

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Casa abierta al tiempo**

**ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL  
ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*), POR MEDIO DEL MÉTODO  
RAPD EN EJEMPLARES DE DOS POBLACIONES.**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN**

**BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**P R E S E N T A :**

**BIOL. VICTOR MANUEL SALOMÓN SOTO**

**DIRECTOR DE TESIS : M. en C. JOSÉ LUIS CONTRERAS MONTIEL**

**ASESORES: DR. PABLO DAMIÁN MATSUMURA**


**DR. CARLOS VÁSQUEZ PELÁEZ**

**MÉXICO D. F.**

**JOSÉ LUIS CONTRERAS MONTIEL  
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
DEPTO. BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION  
C. P. 09340 A. P. 55535  
IZTAPALAPA, MEXICO 13, D. F.**

**JUNIO 2000**

**TEL. 58 04 47 05-01-02 FAX 58 04 49 30**



## INDICE:

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	6
EL ZACATUCHE, TEPORINGO O CONEJO DE LOS VOLCANES ( <i>Romerolagus diazi</i> , Ferrari Pérez en Díaz 1893).....	6
DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.....	8
CONSERVACIÓN DEL ZACATUCHE.....	11
GENÉTICA DE POBLACIONES.....	12
Ley de Hardy-Weinberg.....	12
Deriva genética.....	13
Depresión por consanguinidad.....	14
MARCADORES GENÉTICOS: SU USO EN EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA.....	15
MÉTODO RAPD.....	18
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	48
ANEXOS.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## RESUMEN

El zacatuche (*Romerolagus diazi*), es una especie endémica del Eje Neovolcánico Transversal ubicado en el centro del país y se encuentra actualmente considerada en peligro de extinción.

La destrucción del hábitat de esta especie ha tenido como consecuencia la reducción de su número poblacional, esto provoca un aumento en el número de apareamientos entre individuos emparentados, produciendo a su vez depresión genética que puede llegar a amenazar la supervivencia de una población pequeña, debido a la pérdida de la variabilidad genética, la variabilidad individual, la reducción en la resistencia a enfermedades, a los parásitos y a los retos que plantea su medio ambiente.

Conocer el estado genético que guardan las poblaciones silvestres y en cautiverio de *Romerolagus diazi* ayudará a un mejor manejo genético de éstas y tratar de evitar las consecuencias deletéreas de una reducida variabilidad genética. En este estudio se estimó la variabilidad genética de individuos silvestres y en cautiverio utilizando el método RAPD (Amplificación al Azar de DNA Polimórfico), una técnica basada en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La técnica RAPD amplificó 31 loci del ADN de *Romerolagus diazi*. Se observó que las dos poblaciones presentan diferencias genéticas en 8 loci ( $P < 0.05$ ) y la población silvestre presentó mayor variabilidad genética que la de Chapultepec. De los 31 loci amplificados, 12 se han fijado en ambas poblaciones, 10 no son estadísticamente significativos, 6 se han perdido en los individuos estudiados de Chapultepec que aun permanecen en la población silvestre, 2 han perdido el 88 % de su variabilidad en la colonia de Chapultepec con relación a los individuos silvestres y 1 locus presenta mayor variabilidad en la Colonia de Chapultepec en relación con la población silvestre. Se postula que la introducción de individuos de la zona de Parres D.F. es posible y permitiría aumentar la variabilidad genética de la población de Chapultepec.

## INTRODUCCIÓN

La biodiversidad, tomada como la diversidad de seres vivos en un área o en el planeta, se puede subdividir en tres niveles (Primack, 1993): la *diversidad de especie*, que incluye todas las especies existente en la tierra; la *diversidad genética*, la cual incluye la variación genética de las especies de poblaciones separada geográficamente y entre individuos de una simple población y la *diversidad de comunidades*, que incluye la variación en los hábitats y ecosistemas de una región, la cual está disminuyendo rápidamente como consecuencia directa o indirecta de las acciones humanas.

Se sabe que los principales factores que afectan negativamente la biodiversidad son: la destrucción o fragmentación de los hábitats y ecosistemas, la introducción de especies, la sobreexplotación de los recursos naturales y la contaminación (Primack, 1993; Meffe y Carroll, 1994). Como consecuencia en la actualidad existen muchas especies de animales que no son capaces de sobrevivir sin alguna forma activa de protección y manejo (Garner y Ryder, 1992) y sin la intervención del hombre la recuperación por si solas de estas especies se torna imposible, lo que ha despertado el interés de muchas personas por la conservación y manejo de la diversidad biológica.

Una alternativa para la recuperación de especies en peligro de extinción es la conservación *ex situ* esto es conservación de especies fuera de su hábitat natural en zoológicos o centros de reproducción de fauna silvestre. Los programas de reproducción *ex situ* pueden, en teoría, incrementar rápidamente el número de individuos en una población y ayudar a

proteger su diversidad genética (Worley, 1997). Sin embargo, existen estudios que han demostrado que los animales criados en zoológicos pueden presentar efectos deletéreos debido a la pérdida de su variabilidad genética (Ralls, et. al. 1979; Frankham, 1995; Laikre, 1999). Esto se debe por lo general a que son descendientes de un número pequeño de fundadores y las poblaciones se mantienen pequeñas por mucho tiempo (Stewart y Hutchings, 1997).

Existen reportes de estudios donde la pérdida de la variabilidad genética parece ser un factor muy importante en el incremento del riesgo de extinción de las poblaciones silvestres aisladas (O'Bried et. al. 1985; Wildt et. al. 1987; Jiménez et. al. 1994) por lo que es ampliamente aceptado la necesidad de tomar las medidas requeridas para la conservación de la diversidad genética, debido a esto el estudio y comparación de la variabilidad genética entre las poblaciones silvestres y las poblaciones en cautiverio son de gran valor (Neveu, 1998).

La diversidad genética de muchas especies de la cual hoy se conoce está basada en la medición de variaciones de diferentes proteínas y específicamente isoenzimas (Gray, 1997). Este análisis se basa en que diferentes formas de una enzima pueden ser detectadas si ellas difieren en la carga eléctrica, en el peso molecular o conformación espacial y como consecuencia presentan diferente movilidad cuando se colocan en un campo eléctrico moviéndose a través de una matriz porosa, generalmente un gel de almidón o acrilamida. Esta técnica se llama electroforesis y las diferentes formas de la enzima pueden ser visualizadas como bandas en un gel, en donde cada banda representa la expresión de diferentes alelos de un gen.

Actualmente, la medición de la variación a nivel del ADN es posible a través de técnicas de biología molecular, las cuales presentan ventajas sobre la técnica análisis de isoenzimas, debido a que pueden detectar polimorfismos en ADN codificante y ADN mitocondrial dependiendo de la prueba. Una de estas técnicas, la cual está basada en la técnica PCR ("Polymerase Chain Reaction" o Reacción en cadena de la polimerasa) es RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA o Amplificación al Azar de ADN Polimórfico), el cual detecta ADN del cual no se conoce la secuencia de nucleótidos, a través de secuencias cortas de oligonucleótidos (de 10 pares de bases) que se emplean como cebadores y ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de la diversidad genética en gran número de especies vegetales (Williams et. al. 1990; Williams, et. al. 1993; Rafalski, 1997; Liao y Hsiao, 1998; Dawson et al, 1993; Peakall et al, 1995; Rosseto et al, 1995; Liao y Hsiao, 1998; Stenlid y Vasiliauskas, 1998; Bauert et al, 1998; Huff et al, 1998; insectos (Nagaraja y Nagaraju, 1995), artiodáctilos (Kostia et al, 1996), grandes felinos (Shankaranarayanan, et al, 1997), roedores (Gordon et al, 1998), aves (Nusser et al, 1996; Dhar et al, 1997), anfibios (Kimberling et al, 1996) y peces (Gomes et al, 1998).

El Zacatuche o conejo de los volcanes (*Romerolagus diazi*, Ferrari Pérez, 1983) especie endémica del Eje Neovolcanico Transversal (Villa, 1978; Hoth et. al. 1987; Cervantes, et. al.1990; Bell et. al. 1985) ubicado en el centro del país, es un ejemplo claro donde factores tales como la reducción del área de distribución y la fragmentación de hábitat (ya sea por actividades propias del hombre o por procesos ecológicos) están mermando las posibilidades de sobrevivencia de este lagomorfo en su hábitat natura (Velázquez, 1993).

- En el presente trabajo se manejan los nombres de los métodos sin traducir y sus siglas en ingles, porque traducirlas podría llevar a confusiones.

Esto ha originado que investigadores de México y el extranjero se interesen en la reproducción de la especie en condiciones de laboratorio y semicautiverio (Hoth y Granados, 1987; Matsuzaki et. al. 1996; Sauter, 1996), sin embargo, de todos estos centros el único que se conoce con certeza que tiene actualmente una población establecida de zacatuches es el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México, los cuales descienden de un número reducido de fundadores (Hoth y Granados, 1987). Reyes y Llata (1998) recomiendan la introducción de nuevos individuos a la colonia para minimizar los problemas de consanguinidad (no mencionan cuales problemas), debido a esto es posible suponer una baja variabilidad genética en dicha población como resultado de la deriva genética y la consanguinidad.

En este estudio se comparó la variabilidad genética de individuos silvestres y en cautiverio del Zacatuche mediante la utilización del método RAPD con la finalidad de conocer su status genético que permita plantear las estrategias necesarias en un programa de reproducción, que coadyuven en la conservación de los individuos y la capacidad evolutiva de la especie.

## ANTECEDENTES

EL ZACATUCHE, TEPORINGO O CONEJO DE LOS VOLCANES (*Romerolagus diazi*, Ferrari Pérez en Díaz 1893).

México es uno de los países que pueden, inequívocamente, presumir de una diversidad biológica extraordinaria y única, ocupa el primer lugar en número de especies de reptiles y el segundo lugar en cuanto al número de mamíferos, entre las que destacan aquellas de carácter autóctono (endémicas), especies exclusivas del territorio nacional.

La biodiversidad de los lagomorfos mexicanos es sin lugar a dudas muy amplia y representa la mayor del continente americano (Cervantes, 1993) con 14 especies en total , 8 de las cuales son endémicas del país. Desafortunadamente 4 de las especies endémicas tienen poblaciones pequeñas o hábitats tan restringidos que se ha recomendado su protección completa (Cervantes y González, 1996) de lo contrario podrían extinguirse, perdiéndose parte de la diversidad biológica y con ello la diversidad genética de la que hoy podemos presumir. Una de estas 4 especies es el zacatuche, teporingo o conejo de los volcanes, cuyo nombre científico es *Romerolagus diazi*.

El zacatuche (figura 1) es una especie de lagomorfo mexicana endémica (Hoth et al. 1987) y es una especie catalogada en peligro de extinción (Thornback y Jenkins, 1984). Es el conejo de menor talla en nuestro país (268- 285mm) y se caracteriza por su color pardo oscuro homogéneo, sus orejas redondas pequeñas, patas cortas y cola no distinguible. Su cráneo alargado, su dentadura modificada y su proceso de muda son características



morfológicas atípicas por lo que se le considera como único a nivel mundial (Cervantes, et. al. 1990; Velázquez et. al. 1993).



**Figura 1.-** Un ejemplar de zacatuche (*Romerolagus diazi*) en la Unidad para la Evaluación y Monitoreo para la Biodiversidad Ing. Luis Macias Arellano-INE en San Cayetano Estado de México (Fotografía de José Luis Contreras).

## DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

El zacatuche solamente se distribuye en un área pequeña y restringida en las montañas del Sur y Sureste del Valle de México (Villa, 1973; Bell et al. 1985; Hoth et al. 1987), habita exclusivamente en bosques abiertos de pinos con densas coberturas de gramíneas amacolladas (*Pinus spp./Festuca toluencis*) (Velázquez, 1993). Sin embargo, la reducción del área de distribución y la fragmentación del hábitat de la especie (figuras 2 y 3), debido a actividades propias del hombre o por procesos ecológicos, están mermando

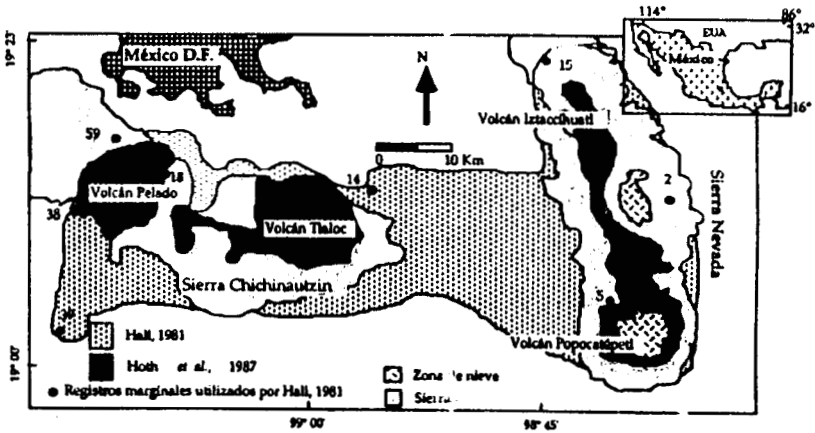
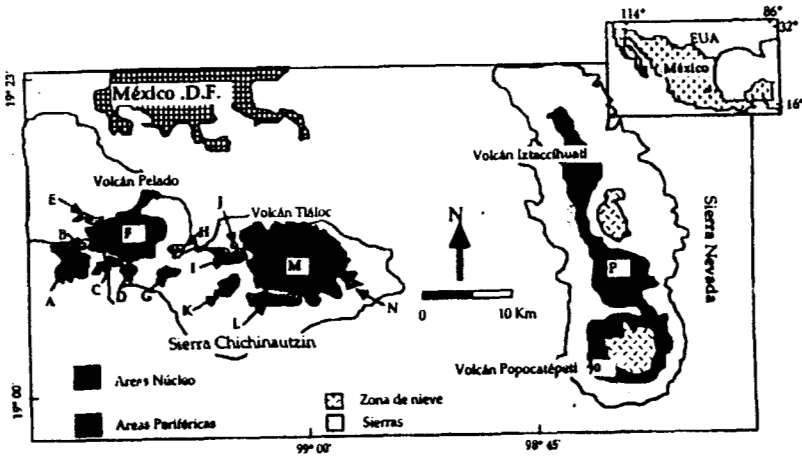


Figura 2.-Área de distribución de *Romerolagus diazi* según Hall (1981) y Hoth et al. (1987), tomado de Velázquez et al. (1996).



**Figura 3.-** Mapa de que muestra la reducción en la distribución actual de *Romerolagus diazi*. El área está fragmentada en 16 unidades cuatro núcleo y 12 periféricas (Velázquez et. al. 1996).

las posibilidades de sobrevivencia de este lagomorfo (Velázquez, 1993). La destrucción de su hábitat ha tenido como consecuencia la reducción en su número poblacional y esto se sabe provoca un aumento en el número de apareamientos entre parientes (Wright, 1951; Stewart y Hutchings, 1997), lo que a su vez produce depresión genética que pudiera llegar a amenazar la supervivencia de una población pequeña (Mills y Smouse, 1994).

Conocer el status genético de las poblaciones silvestres y en cautiverio de *Romerolagus diazi* puede ayudar a determinar el momento en el cual la manipulación genética puede ser un componente importante en una estrategia de conservación (Lacy, 1997; Neveu, et. al. 1998) y a evitar las consecuencias deletéreas de una reducida variabilidad genética.

De acuerdo con Shaffer (1981), Gilpin y Soulé (1986) existen algunos factores que ponen en peligro de extinción a una especie cuando sus poblaciones han disminuido o se han aislado y estos pueden ser de dos tipos determinísticos o estocásticos

Los factores determinísticos son algunos cambios o fuerzas inexorables de las cuales no existe posibilidad de escape (Gilpin y Soulé, 1986). Los fuegos forestales en combinación con el sobrepastoreo de ganado son algunos de los principales agentes de destrucción del hábitat de *Romerolagus diazi* (Hoth et al, 1987), así como otros procesos de fragmentación inducido por el hombre como son la construcción de carreteras y la utilización de las tierras para cultivo (Velázquez, 1993). Ellos son ejemplos de los factores a los cuales *Romerolagus diazi* no puede sustraerse y que pueden estar determinando el futuro de la especie, si no se actúa a conciencia y se implementan medidas adecuadas para su conservación.

Según Shaffer (1981) los factores estocásticos se clasifican en: estocasticidad demográfica, la cual es la combinación de las fluctuaciones al azar en las características demográficas (tasa de natalidad, tasa de mortalidad), diferente proporción de sexos y el rompimiento en la conducta social, lo que ocasiona que el tamaño de la población sea inestable provocando con frecuencia la extinción; *estocasticidad ambiental*, es la variación al azar de la comunidad biológica y el ambiente natural que puede ocasionar variación en el tamaño de la población de una especie; la interacción y competencia entre dos especies por el mismo recurso alimenticio y los cambios en el clima son ejemplos de ello y por último la *estocasticidad genética*, son los cambios al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones, un ejemplo de esta es la deriva genética. Conocer el efecto de estos factores

sobre las poblaciones de *Romerolagus diazi* ayudará a entender de manera más precisa el problema real al que se enfrenta la especie e idear y diseñar mecanismos apropiados para la conservación de la misma. Sin embargo, es casi nula la información al respecto en ésta especie, por lo que es importante empezar a realizar los estudios necesarios con el objetivo de recabar la información suficiente para dilucidar el efecto de los factores estocásticos sobre *Romerolagus diazi*.

## CONSERVACIÓN DEL ZACATUCHE

Desde hace años esta especie ha sido catalogada como en "peligro de extinción" al considerar que su sobrevivencia es improbable si no se aplican medidas especiales de protección (Cervantes, 1993). Debido a esto se ha propuesto diseñar y aplicar sistemas de vigilancia, a fin de evitar el pastoreo excesivo y la quema incontrolada de pastizales (Velázquez et. al. 1996), la restauración del hábitat, mantener zonas exclusivas dentro del área de distribución del zacatuche para su conservación (Galindo-Leal, 1993), así como el monitoreo de la distribución y abundancia de la especie para detectar las tendencias del número poblacional (Velázquez, 1993).

Una medida que complementa las actividades para la conservación *in situ* de las especies en peligro de extinción es la formación de colonias en semicautiverio (*ex situ*) por agrupaciones interesadas en ello como es el esfuerzo de los Zoológicos de Jersey (1958 a 1969 y 1979), el Zoológico Antwerp (1978), la Universidad de Hokkaido (1977 a 1983), la Facultad de Ciencias de la UNAM (1979 a 1980) y el Zoológico de Chapultepec (1984 a la fecha) (Hoth y Granados, 1987). Sin embargo de todos estos el único que se conoce con

certeza que actualmente tiene una población establecida de zacatuches es el zoológico de Chapultepec, cuya población actual son los descendientes de 12 ejemplares donados en 1984 por el Dr. Granados de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Debido al reducido número de animales fundadores es posible esperar una baja variabilidad genética de dicha población como resultado de la deriva genética y la consanguinidad. Por lo que, el conocer la variabilidad genética que presentan, tanto las poblaciones silvestres como las que existen en cautiverio, ayudará a plantear y ejecutar acciones que permitan un mejor manejo genético en los programas de reproducción, evitando los problemas que trae consigo la pérdida de variabilidad genética y apoyando de esta forma la conservación de esta especie y su capacidad evolutiva.

Con la finalidad de ubicarnos en el contexto de los problemas genéticos a los cuales se pueden enfrentar las poblaciones de *Romerolagus diazi* como resultado de la disminución de sus poblaciones debido a la pérdida y la fragmentación de su hábitat, así como la falta de un manejo reproductivo en cautiverio, se revisaran a continuación las bases genéticas de las pequeñas poblaciones.

## **GENÉTICA DE POBLACIONES**

### **Ley de Hardy-Weinberg**

Al analizar una población ideal de tamaño grande con apareamiento al azar, en ausencia de selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de una generación a la siguiente, a esto se le conoce como *ley de Hardy-Weinberg* (Falconer, 1993). Aquellas poblaciones que cumplan con todas estas propiedades

se dice que están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Por ejemplo, supongamos que un gen con dos alelos "A" y "a" tienen frecuencias de "p" y "q" respectivamente, todas las posibles combinaciones entre ellos dará como resultado las frecuencias genotípicas de la progenie (AA:  $p^2$ , Aa:  $2pq$  y aa:  $q^2$ ), si las frecuencias alélicas (p y q) de la progenie son las mismas que la de los padres, se dice entonces que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Entender este sencillo principio es muy importante en el análisis de genética de poblaciones porque muchas de las deducciones a las cuales se puede llegar se basan en esta ley. De esta manera, si las frecuencias alélicas de la progenie son diferentes a las frecuencias observadas en los padres (población en desequilibrio) podemos suponer que una o varias de las propiedades de la ley de Hardy-Weinberg mencionadas anteriormente no se están cumpliendo.

### **Deriva genética**

Cuando el tamaño poblacional se reduce, se incrementa la probabilidad de que un alelo individual se pierda de la población únicamente por el azar; por ejemplo un individuo que lleve un alelo determinado y no produzca progenie viable, determinará que ese alelo se pierda de la población. La progresiva pérdida de alelos por esta vía es lo que se llama *deriva genética*, la cual afecta directamente el promedio de la frecuencia de heterocigotos con relación a todos los loci estudiados (heterocigosidad media) de una población (Stewart y Hutchings, 1997). Debido a que es un proceso al azar la dirección de las frecuencias alélicas es impredecible, lo cual conduce a una diferenciación genética entre las subpoblaciones. La heterocigosidad es la mejor medida de la variación genética en una

población (Falconer, 1993). Se ha demostrado que las poblaciones pequeñas presentan menores niveles de heterocigosidad (Stewart y Hutchings, 1997) y la pérdida de la misma hace a una especie en particular más vulnerable a la extinción. En general, existe una correlación directa entre la heterocigosidad y la aptitud (Allendorf y Leary, 1986), entendiendo por esta última “la probabilidad de que un genotipo sobreviva desde la fertilización hasta la edad reproductiva” y está determinada por diferentes características como: los mecanismos de supervivencia, el vigor híbrido, una mayor resistencia a enfermedades, alta fertilidad, entre otros.

### **Depresión por consanguinidad**

En las grandes poblaciones de muchas especies animales los individuos normalmente no se aparean con sus parientes cercanos (Ralls et al. 1986). Los individuos frecuentemente se dispersan alejándose de su lugar de nacimiento (Cockburn et al. 1985) ó se inhiben los apareamientos entre parientes a través de un olor individual único u otras señales sensoriales. En algunos casos, cuando los apareamientos entre los individuos no emparentados no están disponibles estos mecanismos fallan en la prevención de la consanguinidad (Primack, 1993); esto es más probable que ocurra cuando el tamaño poblacional disminuye (Wright, 1951). Este fenómeno reduce la heterocigosidad e incrementa la probabilidad de expresión de alelos letales y semiletales lo cual da como resultado tasas altas de defectos al nacimiento, lento crecimiento, mayor mortalidad y menor fecundidad a este fenómeno se conoce como *depresión por consanguinidad* (Lacy, 1992; Stewart y Hutchings, 1997) y puede amenazar la supervivencia de una población pequeña (Mills y Smouse, 1994; Caughley, 1994; Stewart y Hutchings, 1997; Gray, 1997).



Su manifestación puede pasar desapercibida a menos que el tamaño pequeño de la población sea mantenido por varias generaciones (Stewart y Hutchings, 1997).

En teoría, el aumento en el número de problemas genéticos podría reducir el promedio del éxito de la progenie consanguínea y como consecuencia una alta tasa de mortalidad juvenil se presentaría en estas poblaciones (Rall et al. 1979; Jiménez, et. al. 1994; Fowler y Whitlock, 1999). Otros caracteres importantes que pueden ser afectados por la consanguinidad son: la conducta de pareja y el éxito reproductivo de los animales (Margulis y Altmann, 1997; Margulis, 1998); es decir, que aun cuando los individuos consanguíneos puedan alcanzar su edad adulta, presentarán un menor éxito reproductivo que individuos no consanguíneos (Wildt, et al. 1987, Keller, 1998).

#### **\* MARCADORES GENÉTICOS: SU USO EN EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA.**

Una de las primeras técnica utilizadas en el estudio de la variación genética de poblaciones naturales fue la electroforesis de isoenzimas, la cuál es una técnica relativamente simple y de bajo costo. La técnica se basa en el hecho de que un individuo con alelos heterocigotos en un locus producirá dos versiones de la misma proteína y solo una si es un homocigoto. Sin embargo, existen limitantes debido a que relativamente pocas enzimas son polimórficas y no todas las bandas representan alelos, además las proteínas desnaturalizadas durante la preparación de la muestra pueden formar bandas falsas y en las especies en peligro la variación observada podría ser el resultado del pequeño tamaño de la muestra. En este último caso de que una especie registrará cero heterocigosis basado en éste método podría interpretarse de que no carece de variación genética. Quizá la principal

desventaja de la electroforesis de proteínas sea el hecho de que detecta solo una proporción, quizá menos de una tercera parte de la variación genética existente (Gray, 1997).

Una vez que el papel del ADN en la herencia fue revelado, se abrieron los caminos para medir directamente la variación genética (Caughley y Gunn, 1996). La capacidad de analizar directamente el ADN para medir la variabilidad genética ha cambiado marcadamente nuestra capacidad para diferenciar las poblaciones y la relación genética entre los individuos (Caughley y Gunn, 1996).

Debido a que la información cualitativa y cuantitativa sobre la diversidad genética es un aspecto esencial de muchos campos en biología básica y aplicada como son la ecología, la biología evolutiva, la taxonomía, la agronomía, la reproducción y la conservación, diferentes técnicas moleculares pueden ser usadas para proveer marcadores de la diversidad genética (Karp y Keith, 1997; Liao y Hsiao, 1998).

Karp y Keith (1997) clasifican en tres categorías las técnicas moleculares que usan la hibridación o están basadas en la técnica conocida como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

a).- Técnicas basadas en la hibridación (no PCR).

Esta primera categoría incluye el análisis denominado RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ó Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción), técnica en la cual las sondas son hibridadas en filtros que contienen ADN, el cual se ha digerido con

enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis de gel y transferidos a otros filtros para el análisis de hibridación por "Southern" (Southern blotting).

b).- Técnicas basadas en la PCR.

Con el desarrollo de la PCR se eliminó la necesidad de la prueba por hibridación. En este tipo de estudios las técnicas basadas en la PCR usando cebadores aleatorios para la amplificación de los productos de ADN (el cebador iniciará la síntesis de ADN aun cuando el emparejamiento con el molde es imperfecto) o semi aleatorios los cuales incluyen derivados de RNA. Una característica común de estas técnicas es que no requieren de la información en la secuencia del genoma que está siendo estudiado y la diferencia entre las técnicas de esta categoría está en la longitud y secuencia de los cebadores usados, las condiciones de la PCR y el método de separación y detección de los fragmentos. A esta categoría pertenece RAPD.

c).- PCR de secuencias blanco y locus simple.

En esta tercera categoría se encuentra el análisis CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), algunas veces llamado PCR-RFLP, donde los fragmentos de ADN amplificados por la PCR son digeridos con una enzima de restricción para revelar los sitios de restricción polimórficos.

## MÉTODO RAPD

Los recientes avances en la aplicación de la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han hecho posible el registro individual de un gran número de loci. El método RAPD es una de estas técnicas que ha atraído el interés general (Lynch y Milligan, 1994).

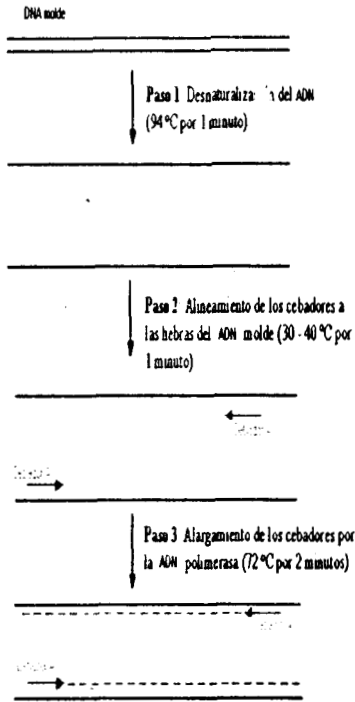
Este método está basado en la amplificación de ADN genómico con cebadores simples de secuencia de nucleótidos arbitraria, estos cebadores detectan polimorfismos en la ausencia de información de la secuencia específica de los nucleótidos y los polimorfismos funcionan como marcadores genéticos (Williams et al. 1990) además requieren pocos conocimientos de la bioquímica o biología molecular de la especie que está siendo estudiada (Welsh y McClelland, 1990; Gordon, 1998). Cada producto amplificado se derivará de una región del genoma que contiene dos segmentos cortos los cuales comparten secuencia de bases similares al cebador y los cuales están en las hebras opuestas y lo suficientemente juntos para permitir que la reacción PCR amplifique esta región. Si los sitios de unión del cebador están ausentes o están muy separados los fragmentos para esta región no son amplificados; ésta es la base de RAPD (Williams et al. 1990), Fig. 4.

Se ha demostrado que los marcadores RAPD son útiles para los estudios de identidades taxonómicas, relaciones sistemáticas, estructura genética de poblaciones, hibridaciones de especies e identificación de la paternidad (Williams, et. al. 1993; Rafalski, 1997; Liao y Hsiao, 1998) en las especies vegetales (Dawson et al, 1993; Peakall et al, 1995; Rosseto et al, 1995; Liao y Hsiao, 1998; Stenlid y Vasiliauskas, 1998; Bauert et al, 1998; Huff et al,

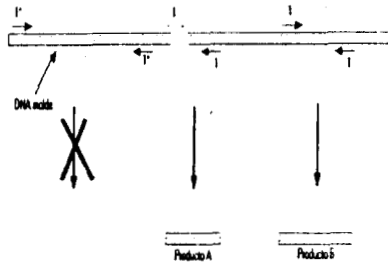
1998) y en animales como: insectos (Nagaraja y Nagaraju, 1995), artiodáctilos (Kostia et al, 1996), grandes felinos (Shankaranarayanan, ed al, 1997), roedores (Gordon et al, 1998), aves (Nusser et al, 1996; Dhar et al, 1997), anfibios (Kimberling et al, 1996) y peces (Gomes et al, 1998). Este método presenta ventajas sobre la electroforesis de isoenzimas ya que éste genera un número mayor de loci requeridos para análisis genéticos. El método es también menos complejo y requiere cantidades mucho menores de ADN que RFLP. El método RAPD satisface el estudio genético de especies raras o en peligro de extinción, donde preocupa el tamaño pequeño de la muestra y la obtención de información adecuada (Gomes et al. 1998; Kimberling, et al, 1996).

Actualmente, la supervivencia de muchas especie animales depende del manejo de la población y de la protección activa de ésta. Sin embargo, aun cuando muchas recomendaciones han sido formuladas para promover la supervivencia de poblaciones en cautiverio algunas se extinguen rápidamente debido a la pérdida de la diversidad genética (Primack, 1993). Los marcadores genéticos tales como el RAPD pueden ser aplicados para una prueba rápida de variación genética en muchos individuos, por lo que la cuantificación de la pérdida de variabilidad genética permitirá la evaluación a priori de la vulnerabilidad de la población (Gordon et. al. 1998) y permitirá la planeación de un mejor manejo reproductivo esencial en los programas de conservación *ex situ* para conservar la diversidad genética (Neveu, et al., 1998). Basados en los antecedentes anteriormente citad con relación a la técnica RAPD se propuso realizar la amplificación de ADN de *Rome. olagus diazi* por medio de esta técnica con la finalidad de analizar la variación genética entre una población silvestre y una en cautiverio.

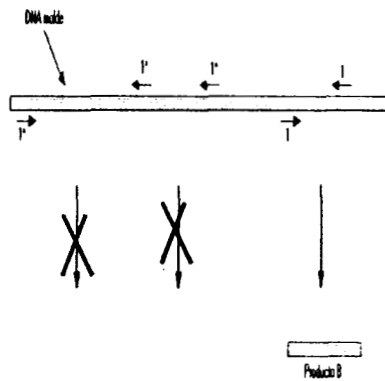
A)



B)



C)



**Figura 4:** A) Se esquematiza un ciclo de la reacción RAPD-PCR con un solo cebador; B) muestra que el cebador (1) que se une lo suficientemente cerca y en sentido contrario amplifica la secuencia de ADN (productos A y B); C) se observa como la unión del cebador (1') unido al ADN molde en un mismo sentido o muy alejado no amplifica la secuencia de ADN.

## **HIPÓTESIS**

Se ha demostrado que la reducción en el área de distribución y el número poblacional aumenta la probabilidad de apareamientos entre parientes, lo que disminuye la variabilidad genética y por tanto es mayor en individuos silvestres que en individuos en cautiverio, entonces es de esperar que la variabilidad genética de ejemplares de *Romerolagus diazi* de la población en cautiverio en el Zoológico de Chapultepec sea menor que la observada en ejemplares obtenidos de una población silvestre, analizada por la técnica RAPD-PCR

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la variabilidad genética de dos poblaciones de *Romerolagus diazi* utilizando el método de RAPD-PCR.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Aislar el ADN genómico obtenido de tejidos provenientes de individuos de ambas poblaciones para llevar a cabo estudios de variabilidad genética.

Realizar la amplificación de fragmentos de ADN de *Romerolagus diazi* obtenido, por medio de la técnica RAPD-PCR.

Seleccionar, los cebadores que detecten polimorfismo que puedan ser utilizados como marcadores genéticos en *Romerolagus diazi*, para estudios posteriores más detallados de la estructura genética de esta especie.

Analizar el patrón de bandas obtenidas mediante la técnica de RAPD-PCR para individuos silvestres e individuos de la Colonia de Chapultepec de *Romerolagus diazi*.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

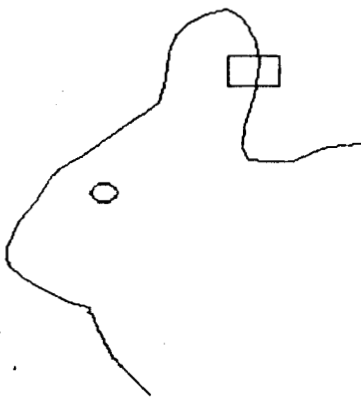
### **Colección de Muestras**

Se estudiaron muestras de dos poblaciones de una población silvestre y una en cautiverio. Los nueve individuos silvestres fueron de la región de Parres, D.F. (Permiso del INE para coleccionar, Clave: DOO 750.- 26/8/97) y trece individuos provenientes de la colonia en cautiverio del Zoológico de Chapultepec. A todos los ejemplares se les tomó una muestra de tejido de oreja de  $1 \text{ cm}^2$  aproximadamente; cada muestra se colocó en criotubos y se almacenaron en depósitos conteniendo nitrógeno líquido para la posterior extracción de ADN, con el fin de amplificarlo a través del método RAPD-PCR y llevar a cabo el análisis genético. Durante el procedimiento de la toma de la muestra, se procuró manejar a los ejemplares el menor tiempo posible con el fin de evitar el estrés que pudiera ocasionarles la muerte. El tiempo promedio de manejo por animal fue de 5 minutos aproximadamente con una sobrevivencia del 100 %.

### **Protocolo de la toma de muestra.**

- Se sujetó suave y firmemente al individuo y se mantuvo en posición vertical exponiendo las orejas lo más posible.
- Se limpió con alcohol la zona de la oreja donde se hizo el corte y se desensibilizó con anestésico local (Xilocaina).
- Se sujetó la oreja con pinzas de disección entre la zona donde se hizo el corte (usando tijeras quirúrgicas). El corte de tejido fue de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ .

- Posterior al corte y obtención de la muestra se aplicó un tratamiento con desinfectante y cicatrizante (Vetsarol). Se regresó el animal a su jaula. El tiempo del procedimiento fue aproximadamente de 5 minutos por animal, reduciendo el estrés por la manipulación ejercida.
- El fragmento de oreja se colocó inmediatamente en tubos de criopreservación y se pusieron en hielo seco o nitrógeno líquido hasta la extracción de ADN.



**Figura 5:** El recuadro muestra la zona de la oreja donde se hace el corte, evitando los principales vasos sanguíneos para prevenir una posible hemorragia.

## Extracción y cuantificación de ADN

El ADN de tejido de oreja se extrajo de acuerdo al método de Aljanabi y Martínez (1997) con algunas modificaciones.

- Se cortó el tejido en fragmentos pequeños con una navaja de rasurar nueva.
- Se colocó el tejido fragmentado en un tubo cónico para microcentrifuga de 2 ml, si se trabajaron varias muestras se colocaron en hielo.
- A cada uno de los tubos, con el tejido fragmentado, se les agregaron 400  $\mu$ l de buffer para ADN estéril (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 2 mM EDTA pH 8.0), 2 % de SDS y 400  $\mu$ g/ml de proteinasa K. Se agitó con un vortex para mezclar bien todos los componentes.
- Se incubó a 55 °C toda la noche.
- Se agregó un volumen igual de fenol (saturado con Tris-HCl pH 8.0).
- Se mezcló suavemente agitando con la mano por 3 minutos y se centrifugó por 20 minutos a máxima velocidad (14,000 rpm).
- Con una pipeta Pasteur (estéril) se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril.
- Se añadió un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamil (24:1), y se mezcló suavemente por 3 minutos y se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad (14,000 rpm).
- Se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril, evitando transferir la fase intermedia que contiene proteínas que pueden interferir en la amplificación del ADN. Si la fase

- intermedia fue muy densa y no fue posible evitar transferir parte de ella, se repitió el paso anterior las veces que se requirieron hasta asegurar que no se tenían proteínas.
- Se añadió de 2 a 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 % (de preferencia haberlo mantenido en el congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aproximadamente).
  - Se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm.
  - Se descargó el etanol, cuidando de no tirar el pellet de ADN.
  - Se limpió el pellet de ADN resuspendiendo con etanol frío al 70 % (1:1), de preferencia haber mantenido el etanol en congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se agitó el tubo suavemente con la mano.
  - Se descargó el etanol y se dejó secar el pellet de ADN, colocando los tubos abiertos en un lugar limpio (esperar de 30 a 40 minutos).
  - Se disolvió el pellet de ADN en TE (Tris HCl 10mM (pH 8) y EDTA 1mM (pH 8)).

En la figura 6 se muestra el procedimiento general de extracción del ADN.

La concentración del ADN se determinó por espectrofotometría (260 nm) y su pureza se obtuvo mediante la relación (260nm/280nm). Mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, 1.5  $\mu\text{g}$  de ADN fueron separados para determinar su integridad. El ADN genómico fue diluido a una concentración final de 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y fue utilizado directamente para el análisis por  $\text{RAPD-PCR}$ .

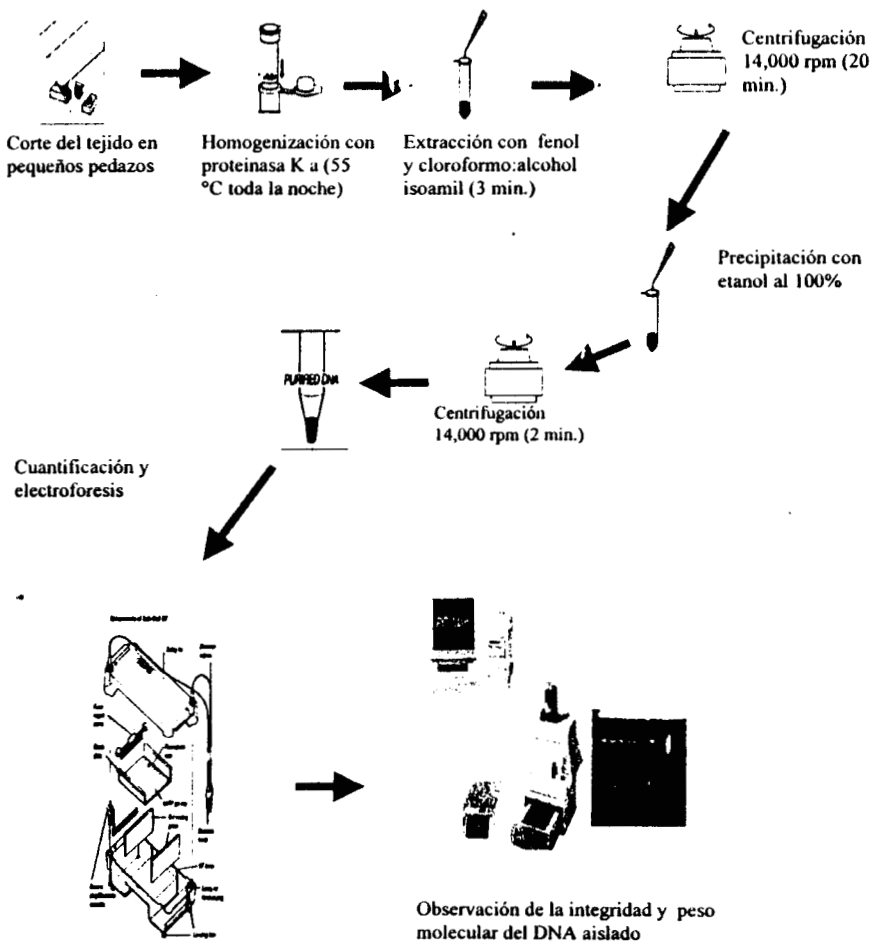


Figura 6: Esquema del proceso de extracción del ADN.

## **Amplificación RAPD-PCR**

Las reacciones fueron realizadas según la técnica descrita por Williams (1990), en un buffer que contiene 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% de gelatina, 200 μM de cada uno de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin Elmer), 10 pM de uno de los cebadores seleccionados (Operon, Inc.), 100 ng de ADN genómico y 2.5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer) en un volumen final de 25 μl.

La amplificación fue realizada en un termociclador (PTC-150, MJ Research), a una temperatura inicial de desnaturalización de 94 °C por 4 minutos, seguido de 45 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 32 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos. El paso de 72 °C fue mantenido por 10 minutos en el último ciclo.

El producto RAPD-PCR (22 μl / pozo) fue separado por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 85 V durante 1h y 10 minutos, se tiñó con bromuro de etidio y el gel fue fotografiado usando un analizador de imágenes con un transiluminador de luz UV.

## INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El tamaño de muestra está en función de las restricciones impuestas por ser una especie en peligro de extinción (Norma Oficial Mexicana NOM-059- ECOL-1994) y se ha demostrado que el tamaño limitado de la muestra utilizada no afecta la estimación de la diversidad y distancia genética cuando se está considerando un gran número de loci (Nei y Roychouddhury, 1974; Nei, 1978). Si se considera que en este estudio se examinaron 31 loci la estimación de la diversidad y distancia genética no es afectada a pesar del número de muestra empleado. La distancia e identidad genética se calcularon de acuerdo a las fórmulas reportadas Nei (1972, 1978).

El análisis de los resultados obtenido se llevó a cabo usando los programas de cómputo Herramienta para el Análisis de Genética de Poblaciones (TFPGA: Tool for Population Genetic Analysis 1.3, Miller, 1997) y Análisis de Genética de Poblaciones (Population Genetic Analysis POPGENE versión 1.32). El análisis estadístico para la diferenciación de las poblaciones para cada locus se realizó con la prueba exacta de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) según Raymond y Rousset (1995).

En el análisis de los marcadores RAPD se deben considerar dos suposiciones; primero, cada marcador representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible es un alelo dominante (Williams, et al., 1990) y está en equilibrio de Hardy-Weinberg con el alelo nulo recesivo (Lynch y Milligan, 1994). Segundo, los marcadores de loci diferentes no migran en la misma posición sobre el gel (Lynch y Milligan, 1994), por lo que el patrón de bandas que se obtenga de un individuo puede ser comparado contra el de uno o más individuos de

la misma población o poblaciones diferentes y de esa manera se puede tener la diferencia o similitud genéticas entre los individuos o poblaciones.

La simulación de las frecuencias de los heterocigotos esperados en la población de Chapultepec se realizó considerando lo siguiente: 1) el tamaño efectivo de la población se calculó con base al grupo fundador (1 macho y 4 hembras) utilizando la fórmula dada por Hartl y Clark (1997),  $N_e = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f}$  donde:  $N_m$  = Número de machos y  $N_f$  = Número de hembras. 2) el coeficiente de consanguinidad para la población de Chapultepec se calculó con base Hartl y Clark (1997),  $F_t = 1 - [1 - (1/2N_e)]^t$ , donde:  $N_e$  = tamaño efectivo de la población y  $t$  = generación y 3) los heterocigotos esperados son los observados en la población silvestre y suponiendo que están en equilibrio de Hardy-Weinberg,



## RESULTADOS :

Para la estandarización de la técnica RAPD-PCR se usó el ADN del mismo individuo, el cual sirvió de molde para realizar las ampliificaciones con los 20 diferentes cebadores (tabla 1), con la finalidad de seleccionar los oligonucleótidos que pudieran generar polimorfismos fácilmente identificables. De los 20 cebadores se seleccionaron 4 (OPE-01, OPE-06, OPE-19 y OPE-20; tabla 1) que fueron los que presentaron un patrón de bandas reproducibles cuando menos en cuatro repeticiones de la reacción RAPD-PCR (Figura 7).

**Tabla 1.-** Lista de los cebadores (oligonucleótidos) del Kit E (Operon, Inc) su secuencia y el porcentaje de G+C de cada uno, utilizados para la ampliificación de ADN de *R. diazi*.

Cebador	%(G+C)	5'- 3'	Cebador	%(G+C)	5'- 3'
OPE-01*	70	CCCAAGGTCC	OPE-11	60	GAGTCTCAGG
OPE-02	70	GGTGCGGGAA	OPE-12	60	TTATCGCCCC
OPE-03	60	CCAGATGCAC	OPE-13	70	CCCGATTCCG
OPE-04	60	GTGACATGCC	OPE-14	70	TGCGGCTGAG
OPE-05	60	TCAGGGAGGT	OPE-15	60	ACGCACAACC
OPE-06*	60	AAGACCCCTC	OPE-16	60	GGTGACTGTG
OPE-07	60	AGATGCAGCC	OPE-17	60	CTACTGCCGT
OPE-08	60	TCACCACGGT	OPE-18	60	GGACTGCAGA
OPE-09	60	CTTACCCCGA	OPE-19*	60	ACGGCGTATG
OPE-10	60	CACCAGGTGA	OPE-20*	60	AACGGTGACC

- Cebadores seleccionados para la ampliificación de ADN de *Romerolagus diazi* con la técnica RAPD-PCR.

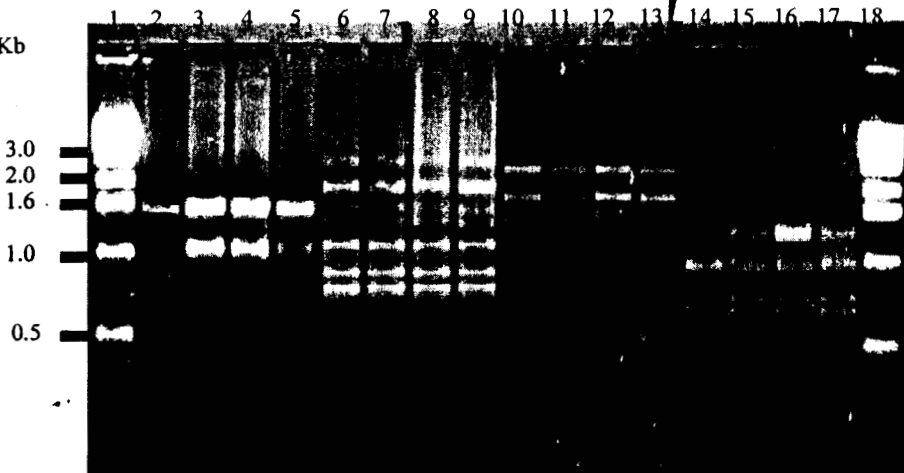
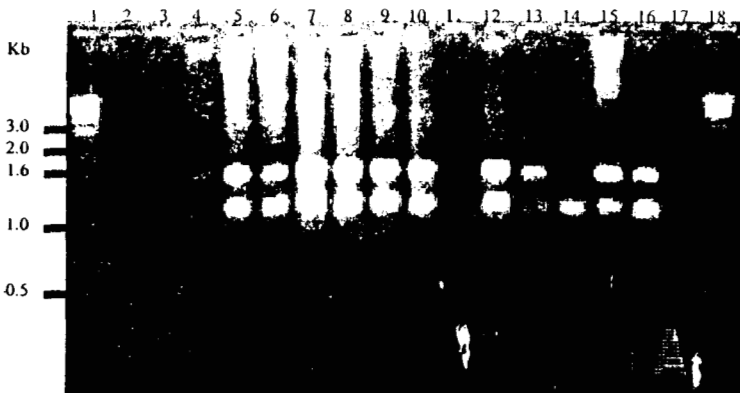
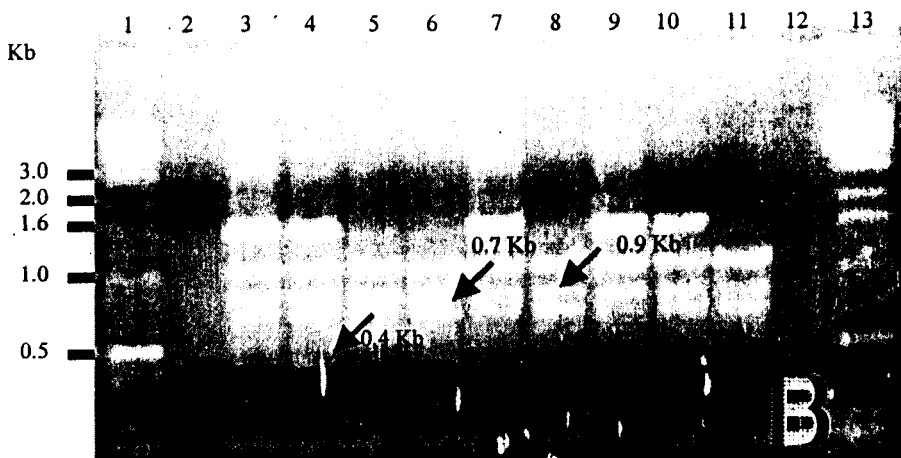


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por cuatro diferentes cebadores empleando como molde el DNA del mismo individuo. Carril 1 y 18=Marcador de peso molecular (1 Kb ladder); Carril 2-5 = Cebador OPE-01; Carril 6-9 = Cebador OPE-06; Carril 10-13 = Cebador OPE-19; Carril 14-17 = cebador OPE-20.

El cebador OPE-01 amplificó un total de 5 bandas de las cuales 3 (las de menor peso molecular) se encuentran presentes solamente en los individuos silvestres con respecto a los individuos de Chapultepec, mientras que 2 bandas de aproximadamente 1.6 Kb y 1.2 Kb son comunes a ambas poblaciones (Fig. 8B). En la figura 8A, se observa la ausencia de las dos bandas en el individuo del carril 11 indicando que es diferente genéticamente a todos los otros individuos y el individuo del carril 14 no presentó la banda de mayor peso molecular mostrando diferencia en ese locus con el resto de los individuos. En la figura 8B, los individuos del carril 5, 6, 8 y 11, presentan la ausencia de la banda de mayor peso molecular 1.6 Kb y los individuos en el carril 9 y 10 no presentan la banda de menor peso molecular 0.4 Kb, las 3 bandas intermedias están presentes en todos los individuos.

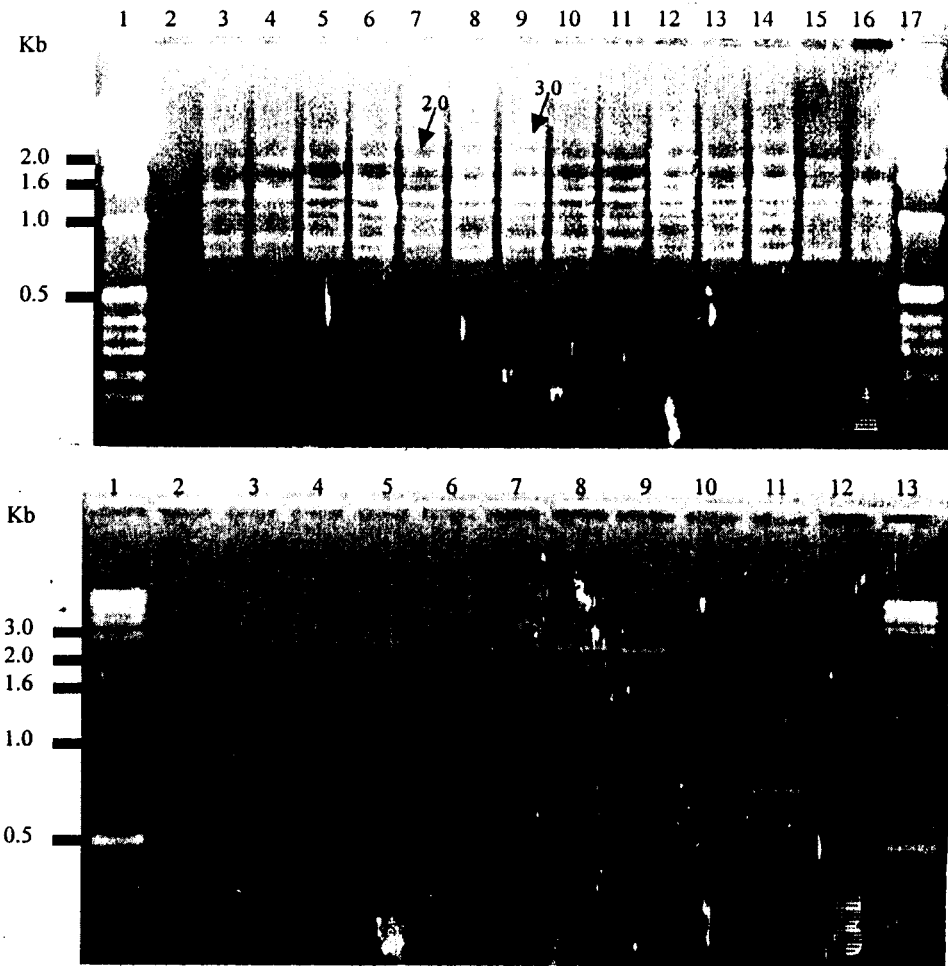


**Figura 8 A:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por el cebador OPE-01 en DNA de diferentes individuos de la Colonia de Chapultepec; Carril 1 y 18=Marcador de peso molecular (1 Kb ladder); Carril 2 y 17 = Vacíos; Carril 3= Control (-); Carril 4 -16= diferentes individuos.



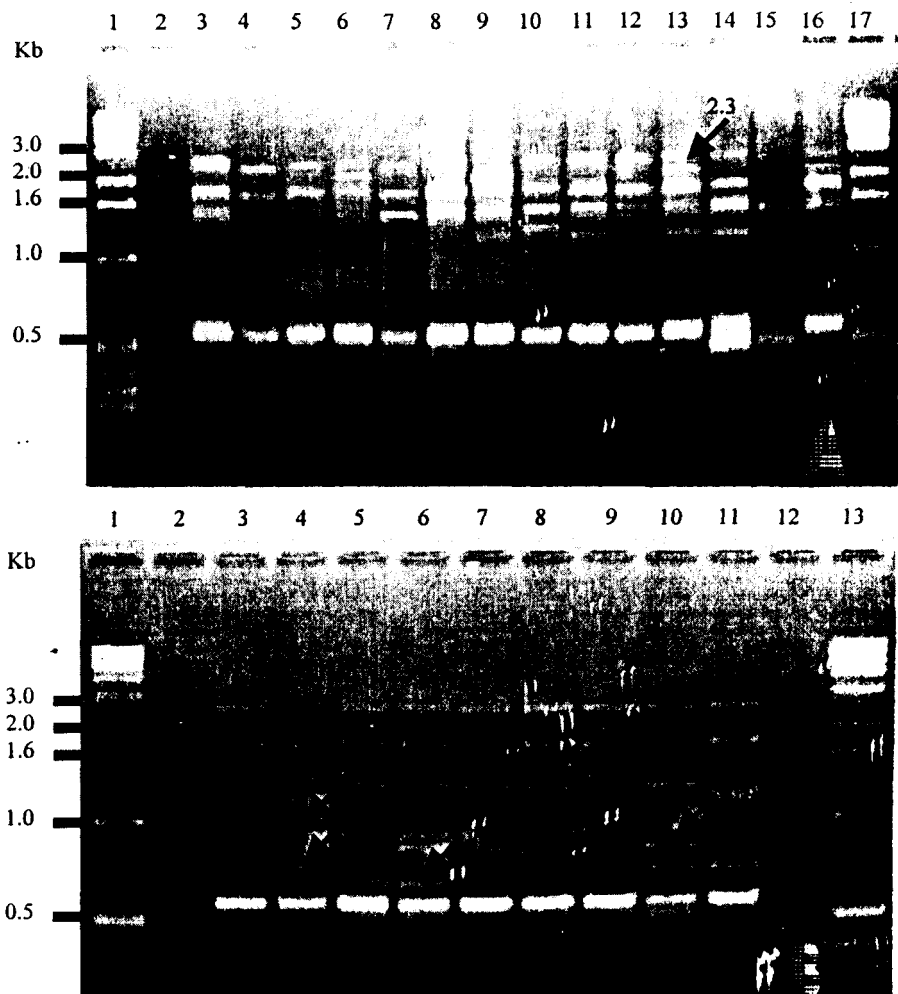
**Figura 8 B:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por el cebador OPE-01 en DNA de diferentes individuos silvestres; Carril 1 y 13 = Marcador de peso molecular (1Kb ladder); Carril 2 = control (-); Carril 3-11=Diferentes individuos; Carril 12= Vacío. Las flechas indican las bandas (0.9, 0.7 y 0.4 Kb) presentes solo en la población silvestre.

El cebador OPE-06 amplificó un total de 8 bandas (Fig. 9), las cuales están presentes en la población de Chapultepec y la población silvestre. En la figura 9A, se observa que los individuos de los carriles 10, 11, 13, 15 y 16, no presentan la banda de 3.0 Kb (señalada con la flecha), mientras que las siguientes 4 bandas (2.0, 1.6, 1.3 y 1.1 Kb) y la banda de 0.9 Kb se presenta en todos los individuos. En los carriles 3, 4, 8, 15 y 16 los individuos no presentan la banda 1.0 Kb y el individuo del carril 11 no presentó la banda 0.8 Kb (señalada con la flecha). En la población silvestre (fig. 9B) se observa que los individuos de los carriles 3, 4, 5, 6, 10 y 11 no presentan la banda de mayor peso molecular 3.0 Kb y las bandas 2.0, 1.6, 1.1, 1.0 y 0.9 Kb están presentes en todos los individuos, la banda de menor peso molecular 0.8 Kb solo se observa en los individuos de los carriles 8, 9 y 11.



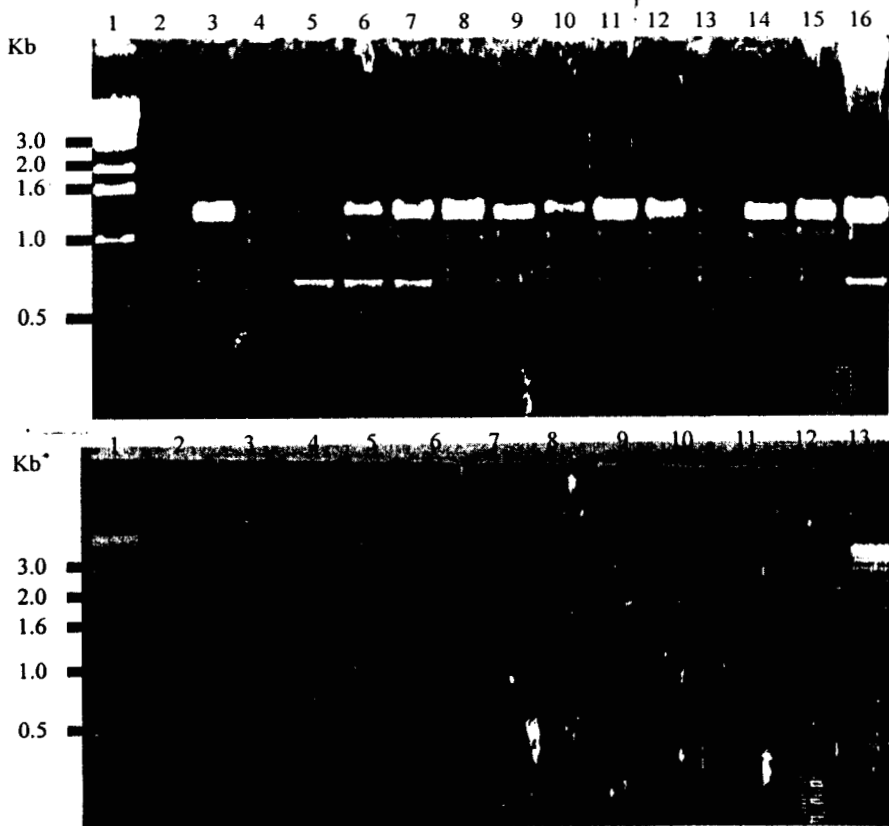
**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por el cebador OPE-06 en DNA de diferentes individuos. (A) Colonia de Chapultepec; Carril 1 y 17= Marcador de peso molecular (1 Kb ladder); Carril 2 = Control (-); Carril 3-16= diferentes individuos. (B) Ejemplares silvestres; Carril 1 y 13 = Marcador de peso molecular (1Kb ladder); Carril 2= control (-); Carril 3-11=Diferentes individuos; Carril 12= Vacío.

En el caso del cebador OPE-19, amplificó un total de 13 bandas de las cuales una banda de 2.3 Kb es específica para ejemplares de Chapultepec y está presente en los individuos de los carriles 6, 9, 13 y 16 (fig. 10A); en esta misma figura observamos que la banda de 2.6 Kb está presente en todos los individuos excepto en los carriles 9 y 15, la banda de 1.7 y 0.6 Kb están ausente en el carril 15. La banda de 1.5 Kb está ausente en los carriles 4, 5 y 6, la banda de 1.3 Kb no se presenta en ningún individuo de Chapultepec, la banda de 1.2 Kb se presenta únicamente en el carril 10 y la banda 1.1 Kb se presenta en los carriles 9, 11, 13, 14 y 16. Las bandas 1.0, 0.9, 0.8 y 0.7 Kb no se presentan en la colonia de Chapultepec solamente, en la población silvestre (Fig. 10B) y la banda de 0.5 Kb solo se presenta en los individuos de los carriles 14 y 15. En la población silvestre (fig. 10 B) encontramos que la banda de 2.6 Kb está ausente únicamente en el carril 4, la banda de 2.3 Kb se ha perdido en esta población, las bandas de 1.7 y 1.5 Kb están presentes en todos los individuos, la banda de 1.3 Kb se presentó solo en esta población en los carriles 5, 6, 7, 8 y 9, la banda de 1.2 Kb se presentó en 4 de 8 individuos, la banda de 1.1 Kb se observó en los individuos de los carriles 4 y 11, la banda 1.0 Kb está ausente en los carriles 3, 8 y 9, la banda de 0.9 Kb se presenta en los carriles 6 y 10, la banda 0.8 Kb se observa en los carriles 4, 10 y 11, la banda de 0.7 Kb se presentó en los individuos de los carriles 5, 6 y 11, la banda de 0.6 Kb está presente en todo los individuos y la banda de 0.5 Kb solamente está presente en el carril 10.



**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por el cebador OPE-19 en DNA de diferentes individuos. (A) Colonia de Chapultepec; Carril 1 y 17=Marcador de peso molecular (1 Kb ladder); Carril 2 = Control (-); Carril 3-16= diferentes individuos. Las flecha indican la banda (2.3 Kb) única para esta colonia. (B) Ejemplares silvestres; Carril 1 y 13 = Marcader de peso molecular (1Kb ladder); Carril 2= control (-); Carril 3-11=Diferentes individuos; Carril 12= Vacío. Las flechas indican las bandas (1.5, 1.0, 0.9, 0.8 y 0.7 Kb) presentes solo en esta población.

El cebador OPE-20 amplificó 5 bandas en total, de las cuales una banda de aproximadamente de 0.9 Kb es específica para individuos silvestres. (Fig. 11B). Las 4 bandas restantes 1.4, 1.0, 0.8 y 0.7 Kb se presentaron en ambas poblaciones y en todos los individuos.



**Figura 11:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el patrón de bandas producidas por el cebador OPE-20 en DNA de diferentes individuos. (A) Colonia de Chapultepec; Carril 1 y 17= Marcador de peso molecular (1 Kb ladder); Carril 2 = Control (-); Carril 3-16= diferentes individuos. (B) Ejemplares silvestres; Carril 1 y 13 = Marcador de peso molecular (1Kb ladder); Carril 2= control (-); Carril 3-11= Diferentes individuos; Carril 12= Vacío. La flecha indica la banda (0.9 Kb) amplificada únicamente en esta población.



En total, los cuatro cebadores utilizados en la reacción RAPD-PCR amplificaron 31 bandas, el oligonucleótido OPE-19 fue el que amplificó el mayor número de bandas (13), representando aproximadamente el 41% del total de bandas observadas. El 32% (10) de las bandas amplificadas fueron únicas para una las poblaciones, donde el 3% (1) de las bandas son específicas para ejemplares de Chapultepec y 29% (9) fueron amplificadas solamente en individuos silvestres.

Del total de loci amplificados, el 68% (21) se detecto son polimórficos y el 32% (10) están representados por bandas monomórficas. El porcentaje de polimorfismo se calculó con base en un criterio del 99%, es decir, cuando el alelo más común tiene una frecuencia menor de 0.99. Se observa que la población de Chapultepec tiene un porcentaje ligeramente menor de polimorfismo con respecto a la población silvestre, 42 % y 45 % respectivamente, el porcentaje de polimorfismo total de todos los loci y en ambas poblaciones fue de 68 % (Tabla 2). Así mismo el promedio de heterocigosidad en la población de Chapultepec fue diferente (0.1501), con respecto a la población silvestre (0.1718). La identidad y distancia genética observada entre estas dos poblaciones fueron: 0.8552 y 0.1564, respectivamente.

**Tabla 2:** Porcentaje de polimorfismo (# de loci polimorficos) por cebador para cada población, subtotal y el total para las dos poblaciones.

CEBADOR	# LOCI	% POLIMORFISMO (# de individuos)	
		CHAPULTEPEC	VOLCAN PELADO
OPE-01	5	40 (2)	40 (2)
OPE-06	8	38 (3)	25 (2)
OPE-19	13	62 (8)	69 (9)
OPE-20	5	0 (0)	20 (1)
Subtotal	31	42 (13)	45 (14)
Total	31	68 (21)	

Como se puede observar en la tabla 3, utilizando el análisis de varian. a molecular (AMOVA) del total de la variación genética encontrada entre las dos poblaciones de *Romerolagus diazi*, aproximadamente el 46 % es atribuible a diferencias entre las dos poblaciones. Mientras que cerca del 54 % del total de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones.

**Tabla 3 :** Análisis de varianza molecular (AMOVA), Suma de Cuadrados (SSD), Cuadrados Medios (MSD) y grados de libertad (g.l).

Origen de la Varianza	SSD	MSD	g.l.	Componetes varianza	% total de varianza	P
Entre poblaciones	23.8	23.8	1	2.2	46	<0.001
Dentro de poblaciones	48.6	2.6	19	2.6	54	

Considerando el total de loci observados en este estudio, advertimos que el 39 % de los loci (3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 25, 27, 28, 30 y 31), se han fijado en ambas poblaciones; los loci 3 y 4 se han fijado hacia el alelo dominante en la población silvestre y en la población de Chapultepec se han fijado hacia el alelo recesivo, los 10 restantes, se han fijado hacia el alelo dominante en ambas

poblaciones. Diez loci más (1, 2, 6, 11, 14, 15, 16, 17, 20, 26), no presentaron diferencia significativa entre ambas poblaciones (anexo 1). El 23 % de los loci (5, 18, 19, 21, 22, 23, 24) son significativamente diferentes entre poblaciones ( $P < 0.05$ ) y el 3 % (locus 29) es diferente con ( $P < 0.14$ ). Estos 8 loci representan el 57 % de los 14 loci polimórficos presentes en la población silvestre seis de los cuales, se han fijado hacia el alelo recesivo en la población de Chapultepec, habiéndose perdido el 100 % de la variabilidad genética para estos loci en esta población en comparación con los heterocigotos observados en los individuos de la población silvestres (Tabla 4). Dos de estos loci (18 y 19) han perdido aproximadamente el 88 % de la variabilidad genética con respecto a la heterocigosidad observada en la población silvestre. El locus 13 fue el único con significancia estadística ( $P < 0.01$ ), que presentó mayor frecuencia de heterocigotos en Chapultepec ( $q^2 = 0.7981$  y  $2pq = 0.4304$ ) en comparación con la población silvestre ( $q^2 = 0.3135$  y  $2pq = 0.3223$ ).

**Tabla 4:** Loci en los cuales se ha perdido heterocigosidad en la colonia de Chapultepec (Het.Chap) con relación a la población silvestres (Het. silv.) calculadas a partir de datos RAPD. Frecuencia de q en Chapultepec (q Chap.) y en la población silvestre (q Silv.).

LOCUS	q Silv	Hsilv.	q Chap.	Hchap.
Locus 5*	0.5246	<b>0.4688</b>	1.0000	<b>0.0000</b>
Locus 18*	0.6287	<b>0.4669</b>	0.9615	<b>0.0740</b>
Locus 19*	0.6287	<b>0.4669</b>	0.9615	<b>0.0740</b>
Locus 21*	0.5246	<b>0.4988</b>	1.0000	<b>0.0000</b>
Locus 22*	0.7981	<b>0.3223</b>	1.0000	<b>0.0000</b>
Locus 23*	0.7981	<b>0.3223</b>	1.0000	<b>0.0000</b>
Locus 24*	0.7981	<b>0.3223</b>	1.0000	<b>0.0000</b>
Locus 29	0.8706	<b>0.2253</b>	1.0000	<b>0.0000</b>

\*  $P < 0.05$

## DISCUSIÓN:

La variación del patrón RAPD fue detectada por 4 de los cebadores utilizados (tabla 2), aunque los cebadores individuales difieren en el número de bandas que amplifican. Como se puede observar es evidente que el oligonucleótido OPE-19 fue el cebador que más variabilidad genética reveló de los cuatros cebadores seleccionados para la realización de este estudio, incluso detectó mayor variabilidad en la población silvestre como era de esperarse. El hecho de que sea el cebador que reveló mayor variabilidad es debido a que fue el que amplificó un mayor número de bandas, por lo que no se podría hacer una comparación entre la variabilidad detectada entre los cebadores utilizados. En el caso de los cebadores OPE-01 y OPE-20 los cuales amplificaron el mismo número de bandas se observa una diferencia del 50 % en la variabilidad detectada siendo OPE-01 el que revela una mayor variabilidad genética al compararse contra el cebador OPE-20 pero ésta es igual en ambas poblaciones. Sin embargo aun cuando OPE-20 fue el que menor variabilidad revela, ésta fue mayor en la población silvestre que en la de Chapultepec, confirmando la hipótesis de poblaciones diferentes. Al comparar la variabilidad genética entre los cebadores OPE-01 y OPE-06 se observa que aun cuando OPE-01 amplificó un número menor de bandas el porcentaje de variabilidad es mayor que el cebador OPE-06 que fue el cebador que reveló mayor variabilidad en la población de Chapultepec contrario a lo esperado. Sin embargo, la prueba de  $\chi^2$  realizada al tomar en consideración todos los loci observados mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre las dos poblaciones.

Esto sugiere que RAPD es sensible a pequeños cambios en el genoma de diferentes individuos, lo que permite visualizar diferencias entre poblaciones (distancia genética entre estas dos poblaciones 0.1564), debido a que RAPD puede detectar en algunos casos simples cambios de

bases en el DNA genómico (Williams et. al. 1990). Esta mayor variación entre poblaciones coincide con el análisis de varianza, que muestra una mayor variabilidad interpoblaciones (54 %) que intrapoblaciones (46 %; tabla 3). Esta mayor variación genética utilizando la técnica RAPD se ha observado al compararse con la técnica de isoenzimas en las especies vegetales (*Hordeum* y *Schizachyrium*), la razón al parecer se debe al número mayor de marcadores disponibles (Dawson et. al. 1993; Huff et. al. 1995). Esto podría explicar el por que del polimorfismo tan alto que se observo en este estudio (68 %), incluso mayor al reportado por Cervantes et. al (1999) para tres especies de lagomorfos mexicanos del género *Sylvilagus* que fue del 60%.

Los resultados muestran que el método RAPD-PCR, puede ser utilizado en el análisis de variabilidad genética de *Romerolagus diazi* y con los datos obtenidos de éste se puede conocer la proporción de alelos que se han fijado en una población. Además, la presencia de bandas específicas para cada grupo de individuos, aun cuando la identidad genética es grande (0.8557) y la distancia genética pequeña (0.1558), permite distinguir claramente las poblaciones. Así mismo la prevalencia de ciertas bandas en una estas podrían sugerir variaciones geográficas de acuerdo a lo reportado por Dhar et. al. (1997), lo cual podría ser reafirmado con un estudio que incluya individuos de diferentes regiones y la selección de cebadores que, como OPE-19, amplifiquen un número mayor de bandas que ampliaría el número de loci en el análisis y reduciría aun más la desviación debida a un tamaño pequeño de la muestra.

La técnica RAPD posee muchas ventajas, incluyendo la generación de un gran número de marcadores genéticos, proveyendo a genetistas, biólogos y personas especializadas en el manejo de fauna silvestre y en especial de especies en peligro de extinción, con una herramienta para la exploración en la genética de poblaciones y medidas de distancias genéticas entre individuos o

poblaciones (Williams, et. al. 1993; Rafalski,1997). En el caso de especies raras o en peligro de extinción, donde es difícil obtener individuos debido a las restricciones legales o a su pequeña población, es aconsejable el uso de RAPD ya que puede analizar un gran número de loci obteniendo datos confiables de una muestra pequeña (Gomes et. al. 1998; Kimberling et. al. 1996; Nei, 1978). El uso de esta técnica rápida y barata, la cual permite analizar un gran número de individuos en un periodo corto de tiempo, facultará a los responsables de los programas de reproducción de especies en peligro de extinción a llevar a cabo un monitoreo del status genético que guardan las poblaciones, ayudando a tomar las decisiones y realizar las acciones más pertinentes y oportunas en los esfuerzos por conservar, no solo los individuos o poblaciones sino también la capacidad evolutiva de la especie.

Debido a que las poblaciones pequeñas tienden a perder variación genética más rápidamente, por deriva genética, que las poblaciones grandes a causa de un muestreo al azar de un número pequeño de alelos en cada generación, esto dará como resultado la diferenciación genética entre las poblaciones (Falconer, 1993). En la tabla 4 se puede observar que el 43 % (6) de los loci polimorficos presentes en la población silvestre han perdido el 100% de su variabilidad en la colonia de Chapultepec en aproximadamente 20 generaciones (anexo 2 A,D,E,F,G,H,) y el 1 % (2) de los loci (anexo2 B y C) han perdido el 88 % de su variabilidad genética con respecto a los heterocigotos observados en la población silvestre.

De acuerdo a la simulación realizada para conocer el comportamiento de las frecuencias de los heterocigotos en la población de Chapultepec, al considerar un coeficiente de consanguinidad extremo ( $F=0.96$ ) y calculado a partir de 5 fundadores (1 macho y 4 hembras de acuerdo a Hoth y Granados, 1987), cuatro loci deberían de conservar aun el 2 % de la variabilidad genética (anexo

2 A, B, C y D) y cuatro deberían conservar el 1 % de los heterocigotos (anexo 2, E, F, G y H) con respecto a la población silvestre. Esto indica que en la población de Chapultepec existe una deficiencia de heterocigotos en 6 de los loci simulados. Esto probablemente puede ser atribuido a un número pequeño de fundadores y a un inadecuado manejo reproductivo, lo cual ha conducido a un alto grado de consanguinidad y deriva genética. Lo que podría verse reflejado en una disminución en la viabilidad, esto es, un incremento en la susceptibilidad a enfermedades y una baja en la fecundidad, dos parámetros que deberían ser cuantificados para tener una idea más exacta de lo que pasa en las poblaciones. Debido a que la depresión por consanguinidad es uno de los varios problemas a los cuales se enfrentan actualmente los programas de conservación y debido a la pérdida de aptitud como una consecuencia del incremento en la expresión de genes deletéreos recesivos en condiciones homocigotos, el factor genético debe ser considerado como un punto de gran importancia cuando se proyectan planes de reproducción y recuperación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Frankham y Ralls, 1998).

Sin embargo este estudio revela que la introducción de individuos de la región de Parres D.F. a la colonia de Chapultepec, permitiría aumentar la variabilidad genética de los 8 loci que han perdido su variabilidad genética en la población de Chapultepec, lo que representaría un aumento del 26 % (en 8 loci) aproximadamente con relación a los 31 loci observados.

El hecho de que el locus 13 presente una mayor variación genética en la población de Chapultepec que en la población silvestre, podría explicarse debido a que las condiciones ambientales difieren de una localidad a otra y de una estación a otra, así la intensidad y la dirección de la selección natural puede variar con respecto al lugar y el tiempo y las diferencias

observadas podrían ser atribuibles a la variación por la presión de la selección natural (Falconer, 1993; Jiménez et. al. 1994; Fowler y Whitlock, 1999).

Aun cuando los resultados revelan que algunos alelos de la población silvestre se han perdido en la colonia de Chapultepec y el promedio de la heterocigosidad es aproximadamente 2.17 % mayor en la población silvestre, la similitud genética entre las dos poblaciones es alta (0.8552), posiblemente atribuible a que 1) las dos poblaciones provienen de la misma región y el 39 % (12 alelos) ya se habían fijado en la población de la cual provienen, permaneciendo sin cambio desde que se extrajeron los individuos fundadores de la colonia de Chapultepec. Esta uniformidad en los alelos fijados se debe a que cuando un alelo alcanza la frecuencia de 1 (fijado) ó 0 (perdido), ningún otro alelo puede estar presente en la población (Falconer, 1993), al menos que exista mutación hacia el alelo que se ha perdido o migración de individuos de alguna población donde ese alelo aun permanece. 2) La población silvestre ha visto disminuida su población drásticamente en los últimos 15 años y también ha pasado por un proceso de fijación de alelos, esto se puede observar en el hecho de que las dos poblaciones comparten 12 alelos que se han fijado en ambas y 13 que no son significativamente diferentes. Como las frecuencias alélicas pueden ser fijadas al azar por deriva genética, observamos que alelos fijados en una población pueden diferir de los fijados para la otra. 3) El tiempo de separación de los fundadores en dos grupos (con 4 hembras y 2 machos cada uno) que se realizó al inicio de la colonia de Chapultepec (Hoth y Granados, 1987) fue lo suficientemente largo, para que diferentes alelos se fijaran o disminuyera su frecuencia en los grupos y al momento de iniciar la reproducción entre los individuos de ambos grupos permitió el aumento de la frecuencia de los alelos perdidos en un grupo y que se habían fijado en el otro.



## **CONCLUSIONES:**

Las poblaciones de *Romerolagus diazi* de la colonia en cautiverio de Chapultepec y la población silvestre de Parres, D.F. presentan diferencias genéticas en 8 loci, de los cuales 7 se comportan de acuerdo a la teoría genética para pequeñas poblaciones.

La técnica RAPD puede ser utilizada para estudios de diversidad genética en *Romerolagus diazi*, extendiéndose hacia otras poblaciones que permitan tener el contexto general de la diversidad genética que guardan las diferentes poblaciones de esta especie.

La técnica RAPD permitirá cuantificar y monitorear la pérdida o ganancia de la diversidad genética de las poblaciones en cautiverio que ayudará en la evaluación y toma decisiones para su manejo reproductivo.

## RECOMENDACIONES

Muchas especies amenazadas o en peligro de extinción han visto reducido su tamaño población o sus hábitats están siendo destruidos lo que actualmente ha llevado a reproducirlos en cautiverio para asegurar su supervivencia a largo plazo. Para que una población sobreviva, debe ser lo suficientemente grande o ser manejada de tal forma que la erosión de la variabilidad genética por deriva genética sea minimizada y evitar la depresión por consanguinidad. Recientemente ha sido reportado por Margan et. al. (1998), que mantener varias poblaciones pequeñas en vez de una población grande de un tamaño total equivalente (50 y 100), presentan un menor coeficiente de consanguinidad, un éxito reproductivo significativo bajo condiciones competitivas, una aptitud similar bajo condiciones en cautiverio, una mayor variabilidad genética y un potencial evolutivo equivalente. Aún cuando este trabajo se realizó en *Drosophila*, se recomienda que especies en peligro de extinción y en cautiverio sean mantenidas en varias poblaciones pequeñas, con intercambio genético ocasional.

La introducción de individuos silvestres de la región de Parres D.F. a la colonia de Chapultepec es posible y recomendable ya que aumentaría la variabilidad genética en los alelos que sean perdido en la población de Chapultepec.

# ANEXOS

**ANEXO 1.-** Prueba exacta para la diferenciación de poblaciones (Raymond y Rousset, 1995), donde, la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) = poblaciones genéticamente iguales y la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) = poblaciones genéticamente diferentes.

Locus 3	p = 0.0000
Locus 4	p = 0.0060
Locus 5	p = 0.0009
Locus 21	p = 0.0010
Locus 19	p = 0.0117
Locus 13	p = 0.0146
Locus 18	p = 0.0152
Locus 23	p = 0.0379
Locus 24	p = 0.0427
Locus 22	p = 0.0430
Locus 11	p = 0.1127
Locus 29	p = 0.1218
Locus 1	p = 0.1466
Locus 17	p = 0.2592
Locus 15	p = 0.2631
Locus 6	p = 0.3895
Locus 2	p = 1.0000
Locus 7	p = 1.0000
Locus 8	p = 1.0000
Locus 9	p = 1.0000
Locus 10	p = 1.0000
Locus 12	p = 1.0000
Locus 14	p = 1.0000
Locus 16	p = 1.0000
Locus 20	p = 1.0000
Locus 25	p = 1.0000
Locus 26	p = 1.0000
Locus 27	p = 1.0000
Locus 28	p = 1.0000
Locus 30	p = 1.0000
Locus 31	p = 1.0000

**Resultado para todos los loci**

X-sq : 131.8652

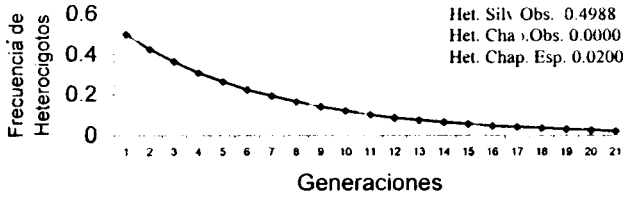
df : 62

General: p = 0.0000

ANEXO 2 .- Simulación de las frecuencias de heterocigotos esperados para diferentes loci en la colonia de Chapultepeca través de 20 generaciones considerando una  $N_e=3.4$  . El valor inicial en cada una de las gráficas es la frecuencia de heterocigotos observada en la población silvestre.

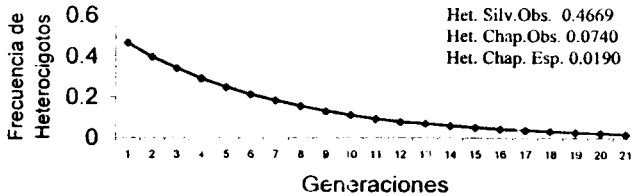
A)

### Locus 5



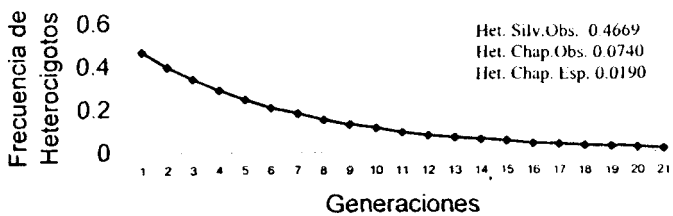
B)

### Locus 18



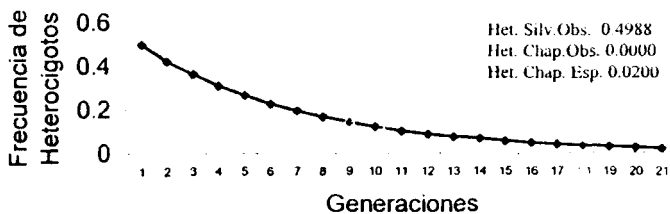
C)

### Locus 19



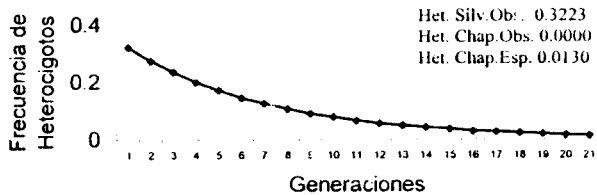
D)

### Locus 21



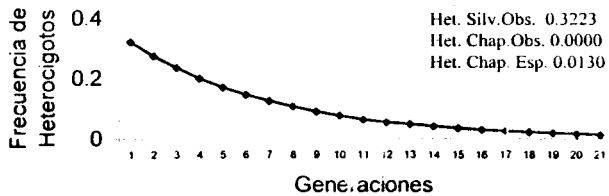
E)

### Locus 22



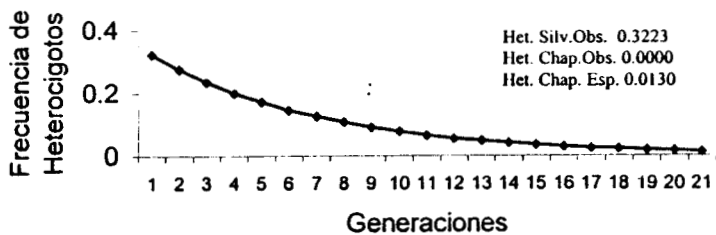
F)

### Locus 23



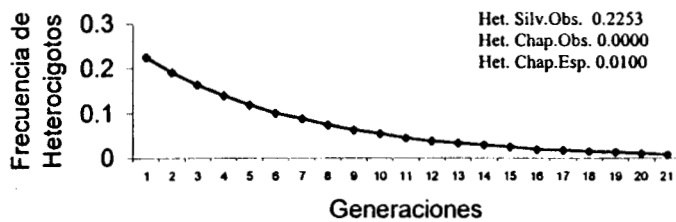
G)

### Locus 24



H)

### Locus 29





## BIBLIOGRAFÍA:

Allendorf, F. W. and Leary, R.F. (1986). Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: M. E. Soulé (Ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. p. 57-76.

Aljanabi, S.M and Martinez, I. (1997). Universal and Rapid salt-extraction of high quality genomic ADN for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22):4692-4693.

Bauert, M.R.; Kálin, M.; Baltisberger, M. And Edwards, P.J. (1998). No genetic variation detected wuthin isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7, 1519-1527.

Bell, D.J., Hoth, J. Velázquez, A., Romero, F.J, Leon, L and Aranda, M. (1985). A survey of the distributionof the Volcano rabbit *Romerolagus diazi*: an endangered Mexican endemic. *Dodo, J. Jersey Wildlife Preserv. Trust*, 22:42-48.

Caughley, G. (1994). Directions in conservation biology. *Journal of animal ecology*, (63):215-244.

Caughley, G. And Gunn, A. (1996). Conservation Biology In Theory And Practice. Blackwell Science, Inc. p. 164- 189.

Cervantes, F.A.; Lorenzo, C. and Hoffmann, R.S. (1990). *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species*, 360:1-7.

Cervantes, F. A. (1993). Conejos y liebres silvestres de México. *Ciencia y Desarrollo*. 110:58-69.

Cervantes, F.A. y González, F.X. (1996). Los Conejos y Liebres Silvestres de México. En: Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Comp. Velázquez, A. Romero, F.J. y López-Paniagua J. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. p. 17-25.

Cervantes, F.A.; Ramirez-Silva, J.P.; Marin, A. and Portales, G.L. (1999). Allozyme variation of Cottontail rabbit (*Sylvilagus*) from Mexico. *Zeitschrift fur Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology*, 64(6):356-362.

Cockburn, A.; Scott, M.P. and Scott, D.J. (1985). Inbreeding avoidance and male-biased natal dispersal in *Antechinus* spp. (Marsupialia: Dasyuridae). *Animal Behaviour*, 33, 908-915.

Dawson, I.K.; Chalmers, K.J.; Vaughn, R. And Powell, W. (1993). Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 2, 151-159.

**Dhar, A.K.; Pokras, M.A.; García, D.K.; Evers, D.C.; Gordon, Z.J. and Aleivar-warren, A. (1997).** Analysis of genetic diversity in common loon *Gavia immer* using RAPD and mitochondrial RFLP techniques. *Molecular Ecology*, 6, 581-586.

**Diaz, A. (1983).** Catálogo de los objetos que componen el contingente de la Comisión. precedido de algunas notas sobre su organización y trabajos. Exposición Internacional Columbina en Chicago. Comisión Geográfico Exploradora, República Mexicana, México, Distrito Federal.

**Falconer, D.S. (1993).** Introduction to Quantitative Genetics. Third Edition, Longman Scientific & Technical, Copublished in the United States with John Wiley & Sons, Inc. New York. p. 4-84.

**Fowler, K. and Whitlock, M.C. (1999).** The variance in inbreeding depression and the recovery of fitness in bottlenecked populations. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266: 2061-2066.

**Frankham, R. (1995).** Conservation Genetics. *Annu. Rev. Genetics* , 29:305-327.

**Frankham, R. and Ralls, C. (1998).** Conservation Biology: Inbreeding leads to extinction *Nature*, 392, 441- 442.

**Galindo-Leal, C. (1993).** Estrategia general para el manejo de los parques nacionales en México:1-70. – Dirección de Araes Protegidas, SARH, México, D.F.

**Garner, K.J. and Ryder, O.A. (1992).** Some Applications of PCR to studies in wildlife genetics. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 64: 167-181.

**Gilpin, M.E. and Soulé, M.E. (1986).** Minimum Viable Populations: Processes of Species Extinction. In: Conservation Biology "The Science of Scarcity and Diversity" Edited by Michael E. Soulé. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. p.19 -33.

**Gomes, C.; Dales, G.R.B.; Oxenford, H.A. (1998).** The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyngfish, *Hirundichthys q. ?nis* in the central western Atlantic. *Molecular ecology*, 7, 1519-1527.

**Gordon, A.D.; Lattier, L.D.; Silbiger, N.R.; Torsella, J.; Wolff, O.J. and Smith, K.M. (1998).** Determination of genetic diversity and paternity in the Gray-Tailed vole (*Microtus canicaudus*) by RAPD-PCR. *Journal of mammalogy*. 79(2):604-611.

**Gray, A. J. (1997).** The genetic basis of conservation biology. In: Conservation Biology, edited by F. Spellerberg, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. p.107-121

**Hartl, D.L. and Clark A.G. (1997).** Principles of Population Genetics. Third Edition, Sinauer Associates, Inc. p. 267-313.

**Hoth, J.; Velázquez, A.; Romero, F.J.; Leon, L.; Arnada, M. and Bell, D.J. (1987).** The volcano rabbit: a shrinking distribution and a threatened habitat. *Oryx*. 21:85-91.

Hoth, J. and Granados, H. (1987). A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, Mexico City. *Int. Zoo Yb.* 26:261-265.

Huff, D.R.; Quinn, J.A.; Higgins, B. And Palazzo, A.J. (1998). Random amplified polymorphic ADN (RAPD) variation among native little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. *Molecular Ecology.* 7, 1591-1597.

Jiménez, J.A.; Hughes, K.A.; Alaks, G.; Graham, L. and Lacy, R.C. (1994). An Experimental Study of Inbreeding Depression in a Natural Habitat. *Science.* 266:271- 273.

Karp, A. And Keith, J.E. (1997). ADN marker: a global overview In: ADN markers, Protocols, Applications, and Overviews. Edited by Gustavo Caetano-Anolles and Peter M. Gresshoff, University of Tennessee. WILEY-VCH. Pp.1-13.

Keller, I F (1998). Inbreeding and its fitness effects in an population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution.* 52(1), p. 240-250

Kimberling, N.D.; Ferreira, A.R.; Shuster, S.M. and Keim, P. (1996). RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog population in the south-western USA. *Molecular Ecology.* 5:521-529.

Kostia, S.; Palo, J. And Varvio, S. (1996). ADN sequences of RAPD fragments in artiodactyls. *Genome.* 39: 456-458.

Lacy, C.R. (1992). The Effects of Inbreeding on Isolated Populations: Are Minimum Viable Population Size Predictable? In: Conservation Biology: the theory and practice of nature conservation and management (P.L. Fielder and S.K. Jain, editors), Chapman & hall, Inc. p. 279-296.

Lacy, C.R. (1997). Importance of genetic variation to the variability of Mammalian population. *Journal of Mammology*, 78(2):320-335,

Laikre, L. (1999). Hereditary Defects and Conservation Genetic Management of Captive Populations. *Zoo Biology*, 18: 81-99

Liao, L.C. and Hsiao, J.Y. (1998). Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soland. (Araceae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, 7, 1275-1281.

Lynch, M. And Milligan, G.B. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3:91-99.

Margan, S.H.; Nurthen, R.K.; Montgomery, M.E.; Woodworth, L.M.; Lowe, E.H; Briscoe, D.A. and Frankham, R. (1998). Single Large or Several Small? Population Fragmentation in the Captive Management of Endangered Species. *Zoo Biology*, 17:467-480

Margulis, S.W. and Altmann, J. (1997). Behavioural risk factors in the reproduction of inbred and outbred offield mice. *Animal Behaviour* 54: 397 – 408

Margulis, S.W. (1998). Relationships among parental inbreeding, parental behaviour and offspring viability in offield mice. *Animal Behaviour* 55: 427 – 438

Matsuzaki, T.; Kamiya, M.; Suzuki, H.; Nomura, T. Y Velázquez, A. (1996). Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. En: Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Comp. Velázquez, A. Romero, F.J. y López-Paniagua J. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. p. 51-66.

Meffe, G.K. and Carroll, C.R. (1994). Principles of Conservation Biology. Sunderland, MA: Sinauer. p. 600

Mills, S. L. and Smouse, E. P. (1994). Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *American Naturalist* 144: 412-431

Miller, M. P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA)1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author

Nagaraja, G.M. and Nagaraju, J. (1995). Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primer. *Electrophoresis*, 16: 1633 – 1638.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106(949): 283-292.

Nei, M. and Roychoudhury, K. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 76: 379-390.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.

Neveu, H.; Hafen, T.; Zimmermann, E.; Rumpler, Y. (1998). Comparison of the Genetic Diversity of Wild and Captive Groups of *Microcebus murinus* Using the Random Amplified Polymorphic ADN Method. *Folia Primatol.* 69(Suppl 1):127-135.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, Diario Oficial, Lunes 16 de Mayo de 1994, p. 2-60.

Nusser, A.J.; Goto, M.R.; Ledig, D.B.; Fleischer, R.C. and Miller, M.M.. (1996). RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. *Molecular Ecology*, 5:463-472.

O'Brien, S.J.; Roelke, M.E.; Marker, L.; Newman, A.; Winkler, C.A. Meltzer, D.; Colly, L.; Evermann, J.F.; Bush, M.; Wildt, D.E. (1985). Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*. 227:1428-1434.



**Peakall, R.; Smouse, P.E. and Huff, D.R.** (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology*, 4: 135-147.

**Primack, R.B.** (1993). "Essentials of conservation biology" Richard B. Primack Sunderland, Massachusetts: Sinauer, C. 1993. Pp 253-276.

**Rafalsky, J. A.** (1997). Randomly amplified polymorphic ADN (RAPD) analysis. In: ADN markers, Protocols, Applications, and Overviews. Edited by Gustavo Caetano-Anolles and Peter M. Gresshoff, University of Tennessee. WILEY-VCH. p.75-83.

**Ralls, K.; Brugger, K. and Ballou, J.** (1979). Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*. 206: 1101- 1103.

**Ralls, K.; Harvey, P.H. and Lyles, A.M.** (1986). Inbreeding in natural populations of birds and mammals. In: M. E. Soulé (Ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. p. 35 – 56.

**Raymond, M. and Rousset, F.** (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6):1280-1283.

**Reyes, P.A. and Llata, G.** (1988). Introduction, Adaptation and Reproduction of the Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*) at the Chapultepec Zoo '84-'88. 5<sup>th</sup> World Conference on Breeding Endangered Species in Captivity, Cincinnati, OH. p. 231-249.

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

Sauter, C.B. (1996). Conducta materna del conejo zacatuche en cautiverio. En: Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Comp. Velázquez, A. Romero, F.J. y López-Paniagua J. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. p. 67-72.

Shaffer, L.M. (1981). Minimum Populations Sizes for Species Conservation. *BioScience*, 31(2): 131- 134.

Shankaranarayanan, P., Banerjee, M., Kacker, R.K., Aggarwal, R.K. and Singh, L. (1997). Genetic variation in Asiatic lions and Indian tigers. *Electrophoresis*, 18: 1693 – 1700.

Stenlid, J. And Vasiliauskas, R. (1998). Genetic diversity within and among vegetative compatibility groups of *Stereum sanguinolentum* determined by arbitrary primed PCR. *Molecular Ecology*, 7, 1265-1274.

Stewart, A.J. and Hutchings, M. J. (1997). Conservation of populations. In: Conservation Biology, edited by F. Spellerberg, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. p.123-140.

Thornback, J. and Jenkins, M. (1984). The IUCN mammal red data book Part 1. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland, p. 516.

Velázquez, A. (1994). Distribution and population size of *Romerolagus diazi* on the pelado volcano, Mexico. *Journal of Mammology*, 75(3): 743-749.

Velázquez, A. Cervantes, F.A. and Galindo-Leal, C. (1993). The volcano Rabbit *Romerolagus diazi*, a peculiar lagomorph. *Lutra*. 36: 62 – 70.

Velázquez, A. (1993). Man-made and ecological habitat fragmentation: study case of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*). *Z. Säugetierkunde*. 58:54 – 61.

Velázquez, A.; Romero, F.J. y León L. (1996). Fragmentación del hábitat del conejo zacatuche. En: Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Comp. Velázquez, A. Romero, F.J. y López-Paniagua J. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. p. 73-86.

Villa, R. B. (1978). Especies mexicanas de vertebrados silvestres raras ó en peligro de extinción. *Anales del Instituto de Biología UNAM*. México 49, Serie Zoología, 1:303-320.

Welsh, J.;McClelland, M. (1990). Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 7213-7418.

**Wildt, D.E.; Bush, M.; Goodrowe, K.L.; Packer, C.; Pusey, A.E.; Brown, J.L.; Joslin, P. And O'Brien, S.J. (1987).** Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*. 329 p.328-331.

**Williams, K.G.J.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.. (1990).** ADN polymorphisms amplified by primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.

**Williams, K.G.J.; Hanafey, M.K.; Rafalsky, J.A. and Tingey, S.V. (1993).** Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic ADN Markers. *Methods in enzymology*, 128, p. 705-740.

**Worley, D. (1997).** *Ex situ* Conservation. In: Conservation Biology, edited by F. Spellerberg, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. p. 186-202.

**Wright, S. (1951).** The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*. 15:323-354