000; Bryja y Konecný, 2003).

Probablemente el barrido sea producto de que los iniciadores específicos hayan formado dímeros, que son fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la suma de los oligonucleótidos y que se producen cuando un iniciador específico se extiende a continuación del otro (Sanbrook y Rusell, 2001). Este problema recae en el diseño de los iniciadores específicos. Según el software Primer 3.0 el juego de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *sry* en musarañas del género *Cryptotis* no cumple con todas las reglas de diseño ya que el oligonucleótido R' presenta una temperatura de alineamiento baja de 55 ° C y el oligonucleótido F' muestra autocomplementaridad en el extremo 3', lo que favorece que los iniciadores específicos formen dímeros.

Tanto para el género *Megasorex* como para *Sorex* fue fácil estandarizar la amplificación de un fragmento del gen *sry* en machos. Para el género *Sorex* la única modificación al protocolo original de PCR de Matsubara *et al.* (2001) fue la elevación de la temperatura de alineamiento de 60 ° C a 68 ° C para eliminar las amplificaciones inespecíficas, mientras que para el género *Megasorex* donde se utilizó el protocolo de Bryja y Konecný (2003) fue necesario aumentar la

concentración final de $MgCl_2$ de 2.5 μM a 3.0 μM y la temperatura de alineamiento de 50 ° C a 62 ° C, logrando mejorar la calidad del amplificado y eliminar las amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, para amplificar el fragmento esperado en los tres géneros de musarañas fue necesario utilizar tres juegos de iniciadores específicos, uno por género.

Alineamiento de primers con secuencia blanco

El primer juego de oligonucleótidos que se utilizó fue el diseñado por Matsubara *et al.* (2001) para la musaraña *Sorex unguiculatus* y fue probado en 5 especies del mismo género. En *S. saussurei* este juego de iniciadores específicos reconoció al 100 % la secuencia de nucleótidos debido a que éstas son idénticas entre las dos especies de musarañas, lo que favoreció la amplificación del fragmento esperado de 155 pares de bases. Sin embargo, en la región reconocida por el oligo F' que va del nucleótido 13 al 23 hay 4 cambios con respecto a *M. gigas*, 3 con *C. mexicana* y 6 con *C. nelsoni*. En la región reconocida por el oligo R' que va del nucleótido 158 al 178 hay 2 cambios con respecto a *C. nelsoni* y ninguno con *M. gigas* y *C. mexicana*. Esto explica por qué se obtenían amplificaciones inespecíficas o de mala calidad en estas especies cuando se utilizaba el juego de iniciadores específicos de Matsubara *et al.* (2001).

El segundo juego de oligonucleótidos que se utilizó fue el diseñado para el ratón común por Sánchez *et al.* (1996) para el ratón común. Con respecto a *C. mexicana* y *C. nelsoni* no hay cambios en la secuencia de nucleótidos en la región reconocida por los iniciadores específicos que en el oligo F' abarca del nucleótido 1 al 22 y en el oligo R' del nucleótido 180 al 202 por lo que la amplificación del fragmento esperado de 202 pares de bases fue sencilla. Sin embargo no era del todo limpia ya que aparecía un barrido a la altura ~50 pb consecuencia de que los iniciadores específicos formaban dímeros, por lo que se decidió modificar el oligonucleótido F' para mejorar la amplificación.

El tercer juego de iniciadores específicos que se utilizó fue diseñado a partir de la secuencia del ratón común *Mus musculus* en el programa Primer 3.0. En comparación con *M. gigas* la secuencia de los oligonucleótidos es idéntica a la región que reconocen, por lo que la amplificación del fragmento esperado de 189 pares de bases fue sencilla. Con respecto a *C. mexicana* y *C. nelsoni* la secuencia del oligo F' que va del nucleótido 23 al 43 presenta 2 y 3 cambios respectivamente. La secuencia reconocida por el oligo R' que va del nucleótido 180 al 202 no presenta cambios. Las modificaciones realizadas en el iniciador específico F' para desaparecer el barrido fueron apropiadas, sin embargo, aparecieron amplificaciones inespecíficas que no se pudieron eliminar. Debido a que los resultados obtenidos no eran de la calidad esperada fue necesario purificar y secuenciar los fragmentos de ADN amplificados

Análisis de las secuencia de nucleótidos

Para cada especie se aisló y se secuenció en tres ejemplares de sexo masculino el fragmento de ADN esperado. No se observó variabilidad dentro de las especies y se obtuvo una secuencia única para cada especie. Esto coincide con lo encontrado en murciélagos por Bullejos *et al.* (2000), quien obtuvo una secuencia de nucleótidos idéntica en todos los fragmentos de ADN del gen *sry* aislados, encontrando que no había variación entre ejemplares de la misma especie.

Para especies del mismo género encontramos que había muy pocas diferencias en la secuencia de nucleótidos. Entre *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* se encontró una diferencia de 2.5 %. Similarmente, entre *Sorex saussurei* y *S. unguiculatus* la diferencia fue de 3.9 %. Estos resultados son superiores a los obtenidos en la comparación de fragmentos del gen *sry* en otros mamíferos. Entre murciélagos (*Eptesicus fuscus* y *E. serotinus*) la diferencia fue de 1.25 % (Bullejos *et al.* 2000); entre chimpancés (*Pan paniscus* y *P. troglodytes*) la diferencia fue del 0.6 % (Kühn *et al.* 2002); entre ratones (*Mus musculus*, *M. spretus* y *M. pahari*) las

diferencias fueron de 0.4 y 0.8 % (Tucker y Lundrigan, 1993); y finalmente, entre castores (*Castor fiber* y *C. canadensis*) no hubo diferencia en la secuencia del nucleótidos (Kühn *et al.* 2002).

A nivel de especies de distinto género encontramos que existe una mayor diferencia en la secuencia de nucleótidos. La mayor diferencia entre musarañas se encontró entre *S. saussurei* y *C. nelsoni* con 14.8 %. Estos resultados son menores a los reportados para el mismo gen en murciélagos (*Myotis myotis*, *Eptesicus fuscus* y *E. serotinus*) en los que la diferencia fue del 20 % (Bullejos *et al.* 2000) y roedores (*Castor fiber*, *C. canadensis* y *M. musculus*) con una diferencia del 21.6 % (Kühn *et al.* 2002). Entre musarañas la menor diferencia entre especies de diferente género fue entre *S. unguiculatus* y *M. gigas* del 8.4 %. Este resultado es mayor al reportado para murciélagos (*E. fuscus* y *Rousettus aegyptiacus*) con el 4.8 % de diferencia (Bullejos *et al.* 2000) y es menor al obtenido con roedores (*Rattus norvegicus* y *M. musculus*) con diferencia del 9.5 % (Kühn *et al.* 2002).

En la comparación de secuencias a nivel de especies de diferente orden encontramos que la musaraña (Orden Soricomorpha) con mayor número de cambios en la secuencia de nucleótidos con respecto al ratón común *M. musculus* (Orden Rodentia) es *C. nelsoni* con una diferencia del 27.7 %. El resto de las musarañas presentan un número de cambios muy similar. Este resultado es parecido al obtenido por Sánchez *et al.* (1996) para las musarañas (*Crocidura suaveolens* y *Neomys anomalus*) y el ratón común *M. musculus* donde existe una diferencia del 25.3 % en la secuencia de nucleótidos de un fragmento de gen *sry*. En ese mismo trabajo comparan a las musarañas con el humano *Homo sapiens* (Orden Primates) encontrando una diferencia del 13.9 % y con el erizo *Erinaceus algirus* (Orden Erinaceomorpha) del 15.8 %.

Exceptuando la comparación entre *C. mexicana* y *C. nelsoni* en los que el número de bases púricas que cambió en la secuencia es igual al número de bases pirimídicas, en el resto de las comparaciones encontramos que la mayor parte de las bases que no se comparten en la secuencia de nucleótidos son púricas. Este

resultado es igual al obtenido en la mayoría de las comparaciones realizadas por Sánchez *et al.* (1996), Bullejos *et al.* (2000), Kühn *et al.* (2002), Tucker y Lundrigan, (1993) y Foster *et al.* (1992). Sin embargo, existe un número pequeño de comparaciones donde las bases que cambiaron en su mayoría fueron pirimídicas (Bullejos *et al.* 2000; Kühn *et al.* 2002). Para conocer la relevancia de los cambios en la secuencia de nucleótidos se tradujeron las secuencias de las cinco musarañas y el ratón común y se compararon.

Análisis de la secuencia de aminoácidos

Para especies del mismo género existen muy pocas diferencias en la secuencia. Entre *Cryptotis mexicana* y *C. nelsoni* se encontró una diferencia de 1.9 % y entre *Sorex saussurei* y *S. unguiculatus* la diferencia fue de 5.9 %. Estos resultados son similares a los obtenidos entre los murciélagos *Eptesicus fuscus* y *E. serotinus* en los que la diferencia es del 3.8 % (Bullejos *et al.* 2000); entre los ratones *Mus musculus* y *M. spretus* la diferencia fue de 1.25 %, entre *M. musculus* y *M. pahari* fue de 2.5 %, y entre *M. spretus* y *M. pahari* no hubo diferencia en la secuencia de aminoácidos (Tucker y Lundrigan, 1993).

A nivel de especies de distinto género la mayor diferencia en la secuencia de aminoácidos fue entre *S. saussurei* y *C. mexicana* con 21.6 %. Este resultado es menor al reportado por Bullejos *et al.* (2000) entre los murciélagos *Eptesicus fuscus* y *Pteropus poliocephalus* con 28.3 % y mayor al reportado por Tucker y Lundrigan (1993) entre los ratones *Mus musculus*, *M. pahari* y *Rattus exulans* con 8.8 %. La menor diferencia entre musarañas de distinto género fue entre *C. nelsoni* y *M. gigas* con 9.8 %. Este resultado es mayor al reportado para murciélagos (*Myotis myotis* y *Eptesicus serotinus*) con el 3.8 % de diferencia (Bullejos *et al.* 2000) y es menor al obtenido con roedores (*Mastomys hildebrandtii* y *Stochomys longicaudatus*) con diferencia del 2.5 % (Tucker y Lundrigan, 1993).

En la comparación con secuencias de diferente orden, la musaraña (Orden Soricomorpha) con mayor número de cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto al ratón común *M. musculus* (Orden Rodentia) fue *S. saussurei* con 31.4 %. Este resultado es similar al obtenido por Sánchez *et al.* (1996) en la comparación entre 2 musarañas y el ratón común donde la diferencia fue del 34 %. Con respecto a la comparación entre musarañas, el humano (Orden Primates) y el erizo (Erinaceomorpha) la diferencia es del 17 % y 15.1 % respectivamente.

A pesar de las diferencias encontradas en la secuencia de nucleótidos, lo anterior comprueba que la caja HMG del gen *sry* es una región que se encuentra conservada a lo largo de todas las especies de mamíferos (Hacker *et al.* 1995). Sin embargo, esto no ocurre con todos los genes que están localizados en los cromosomas sexuales (Toder *et al.* 2000).

Conservación del ADN del cromosoma Y en mamíferos

Existen muchos genes en el cromosoma Y que tienen su homólogo en el cromosoma X, sin embargo, esto no es constante debido a que hay genes que están presentes en algunas especies y ausentes en otras, por ejemplo, sólo los primates tienen el gen *Rps4* mientras que el gen *Ube1* está presente en todos los euterios excepto en los primates (Toder *et al.* 2000; Mitchell *et al.* 1992). Otros genes pueden presentar varias copias tanto en los cromosomas sexuales como en los autosómicos, como es el caso de los genes *Zfy* y *Zfx* en ratones del género *Mus*, donde existen dos copias del gen *Zfy* en el cromosoma Y (*Zfy-1* y *Zfy-2*), una copia del gen *Zfx* en el cromosoma X y otra en el cromosoma 10 (*Zfa*; Tucker *et al.* 2003).

Además, en marsupiales y monotremas no existe región pseudoautosómica por lo que los genes *Zfy*, *Usp9y*, *Dby*, *Uty*, *Amel* y *Sts* que se encuentran en el cromosoma Y de los mamíferos placentados son autosómicos en estas especies

(Toder *et al.* 2000), al igual que sus homólogos del cromosoma X (Mitchell *et al.* 1992; Foster y Marshall 1993), por lo tanto, en estas especies el cromosoma Y determina la diferenciación de la gónada hacia testículo pero no controla el proceso (Marshall, 2002). Este hecho pone de manifiesto la evolución de los cromosomas sexuales a partir de un par autosómico ancestral que adquirió las funciones de determinar el sexo como consecuencia de la constante degradación del cromosoma Y (Toder *et al.* 2000; Marshall, 2002; Foster *et al.* 1992).

A diferencia de las pruebas que utilizan los genes que se encuentran exclusivamente en el cromosoma Y para determinar el sexo, donde la presencia del gen equivale a un macho y la ausencia equivale a una hembra (Pilgrim *et al.* 2004), las pruebas que utilizan los genes que se encuentran en la región pseudoautosómica, identifican con enzimas de restricción secuencias que están presentes en un gen y no en el otro, por lo tanto, los fragmentos resultantes presentan polimorfismo con lo que se puede distinguir entre hembras y machos (Beckwitt *et al.* 2002; Ortega *et al.* 2004; Maldonado, 2006). Sin embargo, debido a la evolución tan rápida que han sufrido los cromosomas sexuales los sitios que reconocen las enzimas se han perdido en muchas especies (Pamilo y Bianchi, 1993; Tucker *et al.* 2003). Por lo tanto, la determinación del sexo utilizando la amplificación de fragmentos exclusivos del cromosoma Y ofrece grandes ventajas sobre las pruebas que utilizan marcadores moleculares que se encuentran en la región pseudoautosómica.

Por lo tanto, este estudio demostró que se pueden utilizar marcadores moleculares de este tipo como parte de las técnicas no invasivas en el estudio, manejo y conservación de la fauna silvestre. En particular en nuestro país se debe promover este enfoque pues la literatura no muestra resultados en esta línea de investigación.

CONCLUSIONES

Se logró la amplificación del marcador molecular *sry* en ejemplares de sexo masculino de tres géneros de musarañas *Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex* a partir de sus tejidos con lo que se pudo identificar el sexo de todos los ejemplares y se confirmó la información obtenida en campo. Así mismo, la secuenciación del fragmento de ADN del gen *sry* permitió confirmar la obtención del fragmento de interés.

RECOMENDACIONES

El siguiente paso consistirá en determinar molecularmente el sexo de ejemplares cuyo sexo no se ha determinado con anterioridad, utilizando restos de piel o tejido producto del canibalismo en musarañas, y a partir de restos óseos contenidos en regurgitaciones y contenidos estomacales de aves rapaces. Además será necesario ampliar los estudios a otras especies de musarañas dentro de los géneros *Cryptotis* y *Sorex*, y al género *Notiosorex*

LITERATURA CITADA

- ARMSTRONG, D. M. Y J. K. JONES. 1972. *Megasorex gigas*. Mammalian Species 16: 1 - 2.
- BECKWITT, R., J. SHEA, D. OSBORNE, S. KRUEGER, Y W. BARKLOW. 2002. A PCR-based method for sex identification in *Hippopotamus amphibious*. African Zoology 37(2): 127-130.
- BRADLEY, B. J., K. E. CHAMBERS, Y L. VIGILANT. 2001. Accurate DNA based sex identification of apes using noninvasive samples. Conservation Genetics 2: 179 - 181.
- BRYJA, J. Y A. KONECNY. 2003. Fast sex identification in mammals using PCR amplification of the Sry gene. Folia Zoology 52 (3): 269 - 274.
- BULLEJOS, M., A. SÁNCHEZ, M. BURGOS, R. JIMÉNEZ, Y R. DÍAZ DE LA GUARDIA. 2000. The SRY gene HMG-box in micro and megabats. Cytogenetics and Cell Genetics 88: 30 - 34.
- CALZADA, L. R, M. L. RUIZ, M. GARCÍA, N. ALTAMIRANO, Y V. CASTILLO. 2000. Diferenciación Sexual Normal. Acta Pediátrica de México 21 (2): 34 - 45.
- CASTRO-ARELLANO, I. 2005. *Sorex saussurei* Merriam 1892. pp. 150-151 En: Los Mamíferos Silvestres de México. Ceballos, G. y G. Oliva (Eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.
- CASTRO-ARELLANO, I. Y C. CEBALLOS. 2005. *Cryptotis mexicana* (Coues, 1877). pp. 133 En: Los Mamíferos Silvestres de México. Ceballos, G. y G. Oliva (Eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.
- CEBALLOS, G. Y A. MIRANDA. 2000. Guía de campo de los mamíferos de la Costa de Jalisco México. Fundación Ecológica Cuixmala, A. C., Instituto de Biología/Instituto de Ecología, UNAM, México, D. F.
- CEBALLOS, G. Y J. ARROYO-CABRALES. 2005. *Cryptotis nelsoni* (Merriam, 1895). pp. 134 - 135 En: Los Mamíferos Silvestres de México. Ceballos, G. y G. Oliva (Eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México D. F.

- CEBALLOS, G Y C. GALINDO. 1984. Mamíferos silvestres de la Cuenca de México. Limusa, México, D. F.
- CHOATE, J. R. 1970. Systematic and zoogeography of Middle American shrews of the genus *Cryptotis*. University of Kansas Publications Museum of Natural History 19: 195-317.
- CHOATE, J. R. 1973. *Cryptotis mexicana*. Mammalian Species 12: 1 - 3.
- CHURCHFIELD, S. 1990. The Natural History of Shrews. Comstock Publishing Associates and Cornell University Press, New York.
- CROWCROFT, P. 1964. Note on the sexual maturation of shrews (*Sorex araneus* Linnaeus, 1758) in captivity. Acta Theologica 8 (5): 89 - 93.
- DALLAS, J. F., D. N. CARSS, F. MARSHALL, K. P. KOEPFLI, H. KRUIK, S. B PIERTNEY, Y P. J. BACON. 2000. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR of spraints. Conservation Genetics 1: 181 - 183.
- FOSTER, J. W., F. E. BRENNAN, G. K. HAMPIKIAN, P. N. GOODFELLOW, A. H. SINCLAIR, R. LOVELL-BADGE, L. SELWOOD, M. B. RENFREE, D, W. COOPER, Y J. A. MARSHALL-GRAVES. 1992. Evolution of the sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. Nature 359: 351 – 533.
- FOSTER, J. W. Y J. A. MARSHALL. 1993. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: Implications for the evolution of the Mammalian testis-determining gene. Proceedings of Natural Academy of Science 91: 1927 – 1931.
- GARCÍA-MEUNIER, P., L. PASTOUT, G. CHEVALIER, Y C. GUINET. 2001. Détermination rapide du sexe chez des embryons da ragondin *Myocastor coypus*, des les stades de gestation. Academy de Sciences de Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 324: 321 - 325.
- GOWANS, S., M. L. DALEBOUT, S. K. HOOKER, H. WHITEHEAD. 2000. Reability of photographic and molecular techniques for sexing northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*). Canadian Journal of Zoology 78: 1224 - 1229.
- GRIFFITHS, 2000. Sex identification using DNA markers. pp. 295 - 321 En: Molecular Methods in Ecology. Baker, A. J. (Ed). Blackwell Science, Oxford.
- GUBBAY, J., J. COLLIGNON, P. KOOPMAN, B. CAPEL, A. ECONOMOU, A. MÜNSTERBERG, N. VIVIAN, P. GOODFELLOW, Y R. LOVELL-BADGE. 1990. A gene mapping to the

sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245 - 250.

GUEVARA, L. 2005. Comparación morfológica y morfométrica entre las musarañas *Cryptotis nelsoni* y *C. mexicana* (Mammalia: Soricomorpha) de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz.

HACKER, A., B. CAPEL, P. GOODFELLOW, Y R. LOVELL-BADGE. 1995. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603 - 1614.

HALL, E. R. 1981. *The Mammals of North America*. Wiley Interscience, New York.

HAQQ, C. M. Y P. K. DONAHOE. 1998. Regulation of Sexual Dimorphism in Mammals. *Physiological Reviews* 78 (1): 1 - 33.

KÜHN, R., G. SCHWAB, W. SCHRÖDER, Y O. ROTTMANN. 2002. Molecular sex diagnosis in Castoridae. *Zoo Biology* 21: 305 - 308.

MALDONADO, J. E. 2006. Monitoreo de especies raras y amenazadas de mamíferos utilizando análisis genéticos y muestreos no invasivos. pp. 37 - 44. En: *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. Vázquez-Domínguez, E. y D. J. Hafner (Eds). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No. 32

MARSHALL, J. A. 2002. Evolution of the testis-determining gene – the rise and fall of *SRY*. pp. 86 - 101. En: *The Genetics and Biology of the Sex Determination*. Chadwick, D. and J. Goode (Eds). Chichester, West Sussex; J. Wiley, New York.

MATSUBARA, K., Y. ISHIBASHI, S. OHDACHI, Y Y. MATSUDA. 2001. A new primer set for sex identification in the genus *Sorex* (Soricidae, Insectivora). *Molecular Ecology Notes* 1: 241 - 242.

MENDOZA, A. Y G. CEBALLOS. 2005 *Megasorex gigas* (Merriam, 1897). pp. 138 - 140. En: *Los mamíferos silvestres de México*. Ceballos, G. y G. Oliva (Eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México D. F.

MERRIAM, C. H. 1897. Descriptions of five new mammals collected by E. W. Nelson in the states of Colima and Jalisco, México. *Proceeding of the Biological Society of Washington* 11: 227 - 230.

- MITCHELL, M. J., D. R. WOODS, S. A. WILCOX, J. A. MARSHALL, Y C. E. BISHOP. 1992. Marsupial Y chromosome encodes a homologue of the mouse Y-linked candidate spermatogenesis gene Ube1y. *Nature* 359: 528 - 531.
- MONTIEL, A. 2006. Registro de musarañas (Mammalia: Soricomorpha) de bosques templados de Colima, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- ORTEGA, J., M. FRANCO, B. A. ADAMS, J. RALLS, Y J. E. MALDONADO. 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin Kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics* 5: 715 - 718.
- PAMILO, P. Y N. O. BIANCHI. 1993. Evolution of the *Zfx* and *Zfy* Genes: Rates and Interdependence between the Genes. *Molecular Biology and Evolution* 10 (2): 271 - 281.
- PILGRIM, K. L., K. S. MCKELVEY, A. E. RIDDLE, Y M. K. SCHWARTZ. 2004. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes* 4 (1): 5 - 6.
- POMP, D., B. A. GOOD, R. D. GEISERT, C. J. CORBIN, Y A. J. CONLEY. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects in diameter of day-10 or 11 pig embryos. *Journal of Animal Science* 73: 1408-1415
- PUCEK, Z. 1960. Sexual maturation and variability of the reproductive system in young shrews (*Sorex* L.) in the first calendar year of life. *Acta Theriologica* 3 (12): 269 - 295.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., J. ARROYO-CABRALES, Y A. CASTRO-CAMPILLO. 2005. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zoológica Mexicana* 21 (1): 21 - 82.
- REID, F. A. 1997. A field guide to mammals of Central America and Southwest Mexico. Oxford University Press, New York.
- SANBROOK, J. Y D. W. RUSSELL. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury.
- SANCHEZ, A., M. BULLEJOS, M. BURGOS, C. HERA, R. JIMÉNEZ, Y R. DÍAZ DE LA GUARDIA. 1996. High sequence identity between the SRY HMG box from humans and insectivores. *Mammalian Genoma* 7: 536 - 538.

- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. 2002. NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo. pp. 2 - 60.
- SHAW, C. L., P. J. WILSON, Y B. N. WHITE. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy* 84 (1): 123 - 128.
- SMITH, M. F., Y J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data of the akodontine tribe. *Biological Journal of Linnean Society* 50: 149 - 177.
- TABERLET, P., J. J. CAMARRA, S, GRIFFIN, E. UHRES, O. HANOTTE, L. P. WAITS, C. DUBOIS-PAGANON, T. BURKE, Y J. BOUVET. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869 - 876.
- TABERLET, P., L. P. WAITS, Y G. LUIKART. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14 (8): 323 - 327.
- TODER, R., M. J. WAKEFIELD, Y J. A. M. GRAVES. 2000. The minimal mammalian Y chromosome-the marsupial Y as a model system. *Cytogenetics and Cell Genetics* 91: 285 - 292.
- TUCKER, P. K, Y B. L. LUNDRIGAN. 1993. Rapid evolution of the sex determining locus In Old mice and rats. *Nature* 364: 715 -717.
- TUCKER, P. K., R. M. ADKINS, J. S. REST. 2003. Differential Rates of Evolution for the ZFY-Related Zinc Finger Genes, *Zfy*, *Zfx* and *Zfa* in the Mouse Genus *Mus*. *Molecular Biology and Evolution* 20 (6) : 999 - 1005.
- VAUGHAN, T. A., J. M. RYAN, Y N. J. CZAPLEWSKI. 2000. *Mammalogy*. Brooks/Cole and Thomson Learning, Philadelphia.
- VILLA, B. Y F. A. CERVANTES. 2003. *Los mamíferos de México*. Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V. y el Instituto de Biología, UNAM, México, D. F.
- WOODMAN, N Y R, M. TIMM. 2000. Taxonomy and evolutionary relationship pf Phillip's smalled-erared shrew, *Cryptotis phillipsii* (Schalbach, 1966), from Oaxaca, México (Mammalia: Insectivora: Soricidae). *Proceeding of Biological Society of the Washington* 113: 339 -355.

APÉNDICE 1

Ejemplares de musarañas (Mammalia: Soricomorpha) utilizados para la identificación molecular del sexo por medio de la amplificación de un fragmento de ADN de gen *sry*. CATCO= número de catálogo cronológico de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA); PRE = preservación; P/E = Piel y esqueleto; S/E = Sólo esqueleto; T = tejidos tst = medida (mm) de testículos, largo x ancho; Mpio = Municipio; ♀ = hembra; ♂ = macho.

CATCO	Especie	PRE	Sexo	Localidad	Fecha de captura
41946	<i>Cryptotis mexicana</i>	S/E, T	♂ (tst. 5x1)	VERACRUZ: El Sumidero, Mpio. Acultzingo. 2360 m 18°41'19'' N, 97°20'00'' W	20 Septiembre 2003
41951	<i>Cryptotis mexicana</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: El Sumidero, Mpio. Acultzingo. 2360 m 18°41'19'' N, 97°20'00'' W	20 Septiembre 2003
41953	<i>Cryptotis mexicana</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: El Sumidero, Mpio. Acultzingo. 2360 m 18°41'19'' N, 97°20'00'' W	20 Septiembre 2003
41954	<i>Cryptotis mexicana</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: El Sumidero, Mpio. Acultzingo. 2360 m 18°41'19'' N, 97°20'00'' W	20 Septiembre 2003
42738	<i>Cryptotis mexicana</i>	P/E, T	♂	VERACRUZ: 0,5 km S Puerto del Aire, Mpio. Acultzingo. 18°41'22'' N, 97°20'16'' W	5 Enero 2005

42741	<i>Cryptotis mexicana</i>	P/E, T	♂ (tst. 7x2)	VERACRUZ: 5 km S Puerto del Aire, Mpio. Acultzingo. 18°41'19'' N, 97°20'00'' W	30 Enero 2005
41956	<i>Cryptotis nelsoni</i>	P/E, T	♂ (tst. 5x1)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla. 1500 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	1 Noviembre 2003
41969	<i>Cryptotis nelsoni</i>	P/E, T	♂ (tst. 7x2)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11.5 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla. 1500 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	1 Noviembre 2003
41970	<i>Cryptotis nelsoni</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11.5 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla. 1500 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	1 Noviembre 2003
41972	<i>Cryptotis nelsoni</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla. 1500 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	1 Noviembre 2003
41973	<i>Cryptotis nelsoni</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11.5 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla. 1500 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	1 Noviembre 2003
42000	<i>Cryptotis nelsoni</i>	S/E, T	♂ (tst. 4x3)	VERACRUZ: Volcán San Martín Tuxtla. Ejido Campeche, 11.5 Km N, San Andrés Tuxtla, Mpio. San Andrés Tuxtla.	20 Marzo 2004

				1300 m 18°32'52'' N, 95°11'30'' W	
43096	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♀	COLIMA: Rancho El Guayabal, 16.6 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1361 m 19°27'52.2'' N, 103°41'46'' W	15 Noviembre 2004
43098	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♀	COLIMA: Rancho El Guayabal, 16.5 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1361 m 19°28'00'' N, 103°41'47'' W	5 Diciembre 2004
43097	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♀	COLIMA: Rancho El Guayabal, 16.5 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1361 m 19°28'00'' N, 103°41'47'' W	5 Diciembre 2005
43092	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♂	COLIMA: Rancho La Mora, 16.73 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1290 m 19°28'21.1'' N, 103°42'12.1'' W	31 Enero 2005
43812	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♂	COLIMA: Rancho La Mora, 16.73 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1240 m 19°28'20.5'' N, 103°42'17.5'' W	23 Junio 2006
43813	<i>Megasorex gigas</i>	P/E, T	♂	COLIMA: Rancho La Mora 16.73 km NNE Comala, Mpio. Comala. 1240 m 19°28'20.5'' N, 103°42'17.5'' W	24 Junio 2006
43104	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♀ (Gestante)	COLIMA: 0.935 km NE El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2327 m 19°27'14.4'' N, 103°56'29'' W	20 Junio 2005
43105	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♂ (tst. 6x4)	COLIMA: 0.931 km NE El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2314 m 19°27'14.4'' N,	20 Junio 2005

				103°56'25'' W	
43106	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♂ (tst. 7x4)	COLIMA: 0.931 km NE El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2314 m 19°27'14.4'' N, 103°56'25'' W	22 Junio 2005
43111	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♂ (tst. 7x4.5)	COLIMA: 0.925 km NE El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2321 m 19°27'15'' N, 103°56'26'' W	22 Junio 2005
43112	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♀ (Lactante)	COLIMA: 0.92 km NE El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2320 m 19°27'13.4'' N, 103°56'28.1'' W	19 Junio 2005
43120	<i>Sorex saussurei</i>	P/E, T	♀ (Gestante)	COLIMA: 0.8 km WNW El Terrero, Mpio. Minatitlan. 2135 m 19°26'28.7'' N, 103°57'32'' W	20 Junio 2005

APÉNDICE 2.

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

- ❖ Pesar la agarosa de acuerdo a la concentración deseada (1% para extracción de ADN; 1.5 % y 2% para PCR)
- ❖ Agregar buffer TBE ó TAE 1X
- ❖ Calentar en horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente (aproximadamente 1 min)
- ❖ Agregar 1 gota de bromuro de etidio para una concentración final de 10 µg/ml
- ❖ Verter la mezcla en el molde del gel y acomodar el peine
- ❖ Dejar solidificar el gel de 20 a 25 minutos
- ❖ Colocar el gel en la cámara de electroforesis y llenarla con buffer TAE ó TBE 1X
- ❖ Colocar las muestras mezcladas con buffer de carga en cada pozo
- ❖ Conectar los cables a la cámara de electroforesis y a la fuente de poder
- ❖ Ajustar el voltaje
- ❖ Correr de 1 a 2 horas

Cantidad de reactivos para preparar geles de agarosa

Agarosa al 1 %		
	Agarosa (g)	Buffer (ml)
35 ml	0.35	35
Agarosa al 1.5 %		
35 ml	0.53	35
40 ml	0.60	40
Agarosa 2 %		
35 ml	70	35
40 ml	80	40

Preparación de buffers y soluciones stock

- ❖ EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 M (pH 8)
Disolver 18.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua
Ajustar a pH 8.0 con 10 N NaOH

- ❖ NaOH 10 N
Disolver 8 g de NaOH en 20 ml de agua

- ❖ TBE (Tris-borato-EDTA)
Solución stock 10X, 1 litro:
108 g de Tris base (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