



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**IDENTIFICACIÓN DE FELINOS DE MÉXICO UTILIZANDO ADN MITOCONDRIAL
DE MUESTRAS FECALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

PRESENTA:

ANAHÍ GUADALUPE MEJÍA PUENTE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ, FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**IDENTIFICACIÓN DE FELINOS DE MÉXICO UTILIZANDO ADN MITOCONDRIAL
DE MUESTRAS FECALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

PRESENTA:

ANAHÍ GUADALUPE MEJÍA PUENTE

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: (GRADO, NOMBRE COMPLETO)
DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ, FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

MÉXICO, D.F. MES, 2013



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** de la alumna **MEJÍA PUENTE ANAHÍ GUADALUPE** con número de cuenta **508019627** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE FELINOS DE MÉXICO UTILIZANDO ADN MITOCONDRIAL DE MUESTRAS FECALES"**, realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA**:

Presidente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Vocal: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Secretario: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Suplente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente: DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de mayo de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto, a través de la beca para estudios de Maestría No. 215401. A la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el financiamiento otorgado al proyecto “Código de barras de Mamíferos de México” del cual forma parte el presente trabajo.

A los miembros del Comité Tutoral: Dr. Fernando Cervantes por aceptar ser mi tutor y brindarme la oportunidad de trabajar con mis amados felinos; Dra. Ella Vázquez por todo el apoyo brindado, hoy y siempre, ¡gracias!; Dra. Dulce Brousset por su calidez y disponibilidad permanente

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Dios.....

A mi padre por nuevamente apoyarme en esta etapa, de la mejor manera que le fue posible

A Efra por estar conmigo hombro con hombro en cada paso de este camino, por ser y permitirme ser esa persona especial.

*A Jon por convertirte en amigo, confidente y cómplice, pero sobre todo por creer en mi.
Gracias por llegar a mi vida.*

A Go por estar en el inicio y seguir acompañándome en el final desde donde quiera que estes. Te extraño.

A todas aquellas personas que me ayudaron desinteresadamente y sin las cuales no me habría sido posible realizar este proyecto: Dr. Jacinto Bañuelos, Dra. Ella Vázquez, Dr. Luis Jave, M. en C. Laura Márquez, Dra. Patricia Castro y Dra. Anne Santerre.

A todos los compañeros y personal de la UNAM que me apoyaron en diversos aspectos, desde la enseñanza de una técnica de laboratorio hasta la expresión de una palabra de aliento: Biól. Daya Navarrete, Biól. Sunny García, Biól. Arturo Mendoza, M. en C. Mayra Gómez, M. en C. Anaid Mora, M. en C. Salvador Ramírez, M. en C. Alfredo Barrera, Dr. Luis Juárez, Dr. Moisés Martínez, Susana Hernández, Don José y Rocío González.

*A todas las personas que colaboraron en la difícil tarea de obtención de muestras: M.V.Z. Fabiola Carbajal, M.V.Z. Daniela Ramos, Dr. Juan Carlos López, M. en C. Jérica Arcangeli, M. en C. Paula Pellicer, M. en C. Julieta Vargas, M. en C. Yolanda Hortelano.
Con agradecimiento especial para: M.V.Z Andrés González, M.V.Z. Fernando Cortés, M.V.Z Daniel Contreras, M.V.Z Javier Ojeda y M.V.Z. Jorge Yáñez.*

A los miembros de mi jurado: Dra. Livia León por el tiempo invertido en la revisión del manuscrito final; Dr. Martín García por sus valiosos comentarios y el apoyo otorgado para la obtención del grado académico; Dr. Daniel Piñero por toda la atención, ayuda y orientación prestada, muchas gracias.

*Para la persona por la que más amor y
agradecimiento siento.....**MI MADRE***

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Felinos en México	3
1.2 Uso de muestras fecales como método no invasivo	8
1.3 Identificación genética de especies	9
2. OBJETIVOS	14
3. HIPÓTESIS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Obtención de muestras	14
4.2 Extracción de ADN	16
4.3 Obtención de secuencias nucleotídicas	17
4.4 Análisis de secuencias nucleotídicas	19
4.5 Identificación de patrones de restricción diagnósticos y diseño de iniciadores específicos para felinos	20
4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos para felinos: estandarización y evaluación	23
4.7 PCR-RFLP	24
4.8 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos	24
5. RESULTADOS	
5.1 Obtención de secuencias nucleotídicas	
5.1.1 Citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I (COI)	25
5.1.2 Citocromo <i>b</i> (Cit <i>b</i>)	26
5.2 Análisis de secuencias nucleotídicas	
5.2.1 Citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I (COI)	26
5.2.2 Citocromo <i>b</i> (Cit <i>b</i>)	29
5.3 Identificación de patrones de restricción diagnósticos y diseño de iniciadores específicos para felinos	32

5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos para felinos: estandarización y evaluación	35
5.5 PCR-RFLP	
5.5.1 Enzima BtsCI	37
5.5.2 Enzima Tsp509I	39
5.6 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos	40
6. DISCUSIÓN	41
6.1 Análisis de secuencias de los genes citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I y citocromo <i>b</i>	42
6.2 Selección y diseño del método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP	46
6.3 Estandarización del método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP	49
6.4 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos	52
7. CONCLUSIONES	54
8. LITERATURA CITADA	54
APÉNDICE 1. Extracción de ADN de tejido animal con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico	68
APÉNDICE 2. Análisis pareado de distancias genéticas entre secuencias del gen citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I (550 pares de bases)	69
APÉNDICE 3. Análisis pareado de distancias genéticas entre secuencias del gen citocromo <i>b</i> (1140 pares de bases)	70
APÉNDICE 4. Haplotipos de las secuencias del gen completo de citocromo <i>b</i> para las siete especies de felinos	71

IDENTIFICACIÓN DE FELINOS DE MÉXICO UTILIZANDO ADN MITOCONDRIAL DE MUESTRAS FECALES

Anahí Guadalupe Mejía Puente

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F.

RESUMEN

En México se encuentran seis de las 40 especies pertenecientes a la familia Felidae: *Panthera onca*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Lynx rufus* y *Puma concolor*. Estas especies desempeñan un papel ecológico primordial en los ecosistemas en que habitan, sin embargo, debido mayormente a actividades antropogénicas, sus densidades poblacionales en el país han disminuido. Por este motivo, identificar la presencia de estos felinos en un área determinada, así como obtener información básica sobre aspectos genéticos y ecológicos, resulta de suma importancia para el manejo y conservación de sus poblaciones. Dados los hábitos secretivos que presentan los individuos de estas especies, su identificación suele realizarse a través de métodos indirectos entre los que se encuentra el análisis de ADN fecal. Para esto se pueden emplear diversas técnicas como la amplificación de un fragmento de ADN para su posterior digestión con enzimas de restricción (conocida como PCR-RFLP). En el presente trabajo se desarrolló un protocolo para identificar a las especies de felinos de México, utilizando ADN mitocondrial extraído de muestras fecales y marcadores RFLP. Se obtuvieron y analizaron las secuencias de los genes citocromo oxidasa *c* subunidad I y citocromo *b*, utilizándose estas últimas para el diseño y estandarización del método de identificación. Lo anterior se debió a que sólo en este gen se obtuvieron secuencias para todas las especies de felinos. Se encontró que las enzimas BtsCI y Tsp509I generaban un patrón de restricción que permitía diferenciar a cada especie felina, en una región pequeña del gen (<300 pb). Se diseñaron y sintetizaron iniciadores que amplificaran un fragmento de dicha región, pero sólo a partir de ADN de las especies de felinos bajo estudio y no de otras especies de mamíferos simpátricas. Finalmente, se estandarizaron las condiciones de amplificación y restricción en ADN de tejido y posteriormente en ADN fecal, lográndose diferenciar exitosamente a las especies felinas de México. El método aquí desarrollado se presenta como una de las alternativas más prometedoras para la identificación de estas

especies y a su vez, ofrece la oportunidad de profundizar en el conocimiento de la ecología y genética de estos felinos (sobre todo de aquellos menos estudiados como son *P. yagouaroundi* y *L. wiedii*) facilitando así, la generación de estrategias de conservación para los mismos.

ABSTRACT

The Family Felidae has 40 species, six of which are present in Mexico: *Panthera onca*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Lynx rufus* and *Puma concolor*. These species perform an ecological role of central importance in the ecosystems they inhabit. However, their population densities in Mexico have decreased, mainly due to human activities. For this reason, identifying the presence of these felids in a given area and obtaining basic information regarding their genetic and ecological aspects, is of extreme importance for the management and conservation of their populations. Because of their secretive habits, indirect methods, like fecal DNA analysis, are commonly used to identify these cats. One of the techniques used to analyse DNA extracted from feces, is the Polymerase Chain Reaction in combination with Restriction Fragment Length Polymorphism markers (known as PCR-RFLP), which consists on the amplification of a DNA fragment for subsequent digestion with restriction endonucleases. In this study, a method was developed to identify Mexican felids species via the analysis of fecal mitochondrial DNA with the PCR-RFLP technique. Sequences of cytochrome oxidase *c* subunit I (COI) and cytochrome *b* (*cyt b*) genes were obtained and analysed, using *cyt b* to design and optimize the identification method. This latter was because adequate sequences for all the species were obtained only for *cyt b*. Two restriction enzymes, BtsCI and Tsp509I, were found to generate a distinctive digestion pattern in a short region of the gene (<300 bp) with which it was able to discriminate each felid species. Primers were design in order to amplify a fragment from this region, but only from feline DNA and not from any other sympatric mammal species. Conditions of amplification and digestion were optimized using tissue and fecal samples, allowing a successful identification of the felid species of Mexico. The method presented here is one of the most promising alternatives to identify these species and, at the same time, offers the unique opportunity to perform ecologic and genetic resarch on these felines, specially with those for which there is limited information (like *P. yagouaroundi* and *L. wiedii*), which can contribute and ease the creation of conservation strategies for these species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Felinos en México

La familia Felidae agrupa a 40 especies de felinos, de las cuales seis se encuentran en México (Wilson y Reeder, 2005; Ramírez *et al.*, 2008): 1. *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), 2. *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire 1803), 3. *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758), 4. *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821), 5. *Lynx rufus* (Schreber, 1777) y 6. *Puma concolor* (Linnaeus, 1771).

Panthera onca es llamado comúnmente jaguar o tigre americano y es el único representante de su género en América. Es el felino más grande del continente (36-135 kg), sus patas son cortas y robustas y sus orejas pequeñas y redondeadas. Su piel presenta manchas negras llamadas rosetas por la forma irregular de sus bordes, las cuales pueden mostrar una o más manchas pequeñas en el centro; las orejas son negras en la parte trasera con una pequeña mancha blanca en el centro. La coloración de fondo varía de amarillo pálido a café rojizo y cambia a blanco en los carrillos, pecho y parte interna de las extremidades. El melanismo se presenta comúnmente en algunas regiones de América del Sur, pero en México no existen registros confirmados. Los ejemplares albinos se han observado muy raramente. El jaguar suele ser de hábitos tanto nocturnos como diurnos, es solitario, terrestre, hábil nadador y trepa con facilidad a los árboles. Se le considera un depredador oportunista ya que su alimentación básicamente depende de la densidad y disponibilidad de las presas, las cuales pueden ser invertebrados, peces, reptiles, aves y mamíferos. Sin embargo, cazan preferentemente mamíferos mayores de un kilogramo de peso, aunque algunas aves y reptiles también son componentes importantes de su dieta (Seymour, 1989; Eizirik *et al.*, 2001; Sunquist y Sunquist, 2002; Chávez *et al.*, 2005). Tewes y Schmidly (1987), mencionan que sólo se tiene un registro de jaguares consumiendo frutos (aguacates caídos en el suelo).

Puma yagouaroundi es llamado comúnmente leoncillo o jaguarundi. Es de tamaño pequeño dentro de los félidos (3-8 kg), tiene cuerpo delgado y alargado, cabeza aplanada, orejas y patas relativamente cortas y cola larga. Su piel no presenta manchas o rayas a ninguna edad y su color es uniforme con dos fases básicas: gris y café, con una variedad de tonalidades. Diferentes coloraciones pueden ser encontradas en una misma población (Tewes y Schmidly, 1987; De Oliveira, 1998a; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda,

2005a). Konecny (1989) menciona que el color del pelaje no presenta relación con la edad o con el sexo. Es un cazador principalmente diurno, terrestre (también es un buen trepador pero sólo sube a los árboles ocasionalmente) y solitario, sin embargo, en cautiverio parecen ser gregarios, por lo menos entre los miembros de una familia. Su alimentación incluye invertebrados, reptiles, aves y pequeños mamíferos. Presenta un amplio repertorio de vocalizaciones, registrándose al menos 13 llamados distintos y también gorgojea casi exactamente como lo hacen las aves (De Oliveira, 1998a; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005a).

Leopardus pardalis (del latín *pardus*=pantera o leopardo y del sufijo latín *alis*=relacionado a) es llamado comúnmente ocelote. Es de tamaño mediano (8-15 kg), cola relativamente corta (que apenas si toca el suelo) y orejas redondeadas y erectas. El color general del cuerpo es gris claro y blanco grisáceo en la parte interior de las extremidades. Su piel presenta manchas negras, que en los costados toman la forma de rosetas alargadas con el interior de color café y se dirigen en sentido oblicuo; las orejas son negras en la parte trasera con una gran mancha blanca. Se distingue de *L. wiedii* por su mayor tamaño, cola más corta y distinto patrón de manchas. Es un cazador principalmente terrestre (aunque también es un buen trepador y descansa en los árboles durante el día), activo tanto en el día como en la noche y solitario. Su alimentación consiste principalmente de mamíferos pequeños y medianos como ratones, ratas y conejos, pero también puede alimentarse de aves, peces, serpientes, lagartijas e insectos. Incluso puede capturar presas más grandes como venados juveniles. Puede ser depredado por los grandes felinos, serpientes y cocodrilos (Murray y Gardner, 1997; De Villa Meza *et al.*, 2002; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005b).

Leopardus wiedii (el nombre *wiedii* fue dado en honor al naturalista alemán Prince Maximilian zu Wied, de cuya colección fue descrita la especie) es llamado comúnmente tigrillo o margay. Es de tamaño pequeño (3-8 kg), cabeza pequeña y redondeada, patas y cola relativamente largas y ojos grandes. El color del cuerpo va de café amarillento hasta café claro en el dorso y a los lados, mientras que el pecho y la parte interna de las extremidades son de color blanco. Su piel presenta manchas de color negro o café oscuro, irregulares, sin formar rosetas; las orejas son negras en la parte trasera con una mancha blanca en el centro. Se distingue de *L. pardalis* por su menor tamaño, cabeza más pequeña, cola más larga, manchas compactas y las marcas del cuello continuas. Es un animal

solitario, principalmente nocturno y el más arborícola de los felinos que habitan en México, ya que duerme, descansa y caza principalmente en los árboles (aunque también caza en tierra). Su alimentación consiste principalmente de mamíferos arborícolas y aves, pero también incluye anfibios y reptiles. Presenta al menos ocho vocalizaciones distintas (De Oliveira, 1998b; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005c).

Lynx rufus (del latín *rufus*=rojo) es llamado comúnmente lince, lince rojizo o gato montés. Es de tamaño mediano, cuerpo robusto, patas largas, cabeza pequeña, orejas grandes y puntiagudas y cola muy corta (18-22% de la longitud de su cuerpo y cabeza). El color de su pelaje puede ir de amarillo pálido, rojizo o café a un gris fuerte, observándose manchas o rayas de color negro que le dan la apariencia de gato moteado; mientras que en la parte ventral y en las extremidades, presenta tonos claros y blanco con manchas oscuras. En la punta de las orejas presenta un mechón de pelo negro, que puede estar ausente durante la época de muda. Es el único representante de su género que exhibe melanismo, pudiendo presentar también albinismo. En cuanto a su tamaño, se observa dimorfismo sexual, siendo más largos y pesados los machos (87 cm y 9.6 kg en promedio) que las hembras (78 cm y 6.8 kg en promedio). Es de hábitos principalmente nocturnos, terrestre (aunque también es un buen trepador), hábil nadador y solitario, aunque miembros de una misma familia pueden movilizarse juntos en invierno. Su alimentación es estrictamente carnívora y consiste principalmente de lagomorfos y roedores y en menor medida de aves galliformes, consumiendo ocasionalmente animales domésticos y otros carnívoros como la zorra de San Joaquín (*Vulpes macrotis mutica*; Larivière y Walton, 1997; Sunquist y Sunquist, 2002; Romero, 2005; Salazar, 2008).

Puma concolor (el nombre de “puma” proviene de la lengua quechua del Perú y fue utilizado por primera vez en 1609 por Garcilaso de la Vega) es llamado comúnmente puma, león de montaña o león americano. Es el segundo felino más grande de América, sin embargo, presenta ciertas características más relacionadas con los gatos pequeños, como el no poder rugir, pero sí maullar y ronronear como éstos. Es de cuerpo musculoso pero esbelto, cabeza pequeña, orejas pequeñas y redondeadas, cola larga (un tercio de la longitud total del animal), garras retráctiles y extremidades posteriores largas, lo cual se cree es una adaptación para el salto pues pueden llegar a brincar desde el suelo a una altura de 5.5 m. Su pelaje es de color uniforme que va del pardo amarillento o arenoso, al café rojizo; en el vientre y alrededor del hocico es blancuzco, mientras que la base de los

bigotes y la punta de la cola son negros. Las crías presentan manchas (las cuales desaparecen entre los seis y diez meses de edad) y ojos azules (los cuales cambian a café dorado en los adultos). Se pueden encontrar ejemplares melánicos y más raramente albinos. Tiene hábitos principalmente crepusculares y nocturnos, es solitario, terrestre (aunque tiene una gran habilidad para trepar árboles) y buen nadador, pero comúnmente evita entrar al agua. Es un cazador oportunista y su alimentación es casi tan amplia como su distribución, pero en general, su dieta se basa principalmente en mamíferos (de 1-15 kg), seguido por marsupiales, aves y reptiles (Currier, 1983; Sunquist y Sunquist, 2002; Chávez, 2005; Salazar, 2008; Rabinowitz, 2010).

De las seis especies, *P. concolor* (Fig. 1F) es la especie de mayor distribución ya que se le encuentra prácticamente en todos los tipos de vegetación natural del país, aunque sus poblaciones más importantes se encuentran en los bosques de coníferas y de encinos del norte de la República (Chávez, 2005). *Panthera onca*, *P. yagouaroundi*, *L. pardalis* y *L. wiedii* (Figs. 1A-1D) habitan principalmente en regiones tropicales (bosques tropicales perennifolio, subcaducifolio, caducifolio y manglares) por lo que se les conoce como felinos neotropicales; se distribuyen desde la península de Yucatán y Chiapas hacia el norte, por ambos planos costeros, llegando a Sonora por la vertiente del pacífico y a Tamaulipas por la vertiente del golfo de México (Tewes y Schmidly, 1987; Aranda, 2005a, 2005b, 2005c; Chávez *et al.*, 2005; Haynes *et al.*, 2005). *Lynx rufus* (Fig. 1E) habita principalmente en zonas templadas (bosques de pino, oyamel y encino) y matorral xerófilo; su distribución abarca desde la frontera con Estados Unidos y la península de Baja California hasta el Istmo de Tehuantepec, exceptuando las regiones tropicales en la costa del Pacífico desde Colima hasta Oaxaca y en la costa del Golfo de México (Romero, 2005; Salazar, 2008).

Las seis especies desempeñan un papel ecológico primordial en los ecosistemas en que habitan, puesto que los felinos son los cazadores más especializados entre los mamíferos. Debido mayormente a actividades antropogénicas como asentamientos humanos y cultivos intensivos, el hábitat del puma y el lince se ha fragmentado generando que sus poblaciones disminuyan por lo que en México, se consideran como especies que requieren protección especial y se necesita un permiso para su cacería (SEMARNAT, 2002). Aunado a la pérdida de su hábitat, el jaguar, el ocelote y el tigrillo, están bajo una fuerte presión de caza debido al comercio de sus pieles, por estas razones en México tienen

el status de especie en peligro de extinción y su caza esta prohibida (SEMANART, 2002). Aunque la piel del jaguarundi no tiene valor comercial, en México esta considerada como especie amenazada y su caza también esta prohibida (SEMANART, 2002), además se sabe muy poco de su biología y comportamiento en vida silvestre al igual que del tigrillo, del cual no existe estudio alguno sobre su población en el país (Tewes y Schmidly, 1987; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005a, 2005c).

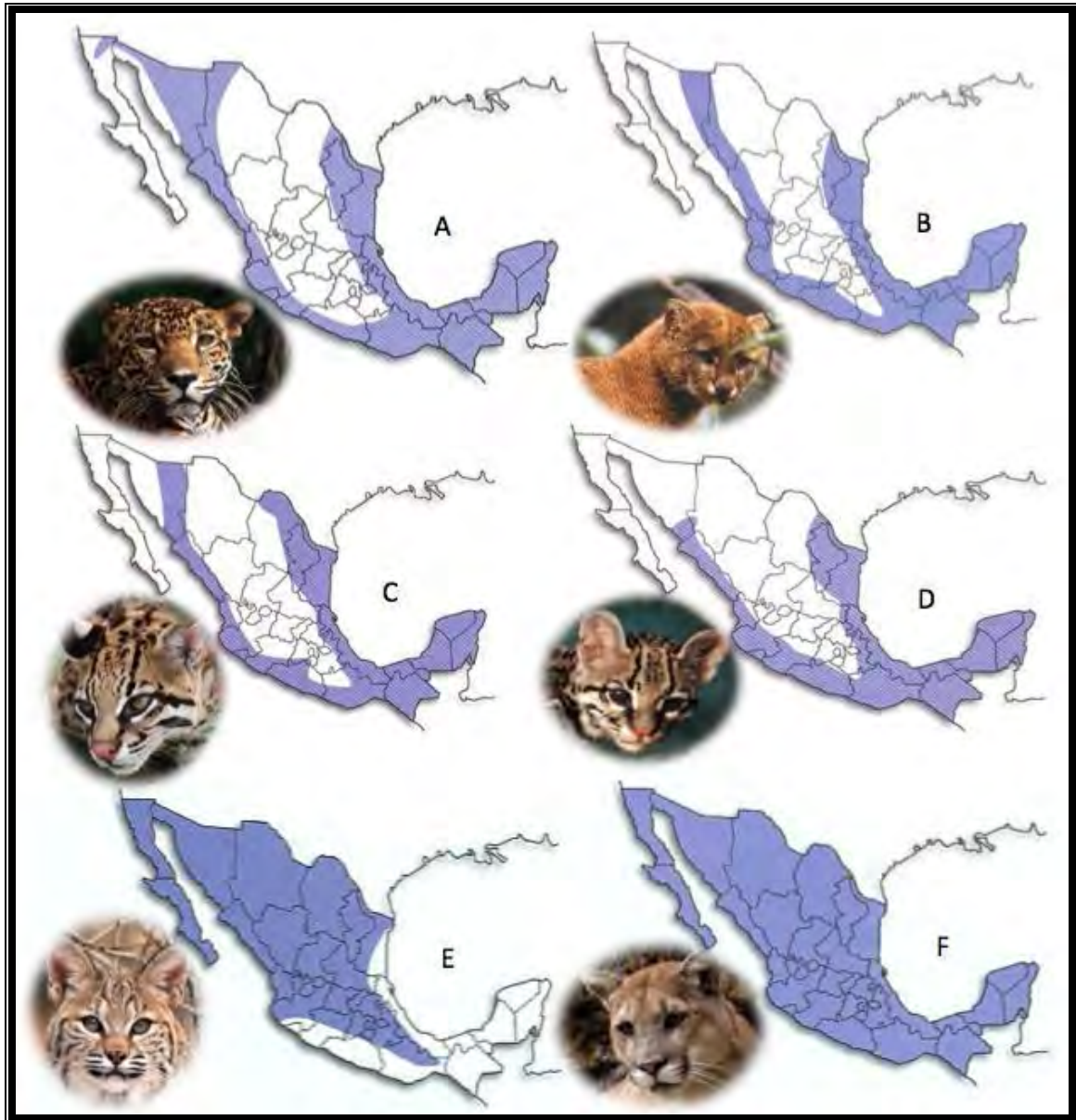


Figura 1. Distribución geográfica de los felinos en México (Modificado de Ceballos y Oliva, 2005; Ceballos *et al.*, 2009; Ceballos *et al.*, 2010). A) *P. onca* (Foto: Andy Rouse); B) *P. yagouaroundi*, (Foto: Fulvio Eccardi); C) *L. pardalis* (Foto: Rolf Nussbaumer; D) *L. wiedii* (Foto: Latin Stock Mexico); E) *L. rufus* (Foto: Shatil y Rozinski); F) *P. concolor* (Foto: Joe y Mary Ann McDonald)

Por todo lo anterior, identificar la presencia de estos felinos en un área determinada, así como obtener información básica sobre aspectos genéticos y ecológicos (densidad, supervivencia y utilización de áreas y hábitat), resulta de suma importancia para el manejo y conservación de sus poblaciones (Maldonado, 2006). Sin embargo, en muchas ocasiones se dificulta el llevar a cabo dicho trabajo, debido en gran parte a los hábitos de estos felinos ya que presentan comportamientos evasivos y habitan áreas con cobertura vegetal densa, además de presentar bajas densidades poblacionales (Tewes y Schmidly, 1987; Aranda, 2005a, 2005b, 2005c; Haynes *et al.*, 2005). Puesto que los individuos de estas especies no son fáciles de detectar y los métodos comúnmente usados para su monitoreo (como la radio-telemetría) son de un alto costo y presentan dificultades para su captura y manejo, suelen utilizarse métodos indirectos para su identificación, como pueden ser huellas, pelaje desprendido, heces y otros rastros (Kohn y Wayne, 1997; Haynes *et al.*, 2005; Maldonado, 2006).

1.2 Uso de muestras fecales como método no invasivo

Usando la definición de Taberlet *et al.* (1999) “las muestras recabadas de manera no invasiva son aquellas que no requieren que el animal sea capturado o manipulado”. Entre los métodos no invasivos más utilizados se encuentra el uso de muestras fecales, debido a que las heces suelen ser los rastros más comunes y fáciles de colectar. Generalmente en estudios de carnívoros, el análisis de heces se ha utilizado para determinar presencia, abundancia y hábitos alimentarios. El criterio habitual para la identificación de excretas es el morfológico, sin embargo, este método puede verse afectado por la similitud en heces de especies simpátricas y la subjetividad de los expertos en campo (Foran *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2004). Por ejemplo, se suele relacionar el diámetro de las excretas con el tamaño corporal de las especies, sin embargo, se ha reportado que aunque la masa corporal del ocelote, puma y jaguar varía ampliamente, sus heces pueden ser de tamaños similares, encontrándose excretas de puma de menos de 20 mm de diámetro y excretas de ocelote de más de 27 mm de diámetro (Farell *et al.*, 2000).

Las heces del jaguarundi y ocelote no presentan algún patrón característico que permita diferenciarlas a simple vista, pudiendo confundirse con las excretas de tigrillo y con las de puma y coyote respectivamente. A su vez, las heces del puma y jaguar son de tamaño y forma similares (Fig. 2). Se ha sugerido asociar las excretas a huellas, sin

embargo, éstas no siempre se encuentran, además de que también presentan similitudes como las del jaguarundi con el tigrillo y gato doméstico, y las del ocelote con el puma, lince y coyote. Como consecuencia, resulta difícil identificar las heces de estos felinos, sobre todo en sitios donde son simpátricos y se reporta que, sin información adicional, la asignación de excretas se realiza correctamente sólo en un 50-66% de los casos (Kohn y Wayne, 1997; Aranda, 2000).

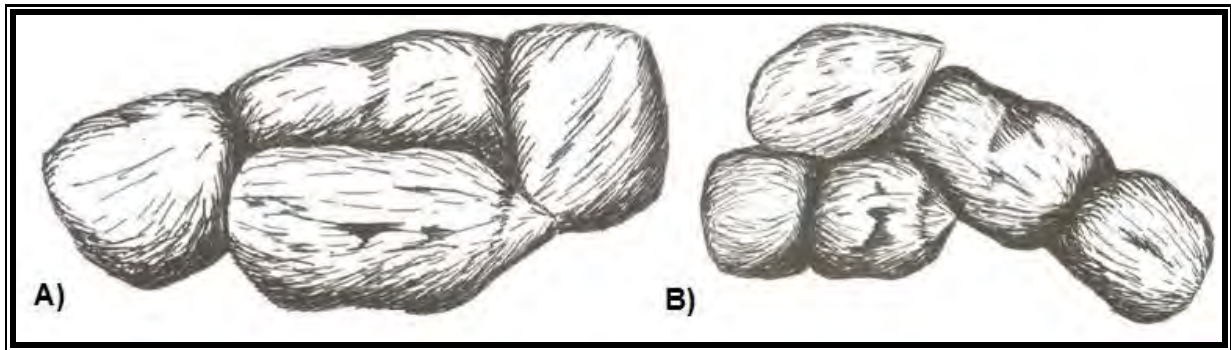


Figura 2. Excretas. A) jaguar; B) puma (Tomado de Aranda, 2000).

Gracias al avance que ha tenido la biología molecular en los últimos años, actualmente es posible utilizar marcadores para el análisis de heces (escatología molecular), lo cual permite la identificación de especies, así como el determinar la distribución, abundancia y dieta de los animales. Esto es posible debido a las células de descamación del epitelio del tracto digestivo presentes en las heces, las cuales son una fuente confiable de ADN para determinar la especie de origen (Ernest *et al.*, 2000; Farrell *et al.*, 2000; Maldonado, 2006; Cossíos y Angers, 2006).

1.3 Identificación genética de especies

La identificación genética o molecular es el uso de marcadores moleculares para determinar el individuo, especie o incluso población de origen de una muestra biológica. La identificación genética de especies se ha utilizado principalmente en la investigación, manejo y conservación de la vida silvestre, siendo el ADN mitocondrial (ADNmt) uno de los marcadores más empleados dentro de este campo (Allendorf y Luikart, 2007). El ADNmt animal es de herencia materna, haploide, no recombinante y presenta una alta tasa de sustitución (hasta 10 veces mayor que la del genoma nuclear) permitiendo detectar

niveles significativos de variación interespecífica a nivel de secuencia de nucleótidos (aún en especies cercanamente relacionadas), por lo cual, diversos segmentos de este marcador han sido ampliamente utilizados en las técnicas de identificación de especies, destacando entre ellos los genes mitocondriales citocromo oxidasa *c* subunidad I (COI) y citocromo *b* (Avisé *et al.*, 1987; Pereira *et al.*, 2008; Linacre y Tobe, 2009).

Actualmente, el gen COI es la secuencia base de un nuevo sistema de identificación molecular de especies animales llamado “Código de barras de ADN” (DNA barcoding). En el 2003, Hebert y colaboradores propusieron que un segmento de este gen, cercano al extremo 5' y de aproximadamente 648 pares de bases, mostraría la suficiente variación nucleotídica como para permitir la distinción e incluso descubrimiento de especies animales crípticas. El código de barras ha probado ser efectivo para la identificación de especies de invertebrados, peces, aves y mamíferos, encontrándose secuencias únicas en más del 94% de las especies analizadas (Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006a; Clare *et al.*, 2007; Hajibabaei *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que el gen citocromo *b* (*cit b*) puede ser un código de barras igual o más adecuado que el gen COI, debido principalmente a que ha sido uno de los marcadores más utilizados en análisis filogenéticos e identificación de especies por presentar poca o ninguna variación intraespecífica, haciéndolo probablemente el gen más secuenciado para especies de vertebrados, así como uno de los mejor caracterizados tanto evolutiva como bioquímicamente (Kocher *et al.*, 1989; Johns y Avisé, 1998; Hansen y Jacobsen, 1999; Parson *et al.*, 2000; Tobe *et al.*, 2009). Con base en estas características y el hecho de que en cada célula diploide se encuentran cientos o miles de copias de ADNmt, el gen citocromo *b* resulta un marcador adecuado para técnicas no invasivas de identificación de especies como el análisis molecular de heces, ya que el ADN puede encontrarse parcialmente degradado y es más factible obtener una mayor parte de las múltiples copias de ADNmt, que de las dos de ADN nuclear en organismos diploides (Kohn y Wayne, 1997; Hansen y Jacobsen, 1999; Farrell *et al.*, 2000; Waits y Paetkau, 2005).

Dadas las ventajas y el enorme potencial que presenta el análisis de ADN fecal, el uso de esta técnica se ha incrementado durante la última década, aplicándose exitosamente en estudios de identificación de felinos utilizando secuencias analizadas mediante métodos filogenéticos (Farrell *et al.*, 2000), microsatélites (Ernest *et al.*, 2000) y el diseño de

oligonucleótidos específicos por especie (Palomares *et al.*, 2002). Particularmente, Cossíos y Angers (2006) utilizaron marcadores RFLP y secuencias de ADN mitocondrial para distinguir correctamente entre heces de gato andino (*Oreailurus jacobita*), gato de las pampas (*Lynchailurus colocolo*) gato de Geoffroy (*Oncifelis geoffroyi*) y puma (*P. concolor*).

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) se basan en el reconocimiento y corte de una secuencia específica de ADN (comúnmente genómico), por enzimas de restricción (endonucleasas). Una variante de este método es utilizar ADN amplificado por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en vez de ADN genómico, lo cual se conoce como PCR-RFLP. Así, al realizar la digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción, se reconocen secuencias específicas en el ADN que varían entre especies y generan distintos fragmentos, ya sea por la presencia/ausencia de la secuencia o por su distinta ubicación en el ADN. El patrón de bandeado resultante es específico por especie y se puede observar separando los fragmentos de distinto tamaño por medio de electroforesis convencional (Lewin, 2006; Rentería, 2006; Pereira *et al.*, 2008).

La amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial a partir de muestras fecales para su posterior digestión con enzimas de restricción, se ha aplicado con éxito en múltiples estudios para la diferenciación de especies de carnívoros. Por ejemplo, Paxinos y colaboradores (1997) identificaron excretas de cinco especies de cánidos simpátricos (*V. macrotis mutica* [zorra de San Joaquín], *Urocyon cinereoargenteus* [zorra gris], *Vulpes vulpes* [zorra roja], *Canis latrans* [coyote] y *Canis familiaris* [perro doméstico]), utilizando iniciadores específicos para cánidos para la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial citocromo *b* de 412 pb, el cual fue digerido con tres enzimas de restricción (Fig. 3).

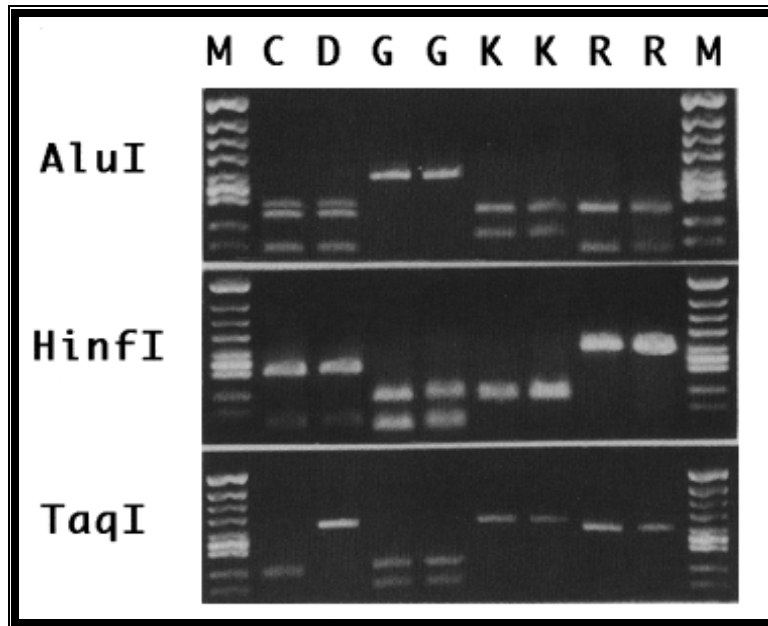


Figura 3. Patrón de bandeado resultante de la digestión de un fragmento del gen citocromo b de cinco cánidos simpátricos. C= coyote, D= perro doméstico, G= zorra gris, K= zorra de San Joaquín, R= zorra roja, M= Marcador de peso molecular (el tamaño de los fragmentos de arriba hacia abajo es de 1057 pb, 770 pb, 612 pb, 495 pb, 392 pb, 345-341-335 pb, 297-291 pb, 210 pb y 162 pb). El segundo carril en cada especie de zorra, es la digestión de ADN extraído a partir de heces (Tomado de Paxinos *et al.* 1997).

De manera similar, Hansen y Jacobsen (1999) identificaron correctamente tres especies de mustélidos, utilizando ADN mitocondrial de muestras fecales. Diseñaron iniciadores específicos para mustélidos y amplificaron un fragmento de 189 pb del gen mitocondrial citocromo *b*, digiriéndolo con dos enzimas de restricción: *Taq I* y *Nla IV*. La enzima *Taq I* generó bandas de 88 y 101 pb para el visón americano (*Mustela vison*) y de 62 y 127 pb para el turón de patas negras (*Mustela putorius*), mientras que para nutria (*Lutra lutra*) no presentó sitios de restricción. La enzima *Nla IV* presentó un sitio de restricción único para nutria, produciendo bandas de 80 y 109 pb.

Como se mencionó anteriormente, Cossíos y Angers (2006) realizaron un estudio para diferenciar entre especies de gato andino, gato de las pampas, gato de Geoffroy, puma y otros carnívoros (*Felis catus* [gato doméstico], *C. familiaris* [perro doméstico] y *Pseudalopex culpaeus* [zorro andino]); amplificaron un fragmento del gen mitocondrial 16S ribosomal, el cual fue digerido con siete enzimas de restricción. La presencia/ausencia de sitios de restricción y el patrón de bandas resultantes permitió la diferenciación entre especies de felinos (Fig. 4).

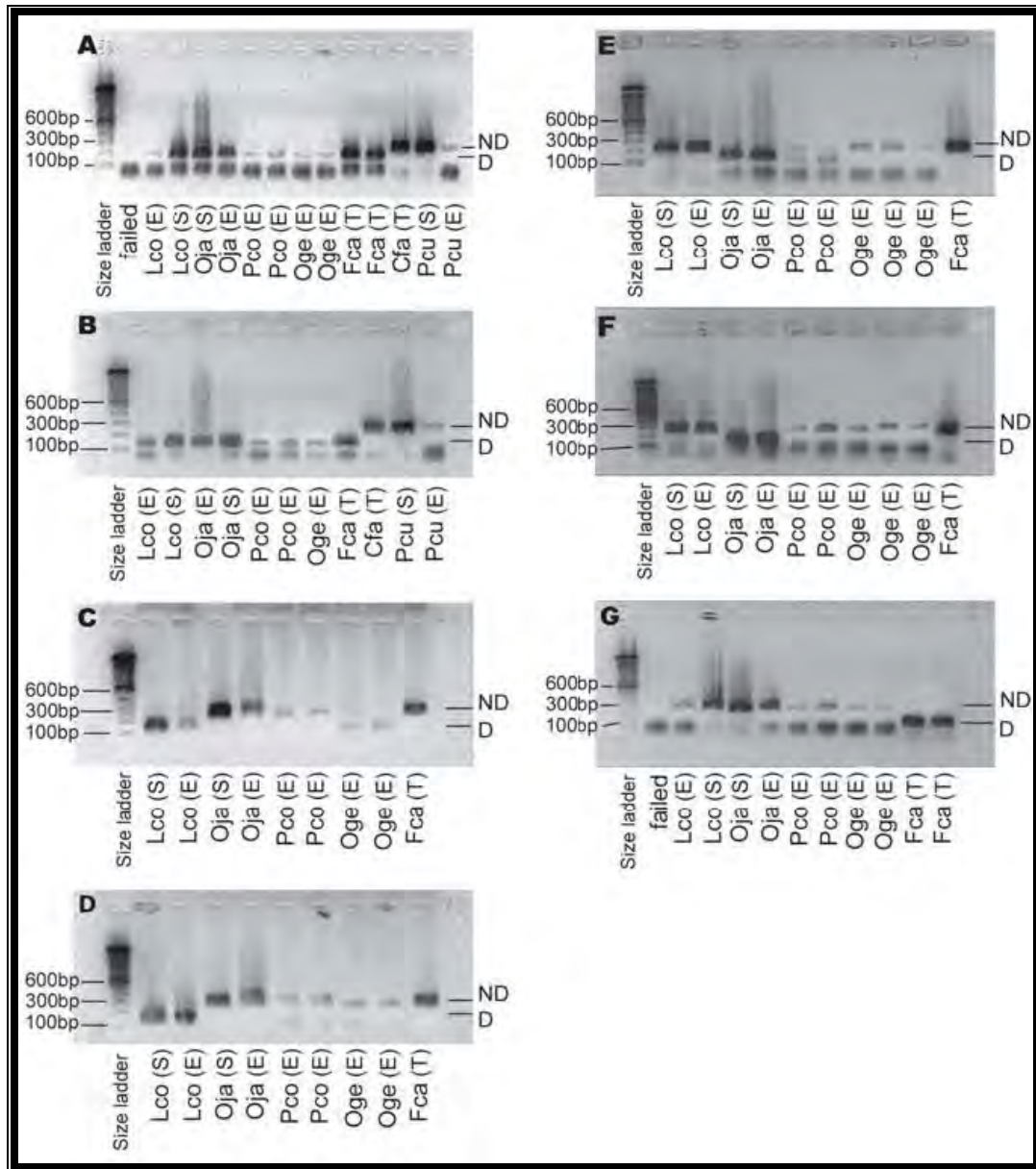


Figura 4. Patrón de bandeado resultante de la digestión de un fragmento del gen 16S ribosomal utilizando siete enzimas de restricción. A= *Dra* I, B= *Hae* III, C= *Nla* III, D= *Nco* I, E= *Ase* I, F= *Mbo* I, G= *Hpa* II. Lco= gato de las pampas, Oja= gato andino, Pco= puma, Oge= gato de Geoffroy, Fca= gato doméstico, Cfa= perro doméstico, Pcu= zorro andino. El origen del ADN extraído es indicado en cada muestra, S= piel, E= excreta y T= tejido. ND= fragmento no digerido, D= fragmento digerido (Tomado de Cossíos y Angers, 2006).

Con base en los trabajos mencionados y puesto que no existen publicaciones que reporten el uso de ADN fecal para la identificación de felinos en el país, los objetivos del presente estudio son:

2. OBJETIVOS

General

Identificar las especies de felinos de México, utilizando ADN mitocondrial extraído de muestras fecales y marcadores RFLP.

Particulares

- Obtener las secuencias del gen mitocondrial citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I para cada una de las especies.
- Identificar en las secuencias una región corta (≤ 300 pb) que presente un patrón de restricción distintivo para cada especie y diseñar iniciadores específicos para esa región.

3. HIPÓTESIS

Una región pequeña del ADN mitocondrial (≤ 300 pb) mostrará la suficiente variación interespecífica para obtener un patrón de restricción que permitirá diferenciar a las especies de felinos silvestres mexicanos a partir de muestras fecales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron un total de 43 muestras de tejido: cinco de jaguarundi (*P. yagouaroundi*), cuatro de tigrillo (*L. wiedii*), 14 de lince (*L. rufus*), cuatro de ocelote (*L. pardalis*), siete de jaguar (*P. onca*), tres de puma (*P. concolor*) y seis de gato doméstico (*F. catus*) para propósitos comparativos; así como una excreta por cada especie (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestras obtenidas de siete especies de felinos

Especie	Nombre común	Tipo de muestra					Procedencia
		hígado	piel*	sangre	oreja	excreta	
<i>Felis catus</i>	gato doméstico	1					CTC-CNMA CCMAG Particular
		4		1		1	
<i>Puma yagouaroundi</i>	jaguarundi	1					CTC-CNMA CNMA CIVS ZOOCH
			1				
				2 1		1	
<i>Leopardus wiedii</i>	tigrillo		1				CNMA CIVS ZOOCH ZOOSJA
				1	1		
				1			
						1	
<i>Leopardus pardalis</i>	ocelote			1	2		CIVS ZOOCH
				1		1	
<i>Panthera onca</i>	jaguar			1	3		CIVS ZOOCH
		1		2		1	
<i>Lynx rufus</i>	lince			3	4		CIVS RBM ZOOCH
			1		2		
				4		1	
<i>Puma concolor</i>	puma	1					CIVS ZOOCH
				2		1	

CTC-CNMA: Colección de Tejidos Congelados de la Colección Nacional de Mamíferos. CNMA: Colección Nacional de Mamíferos. CIVS: Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre de la SEMARNAT. CCMAG: Centro de Control Animal de Guadalajara. ZOOCH: Zoológico de Chapultepec. ZOOSJA: Zoológico San Juan de Aragón. RBM: Reserva de la Biosfera de Mapimí. * Piel seca sin curtir.

Las muestras provenientes de los Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS Guadalajara, Los Reyes y San Bartolomé Tekax), fueron solicitadas en donación a la Dirección General de Vida Silvestre, SEMARNAT; los animales fueron inmovilizados y anestesiados con xilacina + ketamina (contención física y química respectivamente; SEMARNAP y DGVS, 2000), posteriormente se les extrajo 4 ml de sangre y se depositaron en un BD Vacutainer (Fig. 5), mientras que las muestras de oreja se obtuvieron utilizando un punzón para biopsia dérmica y se colocaron en alcohol al 90-100%. Para la obtención de las muestras provenientes de los Zoológicos Chapultepec y San Juan de Aragón, se presentó este proyecto ante el Comité de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS), mismo que fue aprobado; el manejo de los

animales y la toma de muestras fueron realizadas enteramente por el personal del zoológico, bajo los procedimientos aprobados por la DGZVS. Las muestras provenientes de la Reserva de la Biosfera de Mapimí (RBM) fueron tomadas de animales silvestres por el M. en C. Juan Carlos López Vidal y donadas a la CNMA. Las muestras de tejido y sangre fueron almacenadas a -75° y -20° C respectivamente; las excretas fueron colectadas uno o dos días antes de su procesamiento y se mantuvieron a 4° C durante este tiempo.

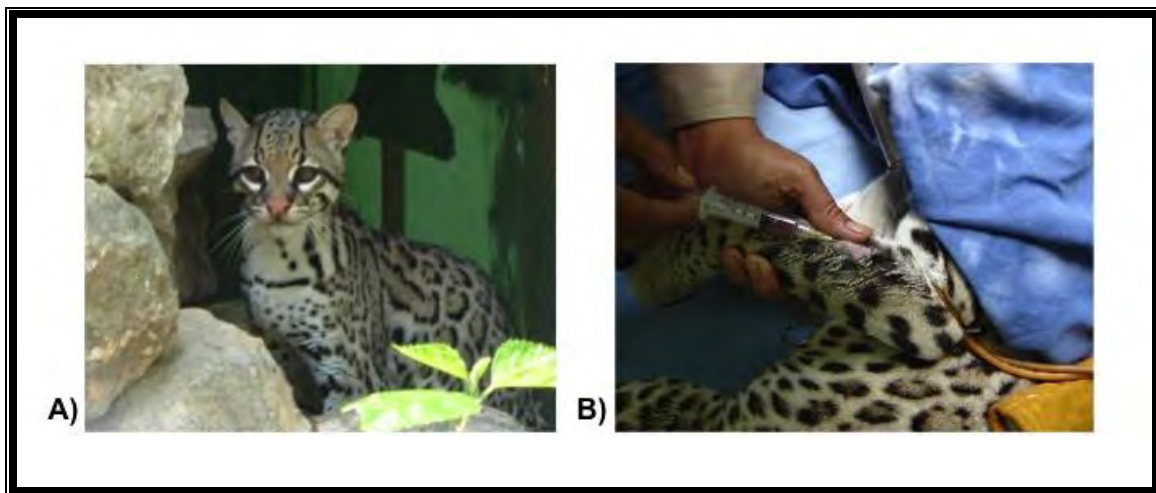


Figura 5. Obtención de muestra. A) Ejemplar de ocelote macho (*L.pardalis*) albergado en el CIVS Guadalajara; B) Toma de muestra de sangre de este ejemplar, el cual se encuentra con la cabeza cubierta para evitar estímulos visuales y minimizar el estrés durante la anestesia (Fotos: Anahí Mejía).

4.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de hígado, sangre y oreja se utilizó el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN^{MR}), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las extracciones de las muestras de piel se realizaron utilizando la técnica de fenol-cloroformo (Apéndice 1), ya que este método es más adecuado cuando se tiene ADN degradado o en poca cantidad. Se cuantificó la cantidad (ng/ μ l) y pureza del ADN extraído por medio de espectrofotometría y se hicieron pruebas de integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. El ADN de las muestras fecales se extrajo utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN^{MR}), el cual está diseñado especialmente para este tipo de muestras.

4.3 Obtención de secuencias nucleotídicas

Para la obtención del código de barras del gen COI (654 pb; Hajibabaei *et al.*, 2007), se enviaron muestras de tejido (dos de *F. catus*, *P. yagouaroundi*, *L. pardalis* y *L. rufus*; una de *P. concolor*, *L. wiedii* y *P. onca*) al Centro Canadiense para el Código de barras de ADN (CCDB por sus siglas en inglés), como parte del proyecto “Código de barras de mamíferos de México” de la UNAM. El ADN extraído se amplificó con el coctel de iniciadores C_VF1LFt1–C_VR1LRt1 (Ivanova *et al.*, 2007) y se secuenció en ambas direcciones (forward y reverse) con los iniciadores M13F (5´-TGTA AACGACGGCCAGT-3´) y M13R (5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´; Messing, 1983).

Para la amplificación del gen completo de citocromo *b* (1140 pb) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se utilizaron los iniciadores universales L14724: 5´-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3´ (MVZ05 en Smith y Patton, 1991, 1993) y H15915: 5´-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3´ (Irwin *et al.*, 1991). Los productos de PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Aunque hubo amplificación del producto esperado, no se obtuvo un resultado favorable al momento de la secuenciación, a pesar de diversos intentos.

Como alternativa, se utilizó el método de clonación el cual se realizó en el laboratorio de Inmunología Molecular del Centro de Investigación Biomedica de Occidente (CIBO). El método de clonación consiste en modificar un vector, como los plásmidos, mediante la inserción de una secuencia de ADN de nuestro interés para su posterior incorporación en células bacterianas (transformación), donde tienen la capacidad de replicarse miles de veces. Posteriormente se siembran estas bacterias en un medio con antibiótico, para el cual el plásmido porta el gen de resistencia. De esta manera, sólo se reproducirán aquellas bacterias que contengan el plásmido. Finalmente se extrae el ADN plasmídico y se secuencian con iniciadores específicos que amplifican el ADN del plásmido junto con el ADN foráneo de nuestro interés (Ávila *et al.*, 1995).

Se realizó la clonación usando el producto de PCR obtenido con los iniciadores universales (L14724 y H15915) y el kit comercial TOPO TA Cloning for Sequencing (Invitrogen^{MR}). Las células sometidas a la transformación, se sembraron en medio LB de

agar con ampicilina y se seleccionaron 8 colonias las cuales se cultivaron en medio LB. Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico con el ChargeSwitch-Pro Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen^{MR}) y se hizo la digestión con la enzima de restricción EcoRI para comprobar la presencia del inserto. Los productos de la digestión se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. Desafortunadamente no se observó la banda indicativa del inserto, debiéndose probablemente a un problema con el antibiótico en el medio selectivo.

Se encontraron secuencias publicadas de fragmentos del gen citocromo *b* para *F. catus*, *P. yagouaroundi*, *P. concolor*, *L. wiedii*, *L. pardalis* (363 pb; Masuda *et al.*, 1996), *P. onca* (289 pb; Janczewski *et al.*, 1995) y *L. rufus* (384 pb; Código de acceso GenBank AY499332). Éstas se alinearon con el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.0. (Hall, 1999) y se analizaron con el programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) para encontrar un patrón de sitios de restricción diferente para cada especie.

A la par, se usaron los iniciadores para carnívoros Cb-M1 (5'-CTCACATGGAATCTAACCATGAC-3') y Cb-MR2 (5'-AGGGAATAGTTTAAATAGAATTTTCAGC-3') para intentar nuevamente obtener la secuencia del gen completo de citocromo *b* (Tamada *et al.* 2005). Los productos de la reacción de PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Aunque se obtuvo el producto esperado en todas las muestras, también se presentó mucha inespecificidad, por lo que se estandarizaron las condiciones de amplificación para reducir la misma (Fig. 6), quedando como sigue: 30-100 ng de ADN, 1X de PCR buffer, 200 μ M de cada dNTP, 0.15 μ M de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 μ l; el programa del termociclador consistió en 35 ciclos de 94° C por 1 min, 55° C por 1 min y 72° C por 1 min, incluyendo una desnaturalización inicial de 94° C por 3 min y una elongación final de 72° C por 10 min. Sin embargo, no se logró evitar la inespecificidad en todas las muestras, por lo que se decidió purificar las muestras con inespecificidad con el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN^{MR}), cortando y por lo tanto obteniendo sólo la banda deseada; mientras que las muestras sin inespecificidad se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN^{MR}).

Las muestras purificadas se secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse) utilizando los iniciadores anidados CbM2 (5'-CCATGACTAATGATATGAAAAAC-3') y Cb-MR1 (5'-TCTTCCTTGAGTCTTAGGGAG-3'; Tamada *et al.* 2005), en el secuenciador automático del Posgrado en Ciencias Biológicas del Instituto de Biología y en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, ambos pertenecientes a la UNAM. Los cebadores anidados se unen en un lugar más interno del producto de amplificación obtenido mediante iniciadores más extrínsecos a la región de interés (Cb-M1 y Cb-MR2), disminuyendo así la complejidad del ADN molde para la reacción de secuenciación (Ávila *et al.* 1995).

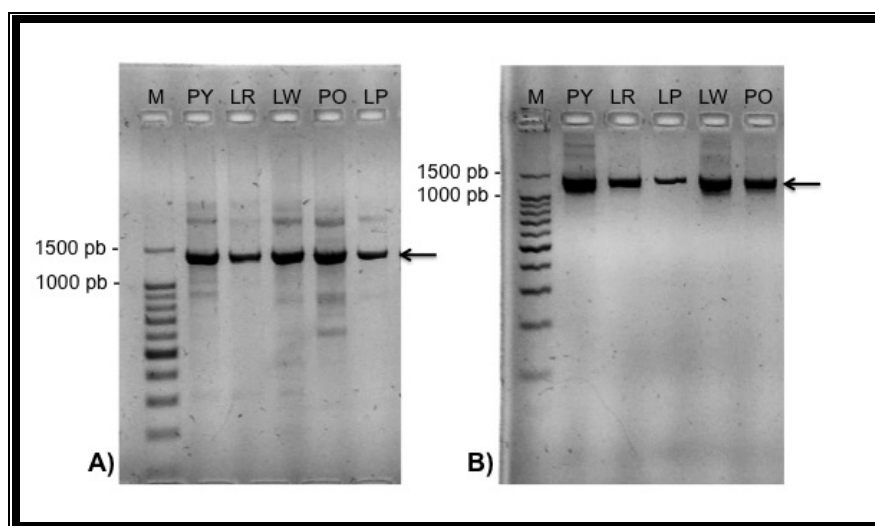


Figura 6. Amplificación del gen citocromo *b* con los iniciadores Cb-M1 y Cb-MR2, donde se observa la reducción de la inespecificidad en unas muestras y la ausencia de ésta en otras muestras. A) Amplificación con las condiciones iniciales tomadas de Tamada *et al.* 2005; B) Amplificación con las condiciones estandarizadas en el presente estudio. La flecha indica el producto de amplificación esperado (citocromo *b*, 1140 pares de bases) y los números el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 100 pb, PY= *P. yagouaroundi*, LR= *L. rufus*, LW= *L. wiedii*, PO= *P. onca*, LP= *L. pardalis*.

4.4 Análisis de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se alinearon, editaron y ensamblaron manualmente con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.0. (Hall, 1999), generando así las secuencias consenso de cada individuo, mismas que se alinearon a la región correspondiente del genoma mitocondrial de *F. catus* (Número de acceso GenBank NC_001700; López *et al.*, 1996) con el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) y se

verificaron visualmente. A los alineamientos de cada gen mitocondrial, se integraron secuencias de los genes COI y citocromo *b* de un individuo de *P. concolor* (Números de acceso GenBank AY598484 y AY598487; Delisle y Strobeck, 2005) y del gen citocromo *b* de un individuo de *F. catus* (Número de acceso GenBank AB004238).

Con el programa MEGA v.4.0 (Tamura *et al.*, 2007) se analizó la variación genética entre las secuencias de cada gen mitocondrial utilizando dos criterios: 1) la comparación de las secuencias entre sí para determinar el número de sitios variables así como el número de haplotipos, y 2) la estimación de las distancias genéticas con base en el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura (K2P; Kimura, 1980), por ser el más adecuado para especies cercanamente relacionadas como los felinos (Masuda *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2003). A este último análisis se incluyeron las secuencias de los genes COI y citocromo *b* de un individuo de *Canis lupus* como grupo externo (Números de acceso GenBank AY598484 y AY598499; Delisle y Strobeck, 2005). A partir de las matrices de distancias obtenidas para cada gen, se elaboraron dendogramas mediante el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) para representar gráficamente las divergencias genéticas y la asignación de individuos a determinadas especies (Heber *et al.*, 2003; Lanteri, 2007). Los dendogramas se enraizaron siguiendo el criterio de grupo externo y se evaluó la significancia estadística de la configuración de las ramas (agrupamiento de las secuencias) a través del método de bootstrap, utilizando 1000 replicas (Felsenstein, 1985).

Los análisis anteriores, aunque hechos con base en métodos filogenéticos, se realizaron con el objetivo de verificar que las secuencias pertenecieran al gen y especie de felino correspondiente (identificación fenética), y no para generar una hipótesis filogenética (divergencia de las especies a partir de un ancestro común; Steinke *et al.*, 2005; Wardill *et al.*, 2005).

4.5 Identificación de patrones de restricción diagnósticos y diseño de iniciadores específicos para felinos

Como resultado del análisis de las secuencias publicadas del gen citocromo *b* para las siete especies de felinos (ver sección 4.3), se encontró en una región de 289 pb, un patrón de

sitios de restricción distintivo, el cual sería amplificado con los primers Cytb-1 (CCAATGATATGAAAAACCATCGTT) y Cytb-2 (GCCCCTCAGAATGATTATTTGT CCTC; Janczewski *et al.*, 1995). Al fragmento amplificado se le haría una doble digestión con las enzimas HphI y HpyCH4V, las cuales cortarían en seis de las siete especies produciendo un patrón igual para *F. catus* y *L. pardalis*, pero distinto para *P. onca*, *L. rufus*, *P. concolor* y *P. yagouaroundi*, mientras que en *L. wiedii* no cortarían. La segunda doble digestión sería con las enzimas TfiI y TaqI, las cuales cortarían en *L. pardalis* y *L. wiedii*, pero no en *F. catus* (Cuadro 2).

Las secuencias obtenidas en el presente trabajo, se alinearon con las secuencias publicadas del gen mitocondrial citocromo *b* y se analizaron con el programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003). Se observó que no había coincidencia en varios de los sitios de corte encontrados anteriormente para las secuencias publicadas (Cuadro 2), por lo cual, se decidió descartar este patrón.

Cuadro 2. Predicción del patrón de digestión de un fragmento de 289 pares de bases del gen citocromo *b* a partir de secuencias publicadas y su comparación con las secuencias obtenidas en el presente estudio

Especie	Doble digestión 1			Doble digestión 2		
	HphI ^a	HpyCH4V ^a	Bandas ^b	TfiI ^a	TaqI ^a	Bandas ^b
<i>Felis catus</i>	62	*	227, 62	*	*	289
<i>Leopardus wiedii</i>	*	*	289	163	*	163, 126
<i>Leopardus pardalis</i>	62	*	227, 62	*	¿230?	230, 59
<i>Puma yagouaroundi</i>	122	*	167, 122			
<i>Panthera onca</i>	122	¿221?	122, 99, 68			
<i>Lynx rufus</i>	¿62?	221	159, 68, 62			
<i>Puma concolor</i>	*	¿221?	221, 68			

^a Posición en pares de bases, en donde ocurre el corte de la enzima. ^b Tamaño en pares de bases de las bandas generadas por el corte de las dos enzimas. * la enzima no corta. ¿? No coincidencia del sitio de corte en las secuencias obtenidas en el presente estudio

Con el programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003), se analizaron los haplotipos de las secuencias del gen completo de citocromo *b* de las siete especies de felinos (ver sección 4.4) y se identificó una región que cumplía los siguientes criterios: 1) presentaba un patrón de sitios de restricción diferentes para cada especie, 2) los sitios de restricción se encontraban conservados entre los individuos de una misma especie y 3) presentaba al menos un sitio de restricción en todas las especies.

Se tomaron de GenBank las secuencias disponibles del gen citocromo *b* de otras especies de mamíferos (Cuadro 3) y se alinearon con las secuencias de felinos, para diseñar iniciadores que amplificaran el fragmento con el patrón de restricción distintivo en las siete especies de felinos, pero no en alguna de las otras especies incluidas en el alineamiento. Las especies de carnívoros y el didélfido (*Didelphis virginiana*), se eligieron por compartir su área de distribución en el país y presentar similitud en sus heces con los félidos bajo estudio, lo cual podría generar errores de identificación durante la colecta de excretas en campo (Foran *et al.*, 1997; Aranda, 2000; Gómez-Moliner *et al.*, 2004; Ceballos y Oliva, 2005). También se incluyó la secuencia del cit *b* de *Homo sapiens*, dado que el riesgo de contaminación con ADN humano es más elevado en los análisis moleculares basados en métodos no invasivos (Foran *et al.*, 1997; Pilgrim *et al.*, 2005; Waits y Paetkau, 2005).

Cuadro 3. Secuencias del gen cit *b* auxiliares en el diseño de iniciadores específicos para felinos

Especie	Nombre común	No. de acceso	
		GenBank	Referencia
<i>Canis familiaris</i>	perro doméstico	NC_002008	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>Canis latrans</i>	coyote	DQ480509	Bjornerfeldt <i>et al.</i> , 2006
<i>Bassariscus astutus</i>	cacomixtle	AF498159	Koepfli y Wayne, 2003
<i>Bassariscus sumichrasti</i>	cacomixtle	DQ660301	Koepfli <i>et al.</i> , 2007
<i>Eira barbara</i>	viejo de monte	AF498154	Koepfli y Wayne, 2003
<i>Galictis vittata</i>	grisón	AF498155	Koepfli y Wayne, 2003
<i>Mephitis mephitis</i>	zorrito	X94927	Ledje y Arnason, 1996
<i>Mustela frenata</i>	comadreja	AF498153	Koepfli y Wayne, 2003
<i>Nasua narica</i>	tejón o coatí	DQ660302	Koepfli <i>et al.</i> , 2007
<i>Procyon lotor</i>	mapache	DQ660306	Koepfli <i>et al.</i> , 2007
<i>Taxidea taxus</i>	tlalcoyote	AF057132	Koepfli y Wayne, 1998
<i>Didelphis virginiana</i>	tlacuache	NC_001610	Janke <i>et al.</i> , 1994
<i>Homo sapiens</i>	humano	NC_012920	Andrews <i>et al.</i> , 1999

Para diseñar los iniciadores específicos, se examinaron cuidadosamente las secuencias de felinos junto con las de los otros mamíferos, con el fin de encontrar secuencias pequeñas (de alrededor de 20 nucleótidos) que flanquearan la región de restricción diagnóstica y presentaran poca variación entre especies de felinos, pero que difirieran por varias mutaciones con respecto al resto de las especies. A la vez, se buscó que estas mutaciones se encontraran en el extremo 3' del iniciador potencial y que las variaciones entre especies de felinos estuvieran en el extremo 5' del mismo (Kwok *et al.*,

1990; Palomares *et al.*, 2002; Lecompte *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2005). Lo anterior se realizó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.0. (Hall, 1999), mientras que las secuencias seleccionadas como iniciadores potenciales, se analizaron con el programa OLIGO Primer Analysis Software v. 6.51 (Rychlik, 2001).

4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos para felinos: estandarización y evaluación

Se estandarizaron las condiciones de amplificación de los iniciadores específicos, usando ADN de muestras de tejido de las siete especies de felinos. Se probaron diferentes concentraciones de dNTP's, iniciadores y MgCl₂, así como distintas temperaturas de alineación y número de ciclos, hasta obtener un producto de PCR robusto.

Para evaluar la especificidad de los iniciadores diseñados se utilizaron las condiciones estandarizadas para amplificar ADN genómico de cuatro especies de mamíferos, de las cuales tres provienen de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM: humano (*H. sapiens*), tlacuache (*D. virginiana* ; Número de catálogo CNMA 45119), zorrillo (*M. macroura* ; Número de catálogo CNMA 40187) y cacomixtle (*B. astutus* ; Número de catálogo CNMA 44067).

Se emplearon los iniciadores universales MVZ05: 5'-CGAAGCTTGATATGAAA AACCATCGTTG-3' (L14724 en Irwin *et al.*, 1991) y MVZ04: 5'- GCAGCCCCCTCAGA ATGATATTTGTCCTC-3' (Smith y Patton, 1991, 1993), para amplificar un fragmento de 480 pares de bases (pb) del gen citocromo *b* como control positivo, que constatará la presencia de ADN amplificable en aquellas especies donde no se obtuviera producto usando los iniciadores específicos para felinos (Kohn *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 2005). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 30-100 ng de ADN, 1X de PCR buffer, 200 µM de cada dNTP, 0.4 µM de cada iniciador, 2.5 mM de MgCl₂ y 1 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 µl; el programa del termociclador consistió en 30 ciclos de 94° C por 1 min, 50° C por 1 min y 72° C por 1 min, incluyendo una desnaturalización inicial de 94° C por 5 min y una elongación final de 72° C por 5 min.

Posteriormente, se usaron los iniciadores específicos y las condiciones estandarizadas en ADN extraído de muestras fecales de las siete especies de felinos,

utilizando 1 µl de ADN molde. Se probaron tres concentraciones distintas de BSA (Bovine Serum Albumin): 0.1, 0.5 y 1 µg/ µl. La BSA mejora el rendimiento y la especificidad de la PCR, al actuar como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la *Taq* polimerasa (Park y Lee, 2003). En todas las reacciones de PCR se incluyó un control negativo para monitorear una posible contaminación de los reactivos. Los productos de PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta.

4.7 PCR-RFLP

Se optimizaron las condiciones de digestión para las enzimas de restricción BtsCI y Tsp509I, utilizando los productos de PCR obtenidos con los iniciadores específicos, a partir de ADN de tejido. Se probaron diferentes cantidades de enzima y producto de PCR (ADN), así como distintos volúmenes y tiempos de reacción, con el fin de evitar la presencia de “actividad estrella” (característica propia de las enzimas de restricción, de mostrar cierta inespecificidad en el reconocimiento de sus secuencias dianas bajo condiciones no óptimas) y digestión nula o incompleta del producto de PCR (Nasri y Thomas, 1986; Salido, 1993). Posteriormente, se utilizaron las condiciones de digestión optimizadas para ambas enzimas, en productos de PCR obtenidos a partir de ADN de muestras fecales de las siete especies de felinos.

En todas las reacciones de restricción se incluyó un control negativo para monitorear una posible contaminación de los reactivos y los fragmentos digeridos se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2.5 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. También se utilizó producto de PCR sin digerir como control, para identificar una digestión fallida o incompleta (Cocolin *et al.*, 2000; Nagata *et al.*, 2005). Los patrones de restricción obtenidos se compararon con los predichos previamente con el programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003), para verificar que fueran iguales.

4.8 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos

En el presente trabajo se generaron secuencias del gen citocromo *b* de felinos, las cuales fueron analizadas para corroborar los patrones de restricción diagnósticos obtenidos a

partir de secuencias publicadas, encontrándose diferencias en los sitios de restricción predichos (ver sección 4.5). De igual forma, en estudios previos de identificación de mamíferos a través del método PCR-RFLP, se ha reportado la presencia de varios patrones de restricción en un mismo gen de una misma especie (polimorfismos intraespecíficos; Zehner *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2005; Fagundes y Nogueira, 2007).

Para evaluar la posible presencia de polimorfismos intraespecíficos en los patrones de restricción diagnósticos generados en este trabajo, se tomaron de GenBank secuencias nuevas del gen citocromo *b* de las especies de felinos silvestres de interés, ingresadas durante el desarrollo de este proyecto. Estas secuencias fueron cortadas virtualmente con el programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) y los patrones resultantes se compararon con los obtenidos en el presente estudio (Gómez-Moliner *et al.*, 2004).

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de secuencias nucleotídicas

5.1.1 Citocromo oxidasa *c* subunidad I (COI)

Se obtuvieron un total de 10 secuencias del código de barras del gen COI para seis especies de felinos. Con base en la verificación visual de los cromatogramas, todas las secuencias son de buena calidad y se encuentran disponibles en el proyecto “UNAM Mammals of Mexico” en el Barcode of Life Data System (BOLD) y en la base de datos de GenBank (Cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencias obtenidas del código de barras del gen COI para seis especies de felinos

Especie	Muestra	No. de identificación	No. de acceso	Longitud ^a
		Barcode	GenBank	
<i>Felis catus</i>	FC2	FCMUN283-09	GU686203	657
	FC3	FCMUN284-09	GU686200	657
<i>Puma yagouaroundi</i>	PY2	FCMUN274-09	GU686199	657
	PY3	FCMUN275-09	GU686196	654
<i>Leopardus wiedii</i>	LW2	FCMUN278-09	GU686202	647
<i>Leopardus pardalis</i>	LP1	FCMUN276-09	GU686205	616
	LP2	FCMUN277-09	GU686204	657
<i>Lynx rufus</i>	LR4	FCMUN279-09	GU686201	657
	LR5	FCMUN280-09	GU686198	655
<i>Puma concolor</i>	PC1	FCMUN282-09	GU686207	550

^aLongitud en pares de bases

5.1.2 Citocromo *b* (Cit *b*)

Se obtuvieron un total de 16 secuencias del gen completo de citocromo *b* (1140 pares de bases) para las siete especies de felinos: una de *F. catus* (muestra FC1), dos de *P. yagouaroundi* (muestras PY1 y PY2), tres de *L. wiedii* (muestras LW1, LW2 y LW3), tres de *L. rufus* (muestras LR1, LR2 y LR3), tres de *L. pardalis* (muestras LP1, LP2 y LP3), tres de *P. onca* (muestras PO1, PO2 y PO3) y una de *P. concolor* (muestra PC1). Con base en la verificación visual de los cromatogramas, todas las secuencias son de buena calidad.

5.2 Análisis de secuencias nucleotídicas

5.2.1 Citocromo oxidasa *c* subunidad I (COI)

Dada la variación en las longitudes de las secuencias obtenidas (ver Cuadro 4), se decidió delimitar el tamaño de todas las secuencias a 550 pares de bases. Este fragmento se localiza de la posición 143 a la 692, considerando la adenina del codón de inicio ATG del gen como la posición número 1, y de la posición 6358 a la 6908, conforme a la nomenclatura del genoma mitocondrial de *F. catus* (Número de acceso GenBank NC_001700; López *et al.*, 1996).

Se integró al análisis un fragmento de 550 pb del gen completo de COI de *P. concolor* tomado de GenBank (Número de acceso AY598484; Delisle y Strobeck, 2005), para contar como mínimo con dos secuencias por especie. Sin embargo, para *L. wiedii* y *P. onca* no se encontraron registros en las bases de datos de GenBank y BOLD (Cuadro 5).

Ninguna de las secuencias presentó inserciones, deleciones o codones de paro. Con base en el número de sitios variables, el intervalo de los valores promedio de diversidad intraespecífica fue de 0 a 0.54 %. Así, se identificaron ocho haplotipos en total (secuencias que difieren entre sí en uno o más nucleótidos) para las cinco especies de felinos, encontrándose que la muestra LW2 (inicialmente registrada como perteneciente a la especie *L. wiedii*) era idéntica a las muestras LP1 y LP2 de *L. pardalis* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diversidad nucleotídica y haplotípica en secuencias del gen COI (550 pb)

Especie	Tamaño de muestra	Sitios variables	Porcentaje	Haplotipo	Individuos
<i>Felis catus</i>	2	1	0.18	1 2	FC2 FC3
<i>Puma yagouaroundi</i>	2	0	0	1	PY2 y PY3
<i>Leopardus pardalis</i>	3	0	0	1	LP1, LP2 y LW2 ^a
<i>Lynx rufus</i>	2	3	0.54	1 2	LR4 LR5
<i>Puma concolor</i>	2	2	0.36	1 2	PC1 PCGB*

* Secuencia tomada de GenBank. ^a Muestra ingresada como perteneciente a la especie *L. wiedii*.

Para el análisis de distancias genéticas bajo el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura (K2P; Kimura, 1980), se incluyó un fragmento de 550 pb del gen completo de COI de lobo (*Canis lupus*) tomado de GenBank (Número de acceso AY598484; Delisle y Strobeck, 2005). Dicha secuencia se utilizó como grupo externo. Con base en la matriz obtenida de distancias genéticas pareadas (Apéndice 2), se elaboró un árbol de distancias y se estimaron los valores promedio en porcentaje de la divergencia genética dentro y entre especies. La topología del dendograma (Fig. 7) mostró a los individuos de una misma especie agrupados en los nodos terminales, todos con valores de bootstrap de 100%, concordando así, con el registro inicial de las muestras (con excepción de la muestra LW2 la cual, como se mencionó anteriormente, se ingresó en un principio

como perteneciente a la especie de *L. wiedii*). En cuanto a los resultados de distancia genética promedio (Cuadro 6), la divergencia intraespecífica varió de 0 a 0.55% con un promedio de 0.22%, la divergencia entre especies felinas se encontró en un intervalo de 10.53 (*P. yagouaroundsi* y *L. rufus*) a 16.66% (*P. yagouaroundsi* y *L. pardalis*) con un promedio de 13.87%, mientras que las distancias entre felinos y *C. lupus* se encontraron en un intervalo de 22.91 (para *F. catus*) a 24.53% (para *L. rufus*).

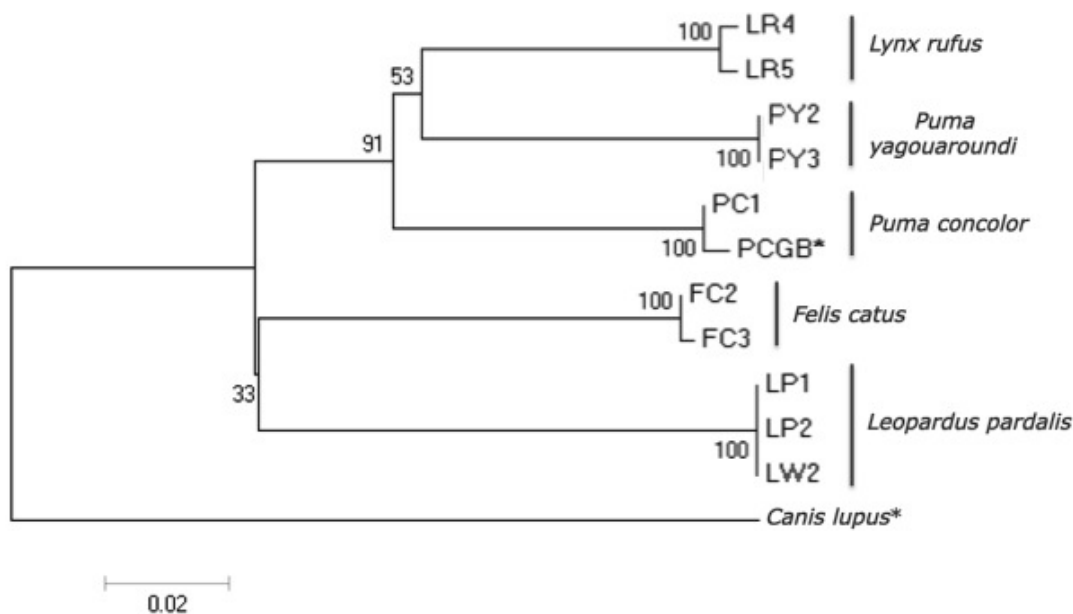


Figura 7. Dendrograma construido mediante el método de Neighbor-joining, utilizando secuencias de 550 pb del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I. Los números cercanos a los nodos indican los valores en porcentaje de bootstrap. * Secuencias tomadas de GenBank.

Cuadro 6. Distancias genéticas promedio intra e interespecíficas para el gen COI

Especie	Tamaño de muestra	Distancias ^a					
		1	2	3	4	5	6
1. <i>Felis catus</i>	2	0.18					
2. <i>Puma yagouaroundsi</i>	2	15.12	0				
3. <i>Leopardus pardalis</i>	3	14.93	16.66	0			
4. <i>Lynx rufus</i>	2	14.30	10.53	15.09	0.55		
5. <i>Puma concolor</i>	2	14.62	10.65	15.66	11.19	0.36	
6. <i>Canis lupus</i>	1	22.91	24.10	24.10	24.53	23.03	0

^a Las distancias se muestran en porcentaje.

5.2.2 Citocromo *b* (Cít *b*)

El gen completo de citocromo *b* (1140 pares de bases) se localiza de la posición 15038 a la 16177, conforme a la nomenclatura del genoma mitocondrial de *F. catus* (Número de acceso GenBank NC_001700; López *et al.*, 1996). Se integró al análisis las secuencias del gen completo de citocromo *b* de *F. catus* (Número de acceso GenBank AB004238) y *P. concolor* (Número de acceso GenBank AY598484; Delisle y Strobeck, 2005), para contar como mínimo con dos secuencias por especie (Cuadro 7).

Ninguna de las secuencias presentó inserciones, deleciones o codones de paro internos. Con base en el número de sitios variables, el intervalo de los valores promedio de diversidad intraespecífica fue de 0 a 4.37%. Este último valor pertenece a *L. wiedii* y resultó muy elevado en comparación con los encontrados en el resto de las especies, señalando la posibilidad de que las dos secuencias de *L. wiedii* en realidad pertenecían a especies distintas. Se identificaron 14 haplotipos en total (secuencias que difieren entre sí en uno o más nucleótidos) para las siete especies de felinos, encontrándose que la muestra LW2 (inicialmente registrada como perteneciente a la especie *L. wiedii*) era idéntica a la muestra LP2 de *L. pardalis* (Cuadro 7).

Para el análisis de distancias genéticas bajo el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura (K2P; Kimura, 1980), se incluyó la secuencia del gen completo de citocromo *b* de lobo (*C. lupus*) tomada de GenBank (Número de acceso AY598484; Delisle y Strobeck, 2005). Dicha secuencia se utilizó como grupo externo. Con base en la matriz obtenida de distancias genéticas pareadas (Apéndice 3) se elaboró un dendograma (Fig. 8). La topología del dendograma muestra a los individuos de una misma especie agrupados en los nodos terminales, todos con valores de bootstrap mayores al 90%, lo que concuerda con el registro inicial de las muestras. Las excepciones a lo anterior fueron las muestras LW2 y LW3, las cuales se agruparon con las muestras de *L. pardalis*, aunque en un principio se ingresaron como pertenecientes a la especie de *L. wiedii*. Esto se debió a que, como se mencionó anteriormente, la secuencia LW2 resultó idéntica a la secuencia LP2 y la distancia genética entre ésta y las secuencias LP1 y LP3 fue de 0.26%, mientras que con respecto a LW1, la distancia fue de 5.45% (Apéndice 3). De igual manera la distancia genética entre LW3 y las muestras de *L. pardalis* varió de 0.8 a 1.06%,

mientras que con respecto a LW1, la distancia fue de 5.84% (Apéndice 3). Por estos motivos, la muestra LW3 también se reubicó en el grupo de *L. pardalis*.

Cuadro 7. Diversidad nucleotídica y haplotípica en secuencias del gen completo de cit *b* (1140 pb)

Especie	Tamaño de muestra	Sitios variables	Porcentaje	Haplotipo	Individuos
<i>Felis catus</i>	2	5	0.44	1	FC1
				2	FCGB*
<i>Puma yagouaroundi</i>	2	0	0	1	PY1 y PY2
<i>Leopardus wiedii</i>	2	63	4.37	1	LW1
				2	LW3
<i>Leopardus pardalis</i>	3	4	0.35	1	LP1
				2	LP2 y LW2 ^a
				3	LP3
<i>Panthera onca</i>	3	9	0.79	1	PO1 y PO3
				2	PO2
<i>Lynx rufus</i>	3	4	0.35	1	LR1
				2	LR2
				3	LR3
<i>Puma concolor</i>	2	0	0	1	PC1 y PCGB*

* Secuencias tomadas de GenBank. ^a Muestra ingresada como perteneciente a la especie *L. wiedii*.

Así, se realizó nuevamente el análisis de diversidad nucleotídica para *L. pardalis* donde el valor promedio de variación intraespecífica aumentó de 0.35 a 0.90%, en tanto que *L. wiedii* quedó con un solo individuo por lo que no se realizaron cálculos de diversidad (Cuadro 8).

Utilizando nuevamente la matriz de distancias genéticas pareadas (Apéndice 3), se estimaron los valores promedio en porcentaje de la divergencia genética dentro y entre especies (Cuadro 9). El valor promedio de distancia intraespecífica no pudo ser calculado para *L. wiedii* por contar con un solo individuo, mientras que en el resto de las especies varió de 0 a 0.53% con un promedio de 0.28%. La divergencia entre especies felinas se encontró en un intervalo de 5.57 (*L. wiedii* y *L. pardalis*) a 16.72% (*P. onca* y *P. concolor*) con un promedio de 13.34%, en tanto que las distancias entre felinos y *C. lupus* se encontraron en un intervalo de 23.63 (para *L. wiedii*) a 26.70% (para *L. rufus*).

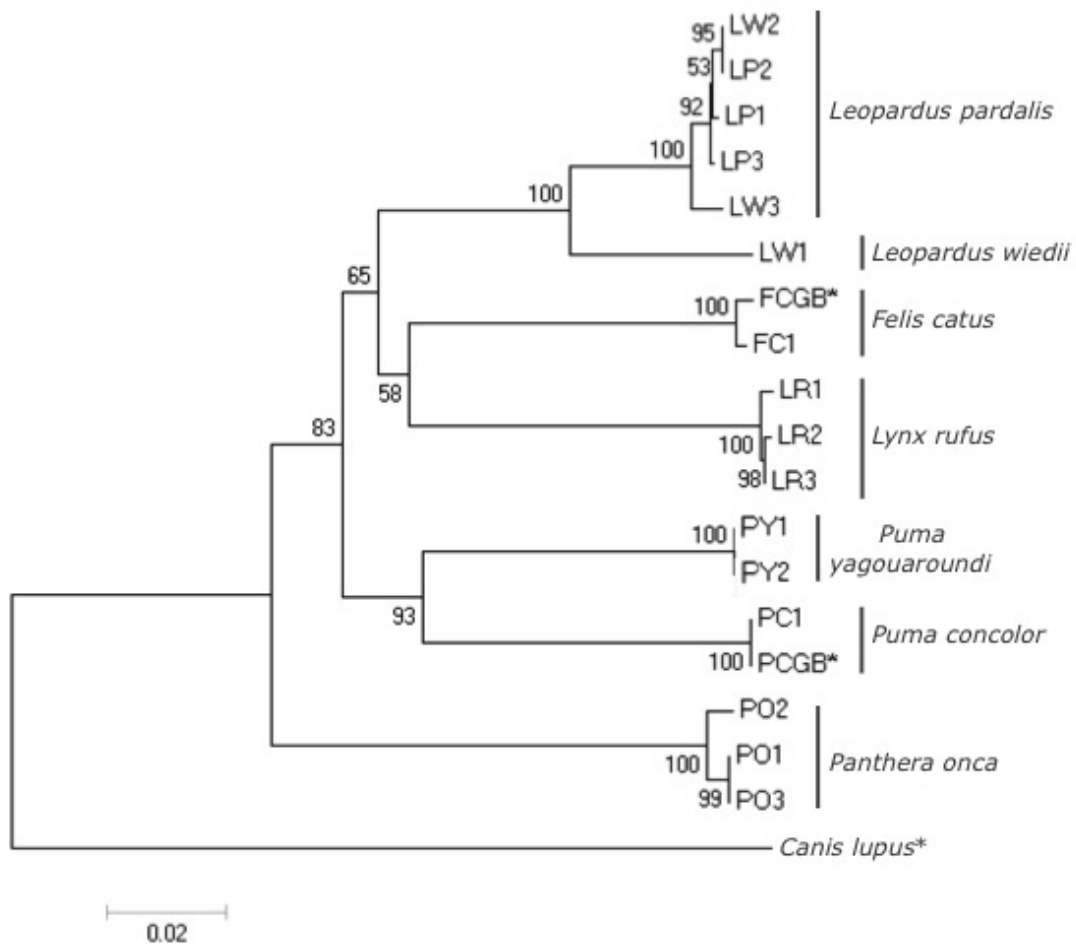


Figura 8. Dendrograma construido mediante el método de Neighbor-joining, utilizando secuencias del gen completo citocromo *b* (1140 pb). Los números cercanos a los nodos indican los valores en porcentaje de bootstrap. * Secuencias tomadas de GenBank.

Cuadro 8. Diversidad nucleotídica y haplotípica en secuencias del gen completo de cit *b* (1140 pb) reubicadas en las especies de *L. wiedii* y *L.pardalis*

Especie	Tamaño de muestra	Sitios variables	Porcentaje	Haplotipo	Individuos
<i>Leopardus wiedii</i>	1	-	-	1	LW1
<i>Leopardus pardalis</i>	5	13	0.9	1	LP1
				2	LP2 y LW2 ^a
				3	LP3
				4	LW3 ^a

^a Muestras ingresadas como pertenecientes a la especie *L. wiedii*.

Cuadro 9. Distancias genéticas promedio intra e interespecíficas para el gen cit *b*

Especie	Tamaño de muestra	Distancias ^a							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Felis catus</i>	2	0.44							
2. <i>Puma yagouaroundi</i>	2	13.04	0						
3. <i>Leopardus wiedii</i>	1	12.87	13.70	0					
4. <i>Leopardus pardalis</i>	5	11.94	13.15	5.57	0.51				
5. <i>Panthera onca</i>	3	15.02	14.96	16.02	15.42	0.53			
6. <i>Lynx rufus</i>	3	11.75	13.70	12.80	12.17	15.29	0.23		
7. <i>Puma concolor</i>	2	13.52	10.73	13.98	12.70	16.72	15.16	0	
8. <i>Canis lupus</i>	1	24.67	24.28	23.63	24.82	24.80	26.70	25.37	0

^a Las distancias se muestran en porcentaje.

5.3 Identificación de patrones de restricción diagnósticos y diseño de iniciadores específicos para felinos

Se utilizó el gen citocromo *b* para el diseño y estandarización del método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP, debido a que sólo en este gen se obtuvieron secuencias para las siete especies de felinos. Como resultado del análisis de los haplotipos de las secuencias del gen citocromo *b* con el programa NEBcutter v.2.0 (Vincze *et al.*, 2003), se encontró que sólo las enzimas BtsCI y Tsp509I generaban patrones de restricción diagnósticos que cumplían los criterios requeridos (ver sección 4.5) en una región pequeña del gen (≤ 300 pb).

Para amplificar dicha región y tomando como base el alineamiento de las secuencias de felinos (haplotipos) y de las secuencias auxiliares de otros mamíferos (ver Cuadro 3), se diseñaron 12 iniciadores degenerados potenciales. De éstos, FelidCB12 (FCB12, 5'-CYACCCTAACACGATTCTT-3') y FelidCB7R (FCB7R, 5'-TCTGGTGA GAATAGRACG-3') fueron seleccionados como los más adecuados, utilizando el programa OLIGO Primer Analysis Software v. 6.51 (Rychlik, 2001). El iniciador FCB7R fue diseñado para amplificar ADN de las siete especies de felinos bajo estudio, pero no de las otras especies de mamíferos incluidas en el alineamiento (Fig. 9).

	710	720	730	740	750	760	770
<i>Felis catus</i> H1	TACTAGTTTTT	AACACTCATACTACT	CGTCTATTTTC	ACCAGACCTGCTAGGAG	ACCAGACACTACATC		
<i>Felis catus</i> H2							G
<i>Herpailurus yagouaroundi</i> H1	T	A		T	C	AT	T
<i>Leopardus wiedii</i> H1	C	A	C	T	T	C	G
<i>Leopardus pardalis</i> H1	C	A		T	T	C	T
<i>Leopardus pardalis</i> H2	C	A		T	T	C	T
<i>Leopardus pardalis</i> H3	C	A		T	T	C	T
<i>Puma concolor</i> H1	C	T	A	C	G	C	T
<i>Panthera onca</i> H1	A	CC	T	G	C	A	T
<i>Panthera onca</i> H2	A	CC	T	G	C	AT	T
<i>Lynx rufus</i> H1	A	CC	G	T	C	G	A
<i>Lynx rufus</i> H2	A	CC	G	T	C	G	A
<i>Lynx rufus</i> H3	A	CC	G	T	C	G	A
<i>Canis familiaris</i>	C	C	CC	TC	A	TC	TT
<i>Canis latrans</i>	C	C	CC	G	C	A	AC
<i>Bassariscus astutus</i>	T	CA	T	TT	T	GGTT	A
<i>Bassariscus sumichrasti</i>	C	CA	T	T	T	GG	T
<i>Eira barbara</i>	C	C	C	T	G	A	A
<i>Galictis vittata</i>	C	CCC	G	T	A	T	A
<i>Mephitis mephitis</i>	C	TA	T	TC	ACCT	A	T
<i>Mustela frenata</i>	C	TA	C		A	A	C
<i>Nasua narica</i>	C	AC	T	T	A	GA	A
<i>Procyon lotor</i>	C	TA	TGT	T	GGTT	A	G
<i>Taxidea taxus</i>	TA	CAC	CCT	A	G	A	AT
<i>Didelphis virginiana</i>	A	A	A	T	TT	TC	TC
<i>Homo sapiens</i>	CT	CC	C	CT	CT	A	G

Figura 9. Fragmento del alineamiento de las secuencias del gen citocromo *b* (1140 pb) utilizadas en el diseño de iniciadores específicos. Se indica el número de haplotipo en las secuencias de especies felinas y se muestra la ubicación del iniciador FCB7R (secuencia subrayada) así como las bases que difieren con respecto a la secuencia de referencia *Felis catus* H1.

Como producto de la amplificación con el par de iniciadores FCB12 y FCB7R se esperaba un fragmento de 226 pb, mismo que sería digerido con las enzimas BtsCI y Tsp509I, cuyas secuencias dianas y sitios de corte (indicados con los símbolos \blacktriangle \blacktriangledown) son 5'-GGATG \blacktriangle NN \blacktriangledown -3' (generando extremos cohesivos monocadena 3') y 5'- \blacktriangledown AATT \blacktriangle -3' (generando extremos cohesivos monocadena 5') respectivamente. De acuerdo con la predicción del programa NEBcutter v.2.0 (Vincze *et al.*, 2003), la digestión con la enzima BtsCI permitiría identificar cinco de las siete especies de felinos, al producir un patrón de restricción distinto para *H. yagouaroundi*, *L. wiedii*, *L. pardalis*, *P. concolor* y *P. onca* pero igual para *F. catus* y *L. rufus*, las cuales a su vez, podrían distinguirse al realizar otra digestión con la enzima Tsp509I (Cuadro 10 y Figura 10). La ubicación del fragmento de 226 pb, el par de iniciadores y los sitios de restricción de las dos enzimas en las secuencias del gen completo de citocromo *b*, se muestran en el Apéndice 4.

Cuadro 10. Predicción del patrón de digestión del fragmento de 226 pares de bases del gen citocromo *b* a partir de las secuencias obtenidas en el presente estudio

Especie	Digestión 1		Digestión 2	
	BtsCI ^a	Bandas ^b	Tsp509I ^a	Bandas ^b
<i>Felis catus</i>	31, 117, 166	31, 49, 60, 86	112	112, 114
<i>Lynx rufus</i>	31, 117, 166	31, 49, 60, 86	157	69, 157
<i>Puma yagouaroundi</i>	117	109, 117		
<i>Leopardus wiedii</i>	31, 117, 166, 175	9, 31, 49, 51, 86		
<i>Leopardus pardalis</i>	31, 166	31, 60, 135		
<i>Puma concolor</i>	143	83, 143		
<i>Panthera onca</i>	31	31, 195		

^a Posición en pares de bases en donde ocurre el corte de la enzima. ^b Tamaño en pares de bases de las bandas generadas por el corte de la enzima.

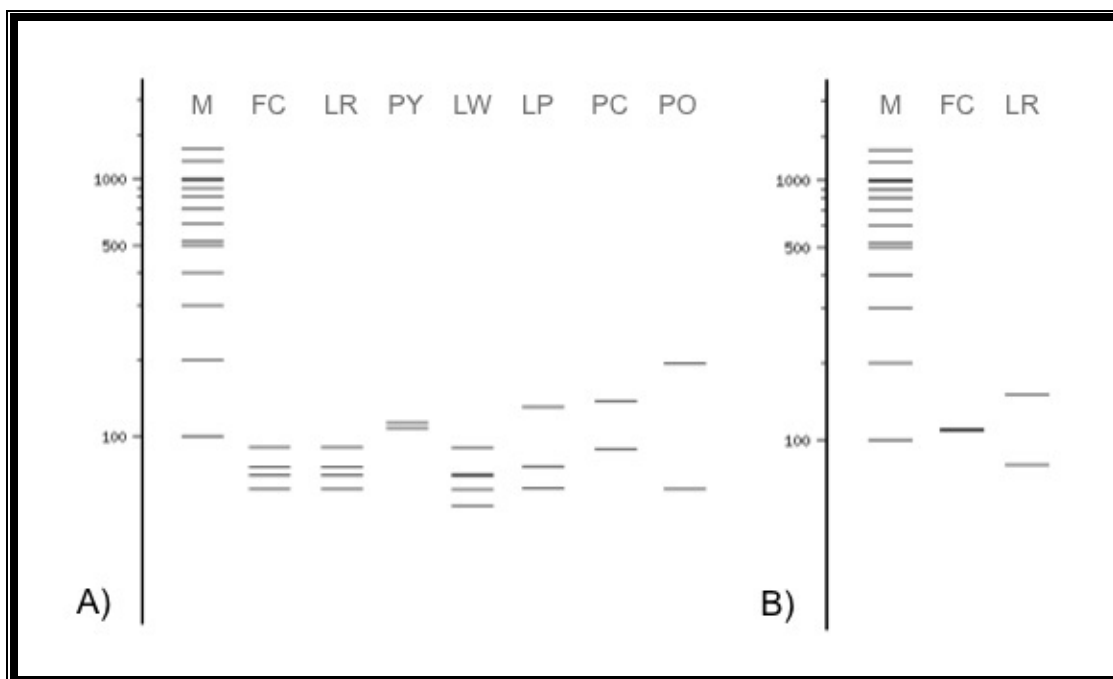


Figura 10. Esquema de la predicción del patrón de digestión del fragmento de 226 pares de bases del gen citocromo *b*, realizado con el programa NEBcutter v.2.0. A) Enzima BtsCI. B) Enzima Tsp509I. M= Marcador de peso molecular de 100 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, PY= *P. yagouaroundi*, LW= *L. wiedii*, LP= *L. pardalis*, PC= *P. concolor*, PO= *P. onca*. El tamaño de las bandas (de abajo hacia arriba) se indica en el cuadro 10 (de menor a mayor). Las bandas 49 y 51 en *L. wiedii* y 112 y 114 en *F. catus* para la enzima Tsp509I, se observan como una sola banda de color más intenso.

5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos para felinos: estandarización y evaluación

Las condiciones de amplificación estandarizadas para los iniciadores sintetizados FCB12 y FCB7R, a partir de ADN de tejido, fueron: 30-100 ng de ADN, 1X de PCR buffer, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 μ M de cada iniciador, 2.5 mM de $MgCl_2$ y 1 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 μ l; el programa del termociclador consistió en 40 ciclos de 94° C por 1 min, 54° C por 1 min y 72° C por 2 min, incluyendo una desnaturalización inicial de 94° C por 2 min y una elongación final de 72° C por 5 min. Los resultados de la PCR con los iniciadores sintetizados fueron los esperados, pues se obtuvo amplificación del fragmento de 226 pb del gen citocromo *b* en las siete especies de felinos, más no en ninguna de las otras especies. Asimismo, en todas las especies se amplificó exitosamente el fragmento de 480 pb del gen citocromo *b* (con los iniciadores universales MVZ05 y MVZ04), utilizado como control positivo (Fig. 11). Lo anterior, constató la presencia de ADN amplificable en las especies no felinas y por lo tanto, la especificidad del iniciador FCB7R.

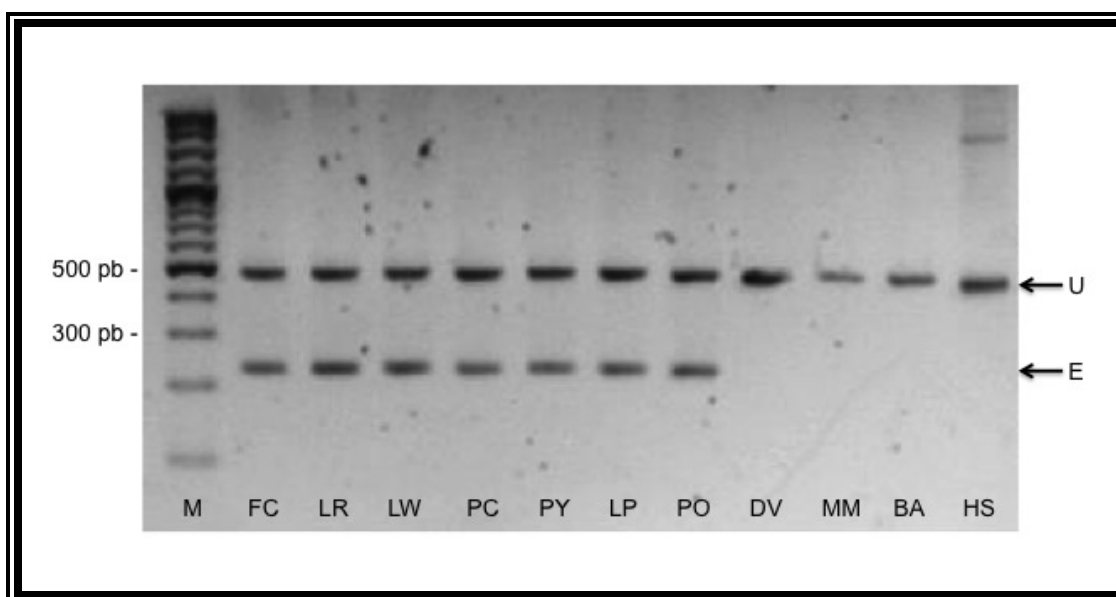


Figura 11. Amplificación del fragmento de 226 pb con los iniciadores específicos (E) y del fragmento de 480 pb con los iniciadores universales (U), ambos pertenecientes al gen citocromo *b*. Los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 100 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, LW= *L. wiedii*, PC= *P. concolor*, PY= *P. yagouaroundi*, LP= *L. pardalis*, PO= *P. onca*, DV= *D. virginiana*, MM= *M. macroura*, BA= *B. astutus* y HS= *H. sapiens*. Las reacciones de PCR se realizaron por separado, utilizando ADN de tejido. La banda inespecífica que se observa en *H. sapiens*, se obtuvo en la amplificación con los iniciadores universales.

Posteriormente, se utilizaron los iniciadores sintetizados y las condiciones estandarizadas en ADN fecal. Para la amplificación del fragmento de 226 pb del gen citocromo *b*, se probaron reacciones con BSA (tres concentraciones: 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y sin ésta, en ADN de *F. catus* (Fig. 12). Sin embargo, no se observaron diferencias entre las bandas obtenidas sin y con BSA, por lo que no se incluyó en las reacciones de amplificación de ADN fecal del resto de las especies felinas (Fig. 13).

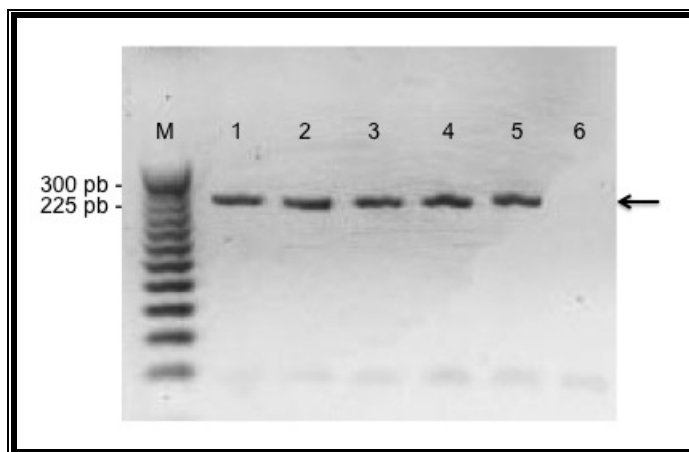


Figura 12. Amplificación del fragmento de 226 pb del gen citocromo *b*, a partir de ADN de *F. catus*. La flecha señala el producto de amplificación esperado, mientras que los números a la izquierda, indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb. 1= ADN de tejido utilizado como control positivo, 2= ADN fecal sin BSA, 3= ADN fecal con 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA, 4= ADN fecal con 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA, 5= ADN fecal con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA, 6= control negativo.

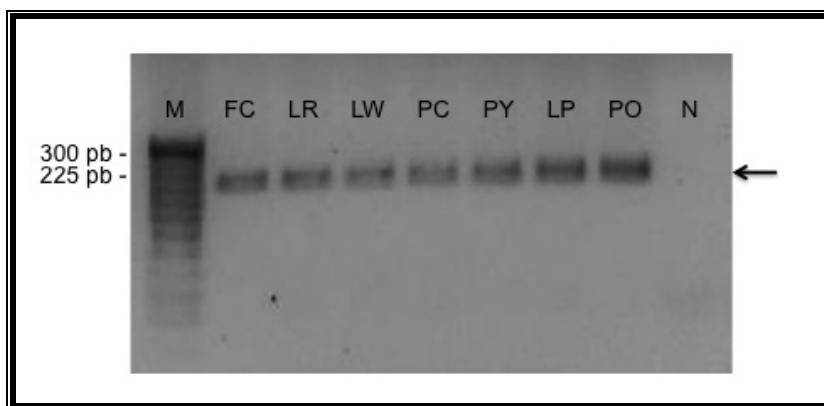


Figura 13. Amplificación del fragmento de 226 pb del gen citocromo *b*, a partir de ADN fecal de las siete especies de felinos. La flecha señala el producto de amplificación esperado, mientras que los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, LW= *L. wiedii*, PC= *P. concolor*, PY= *P. yagouaroundi*, LP= *L. pardalis*, PO= *P. onca*, N= control negativo.

5.5 PCR-RFLP

5.5.1 Enzima BtsCI

Las condiciones de digestión optimizadas para la enzima BtsCI, a partir de ADN de tejido, fueron: 9 µl de producto de PCR (fragmento de 226 pb), 1X de buffer de digestión (suministrado con la enzima por el proveedor), 1 unidad de enzima de restricción y 8.95 µl de agua destilada para un volumen final de 20 µl; la reacción se incubó a 50° C por dos horas. Los resultados de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* concordaron con los predichos, pues se obtuvieron los patrones de restricción especie-específicos que permitieron diferenciar a cinco de las siete especies de felinos (Fig. 14) : *L. wiedii* presentó cinco fragmentos de 9, 31, 49, 51 y 86 pb, de los cuales, dos se observaron como una sola banda (49 y 51 pb), mientras que el de menor tamaño (9 pb) no se observó en el gel; *P. concolor* presentó dos fragmentos de 83 y 143 pb; *P. yagouaroundi* presentó dos fragmentos de 109 y 117 pb que se observaron como una sola banda; *L. pardalis* presentó tres fragmentos de 31, 60 y 135 pb, de los cuales el menor (31 pb), se observó como una banda muy tenue; finalmente, *P. onca* presentó dos fragmentos de 31 y 195 pb, de los cuales el menor (31pb), se observó como una banda muy tenue.

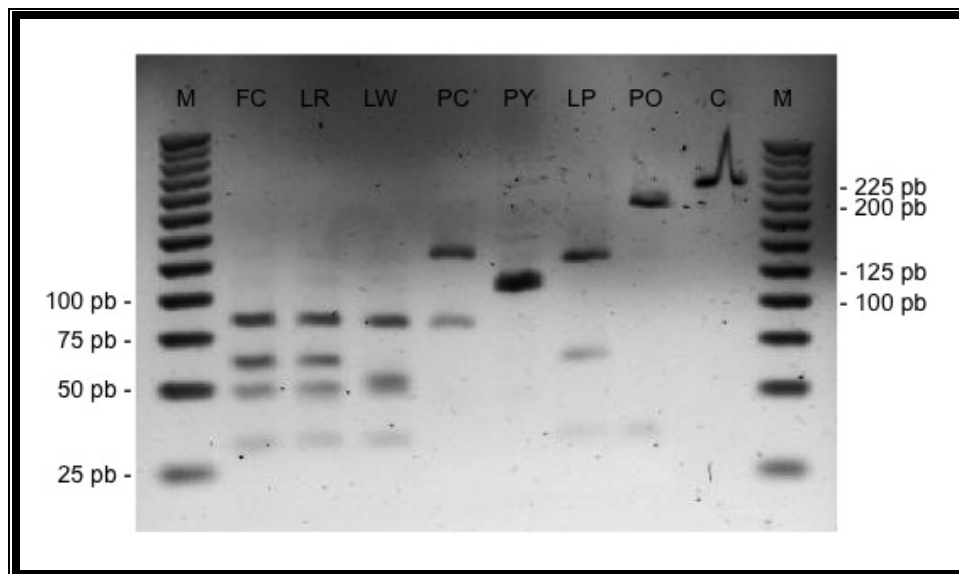


Figura 14. Patrón de bandeo resultante de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* con la enzima BtsCI, obtenido a partir de ADN de tejido de las siete especies de felinos. Los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, LW= *L. wiedii*, PC= *P. concolor*, PY= *P. yagouaroundi*, LP= *L. pardalis*, PO= *P. onca*, C= producto sin digerir utilizado como control.

Posteriormente, se utilizaron las condiciones optimizadas para la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* obtenido a partir de ADN fecal. Los patrones de restricción especie-específicos encontrados fueron iguales a los obtenidos a partir de ADN de tejido (Fig. 15). En ambos casos, *F. catus* y *L. rufus* presentaron cuatro fragmentos de 31, 49, 60 y 86 pb, concordando nuevamente con el patrón predicho.

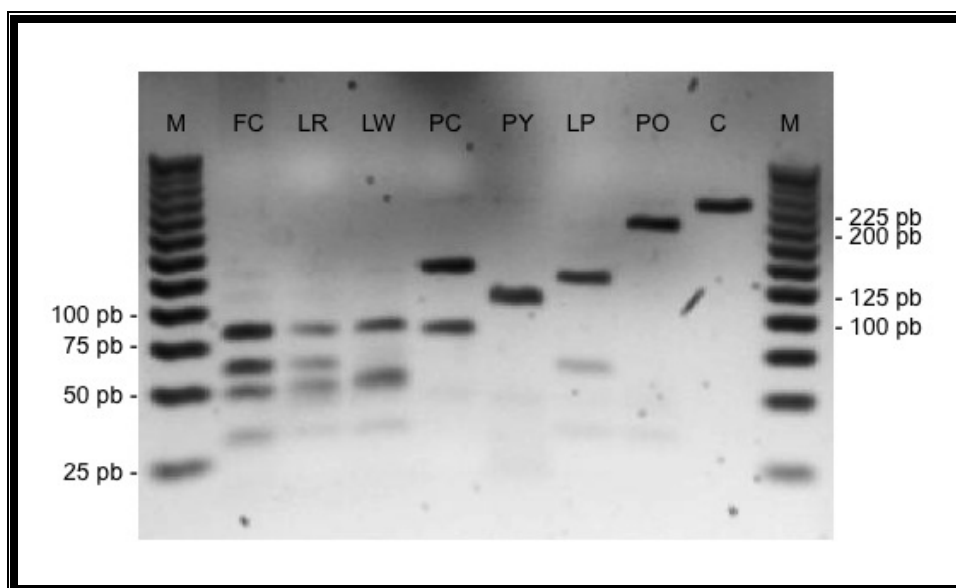


Figura 15. Patrón de bandeo resultante de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* con la enzima BtsCI, obtenido a partir de ADN fecal de las siete especies de felinos. Los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, LW= *L. wiedii*, PC= *P. concolor*, PY= *P. yagouaroundi*, LP= *L. pardalis*, PO= *P. onca*, C= producto sin digerir utilizado como control.

También se digirieron productos de 226 pb del gen citocromo *b* obtenidos a partir de ADN de tejido de las muestras LW2 y LW3. Como se mencionó anteriormente, estas muestras se ingresaron inicialmente como pertenecientes a la especie de *L. wiedii*. Sin embargo, tras el análisis de las secuencias de los genes COI y citocromo *b* (ver sección 5.2), se observó que ambas muestras en realidad pertenecían a la especie de *L. pardalis*. Por lo tanto, como resultado de la digestión con la enzima BtsCI, las dos muestras presentaron el patrón de *L. pardalis* con tres fragmentos de 31, 60 y 135 pb (Fig. 16).

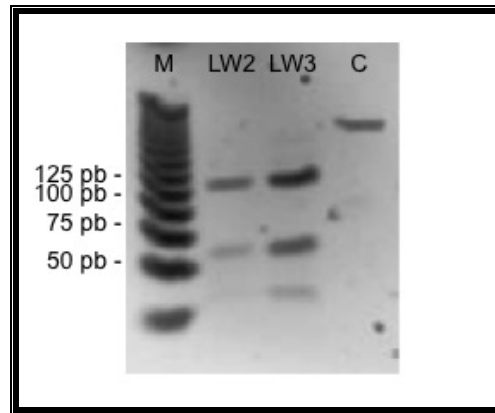


Figura 16. Patrón de bandeo resultante de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* con la enzima BtsCI, obtenido a partir de ADN de tejido de las muestras LW2 y LW3. Los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb, C= producto sin digerir utilizado como control.

5.5.2 Enzima Tsp509I

Las condiciones de digestión optimizadas para la enzima Tsp509I, a partir de ADN de tejido, fueron: 9 µl de producto de PCR (fragmento de 226 pb), 1X de buffer de digestión (suministrado con la enzima por el proveedor), 1 unidad de enzima de restricción y 8.9 µl de agua destilada para un volumen final de 20 µl; la reacción se incubó a 65° C por una hora. Tanto para ADN de tejido como para ADN fecal, los resultados de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* concordaron con los predichos (Fig. 17): *F. catus* presenta dos fragmentos de 112 y 114 pb que se observan como una sola banda, mientras que *L. rufus* presenta dos fragmentos de 69 y 157 pb.

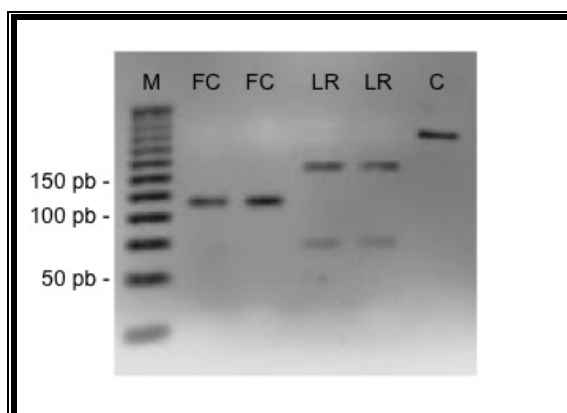


Figura 17. Patrón de bandeo resultante de la digestión del producto de 226 pb del gen citocromo *b* con la enzima Tsp509I, obtenido a partir de ADN de tejido y fecal. El segundo carril de cada especie muestra la digestión a partir de ADN fecal. Los números indican el tamaño de las bandas, en pares de bases, del marcador molecular. M= Marcador de peso molecular de 25 pb, FC= *F. catus*, LR= *L. rufus*, C= producto sin digerir utilizado como control.

5.6 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos

Como resultado de la búsqueda en GenBank de secuencias del gen citocromo *b* pertenecientes a las especies de felinos silvestres de interés, se encontraron un total de 70 secuencias de las cuales se tomaron aquellas que incluían el fragmento de 226 pb diagnóstico: tres de *L. rufus*, dos de *P. onca* y una de *P. concolor*. El fragmento de 226 pb fue extraído de las secuencias y cortado virtualmente con el programa NEBcutter v.2.0, observándose que los patrones de restricción resultantes coincidían con los patrones obtenidos previamente en este trabajo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Predicción del patrón de digestión del fragmento de 226 pares de bases del gen citocromo *b* a partir de secuencias tomadas de GenBank*

Especie	No. de acceso Genbank	Digestión 1		Digestión 2	
		BtsCI ^a	Bandas ^b	Tsp509I ^a	Bandas ^b
<i>Lynx rufus</i>	GU175436	31, 117, 166	31, 49, 60, 86	157	69, 157
	NC_014456	31, 117, 166	31, 49, 60, 86	157	69, 157
	GQ979707	31, 117, 166	31, 49, 60, 86	157	69, 157
<i>Panthera onca</i>	GU175435	31	31, 195		
	HM107682	31	31, 195		
<i>Puma concolor</i>	GU175442	143	83, 143		

* Secuencias no utilizadas anteriormente en este estudio. ^a Posición en pares de bases en donde ocurre el corte de la enzima. ^b Tamaño en pares de bases de las bandas generadas por el corte de la enzima.

6. DISCUSIÓN

En la biología, la mayor parte de los estudios, ya sean con base en moléculas, células, individuos o poblaciones, tienen como referencia el nivel de especie, haciendo de éste una unidad fundamental en diversos campos como la sistemática, ecología, evolución y biología de la conservación, entre otros (Wiens y Servedio, 2000; Balakrishnan, 2005). Es por ello que la investigación en cualquiera de estas áreas de la biología requiere de una adecuada delimitación e identificación de especies, dos tareas estrechamente relacionadas pero distintas entre sí.

La delimitación de especies es el proceso mediante el cual se establecen los límites entre una especie y otra, permitiendo así el descubrimiento de nuevas especies. Esta tarea es dominio de la taxonomía y para su realización se requiere de un concepto de especie, siendo el más utilizado el concepto morfológico, en el cual se clasifica a un grupo de individuos como una especie con base en uno o más caracteres morfológicos compartidos llamados “diagnósticos”, mismos que no se encuentran presentes en otras especies presuntamente debido a la ausencia de flujo genético entre ellas (Wiens y Servedio, 2000; Balakrishnan, 2005; DeSalle *et al.*, 2005; Wiens, 2007; Rach *et al.*, 2008). La identificación de especies es la actividad a seguir después de la delimitación de especies y consiste en la asignación de individuos a una especie previamente establecida. Así, ecólogos, fisiólogos y biólogos evolutivos entre otros, hacen uso de la información suministrada por la taxonomía como una información previa para estructurar la suya, al identificar los organismos con los que están trabajando utilizando las clasificaciones (delimitaciones) creadas con base en el trabajo de taxónomos y biólogos enfocados en el estudio de la especiación (DeSalle *et al.*, 2005; DeSalle, 2006; Lanteri, 2007; Valdecasas, 2011).

Al igual que en la delimitación de especies, el criterio morfológico ha sido el más utilizado en el proceso de identificación de especies. Sin embargo, este método puede generar identificaciones erróneas debido a varios factores como son: 1) la plasticidad fenotípica entre organismos de una misma especie; 2) la presencia de especies crípticas (especies que morfológicamente son casi idénticas pero que se encuentran aisladas reproductivamente); 3) la existencia de evolución convergente, donde una misma característica fenotípica puede aparecer independientemente en organismos no

relacionados filogenéticamente; y 4) problemas prácticos con claves taxonómicas como definiciones imprecisas de caracteres, inclusión de caracteres sólo para un estadio de vida o género, escasez de ilustraciones, falta de datos actualizados, necesidad de conocimiento y experiencia para su uso, así como su inaccesibilidad para muchos investigadores en países no desarrollados (Hebert *et al.*, 2003; Balakrishnan, 2005; Pereira *et al.*, 2008). Además, en algunos casos la identificación se hace con caracteres internos (como los craneales) lo cual requiere del sacrificio del ejemplar, resultando inadecuado en muchas ocasiones como cuando se trabaja con especies protegidas. Por estos motivos, desde la segunda mitad del siglo pasado la identificación de especies ha comenzado a realizarse alternativamente con base en datos moleculares (identificación genética o molecular de especies), destacando entre los marcadores más utilizados el ADNmt y más específicamente, los genes citocromo oxidasa *c* subunidad I (COI) y citocromo *b* (Parson *et al.*, 2000; Hebert *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008).

6.1 Análisis de secuencias de los genes citocromo oxidasa *c* subunidad I y citocromo *b*

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que la variación en las secuencias de ADN puede utilizarse para la identificación de especies (Ward *et al.*, 2005). Para esto suelen emplearse diversos enfoques, siendo de los más comunes el fenético. En éste, se usan métodos de distancia para obtener un árbol cuyos agrupamientos terminales muestren las inferencias sobre la asignación de individuos a determinadas especies (Steinke *et al.*, 2005; Lanteri, 2007; Lowenstein *et al.* 2009). Esta metodología se ha aplicado en distintos grupos taxonómicos utilizando distintos marcadores moleculares, donde los genes citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I (COI) se encuentran entre los más empleados para vertebrados (Hsieh *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007). Conforme se ha incrementado el número de secuencias disponibles del gen citocromo *b*, se ha observado que la variación en este gen posiblemente se encuentra distribuida en patrones predecibles entre especies relacionadas, los cuales muestran un alto nivel de congruencia con los límites de especie establecidos por la taxonomía clásica (Johns y Avise, 1998; Avise y Walker 1999; Bradley y Baker, 2001). Bradley y Baker (2001) analizaron los valores de divergencia del gen citocromo *b* en mamíferos y propusieron que cuando éstos son menores al 2%, son indicativos de variación intraespecífica, cuando son mayores al 11% son indicativos de variación interespecífica, mientras que entre especies hermanas encontraron valores del 4 al 11%. Debido a las tasas evolutivas aproximadamente similares

de los genes COI y citocromo *b*, los valores de diversidad de este último se han utilizado como punto de referencia para los valores encontrados en COI (Hebert *et al.*, 2003; Clare *et al.*, 2007; Lanteri, 2007).

Puesto que las muestras usadas en el presente trabajo provenían de individuos previamente identificados (con base en caracteres morfológicos) por el personal de la institución donante, las secuencias obtenidas de los genes COI y citocromo *b*, 10 y 16 respectivamente, fueron analizadas utilizando los dos enfoques fenéticos anteriormente mencionados (umbrales de similitud y agrupamiento de secuencias), para corroborar que éstas pertenecieran al gen y especie de felino correspondiente. Así, se identificó que los individuos LW2 y LW3, inicialmente registrados como pertenecientes a la especie de *L. wiedii*, en realidad correspondían a la especie de *L. pardalis*.

Los ejemplares LW2 y LW3 se encontraban albergados en los CIVS de la SEMARNAT y debido a que ambos eran juveniles, de aproximadamente 9 y 11 meses de edad respectivamente (Fig. 18A), no es de extrañar el error en su identificación. El motivo de esto es que la mayoría de los caracteres morfológicos distintivos entre *L. pardalis* (complejión robusta, longitud de la cola 26 a 30% de la longitud total, presencia de crestas en el cráneo) y *L. wiedii* (menor tamaño, longitud de la cola 35 a 45% de la longitud total) sólo se pueden observar en adultos (Figs. 18C y 18D), haciendo que los individuos juveniles de ambas especies sean casi indistinguibles (Díaz, 2000; Sunquist y Sunquist, 2002). Por esta razón, el personal de la SEMARNAT basó la identificación de los ejemplares juveniles en la presencia de alrededor de 5 líneas en el cuello de éstos (Fig. 18B), característica atribuida a la especie de *L. wiedii* en la “Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la CITES” (Sánchez *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha señalado que los patrones de manchas y líneas formadas por éstas, son altamente variables entre las dos especies por lo que su uso puede generar identificaciones erróneas, como sucedió en este caso (Reid, 2009).

De esta manera, reasignando las muestras LW2 y LW3 a la especie de *L. pardalis*, ninguno de los haplotipos obtenidos para los genes COI y citocromo *b* se encontró repetido en más de una especie y el agrupamiento de éstos en el árbol de distancias, ubicó más cercanamente a los individuos de una misma especie con valores de bootstrap mayores al 90%. Lo anterior se dio como resultado de la divergencia genética encontrada dentro y

entre las especies. Para el gen COI, la divergencia genética promedio intraespecífica fue de 0.22%, resultando similar a la encontrada en peces (0.39%; Ward *et al.*, 2005), aves (0.43%; Hebert *et al.*, 2004) y mamíferos (0.5%; Borisenko *et al.*, 2007). De igual forma, la distancia promedio interespecífica hallada entre especies felinas, que fue de 13.87%, es similar al promedio estimativo entre especies a nivel de familia (15.5%; Ward *et al.*, 2005; Lanteri, 2007). Para el gen citocromo *b*, la divergencia genética promedio al interior de las especies fue de 0.28%, resultando similar a la encontrada por Tamada y colaboradores (2005) para gato doméstico (*F. catus*, 0.69%), así como a la reportada por Masuda y colaboradores (2008) para la civeta enmascarada de las palmas (*Paguma larvata*, 0.34%). Asimismo, la distancia promedio interespecífica hallada entre especies felinas, que fue de 13.34%, es similar a la encontrada por Masuda y colaboradores (1996) entre 20 especies de felinos (12.6%), así como a la encontrada por Hsieh y colaboradores (2001) entre seis especies de felinos (14.6%). Los valores aquí reportados para los genes COI y citocromo *b* se hallan dentro de los umbrales de diversidad (<2% intraespecífica, >11% interespecífica) propuestos por Bradley y Baker (2001), demostrando así la utilidad de ambos genes como marcadores moleculares para la identificación de especies felinas, por presentar una mucha mayor divergencia genética entre especies que dentro de ellas (Hajibabaei *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008).

Además de la divergencia genética, otro aspecto a considerar en la identificación molecular de especies es la presencia de pseudogenes nucleares de origen mitocondrial (conocidos como “Numts”; López *et al.*, 1994). Con el fin de evitar la necesidad de purificar el ADNmt, comúnmente se utiliza la secuenciación directa de productos amplificados mediante PCR a partir de ADN genómico, lo cual en ocasiones ha resultado en la coamplificación accidental de copias nucleares de los genes COI (Williams y Knowlton, 2001) y citocromo *b* (Smith *et al.*, 1992). Las probabilidades de amplificar Numts aumentan cuando se utilizan primers universales, debido a que éstos hibridizan a los pseudogenes nucleares igual o en mayor medida que a los genes mitocondriales. De darse el caso, la amplificación y secuenciación de Numts puede complicar significativamente la determinación precisa de las secuencias mitocondriales de interés, y por lo tanto generar problemas interpretativos en la identificación de especies. Por esta razón, es recomendable verificar cuidadosamente las señales que indicarían la presencia de Numts como son: ambigüedades en el electroferograma (picos heterocigotos y posiciones sin bases asignadas), modificaciones en el marco de lectura (generadas por inserciones y/o

deleciones) y codones de paro internos (Smith *et al.*, 1992; Bensasson *et al.* 2001; Clare *et al.*, 2006) . Puesto que durante el análisis de las secuencias no se observó ninguno de las características mencionadas anteriormente, se concluye que las secuencias aquí utilizadas provienen de genomas mitocondriales.

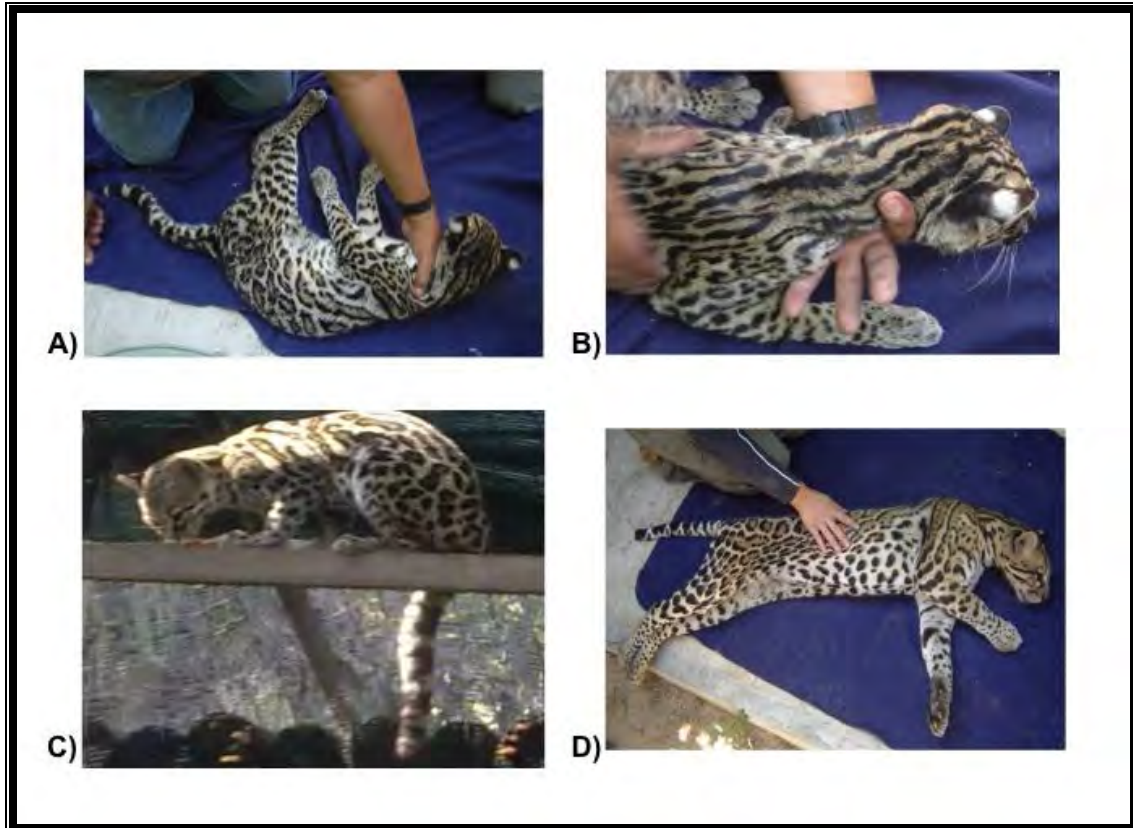


Figura 18. Ejemplares muestreados de las especies *L. wiedii* y *L. pardalis*. A) Ejemplar LW2 de aproximadamente 9 meses de edad; B) Vista de las líneas del cuello del ejemplar LW2, en la cuales se basó su identificación inicial; C) Ejemplar LW1 de aproximadamente 5 años de edad; D) Ejemplar LP3 de aproximadamente 7 años de edad (Fotos: Anahí Mejía).

Así pues, se realizó con éxito la identificación fenética de las secuencias mitocondriales, debido en buena medida al tamaño obtenido de éstas: 1140 pb para citocromo *b* (gen completo) y 550 pb para COI (85% del código de barras; Hajibabaei *et al.*, 2007). Tales longitudes fueron posibles gracias a la buena calidad del ADN, para lo cual fue necesario la colecta de muestras frescas o bien preservadas. Sin embargo, cuando se trabaja con muestras cuyo ADN pudiera encontrarse degradado, las probabilidades de obtener secuencias de dichas longitudes son muy bajas o nulas (Borisenko *et al.*, 2008). Hajibabaei y colaboradores (2006b) obtuvieron la secuencia completa del código de barras

en sólo 24% de 91 especímenes de museo de avispas del género *Apanteles*, conservados en etanol; mientras que Hsieh y colaboradores (2001), no pudieron amplificar el gen completo de citocromo *b* a partir de muestras de tres huesos confiscados, presuntamente pertenecientes a tigre (*Panthera tigris*). De manera similar, Gómez-Moliner y colaboradores (2004) no obtuvieron un fragmento de 550 pb de la región control, al intentar amplificarlo a partir de ADN extraído de muestras fecales de tres especies de mustélidos (*Mustela lutreola*, *M. vison* y *M. putorius*). Es así que, idealmente, todo protocolo diseñado para la utilización de ADN posiblemente degradado (como el proveniente de muestras recabadas de manera no invasiva), debe basarse en la amplificación de secuencias pequeñas (≤ 300 pb; Taberlet *et al.*, 1999; Waits y Paetkau, 2005; Maldonado, 2006).

6.2 Selección y diseño del método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP

De la variedad de muestras que se pueden obtener de manera no invasiva en mamíferos (pelo, restos de piel, orina, células bucales de frutos parcialmente comidos), se seleccionaron las heces por ser las más fáciles de coleccionar así como las más informativas en aspectos genéticos y ecológicos como densidad poblacional (Bellemain *et al.*, 2005), hábitos alimenticios (Farrell *et al.*, 2000), uso de hábitat (Hung *et al.*, 2004), estructura social (Utami *et al.*, 2002), variabilidad genética y filogeografía (Iyengar *et al.*, 2005) entre otros. Además la identificación de especies es una de las aplicaciones más utilizadas en el análisis molecular de muestras fecales para lo cual, se han empleado diversas metodologías (Taberlet *et al.*, 1999; Waits y Paetkau, 2005).

Ernest y colaboradores (2000) identificaron excretas de puma (*P. concolor*) y lince (*L. rufus*) en el Valle de Yosemite, mediante la amplificación de marcadores microsatélites diseñados para gato doméstico (*F. catus*). Generalmente, los marcadores mitocondriales son utilizados para la identificación de especies mientras que los microsatélites se usan para la identificación de individuos (Waits y Paetkau, 2005; Schwartz y Monfort, 2008). Aunque en el estudio mencionado anteriormente se logró la identificación de ambas especies de felinos, se requirió un amplio conocimiento previo de los individuos de esa región con el fin de registrar los genotipos (cantidad y tamaño de alelos) propios de cada especie, por lo que se obtuvieron 62 y 20 muestras de tejido y sangre de puma y lince, respectivamente. Por otro lado, Palomares y colaboradores (2002) sintetizaron iniciadores

especie-específicos para amplificar un fragmento del gen citocromo *b*, a partir de ADN fecal de lince ibérico (*Lynx pardinus*). Sin embargo, observaron amplificaciones en otras especies del mismo género (*L. lynx*, *L. canadensis* y *L. rufus*), así como amplificaciones inciertas en excretas de origen desconocido (bandas de mediana y baja intensidad). Además al utilizar esta metodología, se necesitan sintetizar varios iniciadores (de 4 a 7 comúnmente) para cada especie de interés y usar cada par en reacciones separadas (Kurose *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se seleccionó la técnica de PCR-RFLP debido a que ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación de especies, por presentar la ventaja de requerir como conocimiento previo sólo la secuencia del marcador molecular seleccionado, siendo suficiente en ocasiones una sola secuencia por especie de interés, la cual puede ser generada durante la investigación o tomada de secuencias publicadas en bases de datos (Paxinos *et al.*, 1997; Hansen y Jacobsen, 1999; Mills *et al.*, 2000; Bidlack *et al.*, 2007). En este proyecto se diseñó el protocolo de identificación de especies felinas empleando 18 secuencias del gen completo de citocromo *b* (de las cuales dos fueron tomadas de GenBank): dos de gato doméstico (*F. catus*), dos de jaguarundi (*P. yagouaroundi*), una de tigrillo (*L. wiedii*), tres de lince (*L. rufus*), cinco de ocelote (*L. pardalis*), tres de jaguar (*P. onca*) y dos de puma (*P. concolor*).

Otra ventaja de la técnica de PCR-RFLP es la posibilidad del empleo de iniciadores universales. Sin embargo, dado que este tipo de iniciadores pueden amplificar ADN de especies de grandes grupos taxonómicos (i.e. vertebrados; Kocher *et al.*, 1989), la discriminación de éstas recae en el uso de las enzimas de restricción, cuyo número tiende a aumentar conforme lo hace el número de especies objetivo, incrementando así el costo y tiempo de la técnica (Foran *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1999). Este hecho también se ha llegado a observar cuando se trabaja con iniciadores diseñados para una investigación en particular, como en el estudio de Cossíos y Angers (2006) donde se sintetizaron iniciadores para la amplificación de un fragmento del gen 16S ribosomal de siete especies de carnívoros, logrando su diferenciación con el mismo número de enzimas de restricción (ver sección 1.3). Alternativamente, se han conseguido identificaciones exitosas con la técnica PCR-RFLP utilizando un menor número de enzimas de restricción, al combinarlas con iniciadores específicos diseñados para un grupo de especies más reducido como las familias de los cánidos (Paxinos *et al.*, 1997) o mustélidos (Hansen y Jacobsen, 1999),

aunque la especificidad de estos oligos (amplificación de ADN en especies distintas a las de interés) generalmente no ha sido evaluada. Por lo anterior, en este estudio se decidió usar iniciadores específicos para felinos que amplificaran una región pequeña del gen citocromo *b* y que presentara un patrón de restricción diagnóstico con el menor número de enzimas posibles.

De este modo, analizando las secuencias del gen citocromo *b*, se encontró en una región menor a 300 pb, un patrón de restricción distintivo para las siete especies felinas utilizando sólo dos enzimas de restricción: BtsCI y Tsp509I. El haber identificado este patrón se debió al hecho de contar con la secuencia del gen completo de citocromo *b* (1140 pb), pues en el primer protocolo diseñado a partir de secuencias publicadas, la región de búsqueda en el gen era mucho más limitada (289 pb) y el patrón de restricción diagnóstico encontrado con el menor número de enzimas posibles fue de cuatro (ver sección 4.3). Así, mientras menor sea la longitud de las secuencias disponibles del marcador seleccionado, menores serán las posibilidades de identificar un patrón de restricción distintivo con un bajo número de enzimas (en relación con el número de especies analizadas). Esto se observa en el trabajo de Mills y colaboradores (2000), donde se basaron en secuencias publicadas de 379 pb del gen ribosomal 16S (el cual tiene un tamaño de 1574 pb en *F. catus*; López *et al.* 1996) para desarrollar un protocolo que diferenciaba a cuatro especies de felinos (*L. canadensis*, *L. rufus*, *P. concolor* y *F. catus*) empleando tres enzimas de restricción (HaeIII, HpaII y RsaI).

Como se mencionó anteriormente, con el fin de amplificar la región que incluía el patrón de restricción diagnóstico, se diseñaron iniciadores específicos a través del análisis de los haplotipos felinos, en conjunto con las secuencias de humano y de 12 especies de mamíferos que comparten su área de distribución en el país y presentan similitud en sus heces con las especies félicas bajo estudio (ver Cuadro 3). No se incluyeron secuencias de las presas puesto que es sabido que el ADN de éstas en las excretas, se encuentra en una mucha menor cantidad que el ADN del depredador y se requiere usar la parte interna de las heces para intentar extraerlo, motivo por el que en los estudios enfocados en el ADN fecal de los depredadores, se suelen realizar las extracciones de las heces utilizando la parte externa de las mismas (puntas y materia raspada de la superficie; Reed *et al.*, 1997; Deagle *et al.*, 2005; Bidlack *et al.*, 2007). De 12 iniciadores potenciales diseñados, se sintetizaron el par FelidCB12 (FCB12, 5'-CYACCCTAACACGATTCTT-3') y FelidCB7R (FCB7R,

5'-TCTGGTGAGAATAGRACG-3'). Se diseñaron oligos degenerados porque se ha observado que son más adecuados, tanto en facilidad de uso como en costo, para solucionar la variación de bases en sitios dentro de la región de unión de los iniciadores (Bidlack *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). A pesar de esto, el oligo FCB7R, que fue diseñado para amplificar sólo ADN de las especies de felinos de interés, incluyó variación en tres especies: 1 sitio para *F. catus* y *P. concolor* y 2 sitios para *L. rufus* (Apéndice 4). Sin embargo, las bases no complementarias del iniciador con su secuencia blanco en los 4 sitios son G:T o T:G (purina-pirimidina), las cuales se han reportado no afectan ni la unión del oligo, ni la extensión de la DNA polimerasa (Kwok *et al.*, 1990).

6.3 Estandarización del método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP

Los procesos de estandarización y optimización deben ser realizados en toda técnica de laboratorio previamente a su aplicación en cualquier investigación, con el fin de garantizar el obtener resultados positivos a partir de ésta. En el presente trabajo, estos procesos se realizaron tanto para las condiciones de amplificación de los iniciadores diseñados, como para las condiciones de digestión de las enzimas BtsCI y Tsp509I, utilizando ADN de tejido o sangre de las siete especies de felinos, por generar resultados más constantes que los de ADN extraído de muestras no invasivas (Mills *et al.*, 2000; Schwartz y Monfort, 2008).

Como ya se había mencionado, diversos estudios han hecho uso de iniciadores específicos en combinación con la técnica PCR-RFLP, para conseguir identificaciones exitosas de especies de carnívoros, sin embargo la especificidad de los mismos no había sido evaluada (Paxinos *et al.*, 1997; Hansen y Jacobsen, 1999). En este trabajo se decidió probar la especificidad del iniciador FCB7R en ADN de tejido disponible para cuatro de las 13 especies de mamíferos no objetivo seleccionadas: humano (*H. sapiens*), tlacuache (*D. virginiana*), zorrillo (*M. macroura*) y cacomixtle (*B. astutus*). Usando las condiciones estandarizadas y los iniciadores diseñados FCB12 y FCB7R, se obtuvieron buenas amplificaciones en todas las especies felinas (bandas constantes y robustas) y ninguna amplificación en las otras cuatro especies de mamíferos, mostrando así una alta especificidad del iniciador FCB7R en comparación con la de otros reportados. Por ejemplo, Bidlack y colaboradores (2007) emplearon el oligo CanidL1 (Paxinos *et al.*, 1997) para amplificar ADN de especies pertenecientes a tres familias de carnívoros

(Mephitidae, Procyonidae y Felidae), a pesar de que éste había sido diseñado como iniciador específico para cánidos. Cabe señalar que, aunque la especificidad del oligo FCB7R se probó exitosamente en especies de cuatro familias (dos de éstas incluidas en el orden Carnívora [Mephitidae y Procyonidae]), sería importante evaluar la misma en el resto de especies no objetivo aquí seleccionadas.

Empleando nuevamente las condiciones estandarizadas y los iniciadores FCB12 y FCB7R, se obtuvo un 100% de amplificación a partir de ADN de siete excretas (una por especie de felino). Este resultado era de esperarse puesto que la tasa de amplificación exitosa de ADNmt fecal para carnívoros en cautiverio suele ser alta, como la reportada por Wasser y colaboradores (1997) de 90% para oso (n=50), así como la obtenida por Haag y colaboradores (2009) de 87% para jaguar (n=39), pudiendo llegar a ser del 100% en tamaños de muestra muy pequeños como el reportado por Deagle y colaboradores (2005) para leones marinos (n=5). Por otro lado, aunque variable, esta tasa suele ser menor en carnívoros silvestres como la reportada por Farrell y colaboradores (2000) de 59% para félidos y zorra (n=34), así como la obtenida por Haag y colaboradores (2009) de 56% para jaguar y puma (n=55). La razón de esto se debe principalmente a que el ADN en las heces de animales silvestres se encuentra expuesto a factores ambientales (como cambios de temperatura o humedad), lo cual promueve la degradación del mismo (llevada a cabo en su mayoría por nucleasas, enzimas que cortan el ADN en fragmentos más y más pequeños). Por otra parte, las heces provenientes de animales en cautiverio pueden ser colectadas y procesadas al poco tiempo de su deposición (tal como se realizó en el presente trabajo), aumentando así las probabilidades de obtener ADN fecal de buena calidad (Bhagavatula y Singh, 2006; Sarre *et al.*, 2007; Beja-Pereira *et al.*, 2009).

Al trabajar con heces de animales en cautiverio, aún se tiene el inconveniente de los inhibidores químicos propios de las excretas, como son productos generados por la descomposición del alimento (por ejemplo ácidos, enzimas, lípidos y proteínas), RNA y bacterias. Estos inhibidores suelen restringir la amplificación de ADN fecal aunque éste se haya extraído en buena cantidad y con poca degradación, motivo por el que se recomienda usar adyuvantes de la PCR (sustancias que mejoran la eficiencia y especificidad de la reacción; Henegariu *et al.*, 1997), de los cuales la BSA es la más comúnmente utilizada (Maldonado, 2006; Schwartz y Monfort, 2008; Beja-Pereira *et al.*, 2009). En este trabajo se obtuvo amplificación a partir de ADN fecal sin la adición de BSA y aunque se probaron

distintas concentraciones de la misma, no se observó mejoría en la intensidad de las bandas resultantes como se ha reportado en otros estudios (Palomares *et al.*, 2002). Aunado a la colecta de heces frescas, la buena amplificación del ADN fecal puede deberse a dos factores: 1) el método de extracción (QIAamp DNA Stool Mini Kit), cuyo reactivo “Inhibitex” está especialmente diseñado para adsorber las sustancias que dañan el ADN y los inhibidores de la PCR; y 2) la posibilidad de que el ADN extraído de la superficie de las excretas posea una menor cantidad de sustancias inhibitorias (Bhagavatula y Singh, 2006; Maldonado, 2006). A pesar de que los resultados de amplificación aquí obtenidos fueron satisfactorios, el método de identificación se creó con el fin de aplicarse a excretas de campo, las cuales requieren métodos de preservación y extracción adecuados para las características de la especie en estudio y su hábitat. Tales métodos han sido evaluados en numerosas investigaciones (preservación, Frantzen *et al.*, 1998 y Nsubuga *et al.*, 2004; extracción, Reed *et al.*, 1997 y Puechmaille *et al.*, 2007; ambos, Piggot y Taylor, 2003 y Bhagavatula y Singh, 2006) y sus resultados pueden ser de ayuda al momento de elegir las técnicas a probar en un estudio piloto, el cual sería el paso a seguir en este proyecto.

En cuanto al análisis de restricción con las enzimas BtsCI y Tsp509I, una vez optimizadas las condiciones de digestión, se obtuvieron los patrones de restricción que permitieron diferenciar a las siete especies de felinos, tanto a partir de ADN de tejido como de ADN fecal. Los patrones de bandeos diagnósticos se visualizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2.5%; el tamaño de las bandas se determinó por sus distancias de migración en el gel en comparación con la del marcador molecular de 25 pb (Wolf *et al.*, 1999; España-Luna *et al.*, 2008).

Debido a que la capacidad de resolución de los geles de agarosa suele dificultar la observación de fragmentos menores a 80 pb, así como la de fragmentos que difieran entre sí menos de 15 pb (Wolf *et al.*, 1999; Sambrook y Russell, 2001), diversos estudios de identificación de especies han realizado el análisis de los fragmentos de restricción mediante el uso de geles de poliacrilamida (Zehner *et al.*, 1998; España-Luna *et al.*, 2008) y secuenciación (Hansen y Jacobsen, 1999), aumentando así el riesgo y costo del protocolo, respectivamente (Sambrook y Russell, 2001; Bidlack *et al.*, 2007). Sin embargo, en este trabajo, aunque con variaciones en la intensidad de las bandas, se logró observar todos los fragmentos menores a 80 pb (con excepción del de 9 pb perteneciente a *L. wiedii*), resultando similar a lo reportado por Nagata y colaboradores (2005), quienes

visualizaron en un gel de agarosa al 3% bandas de 28 y 68 pb, pertenecientes a los patrones de restricción especie-específicos de tigre (*Panthera tigris*; 297 y 28 pb) y leopardo (*Panthera pardus*; 229, 68 y 28 pb). Asimismo, en la digestión con la enzima BtsCI se visualizó una separación adecuada entre las bandas de 49 y 60 pb resultantes del patrón encontrado para *L. rufus* y *F. catus*, lo cual permitió la diferenciación entre estas especies y *L. wiedii*, ya que el otro fragmento que difería entre los patrones de las tres especies (9 pb), era demasiado pequeño como para observarse en el gel.

Otro aspecto importante a señalar es el hecho de que la discriminación de todas las especies felinas bajo estudio, está basada en la presencia de al menos un sitio de restricción. En contraste, trabajos como los de Vercillo *et al.* (2004) y Bidlack *et al.* (2007), utilizaron la ausencia de sitios de restricción para la identificación de garduña (*Martes foina*) y coyote (*C. latrans*), respectivamente. Al emplear estas metodologías, especies distintas a las de interés que no mostraran tampoco tales sitios de corte podrían ser identificadas incorrectamente como garduña o coyote (Pilot *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando se digiere un producto de PCR se puede presentar inhibición de la actividad de restricción, debido a sustancias procedentes de la fuente de ADN que fueran transferidas a la mezcla de reacción junto con el ADN molde. Esto generaría una digestión fallida, la cual también podría asignarse erróneamente como una muestra perteneciente a garduña o coyote (Zehner *et al.*, 1998). Es por esto que la metodología aquí empleada presenta la ventaja de evitar la posibilidad de falsos positivos, ya que para identificar una muestra es necesario observar fragmentos de restricción que concuerden con el patrón de bandeo de una determinada especie. Sin embargo, la utilidad diagnóstica del método de identificación puede verse comprometida por la susceptibilidad de la técnica de PCR-RFLP a generar falsos negativos, como resultado de la presencia de variación intraespecífica en los sitios de restricción, por lo cual se debe evaluar dicha variación en las especies de interés (Wolf *et al.*, 1999).

6.4 Evaluación virtual de patrones de restricción diagnósticos

Al utilizar la técnica de PCR-RFLP y dada la alta tasa de mutación que presenta el ADNmt animal, se pueden observar sustituciones nucleotídicas entre individuos de una misma especie, que generen la pérdida o ganancia de sitios de corte y por lo tanto de diversidad de patrones de restricción (polimorfismos intraespecíficos; Pereira *et al.*, 2008). Por ejemplo,

Fagundes y Nogueira (2007) usaron cuatro enzimas para el análisis de restricción del gen completo de citocromo *b* (1140 pb) y reportaron de dos a siete patrones de restricción por enzima para los roedores *Akodon cursor* y *Akodon montensis*. Inicialmente, en este trabajo se encontró un patrón de sitios de restricción diagnósticos a partir de secuencias publicadas de fragmentos del gen citocromo *b* para las especies felinas bajo estudio (una secuencia por especie). Sin embargo, al analizar las secuencias aquí obtenidas, se observó falta de coincidencia en cuatro de los 10 sitios de corte anteriormente ubicados en las secuencias publicadas (ver Cuadro 2). Por esta razón, se evaluó la posible presencia de polimorfismos intraespecíficos en los sitios de restricción diagnósticos aquí utilizados, mediante el análisis virtual de secuencias nuevas del gen citocromo *b* de las especies de felinos silvestres de interés, tomadas de GenBank.

De las 70 secuencias encontradas en GenBank, sólo seis incluían el fragmento de 226 pb diagnóstico (tres de *L. rufus*, dos de *P. onca* y una de *P. concolor*) y los patrones de restricción resultantes a partir de éstas fueron idénticos a los obtenidos previamente en este trabajo. Las otras 64 secuencias, además de ser muy pequeñas en su mayoría (de 63 a 196 pb), se localizaban por debajo de la posición 400 en el extremo 5' del citocromo *b* (datos no mostrados), mientras que el fragmento diagnóstico aquí utilizado se ubica más cercanamente al extremo 3' del gen, de la posición 518 a la 743 (considerando la adenina del codón de inicio ATG del gen como la posición número 1; Apéndice 4; López *et al.*, 1996). Por diversos factores, como los primeros iniciadores universales publicados para el gen citocromo *b* (Kocher *et al.*, 1989), el extremo 5' de este gen ha sido más ampliamente secuenciado que el extremo 3'. Sin embargo es sabido que este último generalmente es menos variable que el extremo 5', lo cual podría explicar tanto la ausencia de variación en los sitios de restricción observada en el fragmento diagnóstico, como la presencia de la misma en el fragmento propuesto a partir de secuencias publicadas, ya que éste se ubicaba de la posición 68 a la 356 (Meyer, 1994). Por otra parte, es importante señalar que ambos conjuntos de secuencias analizadas (las aquí generadas y las tomadas de GenBank) provienen de ejemplares cuya procedencia geográfica es desconocida, además de tenerse un tamaño de muestra muy bajo para las especies de *L. wiedii* y *P. yagouaroundi* (una y dos secuencias, respectivamente). Por lo tanto, los resultados de la variación en los sitios de restricción obtenidos en el presente trabajo no pueden considerarse como concluyentes, pero sí como preliminares para un estudio futuro donde se evalúen individuos representantes del área de distribución de las especies felinas silvestres en México.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se cumplió el objetivo de diferenciar a las especies felinas de México a partir de muestras fecales, puesto que se encontró la suficiente variación interespecífica en un fragmento de 226 pb del ADN mitocondrial, confirmándose así la hipótesis inicialmente planteada. El método aquí desarrollado es de fundamental importancia, ya que no existen reportes publicados de trabajos previos de identificación molecular de especies que incluyan a los seis felinos silvestres de México. Además, cabe destacar la utilidad de este protocolo para otras muestras recolectadas de manera no invasiva, así como su uso potencial en las ciencias forenses y la industria alimentaria en casos enfocados en la detección de comercio ilegal de productos provenientes de estos felinos. Por otro lado, es importante mencionar que la metodología aquí empleada no pretende sustituir la identificación morfológica de las heces, sino aportar mayor precisión y consistencia a ésta, pues el criterio morfológico seguirá siendo necesario ya que provee la diagnosis inicial en la colecta de excretas en campo. Finalmente, considerando las características del presente estudio (secuencias de ejemplares de procedencia geográfica desconocida y heces de animales en cautiverio), el método de identificación basado en la técnica PCR-RFLP debiera ser evaluado en un estudio piloto, donde se tomen en cuenta las condiciones de campo y preferentemente se analicen muestras de referencia antes de aplicarse a una población determinada. No obstante, dados los hábitos secretivos y la vulnerabilidad de los felinos silvestres que habitan en México, la metodología aquí presentada se muestra como una de las alternativas más prometedoras para la identificación de estas especies y a su vez, ofrece la oportunidad de profundizar en el conocimiento de la ecología y genética de estos felinos (sobre todo de aquellos menos estudiados como son *P. yagouaroundi* y *L. wiedii*) facilitando así, la generación de estrategias de conservación para los mismos.

8. LITERATURA CITADA

- Allendorf, F.W y G. Luikart. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido.
- Andrews, R.M., I. Kubacka, P.F. Chinnery, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull y N. Howell. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23 (2): 147.

- Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México.
- Aranda, M. 2005a. *Herpailurus yagouaroundi* (Lacépède, 1809). Pp: 358-359. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Aranda, M. 2005b. *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758). Pp: 359-361. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Aranda, M. 2005c. *Leopardus wiedii* (Schinz, 1821). Pp: 361-362. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Ávila, J.T., A.M. de Vera, C. Hernández y P.M. Vasallo. 1995. Análisis del DNA II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología XV, Suplemento 2*: 31-43.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J.C. y D. Walker. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 992-995.
- Balakrishnan, R. 2005. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Systematic Biology* 54 (4): 689-693.
- Beja-Pereira, A., R. Oliveira, P.C. Alves, M.K. Schwartz y G. Luikart. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 9: 1279-1301.
- Bellemain, E., J.E. Swenson, D. Tallmon, S. Brunberg, y P. Taberlet. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology* 19 (1): 150-161.
- Bensasson, D., D. Zhang, D.L. Hartl y G.M. Hewitt. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (6): 314-321.

- Bhagavatula, J. y L. Singh. 2006. Genotyping faecal samples of bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: A pilot study. *BMC Genetics* 7: 48.
- Bidlack A.L., S.E. Reed, P.J. Palsboll y W.M. Getz. 2007. Characterization of a western North American carnivore community using PCR-RFLP of cytochrome *b* obtained from fecal samples. *Conservation Genetics* 8: 1511-1513.
- Bjornerfeldt, S., M.T. Webster y C. Vila. 2006. Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome Research* 16 (8): 990-994.
- Borisenko, A.V., N.V. Ivanova, J.L. Eger, B.K. Lim, M.D. Engstrom y P.D.N. Hebert. Towards the assembly of a DNA barcode library for Canadian mammals. Cartel presentado en: The Canadian Barcode of Life Science Symposium; 2007 Mayo 10-11; Guelph, Canadá.
- Borisenko, A.V., B.K. Lim, N.V. Ivanova, R.H. Hanner y P.D. Hebert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8: 471-479.
- Bradley, R.D. y R.J. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82 (4): 960-973.
- Ceballos, G., P.R. Ehrlich, R. List y R.A. Medellín. 2009. *Fauna mexicana, esplendor de la naturaleza*. TELMEX, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Ceballos, G., P.R. List, R.A. Medellín, C. Bonacic y J. Pacheco. 2010. *Los felinos de América, cazadores sorprendentes*. TELMEX, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Ceballos, G. y G. Oliva. 2005. Distribución. Pp: 98-850. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Chávez, J.C. 2005. *Puma concolor* (Linnaeus, 1771). Pp: 364-367. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Chávez, J.C., M. Aranda y G. Ceballos. 2005. *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). Pp: 367-370. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.

- Clare, E.L., B.K. Lim, M.D. Engstrom, J.L. Eger y P.D.N. Hebert. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7 (2): 184-190.
- Cocolin, L., E. D'Agaro, M. Manzano, D. Lanari y G. Comi. 2000. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (Seabass, Seabream, Umbrine, and Dentex). *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* 65 (8): 1315-1317.
- Cossíos, D. y B. Angers. 2006. Identification of andean felids feces using PCR-RFLP. *Mastozoología Neotropical* 13 (2): 239-244.
- Currier, M.J.P. 1983. *Felis concolor*. *Mammalian Species* 200: 1-7.
- Deagle, B.E., D.J. Tollit, S.N. Jarman, M.A. Hindell, A.W. Tritest y N.J. Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of DNA prey in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* 14: 1831-1842.
- Delisle, I. y C. Strobeck. 2005. A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 192-201.
- De Oliveira, T.G. 1998a. *Herpailurus yagouaroundi*. *Mammalian Species* 578: 1-6.
- De Oliveira, T.G. 1998b. *Leopardus wiedii*. *Mammalian Species* 579: 1-6.
- DeSalle, R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology* 20 (5): 1545-1547.
- DeSalle, R., M.G. Egan y M. Siddall. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 1905-1916.
- De Villa Meza, A., E. Martínez Meyer y C.A. López González. 2002. Ocelot (*Leopardus pardalis*) food habits in a tropical deciduous forest of Jalisco, Mexico. *The American Midland Nat.* 148: 146-154.
- Díaz, M.M. 2000. Key to the native mammals of Jujuy Province, Argentina. *Occasional Papers Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History* 7: 1-29.
- Eizirik, E., J.H. Kim, M. Menotti-Raymond, P.G. Crawshaw, S.J. O'Brien y W.E. Johnson. 2001. Phylogeography, population, history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10: 65-79.
- España-Luna, M.P., A. González-Hernández, O.G. Alvarado-Gómez y J. Lozano-Gutiérrez. 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma*

- Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie) 24 (1): 1-14.
- Ernest, H.B., M.C.T. Penedo, B.P. May, M. Syvanen y W.M. Boyce. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* 9: 433-441.
- Fagundes, V. y C.D.A. Nogueira. 2007. The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents of the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Akodontini). *Genetics and Molecular Biology* 30 (3): 698-701.
- Farrell, L.E., J. Roman y M.E. Sunquist. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9: 1583-1590.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Frantzen, M.A.J., J.B. Silk, J.W.H. Ferguson, R.K. Wayne y M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* 7: 1423-1428.
- Foran, D.R., K.R. Crooks y S.C. Minta. 1997. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin* 25 (4): 835-839.
- Gómez-Moliner, B.J., M.T. Calabria, J. Rubines, I. Garin, M.J. Madeira, A. Elejalde, J. Aihartza, P. Fournier y S. Palazón. 2004. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*M. vison*) and polecat (*M. putorius*) by analysis of excremental DNA. *Journal of Zoology, London* 262 (3): 311-316.
- Haag, T., A.S. Santos, C. De Angelo, A.C. Srbek-Araujo, D.A. Sana, R.G. Morato, F.M. Salzano y E. Eizirik. 2009. Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. *Genetica* 136: 505-512.
- Hajibabaei, M., D.H. Janzen, J.M. Burns, W. Hallwachs y P.D.N. Hebert. 2006a. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 968-971.
- Hajibabaei, M., M.A. Smith, D.H. Janzen, J.J. Rodríguez, J.B. Whitfield y P.D.N. Hebert. 2006b. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6: 959-964.
- Hajibabaei, M., G.A.C. Singer, E.L. Clare y P.D.N. Hebert. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 5: 24.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/9/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hansen, M.M. y L. Jacobsen. 1999. Identification of mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*), by analysis of DNA from faecal samples. *Journal of Zoology (London)* 247 (2): 177-181.
- Haynes, L., Z. Hackl y M. Culver. 2005. Wild cats of the Sky Islands: A summary of monitoring efforts using noninvasive techniques. *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P* 36: 185-188.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak y C.M. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* 2: 1657-1663.
- Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance y P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23: 504-511.
- Hsieh H-M., H-L. Chiang, L-C. Tsai, S-Y. Lai, N-E. Huang, A. Linacre y J.C-I. Lee. 2001. Cytochrome *b* gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International* 122: 7-18.
- Hung, C., S. Li y L. Lee. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two streams systems in Kinmen. *Animal Conservation* 7 (3): 301-311.
- Ivanova, N.V., T.S. Zemlak, R.H. Hanner y P.D.N. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544-548.
- Irwin, D.M., T.D. Kocher y A.C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- Iyengar, A., V.N. Babu, S. Hedges, A.B. Venkataraman, N. Maclean y P.A. Morin. 2005. Phylogeography, genetic structure and diversity in the dhole (*Cuon alpinus*). *Molecular Ecology* 14: 2281-2297.
- Janczewski, D.N., W.S. Modi, J.C. Stephens y S.J. O'Brien. 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome *b* sequences in the pantherine lineage of Felidae. *Molecular Biology and Evolution* 12 (4): 690-707.

- Janke, A., G. Feldmaier-Fuchs, W.K. Thomas, A. von Haeseler y S. Pääbo. 1994. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137 (1): 243-256.
- Johns, G.C y J.C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1481-1490.
- Kim, K.S., S.E. Lee, H.W. Jeong y J.H. Ha. 1998. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10 (2): 210-220.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca y A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86: 6196-6200.
- Koepfli, K.P. y R.K. Wayne. 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Journal of Zoology* 246: 401-416.
- Koepfli, K.P. y R.K. Wayne. 2003. Type I STS markers are more informative than cytochrome *b* in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Systematic Biology* 52 (5): 571-593.
- Koepfli, K.P., M.E. Gomper, E. Eizirik, C.C. Ho, L. Linden, J.E. Maldonado y R.K. Wayne. 2007. Phylogeny of the Procyonidae (Mammalia: Carnivora): molecules, morphology and the Great American Interchange. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43 (3): 1076-1095.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder y S. Pääbo. 1995. Conservation genetics of the European Brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology* 4: 95-103.
- Kohn, M.H. y R.K. Wayne. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 223-227.
- Konecny, M.J. 1989. Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America. Pp: 242-264. En: *Advances in Neotropical*

- Mammalogy* (Redfor K.H. y J.F. Eisenberg, eds.). Sandhill Crane Press. Gainesville, Estados Unidos de América.
- Kurose, N. R. Masuda y M. Tatara. 2005. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: a noninvasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity* 96 (6): 688-697.
- Kwok, S., D.E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson y J.J. Sninsky. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18 (4): 999-1005.
- Lanteri, A.A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (3-4): 15-25.
- Larivière, S. y L.R. Walton. 1997. *Lynx rufus*. *Mammalian Species* 563: 1-8.
- Lecompte, E., C. Brouat, J. Duplantier, M. Galan, L. Granjon, A. Loiseau, K. Mouline y J. Cosson. 2005. Molecular identification of four cryptic species of *Mastomys* (Rodentia, Murinae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 681-689.
- Ledje, C. y U. Arnason. 1996. Phylogenetics analyses of complete cytochrome b genes of the order carnivora with particular emphasis on the caniformia. *Journal of Molecular Evolution* 42 (2): 135-144.
- Lewin, B. 2006. *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers. Ontario, Canadá.
- Linacre, A. y S.S. Tobe. 2009. Species identification using DNA loci. Pp: 61-94. En: *Forensic science in wildlife investigations* (A. Linacre, ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group. Nueva York, Estados Unidos de América.
- López, J.V., N. Yuhki, R. Masuda, W. Modi y S.J. O'Brien. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* 39: 174-190.
- López, J.V., S. Cevario y S.J. O'Brien. 1996. Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (*Numt*) in the nuclear genome. *Genomics* 33: 229-246.
- Lowenstein, J.H., G. Amato y S-O. Kolokotronis. 2009. The real *maccoyii*: identifying tuna sushi with DNA barcodes – Contrasting characteristics attributes and genetic distances. *PLoS ONE* 4 (11): e7866. doi: 10.1371/journal.pone.0007866
- Machado, J., F. de Melo, A. Ditchfield y J. Stenghel. 2005. The use of PCR-RFLP as an identification tool for two closely related species of bats of genus *Platyrrhinus*. *Genetics and Molecular Biology* 28 (1): 120-122.

- 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 32, Albuquerque, Nuevo Mexico, Estados Unidos de América.
- Masuda, R., J.V. Lopez, J.P. Slattery, N. Yuhki y S.J O'Brien. 1996. Molecular Phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6 (3): 351-365.
- Masuda, R., Y. Kaneko, B. Siritroonrat, V. Subramaniam y M. Hamachi. 2008. Genetic variations of the masked palm civet *Paguma larvata*, inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Mammal Study* 33: 19-24.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101: 20-78.
- Meyer, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (8): 278-280.
- Mills, L.S., K.L. Pilgrim, M.K. Schwaertz y K. McKelvey. 2000. Identifying lynx and other North American felids base don MtDNA analysis. *Conservation Genetics* 1: 285-288.
- Murray, J.L. y G.L. Gardner. 1997. Leopardus pardalis. *Mammalian Species* 548: 1-10.
- Nagata, J., V.V. Aramilev, A. Belozor, T. Sugimoto y D.R. McCullough. 2005. Fecal genetic analysis using PCR-RFLP of cytochrome *b* to identify sympatric carnivores, the tiger *Panthera tigris* and the leopard *Panthera pardus*, in far eastern Russia. *Conservation Genetics* 6: 863:865.
- Nasri, M. y D. Thomas. 1986. Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease HindIII. *Nucleic Acids Research* 14 (2): 811-821.
- Nsubuga, A.M., M.M.Robbins, A.D. Roeder, P.A. Morin, C. Boesch y L. Vigilant. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted form ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology* 13: 2089-2094.
- Palomares, F., J.A. Godoy, A. Piriz, S.J. O'brien y W.E. Jonson. 2002. Faecal genetic análisis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian linx. *Molecular Ecology* 11: 2171-2182.
- Park, K. y J. Lee. 2003. Dealing with carryover contamination in PCR: an enzymatic strategy. Pp: 15-20. En: *PCR Primer: A laboratory manual* (Dieffenbach, C.W., G.S. Dveksler, eds.). CSHL Press. Nueva York, Estados Unidos de América.

- Parson, W., K. Pegoraro, H. Niederstätter, M. Föger y M. Steinlechner. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23-28.
- Paxinos, E., C. Mcintosh, K. Ralls y R. Fleischer. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* 6: 483-486.
- Pereira, F., J. Carneiro y A. Amorim. 2008. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2: 187-200.
- Piggott, M.P. y A.C. Taylor. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology* 51: 341-355.
- Pilgrim, K.L., K.S. Mckelvey, A. E. Riddle y M.K. Schwartz. 2005. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes* 5: 60-61.
- Pilot, M., B. Gralak, J. Goszczynski y M. Postuszny. 2007. A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *Journal of Zoology* 271: 140-147.
- Puechmaille, S.J., G. Mathy y E.J. Petit. 2007. Good DNA from bat droppings. *Acta Chiropterologica* 9: 269-276.
- Rabinowitz, A. 2010. Foreword. Pp: vii-ix. En: *Cougar, ecology and conservation* (Hornocker, M. y S. Negri, eds.). The University of Chicago Press. Chicago, Estados Unidos de América.
- Rach, J., R. DeSalle, I.N. Sarkar, B. Schierwter y H. Hadrys. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 275: 237-247.
- Ramírez, P.J., J. Arroyo y N. González. 2008. Catálogo taxonómico de especies de México, Mamíferos. En: *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad* (Ocegueda, S. y J. Llorente-Bousquets, coords.). CONABIO. México, CD 1.
- Reed, J.Z. D.J. Tollit, P.M. Thompson y W. Amos. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* 6: 225-234.

- Reed, J.E., R.J. Baker, W.B. Ballard y B.T. Kelly. 2004. Differentiating Mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin* 32 (3): 685-692.
- Reid, F.A. 2009. *A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico*. Oxford University Press. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Rentería, M. 2006. Breve revisión de los marcadores moleculares. Pp: 541-566. En: *Ecología Molecular* (Eguiarte L.E., V. Sousa y X. Aguirre, comps.). Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Distrito Federal, México.
- Romero, F. 2005. *Lynx rufus* (Schreber, 1777). Pp: 362-364. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Ross, H.A., G.M. Lento, M.L. Dalebout, M. Goode, G. Ewing, P. McLaren, A.G. Rodrigo, S. Lavery y C.S. Baker. 2003. DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. *Journal of Heredity* 94 (2): 111-114.
- Rychlik, W. 2001. OLIGO: Primer Analysis Software, versión 6.51. Molecular Biology Insights, Inc. Colo, Estados Unidos de América.
- Saitotu, N. y M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salazar, E. 2008. *Análisis bibliográfico y síntesis del estado de conocimiento de los felinos mexicanos (Mammalia: Carnivora, Felidae)*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Salido, E. 1993. Análisis del DNA I. *Nefrología* XIII (2): 111-121.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning, third edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Sánchez, O., M.A. Pineda, H. Benítez, B. González y H. Berlanga. 1998. Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la CITES. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Distrito Federal, México.
- Sarre, S.D., R. Walsh, N. Aitken, A. Foster y N. Mooney. 2007. DNA detection of foxes to prevent establishment in Tasmania. Pp: 454-459. En: *Managing Vertebrate Invasive Species: Proceedings of an International Symposium* (Witmer, G.W., W.C.

- Pitt, K.A. Fagerstone, eds.). USDA/APHIS/WS, National Wildlife Research Center. Fort Collins, Estados Unidos de América.
- Schwartz, M.K. y S.L. Monfort. 2008. Genetic and endocrine tools for carnivore surveys. Pp: 228-250. En: *Noninvasive survey methods for North American carnivores* (Long R.A., P. Mackay, J.C. Ray y W.J. Zielinski, eds.). Islands Press. Washington, DC, Estados Unidos de América.
- SEMARNAP (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca) y DGVS (Dirección General de Vida Silvestre). 2000. *Manejo de felinos en cautiverio*. Instituto Nacional de Ecología. Estado de México, México.
- SEMANART (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2002. Norma Oficial Mexicana 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 de 2002, 1-56.
- Seymour, K.L. 1989. *Panthera onca*. *Mammalian Species* 340: 1-9.
- Smith, M.F. y J.L. Patton. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American Akodontine rodents (Muridae, Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution* 8: 85-103.
- Smith, M.F., W.K. Thomas y J.L. Patton. 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an Akodontine rodent. *Molecular Biology and Evolution* 9 (2): 204-215.
- Smith, M.F. y J.L. Patton. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.
- Steinke, D., M. Vences, W. Salzburger y A. Meyer. 2005. TaxI: a software tool for DNA barcoding using distance methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 1975-1980.
- Sunquist, M. y F. Sunquist. 2002. *Wild cats of the World*. The University of Chicago Press, Chicago, Estados Unidos de América.
- Taberlet, P., L.P. Waits y G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323-327.
- Tamada, T., N. Kurose y R. Masuda. 2005. Genetic diversity in domestic cats *Felis catus* of the Tsushima Islands, based on mitochondrial DNA cytochrome b and control region nucleotide sequences. *Zoological Science* 22: 627-633.

- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tewes, M.E. y D.J. Schmidly. 1987. The neotropical felids: jaguar, ocelot, margay and jaguarundi. Pp. 697-711. En: *Wild furbearer management and conservation in North America* (M. Novak, J.A. Baker, M.E. Obbard y B. Malloch, eds). Ontario Trappers Association. Ontario, Canadá.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tobe, S.S., A. Kitchener y A. Linacre. 2009. Cytochrome *b* or cytochrome *c* oxidase subunit I for mammalian species identification - An answer to the debate. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2: 306-307.
- Utami, S.S., B. Goossens, M.W. Bruford, J.R. De Ruiter, y J.A.R.A.M Van Hoof. 2002. Male bimaturism and reproductive success in Sumatran orang-utans. *Behavioral Ecology* 13 (5): 643-652.
- Valdecasas, A.G. 2011. Una disciplina científica en la encrucijada: la Taxonomía. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, segunda época (9): 9-17.
- Vercillo, F., L. Lucentini, N. Mucci, B. Ragni, E. Randi y F. Panara. 2004. A simple and rapid PCR-RFLP method to distinguishing *Martes martes* and *Martes foina*. *Conservation Genetics* 5: 869-871.
- Vincze, T., J. Posfai y R.J. Roberts. 2003. NEBcutter a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3688-3691.
- Waits, L.P. y D. Paetkau. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69 (4): 1419-1433.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last y P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360: 1859-1868.
- Wardill, T.J., G.C. Graham, M. Zalucki, W.A. Palmer, J. Playford y K.D. Scott. 2005. The importance of species identity in the biocontrol process: identifying the subspecies

- of *Acacia nilotica* (Leguminosae:Mimosoideae) by genetic distance and the implications for biological control. *Journal of Biogeography* 32: 2145-2159.
- Wasser, S.K., C.S. Houston, G.M. Koehler, G.G. Cadd y S.R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* 6: 1091-1097.
- Wiens, J.J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56(6): 875-878.
- Wiens, J.J. y M.R. Servedio. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London* 267: 631-636.
- Wilson, D.E. y D.M. Reeder. 2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. John Hopkins University Press. Baltimore, Estados Unidos de América.
- Williams, S.T. y Knowlton. 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution* 18 (8): 1484-1493.
- Wolf, C., J. Rentsch y P. Hübner. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1350-1355.
- Zehner, R., S. Zimmermann y D. Mebs. 1998. RFLP sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine* 111: 323-327.

APÉNDICE 1

Extracción de ADN de tejido animal con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

1. En un microtubo de 1.5 ml, añadir un fragmento de tejido (de aproximadamente 3 mm² y cortado en trozos pequeños, especialmente si es piel), 700 µl de buffer de extracción (10mM Tris-HCl pH 8; 100mM EDTA y 100mM NaCl y 1% SDS) y 7 µl de proteinasa K (a 20 mg/ml). Moler la muestra con un pistilo.
2. Se deja incubando a 56° C con agitación, por un día.
3. En el tubo con la muestra, añadir 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo (diclorometano + isoamílico, 24:1). Agitar bien y centrifugar 1 minuto a 13200rpm.
4. Trasladar el sobrenadante a un segundo microtubo rotulado y añadir 500 µl de cloroformo, agitar bien y volver a centrifugar 1 min.
5. Trasladar el sobrenadante en un tercer microtubo rotulado y añadir 700 µl de alcohol frío (100 %). Dejar precipitar durante toda la noche a 4° C.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 13200 rpm, de preferencia en una centrífuga refrigerada. Decantar el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200 µl, teniendo cuidado de no llevarse el botón de DNA. Añadir al tubo 700 µl de etanol al 70% frío. Volver a centrifugar 10 minutos a la misma velocidad.
7. Decantar de nuevo el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200 µl, teniendo cuidado de no llevarse el botón de DNA. Secar el precipitado en la centrífuga con vacío o dejar secar el tubo abierto dentro de una caja con tapa, de un día para otro.
8. Resuspender en 200 µl de agua bi-destilada esterilizada.

APÉNDICE 2

Análisis pareado de distancias genéticas entre secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I (550 bases).

Individuos ^a	FC2	FC3	PY2	PY3	LW2	LP1	LP2	LR4	LR5	PC1	PCGB*	<i>C. lupus</i> *
FC2	-											
FC3	0.0018	-										
PY2	0.1500	0.1524	-									
PY3	0.1500	0.1524	0	-								
LW2	0.1481	0.1505	0.1666	0.1666	-							
LP1	0.14.81	0.1505	0.1666	0.1666	0	-						
LP2	0.14.81	0.1505	0.1666	0.1666	0	0	-					
LR4	0.1406	0.1430	0.1042	0.1042	0.1497	0.1497	0.1497	-				
LR5	0.1430	0.1454	0.1064	0.1064	0.1521	0.1521	0.1521	0.0055	-			
PC1	0.1427	0.1451	0.1044	0.1044	0.1543	0.1543	0.1543	0.1109	0.1087	-		
PCGB*	0.1473	0.1497	0.1087	0.1087	0.1589	0.1589	0.1589	0.1152	0.1130	0.0036	-	
<i>C. lupus</i> *	0.2278	0.2304	0.2410	0.2410	0.2410	0.2410	0.2410	0.2467	0.2440	0.2278	0.2328	-

* Secuencias tomadas de GenBank. ^a Los individuos se muestran como fueron enlistados en el cuadro

APÉNDICE 3

Análisis parcado de distancias genéticas entre secuencias del gen citocromo *b* (1140 pares de bases).

Individuos	FC1	FCGB*	PY1	PY2	LW1	LW2	LW3	LP1	LP2	LP3	PO1	PO2	PO3	LR1	LR2	LR3	PCI	PCGB*	<i>C. lupus</i> *	
FC1	-																			
FCGB*	0.0044	-																		
PY1	0.1299	0.1310	-																	
PY2	0.1299	0.1310	0	-																
LW1	0.1281	0.1292	0.1370	0.1370	-															
LW2	0.1184	0.1195	0.1328	0.1328	0.0545	-														
LW3	0.1206	0.1217	0.1283	0.1283	0.0584	0.0106	-													
LP1	0.1173	0.1184	0.1317	0.1317	0.0555	0.0026	0.0097	-												
LP2	0.1184	0.1195	0.1328	0.1328	0.0545	0	0.0106	0.0026	-											
LP3	0.1195	0.1206	0.1317	0.1317	0.0555	0.0026	0.0080	0.0018	0.0026	-										
PO1	0.1465	0.1500	0.1508	0.1508	0.1598	0.1555	0.1508	0.1567	0.1555	0.1543	-									
PO2	0.1523	0.1558	0.1473	0.1473	0.1610	0.1543	0.1496	0.1555	0.1543	0.1531	0.0080	-								
PO3	0.1465	0.1500	0.1508	0.1508	0.1598	0.1555	0.1508	0.1567	0.1555	0.1543	0	0.0080	-							
LR1	0.1173	0.1184	0.1374	0.1374	0.1299	0.1247	0.1202	0.1235	0.1247	0.1235	0.1505	0.1540	0.1505	-						
LR2	0.1173	0.1184	0.1374	0.1374	0.1277	0.1224	0.1202	0.1213	0.1224	0.1213	0.1529	0.1564	0.1529	0.0035	-					
LR3	0.1162	0.1173	0.1363	0.1363	0.1265	0.1213	0.1191	0.1202	0.1213	0.1202	0.1517	0.1552	0.1517	0.0026	0.0009	-				
PC1	0.1358	0.1346	0.1073	0.1073	0.1398	0.1274	0.1252	0.1263	0.1274	0.1286	0.1676	0.1664	0.1676	0.1505	0.1528	0.1516	-			
PCGB*	0.1358	0.1346	0.1073	0.1073	0.1398	0.1274	0.1252	0.1263	0.1274	0.1286	0.1676	0.1664	0.1676	0.1505	0.1528	0.1516	0	-		
<i>C. lupus</i> *	0.2461	0.2474	0.2428	0.2428	0.2363	0.2508	0.2429	0.2495	0.2508	0.2469	0.2475	0.2488	0.2475	0.2657	0.2684	0.2670	0.2537	0.2537	-	

* Secuencias tomadas de GenBank.

APÉNDICE 4

Haplotipos de las secuencias del gen completo de citocromo *b* para *Puma concolor*, *Lynx rufus*, *Panthera onca*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Puma yagouaroundi* y *Felis catus*, utilizadas como base para el desarrollo del presente estudio. Se muestra la variabilidad nucleotídica entre haplotipos de una misma especie, así como el fragmento diagnóstico de 226 pb flanqueado por la ubicación de los iniciadores (FCB12 y FCB7R) y las secuencias blanco de las enzimas BtsCI (5'-GGATG-3') y Tsp509I (5'-AATT-3') presentes en éste.



10 20 30 40 50 60 70 80 90
Lynx rufus H3 G.
Lynx rufus H2 G. A.
Lynx rufus H1 ATGACCAACATT CGAAAATCACACCCTCTTATCAAATAATCAACCACCTATT CATCGATTTACCCACCCCATCCAACATCTCAGCATGA

100 110 120 130 140 150 160 170 180
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 TGAAACTTCGGCTCCCTGCTAGGAGTCTGCCTAATCTACAGATCCTCACC GGCTCTTCTAGCCATACACTACACATCAGACACGCTA

190 200 210 220 230 240 250 260 270
Lynx rufus H3 T. C.
Lynx rufus H2 T. C.
Lynx rufus H1 ACCGCCTTTTTCATCAGTCACCCATATCTGCCGCGACGTTAATTATGGCTGAGTCATCCGATATATACATGCCAACGGAGCCTCCATGTTTC

280 290 300 310 320 330 340 350 360
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 TTTATCTGTCTATACATGCACGTAGGACGAGGAATGTACTACGGCTCCTACACCCCTTTCAGAGACATGAAATATCGGAATCATATTACTA

370 380 390 400 410 420 430 440 450
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 TTCACAGTTATAGCCACAGCCTTCATAGGATACGTTCTACCATGAGGCCAAATATCCTTCTGAGGGGCAACTGTAATCACTAATCTCCTA

460 470 480 490 500 510 520 530 540
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 TCAGCAATTCGTATATTGGGACCAACTTAGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTCTCAGTAGATAAAGCTACCCTAACACGATTCTTCGCC

550 560 570 580 590 600 610 620 630
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 TTCCACTTCATCCTTCCATTCATCTCAGCCTTAGCAGCAGTGCACCTCCTATTCTCCACGAACAGGATCTAACAAATCCCTCAGGA
FCB12

640 650 660 670 680 690 700 710 720
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 ATCAGATCCAACCTCAGATAAGATCCCATTCACCCCTACTATACAATTAAGACATCCTGGGCCTCCTAGTACTAATCCTAGCACTCATA
BtsCI Tsp509I BtsCI

730 740 750 760 770 780 790 800 810
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 CTACTCGTCTTATTCTCGCCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACACTACATCCCGCCAACCCCTCTAACACCCCTCCCATATCAAGCCC
FCB7R

820 830 840 850 860 870 880 890 900
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 GAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATCTCCGATCCATTCTAATAAACTAGGAGGAGTTCTGGCCCTAGTACTCTCCATCCTAGTC

910 920 930 940 950 960 970 980 990
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 CTAGCGATCATCCAATCCTCCACACCTCAAACAACGAGGAATAATATTTGACCCACTGGGTCAATGCCTATTCTGACTCCTGGTAGCA

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 GACCTCCTAACCCTAACATGAATTGGCGGTCAACCCGTAGAGTACCCTTTATCACCATCGGCCAACTAGCCTCTATCCTATACCTTCTTA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
Lynx rufus H3
Lynx rufus H2
Lynx rufus H1 ACCCTCCTAATCCTAATGCCATCTCAGGCATCATTGAAAACCGTCTCCTCAAGTGAAGA

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Panthera onca H2T
Panthera onca H1 ATGACCAACATTGAAAATCTCACCCCTTATCAAGATCATCAACCACTCATTATTGATCTTCCCGCTCCATCCAATATCTCAGCATGA

100 110 120 130 140 150 160 170 180
Panthera onca H2C
Panthera onca H1 TGGAACTTTGGTTCCCTACTAGGAGTGTGTTAATCCTACAAATTCTTACTGGTCTTCTCCTAGCCATACACTACACGTCAGATACAATA

190 200 210 220 230 240 250 260 270
Panthera onca H2C
Panthera onca H1 ACCGCTTTCTCATCAGTCACCCATATCTGCCGCGACGTAATTCAGGCTGAATCATCCGATATTTACAGCCAATGGAGCCTCCATATTC

280 290 300 310 320 330 340 350 360
Panthera onca H2A
Panthera onca H1 TTTATCTGCCTGTACATACACGTAGGACGAGGAATATACTACGGCTCCTACACTTTCTCAGAAACATGAAATATTGGAATCGTACTATTA

370 380 390 400 410 420 430 440 450
Panthera onca H2G
Panthera onca H1 TTCACAGTCATAGCTACAGCTTTCATAGGATATGTCTACCATGGGGCCAAATATCCTTTTGAGGGGCAACCGTAATCACCAACCTCCTA

460 470 480 490 500 510 520 530 540
Panthera onca H2A
Panthera onca H1 TCGGCAATCCCATATTTGGAACCAATCTAGTAGAGTGGATCTGAGGGGCTTCTCAGTAGACAAGCCACCCTAACACGATTTCTTTGCC

550 560 570 580 590 600 610 620 630
Panthera onca H2FCB12
Panthera onca H1 TTCCACTTCATCCTTCCATTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTCCATCTCCTATTCTTTCATGAGACAGGATCCAATAACCCCTCAGGA

640 650 660 670 680 690 700 710 720
Panthera onca H2BtsCI
Panthera onca H1 GTGGTATCCGACTCAGACAAAATCCATTTACCACATACTACACAATCAAAGATATCCTGGGCTCCTAGTACTAATCCTAATACTCATG

730 740 750 760 770 780 790 800 810
Panthera onca H2T.....G
Panthera onca H1 CTACTCGTCTATTCTCACCAGCCTACTAGGAGACCCCGATAACTATACCCCGCCAACCTCTAAACACCCCTCCCACATCAAACCC

820 830 840 850 860 870 880 890 900
Panthera onca H2FCB7R
Panthera onca H1 GAATGATATTTCTATTGTCATACGCAATCCTCCGATCTATCCCAATAAGCTAGGAGGAGTTTAGCCCTAGTTCTATCTATCTTAACC

910 920 930 940 950 960 970 980 990
Panthera onca H2C
Panthera onca H1 TTAGCTATCATCCCGCTCTCCACACTTCTAAACAACGAGGAATAATGTTTCGACCCTAAGCCAATGCTTATTCTGATTACTAGTAGGG

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
Panthera onca H2G
Panthera onca H1 GACCTTCTGACCTAACATGAATGGCGGCAACCTGTAGAACACCCCTTATCACCCTCGGCCAACTGGCCTCCATCCTATACTTCTCT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
Panthera onca H2G
Panthera onca H1 ATCCTTCTAATCCTAATACCTATCTCAGGCATTATTGAAAATCGCCTCCTTAAATGAAGA

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
ATGACCAACATCCGAAAATCACACCCCTTATTAAAATTATCAATCACTCATTATCGATCTACCCGCTCCATCCAACATCTCAGCATGA

100 110 120 130 140 150 160 170 180
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TGGAACTTCGGCTCCTTATTAGGAATTTGCCTAAATTTACAATCCTCACCAGCCTTTCTGGCCATACACTATACATCAGATACAACA

190 200 210 220 230 240 250 260 270
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
ACCGCCTTTTCATCAGTTACCCACATCTGCCGCGAGTCAACTATGGCTGAATCATCCGATACATACATGCCAACGGAGCCTCCATATTT

280 290 300 310 320 330 340 350 360
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TTTATCTGCCTATACATACACGTAGGACGAGGAATATATTACGGCTCCTACACCTTCTCAGAAACATGAAACATTTGGAATCATACTGCTA

370 380 390 400 410 420 430 440 450
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TTCGCAGTTATAGCCACAGCCTTCATAGGATACGTCCTACCATGAGGTCAAATATCCTTCTGAGGAGCAACTGTAATCACCAATCTCCTTA

460 470 480 490 500 510 520 530 540
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TCAGCAATCCCATATATCGGAACTAGCCTGGTAGAATGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGATAAAGCCACCTAACACGATTCTTTGCT

550 560 570 580 590 600 610 620 630
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TTCCACTTCATCCTTCCATTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTCCATCTTCTATTCTCCACGAAACAGGATCTAATAACCCCTCAGGA
FCB12

640 650 660 670 680 690 700 710 720
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
ATTACATCTGACTCAGACAAAATCCCATTCCACCATATTACACAATTAAAGACATCCTAGGCCTCCTAGCCTAATTTTAAACCTTATA
BtsCI

730 740 750 760 770 780 790 800 810
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
TTACTCGTTCATTCTCACCAGACTTGCTAGGAGACCAGACAACACTACATCCCCGCCAACCTCTAAATACTCCTCCCCATATCAAACCC
FCB7R

820 830 840 850 860 870 880 890 900
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
GAATGATACTTCTTATTCGCATACGCAATTCCTCCGATCCCAACAAAATTAGGAGGAGTCTAGCTTTAGTACTCTCCATCCTAATC

910 920 930 940 950 960 970 980 990
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
CTAGCAATCATCCCAATCCTCCATACCTCCAACAACGAGGAATAATATTCGACCACTAAGCCAATGCCTATTCTGACTCCTAGTAGCA

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
GACCTCCTAACTCTGACATGAATTTGGCGGTCAACCCGTAGAACACCCCTTTTATTACCAATGGTCAACTAGCTTCCATCCTATACTTCTCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
Leopardus pardalis H3
Leopardus pardalis H2
Leopardus pardalis H1
ACTCTCCTGATCTTAATACCCATCTCAGGCATCATTGAAAATCGCCTCCTTAATGAAGA

Leopardus wiedii H110.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90
 ATGACCAACATTGAAAAACACACCCCTTGTTAAAATTATTAATCACTCATTATCGACCTACCCGCTCCGTCACACATCTCAGCATGA

Leopardus wiedii H1100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180
 TGGAACTTCGGCTCTTTATTAGGGATTTGCCTAATCCTACAAATCTCACCGGCCTTTTCTGGCCATACACTATACATCAGACACAGCA

Leopardus wiedii H1190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270
 ACCGCTTTTTCATCAGTTACCCACATCTGCCGACGCTCAACTATGGCTGAATCATCCGATACATACATGCCAACGGAGCCTCCATATTT

Leopardus wiedii H1280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360
 TTTATCTGCCTATACATACACGTAGGGCGAGGAATATATTACGGCTCCTACACCTTCTCAGAAACATGAAACATCGGAATCATACTGCTA

Leopardus wiedii H1370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450
 TTTGCAGTTATAGCCACAGCCTTCATAGGATACGTTCTACCATGAGGTCAAATATCCTTTTGAGGGGCAACTGTAATTACCAATCTCCTG

Leopardus wiedii H1460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540
 TCAGCAATCCCATACATCGGAAGTACGCTAGTAGAATGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAGCTACCCAACACGATTCTTTGCT

Leopardus wiedii H1550.....560.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630
 TTCCACTTCATCCTCCCATTCATCATCTCAGCCCTAGCAGCAGTTCATCTCCTATTTCTCCAGCAACAGGATCCAATAACCCCTCAGGA
 BtsCI FCB12

Leopardus wiedii H1640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720
 ATTACATCCGACTCAGACAAAATCCATTCCACCCACTACATAATTAAAGACATCCTAGGCATCCTAGCACTAATTCTAACACTTATA
 BtsCI BtsCI BtsCI

Leopardus wiedii H1730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800.....810
 CTACTCGTTCTATTCTCACCAGACCTGCTAGGGGACCCAGACAACCTACACCCCGCCAAACCCCTAAATACCCTCCCATATCAAACCC
 FCB7R

Leopardus wiedii H1820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900
 GAATGATATTTCTATTTCGCATATGCAATTCTCCGATCCATCCCCAACAAATAGGAGGAGTCTAGCCTTAGTACTCTCAATCCTAGTC

Leopardus wiedii H1910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990
 CTAATAATGATCCCAATCTCCATACCTCCAACAACGAGGAATAATATTCGACCCACTAAGCCAATGCCTATTCTGACTCCTAGTAGCA

Leopardus wiedii H11000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050.....1060.....1070.....1080
 GACCTCCTAACTCTAACATGAATTGGCGGCCAACCCGTAGAACACCCCTTATTACCATCGGCCAACTAGCCTCCGCTCCTATACTTCTCA

Leopardus wiedii H11090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140
 ACTCTCCTGATCCTAATACCCATCTCAGGCATCATTGAAAATCGCCTCCTTAAATGAAGA

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Felis catus H2
Felis catus H1 ATGACCAACATTTCGAAAATCACACCCCTTATCAAATTTAATAATCACTCATTTCATCGACCTACCGGCCCATCTAACATCTCAGCATGA

100 110 120 130 140 150 160 170 180
Felis catus H2
Felis catus H1 TGAAACTTCGGCTCCCTTCTAGGAGTCTGCCTAATCTTACAATCCTCACC GGCTCTTTTTGGCCATACACTACACATCAGACACAATA

190 200 210 220 230 240 250 260 270
Felis catus H2
Felis catus H1 ACCGCCTTTTCATCAGTTACCCACATCTGTCCGACGTTAATTATGGCTGAATCATCCGATATTTACACGCCAACGGAGCTTCTATATTC

280 290 300 310 320 330 340 350 360
Felis catus H2
Felis catus H1 TTTATCTGCCTGTACATACATGTAGGACGGGAATATACTACGGCTCTACACCTTCTCAGAGACATGAACATTGGAATCATACTATTA

370 380 390 400 410 420 430 440 450
Felis catus H2
Felis catus H1 TTTACAGTCATAGCCACAGCTTTTATGGGATACGCTCTACCATGAGGCCAAATGTCTTCTGAGGAGCAACCGTAATCACTAACCTCTCG

460 470 480 490 500 510 520 530 540
Felis catus H2
Felis catus H1 TCAGCAATTCATACATCGGGACTGAACTAGTAGAATGGATCTGAGGGGGCTTCTCAGTAGACAAAGCCACCTAACACGATTCTTCGCC

550 560 570 580 590 600 610 620 630
Felis catus H2
Felis catus H1 TTCCACTTCATCCTTCATTCTCAGCCTTAGCAGCAGTACACCTCTTATTCCTTCATGAAACAGGATCTAACACCCCTCAGGA

640 650 660 670 680 690 700 710 720
Felis catus H2
Felis catus H1 ATTACATCCGATTCAGACAAAATCCATTCCACCCATACTATACAATCAAAGACATCCTAGGTCTTCTAGTACTAGTTTTAACACTCATA

730 740 750 760 770 780 790 800 810
Felis catus H2
Felis catus H1 CTACTCGTCTCTATTTTCACCAGACCTGCTAGGAGACCCAGACAACCTACATCCAGCCAAACCTTTAAATACCCCTCCCATATTAACCT

820 830 840 850 860 870 880 890 900
Felis catus H2
Felis catus H1 GAATGATACTTCCTATTCGCATACGCAATTCTCCGATCCATCCCAACAAACTAGGAGGAGTCTAGCCCTAGTACTCTCCATCCTAGTA

910 920 930 940 950 960 970 980 990
Felis catus H2
Felis catus H1 CTAGCAATCATTCCAATCCTCCACACCTCCAACAACGAGGAATAATGTTTCGACCACTAAGCCAATGTCTATTCTGACTCCTAGTAGCG

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
Felis catus H2
Felis catus H1 GATCTCCTAACCTAACATGAATCGGTGGCCAACTGTAGAACATCCATTTCATCACCATCGGCCAACTAGCCTCCATCCTATATTTCTCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
Felis catus H2
Felis catus H1 ACCCTCCTAATCCTAATACCCATCTCAGGCATTATTGAAAACCGTCTACTCAAATGAAGA

Puma yagouaroundsi H1 10 20 30 40 50 60 70 80 90
 ATGACCAACATT CGAAAATC ACACCCCTCATT AAAATCATCAATCACTATTATTGATCTACCTGCCCATCCAACATTT CAGCATGA

Puma yagouaroundsi H1 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TGAATTTTGGTTCCCTGTTAGGAGTCTGCCTAATCCTACAAATCCTAACGGCCTCTTCCTAGCTATACACTACACATCAGACACAACA

Puma yagouaroundsi H1 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 ACTGCCTTTTCATCAGTCACCCACATCTGCCGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGATACATACATGCTAACGGGGCCTCCATATTC

Puma yagouaroundsi H1 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 TTTATCTGCTTTGTACATACACGTAGGACGAGGAATATATTACGGCTCCTACACCTTCTCAGAAACATGGAATATTGGAATTACTACTA

Puma yagouaroundsi H1 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TTTACGGTCATAGCCACAGCCTTTATAGGATATGTCCTGCCATGAGGCCAAATATCTTTTGAGGAGCAACCGTAATTACCAACCTCCTA

Puma yagouaroundsi H1 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 TCAGCAATCCATATATCGGAACCAACTTAGTAGAGTGAATCTGAGGAGGATTTCTCGGTAGATAAGGCCACCCTAACACGATTCTTTGCC

Puma yagouaroundsi H1 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 TTCCATTTTATCCTCCATTATCATCTCAGCTCTAGCAGCAGTACACCTCCTATTTCTCCACGAAACAGGATCTAACAACCCCTCAGGA

Puma yagouaroundsi H1 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 GTTTCATCCAAACCCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACAATCAAGGACATTTTAGGTCCTCTAGTATTAATTTTAACTACTATA
 BtsCI
 730 740 750 760 770 780 790 800 810
 CTACTCGTTCTATTCTCACCAGACCTATTAGGAGACCCAGATAAATAATATCCCCGCAACCCCTAAATACCCCTCCCCATATAAACCT

Puma yagouaroundsi H1 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAATGATATTTCTTATTTCGCATATGCAATCCTCCGATCTATCCCCAACAACTAGGAGGAGTCTAGCCCTAGTACTTTCCATCCTAATC

Puma yagouaroundsi H1 910 920 930 940 950 960 970 980 990
 CTAGCAATCATCCCAGCCCTACACACTTCCAACAACGAGGAATAATTTTCGACCACTAAGCCAATGCCTATTCTGACTCCTAGTAGCA

Puma yagouaroundsi H1 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GACCTCCTAACCTAACATGAATGGCGGCCAACCCGTAGAACATCCTTTCATCACTATCGGCCAACTAGCCTCTATCCTATACTTCTCA

Puma yagouaroundsi H1 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ACCCTCCTAATTCTAATACCCCTATCAGGTGTTATTGAAAACCGTATTCTAAAATGAAGA

FCB12

FCB7R